

JUNIO 2018

VOLUMEN 53 (2)

Boletín de la
Sociedad Argentina de
BOTÁNICA



S Δ B

IKIVVWNNVVI
SOCIEDAD ARGENTINA DE BOTÁNICA

ISSN 0373-580X Córdoba, Argentina



BOLETÍN DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BOTÁNICA

Es el órgano de difusión de la Sociedad Argentina de Botánica encargado de editar trabajos científicos originales, revisiones y reseñas en todas las ramas de la biología vegetal y de los hongos. Se edita un volumen anual con dos entregas semestrales. Los trabajos son sometidos a un sistema de arbitraje antes de ser aceptados. Las instrucciones a los autores pueden consultarse en las siguientes páginas en Internet. Authors instructions can be consulted on the following web pages:

<http://www.botanicaargentina.com.ar/> <http://revistas.unc.edu.ar/index.php/BSAB>

El Boletín está incorporado al Núcleo Básico de revistas científicas argentinas y Scielo (Scientific Electronic Library On Line) y es citado en Science Citation Index Expanded, Current Contents (Agriculture, Biology & Environmental Sciences), Scopus, AGRICOLA, Index to American Botanical literature, Periódica, Latindex, Excerpta Botanica, The Kew Record of Taxonomic Literature, CAB (Center for Agriculture and Bioscience International), Biosis Previews, Biological Abstracts.

Directores

GABRIEL BERNARDELLO (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Córdoba), boletinsab@gmail.com

ANA MARÍA GONZALEZ (Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes)

Editores Asociados

LUZ ALLENDE (Universidad Nacional de Gral. Sarmiento, Los Polvorines) **Ficología**

ANA CALVIÑO (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Córdoba) **Biología Reproductiva**

CAROLINA I. CALVIÑO (Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Río Negro) **Plantas Vasculares**

FRANCO E. CHIARINI (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Córdoba) **Plantas Vasculares**

MASSIMILIANO DEMATTEIS (Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes) **Plantas Vasculares**

GEORGINA M. DEL FUEYO (Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, CABA) **Paleobotánica**

GUILLERMO FUNES (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Córdoba) **Ecología**

ANA MARÍA GONZALEZ (Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes) **Morfología, Anatomía**

DIEGO GUTIÉRREZ (Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, CABA) **Plantas Vasculares**

NORMA I. HILGERT (Instituto de Biología Subtropical, Puerto Iguazú) **Etnobotánica**

LEOPOLDO IANONNE (Universidad de Buenos Aires) **Micología**

GONZALO J. MARQUEZ (Universidad Nacional de La Plata) **Palinología**

OLGA G. MARTINEZ (Universidad Nacional de Salta) **Plantas Vasculares**

FEDERICO MOLLARD (Universidad de Buenos Aires) **Fisiología**

EUGENIA A. SAR (Universidad Nacional de La Plata) **Ficología**

VIVIANA SOLIS NEFFA (Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes) **Genética, Evolución**

GUILLERMO SUAREZ (Instituto Miguel Lillo, Tucumán) **Briología**

OMAR VARELA (Universidad Nacional de Chilecito, La Rioja) **Ecología**

M. VICTORIA VIGNALE (Universidad de Buenos Aires) **Micología**

PAULA ZUNINO (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Córdoba) **Fitoquímica**

Asesores Editoriales

MARCELO AIZEN - **Biología Reproductiva** (Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Río Negro)

PASTOR ARENAS - **Etnobotánica** (Cefybo, Universidad de Buenos Aires)

MARCELO CABIDO - **Ecología** (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Córdoba)

LEZILDA CARVALHO TORGAN - **Ficología** (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil)

CECILIA EZCURRA - **Plantas Vasculares** (Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Río Negro)

PABLO GOLOBOFF - **Sistemática Filogenética** (Fundación Miguel Lillo, Tucumán)

NANUZALUIZA DE MENEZES - **Anatomía** (Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil)

MARTAMORBELLI - **Paleobotánica, Palinología** (Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires)

DENISE PINHEIRO DA COSTA - **Briología** (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil)

LIDIA POGGIO - **Genética, Evolución** (Universidad de Buenos Aires)

JEFFERSON PRADO - **Plantas Vasculares** (Instituto de Botánica, San Pablo, Brasil)

MARIO RAJCHENBERG - **Micología** (Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico, Esquel, Chubut)

FERNANDO ZULOAGA - **Plantas Vasculares** (Instituto de Botánica Darwinion, San Isidro, Buenos Aires)

El Boletín es propiedad de la Sociedad Argentina de Botánica. Domicilio legal: Av. Angel Gallardo 470 CABA

© Sociedad Argentina de Botánica. Córdoba, 2018.

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Avda. Vélez Sarsfield 299, 5000 Córdoba, Argentina. Tel.: 0351 – 433 2104

Queda hecho el depósito que establece la ley 11.723

Inscrito en el Registro de la Propiedad Intelectual N° en trámite

Fecha de Distribución: 29 de junio de 2018.

ÍNDICE

MICOLOGÍA - MYCOLOGY

- IVANA F. DELLA MÓNICA, ALICIA M. GODEAS y JOSÉ M. SCERVINO - Interacciones microbianas: Efecto de hongos biocontroladores y solubilizadores de fósforo en los estadios pre-simbióticos de hongos micorrízico arbusculares. ... 153-160
Microbial interactions: effect of biocontrol and P solubilizing fungi in pre-symbiotic stages of arbuscular mycorrhizal fungi.
- SILVIA E. NAVARRO RAMOS, DANIEL RENISON y ALEJANDRA G. BECERRA - La inoculación con hongos micorrízico arbusculares promueve el crecimiento de plantines de *Kageneckia lanceolata* (Rosaceae). 161-167
Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi promotes the growth of *Kageneckia lanceolata* (Rosaceae) seedlings.
- CAROLINA ROTHEN, VICTORIA MIRANDA, SEBASTIÁN FRACCHIA, ALICIA GODEAS and ALEJANDRA RODRÍGUEZ - *Microdochium bolleyi* (Ascomycota: Xylariales): Physiological characterization and structural features of its association with wheat. 169-182
Microdochium bolleyi (Ascomycota: Xylariales): Caracterización fisiológica y caracteres estructurales de su asociación con trigo.

FICOLOGÍA - PHYCOLOGY

- GABRIELA MATALONI, LUCIANA BURDMAN, VALERIA CASA, DANIELA GONZALEZ and MARÍA CLARA MASETTI - Hydrology-driven seasonal changes in the phytoplankton of a subtropical river (Riacho Formosa, Argentina). 183-193
Cambios estacionales dependientes de la hidrología en el fitoplancton de un río subtropical (Riacho Formosa, Argentina).
- ANDREA S. LAVIGNE, INÉS SUNESEN and EUGENIA A. SAR - First record of *Thalassiosira catharinensis* (Bacillariophyta) from argentinean marine coastal waters. 195-200
Primer registro de *Thalassiosira catharinensis* (Bacillariophyta) en aguas costeras marinas argentinas.

BRIOLOGÍA - BRYOLOGY

- AGUSTINA C. COTTET, JOSE M. SCERVINO y MARÍA I. MESSUTI - An improved staining protocol for the assessment of arbuscular mycorrhizal in bryophytes. 201-206
Un protocolo de tinción mejorado para la visualización de micorrizas arbusculares en briofitas.

FISIOLOGÍA - PHYSIOLOGY

- PEYMAN ASHKAVAND, MEHRDAD ZARAFSHAR, MASOUD TABARI, JAVAD MIRZAI, AMIRREZA NIKPOUR, SEYED KAZEM BORDBAR, DANIEL STRUVE and GUSTAVO GABRIEL STRIKER - Application of SiO₂ nanoparticles as pretreatment alleviates the impact of drought on the physiological performance of *Prunus mahaleb* (Rosaceae). 207-219
La aplicación de nanopartículas de SiO₂ como pretratamiento disminuye el impacto de la sequía en la performance fisiológica de *Prunus mahaleb* (Rosaceae).

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA - REPRODUCTIVE BIOLOGY

- MARÍA DEL PILAR SEPÚLVEDA-NIETO, ÁNGELA MARÍA MORALES-TRUJILLO y LILIANA KATINAS - Viviparidad en *Goepertia inocephala* (Marantaceae). 221-225
Vivipary in *Goepertia inocephala* (Marantaceae).

PALEOBOTÁNICA Y PALINOLOGÍA - PALEOBOTANY AND PALYNOLOGY

- MARIANA FERNÁNDEZ HONAIN, MARA DE RITO y MARGARITA OSTERRIETH - Análisis de los silicofitolitos presentes en especies de las familias Cannabaceae, Moraceae y Urticaceae del SE bonaerense y estudio comparativo de los cistolitos. 227-237
Silicophytolith analyses in species of Cannabaceae, Moraceae and Urticaceae from SE Buenos Aires province and a comparative study of their cystoliths.
- LETICIA TEJERA, ÁNGELES BERI and XIMENA MARTÍNEZ BLANCO - General characteristics of airborne pollen in Montevideo city, Uruguay. 239-253
Características generales del polen aéreo en Montevideo, Uruguay.

GENÉTICA Y EVOLUCIÓN - GENETICS AND EVOLUTION

- MARTA CAROLINA BREM, JUAN PABLO COULLERI, CAROLA REGINA VOLPONI y MARÍA SILVIA FERRUCCI - Tamaño del genoma, características cariotípicas y tamaño del polen en especies argentinas de *Spergula* (Caryophyllaceae). 255-266
Genome size, karyotypic features and pollen size in Argentinian species of *Spergula* (Caryophyllaceae).
- ERCILIA M. SARA MORENO, NOELIA E. A. ALMIRÓN, M. CAROLINA PEICHOTO y VIVIANA G. SOLÍS NEFFA - Variabilidad genética en poblaciones de *Elionurus muticus* (Poaceae) de Corrientes, Argentina, a partir de marcadores moleculares de ADN nuclear y cloroplástico. 267-278
Genetic variability in populations of *Elionurus muticus* (Poaceae) from Corrientes, Argentina, based on molecular markers of nuclear and chloroplastic DNA.

ECOLOGÍA Y FITO GEOGRAFÍA - ECOLOGY AND PHYTOGEOGRAPHY

- JONATHAN URRUTIA-ESTRADA, ANDRÉS FUENTES-RAMÍREZ, FRANCISCO CORREA-ARANEDA y ENRIQUE HAUENSTEIN - Impactos de la fragmentación sobre la composición florística en bosques pantanosos del centro-sur de Chile. ... 279-294
Impacts of fragmentation on floristic composition of swamp forests in south-central Chile.

SISTEMÁTICA DE PLANTAS VASCULARES - SYSTEMATICS OF VASCULAR PLANTS

- EVANGELINA C. LOZANO y MARÍA A. ZAPATER - Delimitación taxonómica de *Ceiba chodatii* y *C. speciosa* (Malvaceae, Bombacoideae) en diferentes estadios fenológicos. 295-306
Taxonomic delimitation of *Ceiba chodatii* and *C. speciosa* (Malvaceae, Bombacoideae) in different phenological stages.
- MARCELO P. HERNÁNDEZ, SUSANA E. FREIRE y DANIEL A. GIULIANO - *Senecio farinifer* y *S. madariagae* (Asteraceae, Senecioneae), nuevos registros para la flora argentina. 307-312
Senecio farinifer and *Senecio madariagae* (Asteraceae-Senecioneae), new records for Argentine flora.
- JAVIER SANTA CRUZ and SEBASTIÁN CORDERO - First record of *Araujia sericifera* (Apocynaceae: Asclepiadoideae) for Chile, a new alien climbing species from South America. 313-317
Primer registro de *Araujia sericifera* (Apocynaceae: Asclepiadoideae) para Chile, una nueva especie exótica trepadora de América del Sur.

ETNOBOTÁNICA - ETHNOBOTANY

- MARCO FLAMINI, MARÍA EUGENIA SUÁREZ y GERARDO ROBLEDO - Hongos útiles y tóxicos según los yuyeros de La Paz y Loma Bola (Valle de Traslasierra, Córdoba, Argentina). 319-338
Useful and toxic fungi according to the yuyeros of La Paz and Loma Bola (Valle de Traslasierra, Córdoba, Argentina).

- OBITUARIO - OBITUARY 339-343

INTERACCIONES MICROBIANAS: EFECTO DE HONGOS BIOCONTROLADORES Y SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO EN LOS ESTADIOS PRE-SIMBIÓTICOS DE HONGOS MICORRÍFICO ARBUSCULARES

IVANA F. DELLA MÓNICA¹, ALICIA M. GODEAS² y JOSÉ M. SCERVINO³

Summary: Microbial interactions: effect of biocontrol and P solubilizing fungi in pre-symbiotic stages of arbuscular mycorrhizal fungi. Phosphorus (P) is an essential macronutrient with a low bioavailability in soils, thus limiting the plant growth. The use of P solubilizing fungi (HS) is a promising alternative to increase the efficiency of P-fertilizers. However, it is not fully understood if HS have antagonist effects on beneficial soil microbiota, such as arbuscular mycorrhizal fungi (HMA). This work studies the effect of HS with biocontrol abilities against phytopathogenic fungi on the pre-infective stages development of HMA, the first step in mycorrhizal root colonization. Spores of the HMA *Gigaspora rosea* were exposed *in vitro* to different exudate concentrations (0; 0,01; 0,1; 1; 3%) of different HS fungal strains (*Talaromyces helicus* strain L7B, *T. helicus* strain N24, *T. diversus* and *Penicillium purpurogenum*) in a system containing semi-liquid medium. Spores germination, elongation, ramification and morphology of the pre-infective mycelium of HMA were evaluated. We observed that only *T. diversus* increased germination while *T. helicus* L7B promoted the elongation, ramification and produced changes in the mycelial morphology without affecting spores' germination. These results showed that germination and pre-infective development of *G. rosea* can be modified in length and ramification as a function of the identity of the HS strain used, suggesting that microbial interactions can positively impact on plant P nutrition through the modification of the previous stage to mycorrhizal symbiosis.

Key words: Arbuscular mycorrhiza, *Gigaspora*, microbial interactions, P solubilizing fungi, pre-infective, Symbiosis, *Talaromyces*.

Resumen: El fósforo (P) es un macronutriente poco biodisponible para las plantas y por lo tanto, limitante para su crecimiento. El uso de hongos solubilizadores de P (HS) es una alternativa prometedora en el aprovechamiento de la fertilización fosforada. Sin embargo, aún no se ha establecido si los HS tienen efectos sobre la microbiota benéfica del suelo, como los hongos micorrízico-arbusculares (HMA). Este trabajo estudia el efecto de HS con capacidad biocontroladora de fitopatógenos fúngicos sobre el desarrollo micorrízico pre-infectivo de HMA, el primer paso en la colonización de la raíz, de los HMA. Se expusieron esporas del HMA *Gigaspora rosea* a distintas concentraciones de exudados (0; 0,01; 0,1; 1; 3%) de distintos HS: *Talaromyces helicus* cepa L7B, *T. helicus* cepa N24, *T. diversus* y *Penicillium purpurogenum*, en un sistema *in vitro* con medio semilíquido. Se evaluó la germinación de las esporas y la elongación, ramificación y morfología del micelio pre-infectivo. Se observó que solo *T. diversus* incrementó la germinación y que *T. helicus* L7B promovió la elongación, ramificación y modificó la morfología del micelio pre-infectivo del HMA sin afectar la germinación. Estos resultados demuestran que el desarrollo pre-infectivo de *G. rosea* (germinación, elongación, ramificación y morfología) puede ser modulado en función de la cepa de HS estudiada, sugiriendo que las interacciones microbianas podrían impactar positivamente sobre la nutrición fosforada vegetal mediante la modificación del estadio previo a la simbiosis micorrízica.

Palabras clave: *Gigaspora*, hongos solubilizadores de fósforo, interacciones microbianas, micorrizas arbusculares, pre-infectivo, simbiosis, *Talaromyces*.

¹ Instituto de Micología y Botánica (INMIBO-CONICET) - Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 4° Piso, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, laboratorio 69. Buenos Aires, Argentina. e-mail: ivanadm@bg.fcen.uba.ar, ifdellamonica@gmail.com.

² Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA-CONICET) - Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 4° Piso, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, laboratorio 12. Buenos Aires, Argentina.

³ Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA-CONICET) - Universidad Nacional de Comahue, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

INTRODUCCIÓN

El incremento de la demanda de alimentos a nivel global presenta desafíos a la hora de implementar técnicas productivas, sustentables y amigables con el medio ambiente. El fósforo (P) es un nutriente esencial limitante en el crecimiento y rendimiento de los cultivos. La utilización de bioinoculantes como los hongos solubilizadores de fósforo (HS) para incrementar la disponibilidad de P para las plantas y su productividad es una herramienta prometedora siendo hasta ahora poco utilizada (Osorno & Osorio, 2014). Los bioinoculantes en base a estos microorganismos deben aportar un beneficio para los cultivos, sin generar efectos adversos sobre el ecosistema en el cual se aplica, particularmente a la microbiota benéfica asociada a las raíces de las plantas. Los hongos micorrízico arbusculares (HMA), son microorganismos simbioses radicales presentes en el suelo que, además de tener un importante rol en el transporte del P soluble desde el suelo hacia las plantas, les confieren múltiples beneficios frente a situaciones de estrés como resistencia a sequía, salinidad, metales pesados, entre otros (Nadeem *et al.*, 2014).

En la rizósfera, cohabitan una amplia diversidad de microorganismos entre los que se encuentran los HS y los HMA (Khan *et al.*, 2010). Los HS incrementan la disponibilidad del P en la solución del suelo, permitiendo que las plantas lo incorporen. Por su parte, los HMA absorben el P soluble del suelo en zonas lejanas a las raíces y lo transfieren hacia las plantas por medio de estructuras intracelulares altamente especializadas para el intercambio de nutrientes (Brundrett, 2004). Numerosos estudios muestran que la aplicación de microorganismos benéficos como HS y/o HMA logran mejorar el crecimiento y productividad de diversos cultivos (Hu *et al.*, 2009; Della Mónica *et al.*, 2014). La aplicación combinada de bacterias solubilizadoras de P y HMA en ensayos de invernadero está documentada en varios hospedantes, con resultados positivos (Boostani *et al.*, 2014; Nadeem *et al.*, 2014). Asimismo, otros trabajos muestran sinergismo entre HS y HMA en plantas (Şahin *et al.*, 2004; Khan, 2007). Sin embargo, el conocimiento del efecto que los HS tienen sobre los HMA es escaso, siendo necesario realizar estudios más profundos acerca de las interacciones entre los microorganismos del suelo para poder elegir combinaciones que favorezcan el

desarrollo y crecimiento de las plantas.

El establecimiento de la simbiosis micorrízica puede estar influenciada por distintas vías a través de las poblaciones de microorganismos del suelo (Johansson *et al.*, 2004; Scervino *et al.*, 2009; Della Mónica *et al.*, 2015). La etapa de crecimiento pre-simbiótico en los HMA, al igual que la germinación, puede ser influenciada por distintos factores y es crucial para el establecimiento de la colonización micorrízica (Akiyama & Hayashi, 2006; Scervino *et al.*, 2007). La presencia de exudados radicales solubles y volátiles, especialmente flavonoides y estrigolactonas, puede llegar a incrementar 8 veces la producción de micelio en esta etapa (Peters & Verma, 1990; Scervino *et al.*, 2007). Asimismo, sustancias secretadas por microorganismos también pueden modular el desarrollo hifal pre-infectivo (Fracchia *et al.*, 2004; Scervino *et al.*, 2009; Della Mónica *et al.* 2014). Dado que los HS producen sustancias que podrían promover o inhibir el crecimiento de los HMA (Della Mónica, 2014), es importante evaluar el impacto de la aplicación de HS sobre los HMA.

En este trabajo se estudia el efecto *in vitro* de hongos con capacidad biocontroladora de fitopatógenos fúngicos y solubilizadora de P sobre el hongo micorrízico arbuscular *Gigaspora rosea* con relación a su desarrollo pre-simbiótico, evaluando la germinación de esporas, y el desarrollo del micelio en función a su elongación, ramificación y morfología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de los experimentos se utilizaron esporas del HMA *Gigaspora rosea* Nicolson & Schenck (BEG9) y cuatro cepas de HS caracterizadas previamente respecto de la capacidad y eficiencia de solubilización de P y biocontrol (Rodríguez, 2004; Scervino *et al.*, 2010; Della Mónica, 2014; Della Mónica *et al.*, 2018): *T. helicus* cepa N24 (BAFC 3126), *T. helicus* cepa L7B (BAFC 3127), *T. diversus* (BAFC 3128) y *Penicillium purpurogenum* (BAFC 3303). Se realizó un diseño factorial completo de 4 (HS) x 5 (concentraciones de exudados), con 5 réplicas por tratamiento. Cada parámetro medido (germinación, longitud hifal, número de ápices y morfología del micelio) fue comparado con tratamientos control realizados con medio de cultivo sin exudados

(concentración 0%). Se analizaron los datos realizando un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (Concentraciones de exudados y HS), luego de la verificación del cumplimiento de los supuestos. Cuando el ANOVA arrojó diferencias significativas ($p \leq 0,05$), se analizaron los contrastes con la prueba de Tukey HSD.

Las esporas de *G. rosea* fueron obtenidas de plantas de trigo cultivadas en maceta durante 6 meses en sustrato inoculado con *G. rosea* bajo condiciones de 16/8 hs de luz/oscuridad, 25/18°C día/noche. Mediante el método de tamizado húmedo se recolectaron esporas sanas y morfológicamente homogéneas, y se colocaron sobre un papel de filtro humedecido, conservándose para la esterilización superficial mediante el protocolo de Mosse (1962). Las esporas superficialmente esterilizadas se utilizaron inmediatamente para los ensayos.

Los exudados de HS fueron obtenidos siguiendo el método descrito por Fracchia *et al.* (2004). Luego de 10 días de crecimiento a 25°C con agitación a 125 rpm, los cultivos líquidos fueron centrifugados (3000 g, 1 min), filtrados (0,22 μm) y los sobrenadantes conservados a -20°C hasta su uso.

Se utilizaron cajas de Petri de 50 mm de diámetro con 10 ml de medio Gel-GRO semilíquido (ICN Biochemicals, Aurora, Ohio, USA. Gel Gro 4%, buffer MES 0,195% pH 7). Este medio semilíquido permite el contacto de toda la espora con los exudados de los hongos (Fracchia *et al.*, 2001). El medio fue suplementado con distintos volúmenes de exudado de HS para obtener distintas concentraciones finales (0%; 0,1%; 0,5%; 1% y 3%). En cada caja se colocaron diez esporas superficialmente esterilizadas y se incubaron en oscuridad, a 25°C, durante dos semanas. Se calculó el porcentaje de germinación (% esporas germinadas/esporas totales) en cada tratamiento. En las esporas germinadas se midió la longitud hifal y el número de ápices hifales, promediando los resultados de los parámetros para cada tratamiento. El micelio se cuantificó bajo lupa por el método de la intersección (Brundrett, 1991), previa tinción con azul Tripán 0,05% en ácido láctico (Phillips & Hayman, 1970). La morfología del micelio fue calculada como la proporción entre la longitud hifal y el número de ápices presentes en cada espora germinada (Moore, 2002; Della Mónica *et al.*, 2014).

RESULTADOS

La germinación de esporas de *G. rosea* se vio afectada por los exudados de algunas de las cepas de HS ($F=10,95$; $p<0.0001$) independientemente de su concentración ($F=0,02$; $p=0,99$). La interacción entre los factores estudiados no fue significativa ($F=1,16$; $p=0,33$). Particularmente, los exudados de *T. diversus* incrementaron entre un 70% y 100% la germinación respecto a los de *T. helicus* N24, *P. purpurogenum*, *T. helicus* L7B y al control (Fig. 1A).

Independientemente de la concentración de exudado utilizada (ausencia de interacción entre los factores, $F=0,82$; $p=0,63$), el crecimiento de las hifas de las esporas germinadas (longitud hifal) fue modificado por el factor cepa de HS ($F=20,57$; $p<0.0001$). En este caso, el agregado de exudados de *T. helicus* L7B triplicó la longitud hifal respecto al control y las demás cepas fúngicas (Fig. 1B). Por otro lado, la concentración de exudados no modificó la longitud hifal ($F=2,13$; $p=0,1$).

Al analizar el número de ápices del micelio de esporas germinadas, si bien no hubo interacción entre los factores ($F=1,478$; $p=0,1516$), se encontró que con exudados de *T. helicus* L7B se duplicó el valor obtenido con respecto al control y fue significativamente mayor al número obtenido con los exudados de las otras cepas (Fig. 1C; $F=13,73$; $p<0.0001$). El factor concentración de exudados no produjo diferencias significativas para este parámetro ($F=0,42$; $p=0,74$).

La morfología del micelio pre-infectivo de *G. rosea* (longitud hifal por unidad de ápice) no se vio afectada por la interacción entre los factores concentración de exudados y cepa de HS ($F=1,5587$; $p=0,1229$). Al estudiar los efectos principales de los factores por separado se observó que, independientemente de la concentración, la morfología del micelio varía según la cepa de HS ($F=14,34$; $p<0.0001$). Los exudados de *T. helicus* L7B incrementaron un 66% la longitud hifal por ápice respecto del control (Fig. 2A). Por otro lado, la morfología también fue afectada por el factor concentración de exudados ($F=6,14$; $p<0.0001$). Se observó que la morfología del micelio de la espora germinada varía en función de las concentraciones: con 0,5% se obtienen los valores significativamente más altos, seguido por las concentraciones 0,1%, 1% y 3%, en orden decreciente (Fig. 2B).

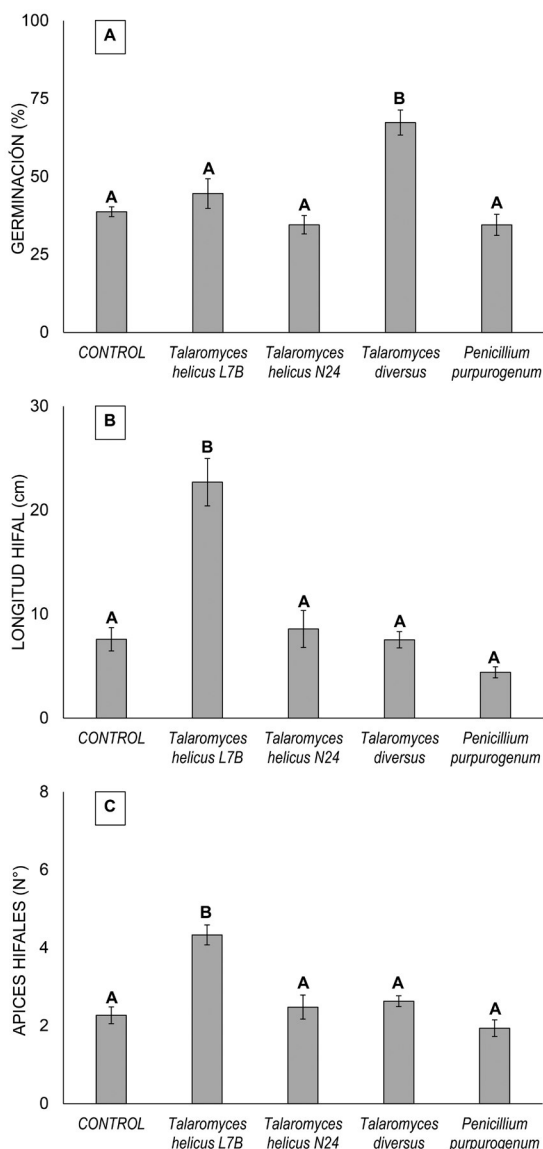


Fig. 1. Desarrollo pre-simbiótico de esporas del hongo micorrízico arbuscular *Gigaspora rosea* en presencia de exudados de cuatro cepas (*Talaromyces helicus* cepa L7B, *T. helicus* cepa N24, *Talaromyces diversus* y *Penicillium purpurogenum*) de hongos solubilizadores de P y biocontroladores de fitopatógenos fúngicos. **A:** Porcentaje de germinación de esporas. **B:** Longitud del micelio medida en centímetros. **C:** Número de ápices hifales presentes en el micelio. Las barras verticales denotan los errores estándar. Distintas letras muestran diferencias estadísticamente significativas según Tukey HSD ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Estudios previos mostraron la importancia del estudio de las interacciones que involucran a los hongos saprobios del suelo y los HMA (Fracchia *et al.*, 2004; Scervino *et al.*, 2008; Scervino *et al.*, 2009; Della Mónica *et al.*, 2014, 2015). Estos microorganismos del suelo pueden influenciar en forma drástica la formación y desarrollo de la simbiosis de HMA, modificando así el efecto sobre el desarrollo de las plantas.

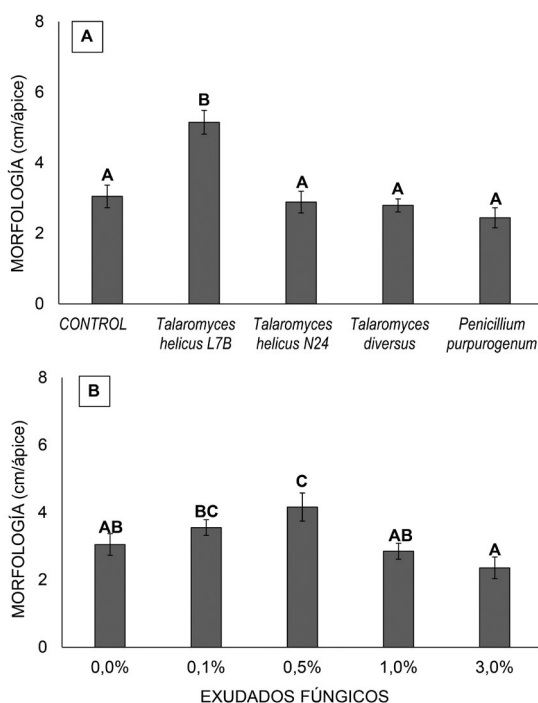


Fig. 2. Efecto de los factores principales (Cepa de hongo solubilizador de P × Concentración de exudados) sobre la Morfología del micelio micorrízico de esporas de *Gigaspora rosea* germinadas, calculado como centímetros de longitud de micelio por unidad de ápice. **A:** Factor Cepa Fúngica (*Talaromyces helicus* cepa L7B, *T. helicus* cepa N24, *Talaromyces diversus* y *Penicillium purpurogenum*). **B:** Factor Concentración de Exudados (0%; 0,1%; 0,5%; 1% y 3%). Las barras verticales denotan los errores estándar. Distintas letras muestran diferencias estadísticamente significativas según Tukey HSD ($p < 0,05$).

La germinación de esporas de HMA puede verse afectada por diversos factores como pH, tipo de sustrato, disponibilidad de nutrientes, temperatura, y diversas sustancias como flavonoides, estrigolactonas y/o exudados volátiles y solubles provenientes de plantas y microorganismos (Giovannetti, 2000; Akiyama *et al.*, 2005; Steinkellner *et al.*, 2007). Estudios previos han evaluado el efecto de distintas especies de hongos del suelo sobre la germinación de especies de HMA (*Glomus mosseae*, *Rhizophagus irregularis*, *Gigaspora margarita*) obteniendo resultados variables (Fracchia *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2004). Fracchia *et al.* (1998) mostró que *Wardomyces inflatus* incrementó la germinación y desarrollo de *G. mosseae*, mientras que *Gliocladium roseum*, *Trichoderma pseudokoningii* y *Trichoderma harzianum* no afectaron estos parámetros. Martínez *et al.* (2004) mostraron que distintas cepas de *T. pseudokoningii* inhibieron o tuvieron efectos neutros sobre la germinación de *G. mosseae* y *G. rosea*. Otros trabajos han estudiado el efecto de hongos endófitos de vástago, *Epichloë*, sobre el desarrollo pre-infectivo de HMA observando efectos positivos o neutros sobre la germinación de esporas, la elongación y ramificación del micelio de *G. rosea* y *G. margarita*, dependiendo de la cepa de *Epichloë* estudiada (Novas *et al.*, 2011; Vignale *et al.*, 2017). Es importante destacar que estos hongos foliares poseen transmisión vertical, por lo que su colonización es previa a la micorrícica y también pueden modular el patrón de exudación radical, a diferencia de los HS estudiados en este trabajo que no son endófitos y simplemente habitan en la rizósfera y el rizoplano. Si bien se han estudiado los efectos de distintas especies de microorganismos, el estudio de la influencia de HS con capacidad biocontroladora de fitopatógenos fúngicos sobre HMA es incipiente. *Talaromyces flavus* es una cepa fúngica con capacidad biocontroladora de hongos fitopatógenos (Madi *et al.*, 1997; Tjamos & Fravel, 1997) y que recientemente se caracterizó como solubilizadora y mineralizadora de P (Della Mónica *et al.*, 2018). Esta cepa incrementó el crecimiento pre-infectivo y la eficiencia micorrícica en plantas de trigo (Della Mónica *et al.*, 2014). Estudios realizados con hongos endófitos septados oscuros, capaces de mineralizar y solubilizar distintas fuentes de P, mostraron que *Phaeomollisia piceae* interactúa con *G. rosea* incrementando la toma de

P del suelo en trébol (Della Mónica *et al.*, 2015). Nuestros resultados muestran que los exudados de *T. diversus*, incrementan significativamente la germinación de las esporas de *G. rosea*, mientras que los exudados de *T. helicus* N24, *T. helicus* L7B y *P. purpurogenum* no tienen un efecto neto sobre este parámetro. Esto indica una clara dependencia de la especie de HS involucrada en la interacción. Esta dependencia podría deberse a que cada especie libera compuestos de diferente naturaleza química al medio y que la germinación de las esporas de HMA puede ser afectada por los mismos.

Los experimentos realizados en este trabajo muestran que los diferentes HS por medio de sus exudados modifican parámetros pre-infectivos como la longitud hifal de las esporas germinadas de *G. rosea* y el número de ramificaciones hifales que desarrollan. Puntualmente, los exudados de *T. helicus* L7B, aproximadamente triplicaron el desarrollo hifal y duplicaron el nivel de ramificación con respecto al control, sugiriendo que esta especie de HS produce sustancias solubles que favorecen el desarrollo pre-infectivo del HMA. Sin embargo, la naturaleza de los compuestos involucrados en la modulación del desarrollo micorrícico pre- y post- simbiótico por parte de los microorganismos que cohabitan en la rizósfera es poco conocida. Estudios previos mostraron que ciertos organismos saprótrofos como algunas levaduras en la fase de metabolismo secundario produjeron aumentos sobre el desarrollo hifal y la ramificación del micelio del HMA (Fracchia *et al.*, 2004; Scervino *et al.*, 2008). Es interesante notar que los metabolitos producidos por las distintas especies de hongos no siempre actúan de la misma forma en el desarrollo pre-infectivo de las micorrizas. Un claro ejemplo es *T. helicus* L7B el cual, si bien no modificó la germinación de las esporas, incrementó los parámetros de elongación y ramificación hifal, modificando aún la morfología del micelio; mientras que la cepa *T. diversus* incrementó la germinación, pero no afectó otros parámetros de desarrollo de HMA. El aumento en el crecimiento del micelio pre-infectivo y/o en el número de ápices hifales, podría traducirse en una mayor infección sobre las raíces de las plantas (debido al incremento de la posibilidad de contacto entre una mayor cantidad de ápices de HMA y las raíces), e influir positivamente en el transporte de nutrientes. De hecho, Della

Mónica *et al.* (2014) mostraron que los exudados producidos por *T. flavus* incrementaron parámetros en el desarrollo del micelio pre-infectivo de *G. rosea* y este incremento se tradujo en una mayor colonización micorrícica e incorporación de P en plantas de trigo, sugiriendo que esto también podría ocurrir con otras especies del género *Talaromyces*. Es interesante notar que las especies estudiadas de *Talaromyces* fueron caracterizadas previamente como hongos biocontroladores de patógenos vegetales (Madi *et al.*, 1997; Tjamos & Fravel, 1997; Rodríguez, 2004), lo que podría producir mayores beneficios en su aplicación sobre cultivos en situaciones de estrés biótico, aunque se deben realizar más estudios para comprobar esta afirmación.

El agregado de exudados de *T. helicus* L7B modificó la morfología del micelio incrementando en un 66% la elongación por unidad de ápice hifal con respecto al control. Por otro lado, concentraciones de exudados superiores al 1% produjeron menor elongación hifal por ápice que concentraciones menores. Estudios previos realizados con *G. rosea* mostraron que compuestos secretados por las raíces (strigolactonas) estimulan el desarrollo pre-infectivo e inducen cambios en las esporas germinadas, incrementando el número de ramificaciones hifales (Besserer *et al.*, 2006). También se ha mostrado que la morfología del micelio se ve afectada por exudados radicales, incrementando la ramificación de las esporas germinadas hacia una estructura en forma de abanico (del inglés “fan-like structure”) (Juge *et al.*, 2009). Por el contrario, una mayor elongación por ápice muestra una mejor capacidad para la exploración del sustrato por parte de la micorriza. Todos estos estudios sumados a los nuestros sugieren que la presencia de estas sustancias en las cercanías de la espora germinada actúa como sensor de la proximidad de las raíces a ser colonizadas. Posiblemente las cepas de HS estudiadas secreten sustancias análogas a las segregadas por las raíces y que desencadenen un cambio en la morfología de HMA maximizando la colonización radical y exploración del sustrato.

El desarrollo pre-infectivo de HMA mostró una amplia gama de respuestas para los parámetros estudiados, desde efectos neutros (*T. helicus* N24), hasta estimulación (*T. helicus* L7B) dependiendo de la cepa fúngica analizada. Esto demuestra

que los exudados de hongos solubilizadores y biocontroladores estudiados presentan sustancias que son capaces de actuar como moduladores del desarrollo pre-infectivo de los HMA dependiendo de la variabilidad intraespecífica de las cepas. En conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis que los efectos sobre el desarrollo hifal pre-infectivo de los HMA dependen de la naturaleza y concentración de los exudados de los hongos solubilizadores y biocontroladores (Della Mónica, 2014).

El estudio de las interacciones microbianas tiene un alto impacto en el desarrollo y aplicación de tecnologías que mejoren la producción de cultivos. Es importante destacar que los hongos estudiados además de ser biocontroladores de patógenos, son solubilizadores de P, por lo que estos resultados demuestran que la relación existente entre los facilitadores y los transportadores de P es previa al establecimiento de la simbiosis micorrícica. Asimismo, esta interacción microbiana podría influir en la nutrición fosforada de las plantas mediante el incremento de la disponibilidad de P soluble por los HS y la modulación del desarrollo pre-infectivo de los HMA.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por el apoyo financiero brindado.

BIBLIOGRAFÍA

- AKIYAMA, K. & H. HAYASHI. 2006. Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann. Bot.* 97: 925-931.
- AKIYAMA, K., K. MATSUZAKI & H. HAYASHI. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
- BESSERER, A., V. PUECH-PAGÈS, P. KIEFER, V. GOMEZ-ROLDAN, A. JAUNEAU, S. ROY, J. C. PORTAIS, C. ROUX, G. BÉCARD & N. SÉJALON-DELMAS. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.* 4: e226.

- BOOSTANI, H.R., M. CHOROM, A.A. MOEZZI & N. ENAYATIZAMIR. 2014. Mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizae fungi to enhancement of plant growth under salinity stress: A review. *Sci. J. Biol. Sci.* 3: 98-107.
- BRUNDRETT, M.C. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 79:473-495.
- BRUNDRETT, M.C. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. In: MACFAYDEN, A., M. BEGON & A.H. FITTER (eds.) *Advances in Ecological Research*, pp. 171-313, London.
- DELLA MÓNICA, I.F., M.S. GODOY, A.M. GODEAS & J.M. SCERVINO. 2018. Fungal extracellular phosphatases: their role in P cycling under different pH and P sources availability. *J. Appl. Microbiol.* 124: 155-165.
- DELLA MÓNICA, I.F., M.C.N. SAPARRAT, A. M. GODEAS & J.M. SCERVINO. 2015. The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal Ecol.* 17: 10-17.
- DELLA MÓNICA, I.F. 2014. Hongos solubilizadores y movilizadores de fósforo en la interfase suelo-raíz-planta. Análisis de los mecanismos implicados en su solubilización. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Tesis Doctoral, pp. 69-111.
- DELLA MÓNICA, I.F., P.J. STEFANONI RUBIO, R.P. CINA, M. RECCHI, A.M. GODEAS & J.M. SCERVINO. 2014. Effects of the phosphate-solubilizing fungus *Talaromyces flavus* on the development and efficiency of the *Gigaspora rosea-Triticum aestivum* symbiosis. *Symbiosis* 64: 25-32.
- FRACCHIA, S., I. SAMPEDRO, J.M. SCERVINO, I. GARCIA ROMERA, A. GODEAS & J.A. OCAMPO. 2004. Influence of saprobe fungi and its exudates on arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 36: 169-182.
- FRACCHIA, S., A. MENÉNDEZ, A.M. GODEAS & J.A. OCAMPO. 2001. A method to obtain monospore cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil. Biol. Biochem.* 33: 1283-1285.
- FRACCHIA, S., M.T. MUJICA, I. GARCIA-ROMERA, J.M. GARCIA-GARRIDO, J. MARTIN, J.A. OCAMPO & A. GODEAS. 1998. Interactions between *Glomus mosseae* and arbuscular mycorrhizal sporocarp-associated saprophytic fungi. *Plant Soil* 200:131-137.
- GIOVANNETTI, M. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In: KAPULNIK, Y. & D.D DOUDS JR. (eds.) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and function*, pp. 47-68. Springer, London.
- HU, J., X. LIN, J. WANG, J. DAI, X. CUI, R. CHEN & J. ZHANG. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungus enhances crop yield and P-uptake of maize (*Zea mays L.*): A field case study on a sandy loam soil as affected by long-term P-deficiency fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 41: 2460-2465.
- JOHANSSON, J. F., L. R. PAUL & R. D. FINLAY. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol.* 48: 1-13.
- JUGE, C., A. P. COUGHLAN, J. A. FORTÍN & Y. PICHÉ. 2009. Growth and branching of asymbiotic, presymbiotic, and extraradical AM fungal hyphae: clarification of concepts and terminology. In: KHASA, D., Y. PICHÉ & A. P. COUGHLAN (eds.) *Advances in Mycorrhizal Science and Technology*, pp. 39-50. NRC Research Press, Ottawa.
- KHAN, I. A., S. AHMAD, S. N. MIRZA, M. NIZAMI, M. ATHAR & S. M. SHABBIR. 2007. Growth response of buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) to phosphorus and mycorrhizal inoculation. *Agric. Conspec. Sci.* 72: 129-132.
- KHAN, M. S., A. ZAIDI, M. AHMAD, M. OVES & P. A. WANI. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. *Arch. Agron. Soil Sci.* 56: 73-98.
- MADI L., T. KATAN, J. KATAN & Y. HENIS. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathol.* 87: 1054-1060.
- MARTINEZ, A., M. OBERTELLO, A. PARDO, J. A. OCAMPO & A. GODEAS. 2004. Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza* 14: 79-84.
- MOORE, D. 2002. Hyphal growth. In: MOORE, D (ed.), *Fungal morphogenesis*, pp. 26-63. Cambridge University Press, Cambridge.
- MOSSE, B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 27: 509-520.
- NADEEM, S. M., M. AHMAD, Z. A. ZAHIR, A. JAVAID & M. ASHRAF. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol. Adv.* 32: 429-448.
- NOVAS, M. V., L. J. IANONNE, A. M. GODEAS & J. M. SCERVINO. 2011. Evidence for leaf endophyte regulation of root symbionts: effect of *Neotyphodium* endophytes on the pre-infective state of mycorrhizal fungi. *Symbiosis* 55: 19-28.
- OSORNO, L. & N. W. OSORIO. 2014. Effect of carbon and nitrogen source and concentration on rock phosphate dissolution induced by fungi. *J. App. Biotechnol.* 2: 32-42.

- PETERS, N. & D. VERMA. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3: 1990.
- PHILLIPS, J. M. & D. S. HAYMAN. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- RODRÍGUEZ, M. A. 2004. Hongos del suelo antagonistas de *Sclerotinia Sclerotiorum*: selección y estudio de potenciales agentes de biocontrol. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Tesis Doctoral, pp. 153-351.
- ŞAHİN, F., R. ÇAKMAKÇI & F. KANTAR. 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil* 265: 123-129.
- SCERVINO, J. M., M. P. MESA, I. F. DELLA MÓNICA, M. RECCHI, N. S. MORENO & A. GODEAS. 2010. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biol. Fertil. Soil.* 46: 755-763.
- SCERVINO, J. M., A. GOTTLIEB, V. A. SILVANI, M. PÉRGOLA, L. FERNÁNDEZ & A. M. GODEAS. 2009. Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil Biol. Biochem.* 41: 1753-1756.
- SCERVINO, J. M., I. SAMPEDRO, M. A. PONCE, M. A. RODRIGUEZ, J. A. OCAMPO & A. GODEAS. 2008. Rhodotorulic acid enhances root colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi due to its stimulatory effect on the pre-symbiotic stages of the AM fungi. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2474-2476.
- SCERVINO, J. M., M. A. PONCE, R. ERRA-BASSELLS, J. BOMPADRE, H. VIERHEILIG, J. A. OCAMPO & A. M. GODEAS. 2007. The effect of flavones and flavonols on colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal fungi of the genera *Gigaspora* and *Glomus*. *Can. J. Microbiol.* 53: 702-709.
- STEINKELLNER, S., V. LENDZEMO, I. LANGER, P. SCHWEIGER, T. KHAOSAAD, J. P. TOUSSAINT & H. VIERHEILIG. 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* 12: 1290-1306.
- TJAMOS E. C. & D. R. FRAVEL. 1997. Distribution and establishment of the biocontrol fungus *Talaromyces flavus* in soil on roots of solanaceous crops. *Crop Prot.* 16: 135-139.
- VIGNALE, M. V., L. J. IANNONE, J. M. SCERVINO & M. V. NOVAS. 2017. *Epichloë* exudates promote *in vitro* and *in vivo* arbuscular mycorrhizal fungi development and plant growth. *Plant Soil* 422: 267-281.

Recibido el 20 de agosto de 2017, aceptado el 25 de abril de 2018. Editor: Leopoldo Iannone.

LA INOCULACIÓN CON HONGOS MICORRÍFICOS ARBUSCULARES PROMUEVE EL CRECIMIENTO DE PLANTINES DE *KAGENECKIA LANCEOLATA* (ROSACEAE)

SILVIA E. NAVARRO RAMOS¹, DANIEL RENISON¹ y ALEJANDRA G. BECERRA²

Summary: Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi promotes the growth of *Kageneckia lanceolata* (Rosaceae) seedlings. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increase the survival and biomass production of host plants and improve nutrient absorption. AMF are very important in the restoration of degraded soils and in the growth of vegetation in nursery and field conditions. In order to restore populations of *Kageneckia lanceolata*, species considered vulnerable by the World Conservation Monitoring Center, it was proposed to evaluate the effect of inoculation with AMF on the growth, radical colonization and nutritional content in this species. We performed a greenhouse experiment to test the hypothesis that inoculation with AMF promotes the growth and nutrition of *K. lanceolata*. The inoculum used was natural soil coming from the rhizosphere of a forest with *K. lanceolata*. After 6 months, plants inoculated with AMF showed twice more aerial biomass and three more phosphorus than non-inoculated seedlings. This is the first study that shows the positive effect of AMF on growth and mineral nutrition of *K. lanceolata*.

Key words: Durazno de campo, greenhouse, natural mycorrhizal soil inoculum, phosphorus, restoration, vulnerable species.

Resumen: Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) incrementan la supervivencia y producción de biomasa de las plantas hospedadoras y mejoran la absorción de nutrientes. Los HFMA son muy importantes en la restauración de suelos degradados y en facilitar el crecimiento de la vegetación bajo condiciones de vivero y campo. Con el fin de restaurar las poblaciones de *Kageneckia lanceolata*, especie considerada vulnerable por World Conservation Monitoring Center, en este trabajo se propuso evaluar el efecto de la inoculación con HFMA en el crecimiento, la colonización radical y el contenido nutricional de esta especie. Para poner a prueba la hipótesis de que la inoculación con los HFMA promueve el crecimiento y la nutrición de *K. lanceolata*, se realizó un experimento de invernadero. El inóculo utilizado fue suelo natural proveniente de la rizosfera de un bosque con *K. lanceolata*. Después de 6 meses, los plantines inoculados con HFMA presentaron dos veces más de biomasa aérea y tres veces más de fósforo que los no inoculados. Este es el primer estudio que muestra el efecto positivo de los HFMA sobre el crecimiento y la nutrición mineral de *K. lanceolata*.

Palabras clave: Durazno de campo, especie vulnerable, fósforo, inóculo natural de micorrizas del suelo, invernadero, restauración.

INTRODUCCIÓN

Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) tienen gran importancia en la restauración de suelos degradados facilitando el crecimiento de la vegetación bajo condiciones de

vivero y de campo (Turnau & Haselwandter, 2002; Smith & Read, 2008). El efecto positivo de los HFMA se puede observar en las plantas hospedadoras al incrementarse su reproducción, supervivencia y producción de biomasa (Jayachandran & Fisher, 2008; Smith & Read, 2008). Los HFMA mejoran la absorción de nutrientes (principalmente de fósforo) (Smith *et al.*, 2011), la tolerancia a condiciones de estrés y la resistencia a los patógenos del suelo, entre otras funciones (Wehner *et al.*, 2010; Millar & Bennett, 2016). En especies leñosas nativas del centro de Argentina se ha probado la inoculación

¹ Centro de Ecología y Recursos Naturales Renovables-Dr. Ricardo Luti (CERNAR-IIByT)-CONICET, UNC.

² Laboratorio de Micología, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)-CONICET, UNC. Contacto: silnara1@hotmail.com

micorrícica en las especies *Acacia caven*, *Polylepis australis* y *Prosopis chilensis*, resultando positiva en las tres especies (Herrera *et al.*, 1993; Pérez & Urcelay, 2009; Soterías *et al.*, 2013).

Sin embargo, los HFMA pueden tener un efecto neutro o negativo sobre la planta hospedadora, dependiendo de las condiciones ambientales y de las especies asociadas (Jones & Smith, 2004; Smith & Read, 2008). Tal es el caso de *Fragaria moschata* y *Potentilla reptans*, ambas especies de la familia Rosaceae, que mostraron respuestas negativas en el crecimiento a la inoculación con HFMA (Sudová & Vosátka, 2008). Debido a que el efecto de los HFMA no siempre es positivo, antes de llevar a cabo inoculaciones a gran escala con plantines destinados a ser usados en plantaciones, es conveniente realizar ensayos para determinar si estas inoculaciones son beneficiosas.

Kageneckia lanceolata Ruiz et Pavón. (Rosaceae, “durazno de campo”) (de ahora en adelante *Kageneckia*) es una especie neotropical considerada vulnerable por World Conservation Monitoring Center (1998), siendo sus principales amenazas el pastoreo doméstico y la deforestación. *Kageneckia* es un árbol pequeño, de copa alargada, rala y estrecha, sus hojas son caducas, sus flores son imperfectas y se agrupan en cimas pequeñas y su fruto es leñoso en forma de estrella. Se distribuye en Perú, Bolivia y Argentina, encontrándose en el Chaco serrano y en su transición con las Yungas (Demaio *et al.*, 2002). Hasta el momento no se han estudiado las interacciones *Kageneckia*-HFMA. Con el fin de ayudar a restaurar sus poblaciones y los ecosistemas donde se encuentra esta especie, en este trabajo se propuso evaluar, bajo condiciones de invernadero, el efecto de la inoculación con HFMA en el crecimiento, la colonización radical y el contenido nutricional en plantines de *Kageneckia*. Se pone a prueba la hipótesis de que la inoculación con los HFMA promueve el crecimiento y la nutrición de los plantines del durazno de campo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

El distrito Chaqueño Serrano en la provincia de Córdoba, Argentina (lat. -31,4°; long. -64,6°), tiene una precipitación media anual de 859 mm y la temperatura media anual es de 15°C. Entre las

especies vegetales más representativas del lugar se pueden citar a *Acacia caven*, *Celtis ehrenbergiana*, *Kageneckia lanceolata* y *Lithraea molleoides* (Giorgis *et al.*, 2005), siendo *Kageneckia* exclusiva del estrato arbóreo inferior del Chaco Serrano (Demaio *et al.*, 2002).

Material biológico utilizado

Las semillas de *Kageneckia* utilizadas para la producción de plantines fueron recolectadas durante los meses de diciembre de 2013 y enero de 2014, de 9 árboles distribuidos en tres poblaciones de Córdoba (Argentina): Cuesta Blanca (lat.-31,481° long.-64,590°), Copina (lat.-31,493°, long.-64,665°) y Cerro Blanco (lat.-31,338°, long.-64,664°).

Las muestras de suelo utilizado para inocular las plántulas, se recolectaron de 12 bosques situados en los alrededores de la localidad de Cuesta Blanca (lat.-31,459°; long.-64,588°). La recolección se realizó durante el invierno (agosto de 2014) de la rizosfera de *Kageneckia* (0-20 cm profundidad). Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, se mezclaron y almacenaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Las 12 muestras de suelo se homogenizaron para realizar los siguientes análisis edáficos: textura, nitrógeno total (%) con el método de Kjeldahl (Bremner & Mulvaney, 1982), materia orgánica (%) (Walkley & Black 1934), pH (25% en solución con agua), fósforo extraíble (ppm) por medio del método de Bray and Kurtz I (Jackson, 1964), conductividad eléctrica, y la capacidad de intercambio catiónico (CIC).

A fin de conocer la diversidad de HFMA presentes en el inóculo, el suelo se tamizó con una malla de apertura de 1 cm, para remover hojarasca, piedras y palos. Se tomaron 100 g de suelo rizosférico fresco que fue tamizado empleando mallas de distinto tamaño de apertura (125 y 38 µm), siguiendo la metodología propuesta por Gerdemann & Nicolson (1963). El contenido retenido en los tamices fue centrifugado en sacarosa al 80% (Walker *et al.*, 1982). Las esporas obtenidas se colocaron en cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro con base cuadrada de 1 cm de lado. Las esporas y esporocarpos (aparentemente saludables y sin ningún tipo de ataque) fueron cuantificados e identificados a nivel de especie cuando fuera posible, bajo microscopio estereoscópico y microscopio óptico (Nikon, E200). Para cada tipo morfológico, se realizaron preparados permanentes usando polivinil-alcohol (PVA) y PVA

+ Melzer (Omar *et al.*, 1979) como medios de montaje. Las morfoespecies fueron identificadas siguiendo los manuales de identificación de INVAM, Blaszkowski (2003), Schenk & Perez (1990) y Redecker *et al.* (2013). Las esporas y esporocarpos de las morfoespecies fueron examinados y fotografiados con una cámara conectada a un microscopio Axiophot Zeiss (100 ISO).

Inoculación de plantines de Kageneckia

Las semillas de *Kageneckia* recolectadas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min y se enjuagaron con agua esterilizada. Posteriormente, se germinaron en bandejas con arena esterilizada (1h en autoclave a 120°C y 2 atm de presión). A los 3 meses, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 450 g con suelo natural tinalizado (1 h en autoclave a 100°C, por 3 días consecutivos con intervalos de 24 h de reposo) y arena esterilizada en una proporción 3:1. El suelo natural tinalizado fue el mismo suelo utilizado para la obtención del inóculo.

Al momento del trasplante, se inocularon las plántulas con 100 g de suelo rizosférico fresco, localizado a 3 cm de la superficie. El tratamiento control consistió en 100 g de suelo rizosférico esterilizado, al que se le adicionaron 50 ml de una solución de suelo nativo (100 g) previamente filtrado por un tamiz de 38 µm a fin de excluir el inóculo micorrízico (esporas, micelio extraradical y fragmentos de raíces colonizados) y recuperar la microbiota nativa (Koide & Li, 1989; Pérez & Urcelay, 2009).

Los tratamientos fueron asignados aleatoriamente a las unidades experimentales, siguiendo un diseño completamente aleatorizado con 9 réplicas por cada uno de los tratamientos (inoculado y no inoculado).

Las condiciones de crecimiento en invernadero fueron de 25°C, 12h de fotoperiodo y riego tres veces al día mediante riego automático por aspersión.

Respuesta de Kageneckia frente a la inoculación

Al final del experimento (6 meses) se cosecharon los 9 plantines de cada tratamiento y se midieron los parámetros de crecimiento vegetal: biomasa aérea y radical y el contenido de fósforo y de nitrógeno total en hojas. El contenido de fósforo total (%) de las hojas se obtuvo por el método de digestión ácida (Jones *et al.*, 1991) y N total (%) de las hojas se obtuvo por el método Kjeldahl (volumetría ácido-base).

La colonización micorrízica arbuscular (CMA) fue evaluada siguiendo las técnicas descritas por Phillips & Hayman (1970) y Grace & Stribley (1991). Se utilizaron 0,5 g de raíces frescas las que se aclararon con KOH al 10% (15 min, 90°C), posteriormente se acidificaron con HCL al 1% (1 min, temperatura ambiente) y tiñeron con Azul de Anilina al 0,05% (5 min, 90°C). Se cuantificó el porcentaje de CMA y de estructuras intra-radicales (arbúsculos, vesículas e hifas), siguiendo la técnica propuesta por McGonigle *et al.* (1990) utilizando un microscopio óptico (Nikon, E200) a 400x de aumento.

Análisis de datos

Las variables respuesta: biomasa aérea y radicular y el contenido de nutrientes en las hojas (fósforo y nitrógeno total) se compararon entre los dos tratamientos (inoculado y no inoculado) mediante métodos no paramétricos. En todos los casos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. La correlación entre la biomasa aérea y el fósforo se realizó con el coeficiente de correlación lineal de Pearson, con un nivel de significancia de 0,05. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2015).

RESULTADOS

Inóculo: características del suelo y comunidad de HFMA

El suelo de la rizofera de *Kageneckia* utilizado como inóculo se caracterizó por presentar una textura franco arenosa (58,5% arena, 33,2% limo y 8,3% arcilla), un pH moderadamente ácido y una muy alta capacidad de intercambio catiónico. Además, una alta concentración de fósforo, contenido de nitrógeno total, porcentaje de materia orgánica y relación carbono:nitrógeno (Tabla 1).

La abundancia de esporas en el inóculo micorrízico fue de 120 esporas/100 g de suelo seco. Se identificaron 7 morfoespecies pertenecientes a 6 géneros (*Acaulospora*, *Claroideoglosum*, *Funneliformis*, *Gigaspora*, *Glomus* y *Scutellospora*): *Acaulospora mellea* Spain & Schenck, *Claroideoglosum claroideum* Schenck & Smith, *Funneliformis mosseae* (Nicolson & Gerdemann) Walker & Schuessler, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, *Glomus brohultii* Herrera, Ferrer & Sieverding, *Glomus fuegianum* (Spegazzini) Trappe

Tabla 1. Propiedades edáficas del suelo de la rizosfera de 12 árboles de *Kageneckia lanceolata* utilizado como inóculo.

Tipo de medición y unidades utilizadas	Valor
Clase textural	Franco-arenoso
pH	5,5
Materia Orgánica (%)	15,44
Carbono orgánico (%)	8,96
Nitrógeno total (%)	0,63
Relación Carbono:Nitrógeno	14,2
Fósforo (ppm)	24,5
Conductividad Eléctrica (dS/m)	3,7
Humedad equivalente (%)	32,7
Capacidad de intercambio catiónico (meq/100g)	35,5

& Gerdemann, y *Scutellospora biornata* Spain, Sieverding & Toro.

Crecimiento de los plantines y colonización micorrícica

Después de 6 meses de crecimiento en invernadero, los plantines inoculados presentaron dos veces más biomasa aérea y tres veces más fósforo que los no inoculados (Tabla 2, Fig. 1). Se observó una correlación lineal de Pearson con una tendencia positiva entre el fósforo y la biomasa aérea ($r=0,334$; $P = 0,071$). Los plantines inoculados presentaron un 12% más nitrógeno total que los no inoculados, mientras que la biomasa radical no difirió entre los plantines con y sin inóculo (Tabla 2, Fig. 1).

Los plantines control (no inoculados) no presentaron CMA, evidenciando ausencia de contaminación en el transcurso del experimento. La CMA en los plantines inoculados varió entre 80 y 95%. Las estructuras micorrícicas presentes en los plantines inoculados fueron puntos de entrada, hifas, vesículas y arbusculos (Fig. 2). La colonización de hifas varió de 47 a 78%, la de vesículas de 11 a 43% y la de arbusculos de 0-5%.

Tabla 2. Biomasa aérea, biomasa radical y contenido de nutrientes en plantines inoculados y no inoculados de *Kageneckia lanceolata*. Se muestran las medias \pm error estándar de 9 muestras. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) según la prueba de Kruskal-Wallis.

	Plantines inoculados	Plantines no inoculados	valor P	Prueba
Biomasa aérea (g)	5,54 \pm 0,70a	2,34 \pm 0,62b	0,008	H= 6,79
Biomasa radical (g)	1,11 \pm 0,12a	0,73 \pm 0,19a	0,114	H= 2,67
Fósforo (%)	0,17 \pm 0,01a	0,05 \pm 0,01b	<0,0001	H=12,79
Nitrógeno total (%)	1,84 \pm 0,09a	1,63 \pm 0,05a	0,053	H= 3,77

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La inoculación de especies leñosas con HFMA ha sido puesta a prueba en algunos trabajos a fin de optimizar la restauración de zonas degradadas (Allen *et al.*, 2003; Caravaca *et al.*, 2005).

Los HFMA son importantes en la absorción de nutrientes y en el incremento del crecimiento de muchas especies de plantas (Jeffries *et al.*, 2003; Smith & Read 2008). En este trabajo la inoculación con HFMA de plantines de *Kageneckia* bajo condiciones de invernadero resultó ser efectiva. Esto apoya nuestra hipótesis y coincide con otros trabajos llevados a cabo en invernadero (Ouahmane *et al.*, 2007; Echairi *et al.*, 2008; El Mrabet *et al.*, 2014). Se observó una alta cantidad de fósforo en los tejidos de los plantines inoculados con HFMA lo que puede explicar el aumento de la biomasa aérea, además una correlación con tendencia positiva entre ambas variables. Esto coincide con los resultados obtenidos por El Mrabet *et al.* (2014) para plantines de *Argania spinosa*. A diferencia de otros ensayos de invernadero donde el inóculo micorrícico promovió un aumento en la biomasa radical de *P. australis* (Soteras *et al.*, 2013), en este trabajo no se observó este mismo efecto en las raíces de *Kageneckia*. Esto coincide con la teoría de asignación de biomasa que sugiere que la colonización micorrícica disminuye la relación raíz/tallo, ya que las plantas micorrizadas

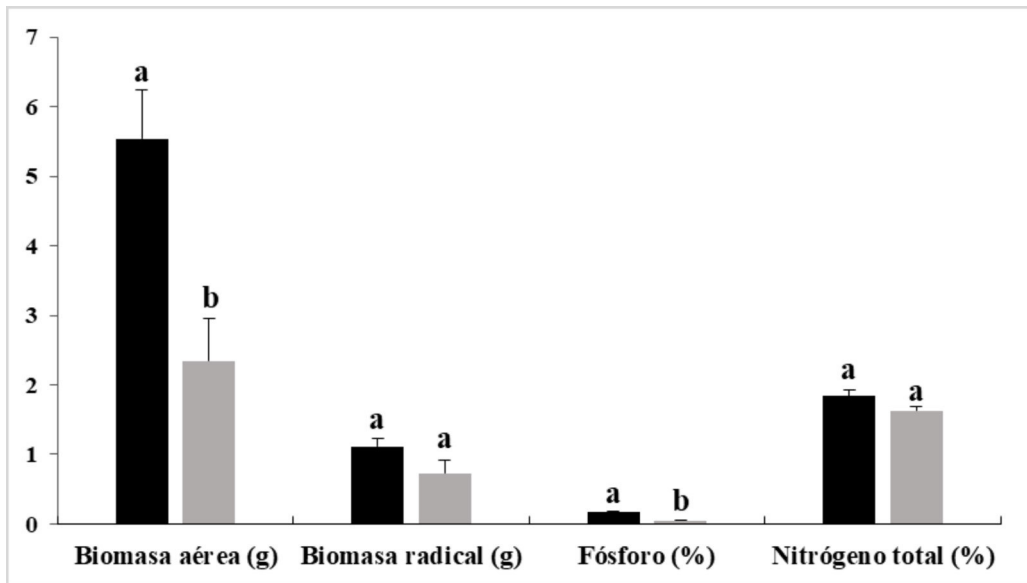


Fig. 1. Biomasa aérea, biomasa radical y porcentajes de nutrientes (fósforo y nitrógeno total) en plantines inoculados y no inoculados (■: inoculados; □: no inoculados) de *Kageneckia lanceolata* después de 6 meses de crecimiento. Se indica la media \pm error estándar de 9 muestras. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los dos tratamientos mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

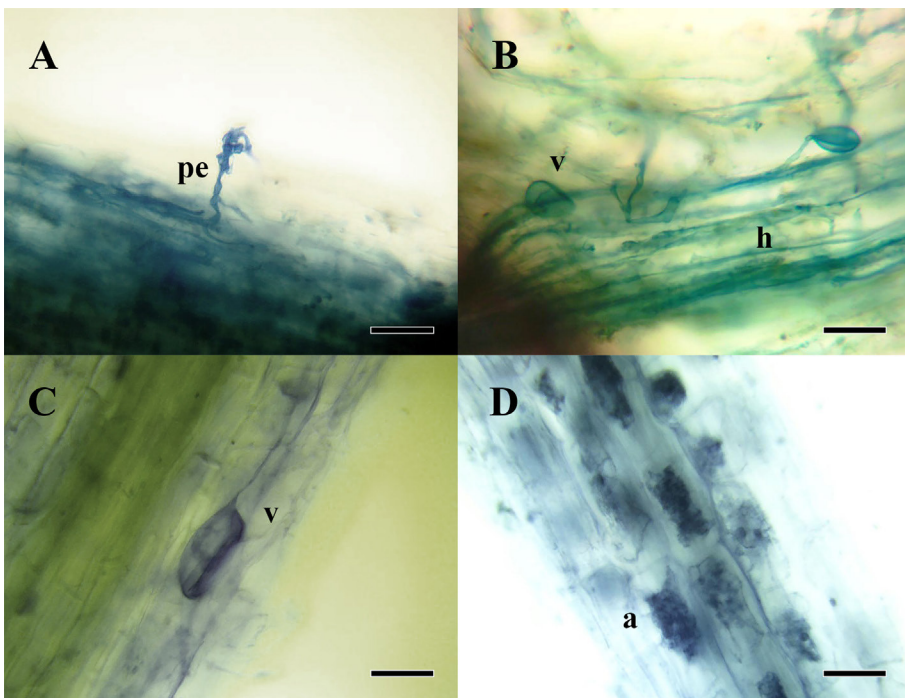


Fig. 2. Estructuras micorrícicas en raíces colonizadas de *Kageneckia lanceolata*. **A:** Punto de entrada (pe). **B:** Hifas (h) y vesículas (v). **C:** Vesículas (v). **D:** Arbúsculos (a). Escala A-D: 10 μ m.

asignan menos fotosintatos al crecimiento radical al adquirir los nutrientes principalmente a través del micelio extraradical de los HFMA asociados con sus raíces (Johnson 2010; Veresoglou *et al.*, 2011).

Las esporas del inóculo micorrícico utilizado, coinciden con los géneros encontrados en la rizosfera de otras especies de la familia Rosaceae (Błaszowski, 1994; Soteris *et al.*, 2013). Los inóculos de primavera en general presentan un mayor número de esporas en el suelo (mayor diversidad y riqueza), lo que se traduce en un mayor crecimiento del árbol (Lugo & Cabello 2002; Soteris *et al.*, 2014). En este estudio usamos inóculo de invierno que también resultó exitoso en cuanto al crecimiento y colonización micorrícica de *Kageneckia*.

Este trabajo muestra por primera vez, bajo condiciones de invernadero, que *Kageneckia* se micorriza y que requiere de los HFMA para su crecimiento y nutrición mineral. A fin de optimizar prácticas en restauración, resultaría importante evaluar el crecimiento de plántulas de *Kageneckia* con y sin inóculo bajo condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica- PICT 2013-049. Agradecemos al Biól. Nicolás Marro por su ayuda en el cuidado de los plantines.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, E. B., M. F. ALLEN, L. EGERTON-WARBURTON, L. CORKIDI & A. GÓMEZ-POMPA. 2003. Impacts of early- and late-seral mycorrhizae during restoration in seasonal tropical forest, Mexico. *Ecol. Appl.* 13: 1701-1717.
- BLASZKOWSKI, J. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), Endogone and Complexipes species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland. Disponible en: <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/Taxonomy.html> [Acceso: 25 Julio 2017].
- BREMNER, J. M. & C. S. MULVANEY. 1982. Nitrogen-total. In: PAGE, A. L. (ed.), *Methods of soil analysis* Part II, pp. 562-595. American Society of Agronomy: Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
- CARAVACA, F., M. M. ALGUACIL, J.M. BAREA & A. ROLDÁN. 2005. Survival of inocula and native AM fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. *Soil Biol. Bioch.* 37: 227-233.
- DEMAIO, P., U.O. KARLIN & M. MEDINA. 2002. *Árboles nativos del centro de Argentina*. L.O.L.A. Buenos Aires.
- DI RIENZO J. A., F. CASANOVES, M. G. BALZARINI, L. GONZALEZ, M. TABLADA, C. W. ROBLEDO. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
- ECHAIRI, A., R. NOUAIM, & R. CHAUSSOD. 2008. Intérêt de la mycorrhization contrôlée pour la production de plants d'arganier (*Argania spinosa*) en conditions de pépinière. *Sécheresse* 19: 277-281.
- EL MRABET S., L. OUAHMANE, A. EL MOUSADIK, F. MSANDA & Y. ABBAS. 2014. The effectiveness of arbuscular mycorrhizal inoculation and bio-compost addition for enhancing reforestation with *Argania spinosa* in Morocco. *Open Journal of Forestry* 4: 14-23.
- GERDEMANN, J. W. & T. H. NICOLSON. 1963. Spores of a mycorrhizal Endogone species extracted from the soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- GIORGIS, M. A., A. M. CINGOLANI, D. E. GURVICH, N. REYNERO & S. RUFINI. 2005. Diferencias en la estructura de la vegetación del sotobosque entre una plantación de *Pinus taeda* L. (Pinaceae) y un matorral serrano (Cuesta Blanca, Córdoba). *Kurtziana* 31.
- GRACE, C. & D. P. STRIBLEY. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 95: 1160-1162.
- HERRERA, M. A., C. P. SALAMANCA & J. M. BAREA. 1993. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Appl. Environ. Microb.* 59: 129-133.
- INVAM (International Collection of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi). Disponible en <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm> [Acceso: 25 Julio 2017].
- JACKSON, M. L. 1964. *Análisis químico de suelos*. 2nd Edn. Omega, Barcelona.
- JAYACHANDRAN, K. & J. FISHER. 2008. Arbuscular mycorrhizae and their role in plant restoration in native ecosystems. In: SIDDIQUI, Z. A. & K. FUTAI (eds.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, pp. 195-209. New Delhi. Springer.

- JEFFRIES, P., S. GIANINAZZI, S. PEROTTO, K. TURNAU & J. M. BAREA. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fert. Soils*. 37: 1-16.
- JONES J. B., B. WOLF, H. A. MILLS. 1991. *Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide*. Micro-Macro Publishing, Inc, Athens.
- JONES, M. D. & S. E. SMITH. 2004. Exploring functional definitions of mycorrhizas: are mycorrhizas always mutualisms? *Can. J. Botany*. 82: 1089-1109.
- JOHNSON, N. C. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytol.* 185: 631-647.
- KOIDE, R. T. & M. LI. 1989. Appropriate controls for vesicular–arbuscular mycorrhiza research. *New Phytol.* 111: 35-44.
- LUGO, M. A. & M. N. CABELLO. 2002. Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Cordoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia* 94: 579-586.
- MC GONIGLE, T. P., M. MILLER, D. G. EVANS, G. L. FAIRCHILD, J. A. SWAN. 1990. A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115: 495-501.
- MILLAR, N. S. & A. E. BENNETT. 2016. Stressed out symbiotes: hypotheses for the influence of abiotic stress on arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 182: 625-641.
- OMAR M. B., L. BOLLAND, W. A. HEATHER. 1979. A permanent mounting medium for fungi. *Bull. Brit. Mycol. Soc.* 13: 31-32.
- OUAHMANE, L., M. HAFIDI, J. THIOULOUSE, M. DUCOUSSO, M. KISA, A. PRIN, A. GALIANA, A. BOUMEZZOUGH & R. DUPONNOIS. 2007. Improvement of *Cupressus atlantica* Gaussen growth by inoculation with native arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Appl. Microbiol.* 103: 683-690.
- PÉREZ, M., & C. URCELAY. 2009. Differential growth response to arbuscular mycorrhizal fungi and plant density in two wild plants belonging to contrasting functional types. *Mycorrhiza* 19: 517-523.
- 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. *T. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- SMITH, S. E., I. JAKOBSEN, M. GRONLUND & F. A. SMITH. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology* 156: 1050-1057.
- SMITH S. E. & D. READ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Academic Press, Great Britain.
- SCHENK, N. C. & Y. PEREZ. 1990. Manual of identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. INVAM, University of Florida, Gainesville.
- SOTERAS F., D. RENISON & A. G. BECERRA. 2013. Growth response, phosphorus content and root colonization of *Polylepis australis* Bitt. seedlings inoculated with different soil types. *New Forests* 44: 577-589.
- SOTERAS, F., D. RENISON & A. G. BECERRA. 2014. Restoration of high altitude forests in an area affected by a wildfire: *Polylepis australis* Bitt. seedlings performance after soil inoculation. *Trees* 28: 173-182.
- SUDOVÁ, R. & M. VOSÁTKA. 2008. Effects of inoculation with native arbuscular mycorrhizal fungi on clonal growth of *Potentilla reptans* and *Fragaria moschata* (Rosaceae). *Plant Soil* 308: 55-67.
- TURNAU, K. & K. HASELWANDTER. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi, an essential component of soil microflora in ecosystem restoration. In: GIANINAZZI S., H. SCHÜEPP, J. M. BAREA & K. HASELWANDTER (eds.), *Mycorrhizal technology in agriculture*, pp. 137-149. Birkhäuser, Verlag/ Switzerland.
- VERESOGLOU, S. D., G. MENEXES & M. C. RILLIG. 2012. Do arbuscular mycorrhizal fungi affect the allometric partition of host plant biomass to shoots and roots? A meta-analysis of studies from 1990 to 2010. *Mycorrhiza* 22: 227-235.
- WALKER, C., W. MIZE, H. S. MCNABB. 1982. Populations of endogonaceous fungi at two populations in central Iowa. *Can. J. Botany* 60: 2518-2529.
- WALKLEY, A. & I. A. BLACK. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-38.
- WEHNER, J., P. M. ANTUNES, J. R. POWELL, J. MAZUKATOW & M. C. RILLING. 2010. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity? *Pedobiologia* 53: 197-201.

Recibido el 7 de septiembre de 2017, aceptado el 19 de febrero de 2018. Editor: Leopoldo Iannone.

MICRODOCHIUM BOLLEYI (ASCOMYCOTA: XYLARIALES): PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND STRUCTURAL FEATURES OF ITS ASSOCIATION WITH WHEAT

CAROLINA ROTHEN^{1*}, VICTORIA MIRANDA¹, SEBASTIÁN FRACCHIA¹, ALICIA GODEAS²
and ALEJANDRA RODRÍGUEZ²

Summary: Plant roots can be colonized by asymptomatic fungal strains belonging to several taxa, among them, the group defined as Dark Septate Endophytes (DSE). *Microdochium bolleyi* commonly colonizes wheat roots and other crops. It is considered a weak pathogen or even a non-pathogenic fungal species, which has also been considered as a potential biocontrol agent against aggressive soil-borne pathogens in cereal crops. We isolated a strain of *M. bolleyi* from wheat roots sampled in a crop field in Argentina, and characterized its abilities to grow in different carbon and nitrogen sources, to produce indole and to solubilize phosphorus; also several enzymatic activities were evaluated. In addition, resynthesis was performed under controlled conditions in order to characterize root fungal colonization under both, optical and transmission microscopy. The strain 22-1 colonized wheat root parenchymal tissue, forming chlamydospores inside parenchymal cells and root hairs, and poorly grew in carbon and nitrogen sources. This fungus also synthesized indoles in *in vitro* culture, but it cannot solubilize phosphorus. Only amylase activity was detected out of seven enzymatic activity measured. *Microdochium bolleyi* (strain 22-1) colonized the roots, it formed typical DSE fungal structures and behaved like a "true endophyte"; however further studies are necessary to elucidate its role in the association with wheat.

Key words: Dark septate endophytes, *Microdochium bolleyi*, root endophytes, wheat crop.

Resumen: *Microdochium bolleyi* (Ascomycota: Xylariales): Caracterización fisiológica y caracteres estructurales de su asociación con trigo. Las raíces de las plantas hospedan una gran diversidad de hongos, entre ellos, se encuentran los Endofitos Septados Oscuros (ESO). *Microdochium bolleyi* coloniza las raíces de trigo y otros cereales, aunque algunos autores lo han considerado un patógeno débil, otros han demostrado su acción biocontroladora contra patógenos agresivos del suelo. En el presente trabajo, se aisló una cepa de *M. bolleyi* (22-1) de raíces de trigo. Esta cepa fue metabólicamente caracterizada y se realizó un ensayo de síntesis bajo condiciones controladas con el fin de caracterizar la colonización del hongo en la raíz bajo microscopía óptica y de transmisión. Su crecimiento fue escaso en las fuentes de carbono y nitrógeno evaluadas, sintetizó indoles en cultivo *in vitro*, pero no mostró habilidades para solubilizar el fósforo, por último, solo se detectó actividad amilasa. La cepa 22-1 coloniza la corteza radicular del trigo, formando clamidosporas melanizadas inter e intracelularmente y en el interior de los pelos radiculares. *Microdochium bolleyi* (cepa 22-1) coloniza la raíz de trigo formando las típicas estructuras de los ESO y comportándose como un "verdadero endófito", sin embargo, se necesitan más estudios para terminar de dilucidar su papel en la asociación con el trigo.

Palabras clave: Endofitos septados oscuros, hongos endofitos, *Microdochium bolleyi*, trigo.

¹ Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica de La Rioja (CRILAR), Provincia de La Rioja, UNLAR, SEGEMAR, UNCa, CONICET. Entre Ríos y Mendoza, 5301 Anillaco, La Rioja, Argentina

² Laboratorio de Microbiología del Suelo. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA). CONICET- Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes 2160. Ciudad Universitaria C1428EGA Buenos Aires. Argentina

*Corresponding author: carorotheng@gmail.com

INTRODUCTION

Most plant species can associate with a wide diversity of root endophytic fungi, including the denominated Dark Septate Endophytes (DSE). These endophytes comprise a group of cosmopolitan fungi, mostly of ascomycetes species included in different orders as Helotiales, Pleosporales, Sordariales and Xylariales (Jumpponen, 2001; Jumpponen & Trappe, 1998). DSE are characterized by melanized septate hyphae and microesclerotia or chlamydospores that can colonize the parenchymal tissue of the roots either intra- or intercellularly (Addy *et al.*, 2005; Muthukumar & Tamilselvi, 2010; Sieber & Grünig, 2013), without causing disease symptoms on the host plant (Jumpponen, 2001). Among DSEs, *Phialocephala fortinii* is one of the best studied taxa, recorded in different environments and plant species (Brenn *et al.*, 2008; Jumpponen & Trappe, 1998). Isolates of this fungus inoculated in several experimental trials, using a range of host plant species and culture conditions (Fernández & Cagigal, 2017; Newsham, 2011; Wilcox & Wang, 1987), yielded positive, neutral or negative effects on plant growth. Similarly, it has been demonstrated that some asymptomatic strains of well-known dark pathogenic fungal taxa (*viz.* *Curvularia* spp, *Phoma* spp.) could be included within this group, as they colonize the root parenchymal tissue with melanized mycelium, behaving as typical DSE fungi (Loro *et al.*, 2012; Priyadharsini & Muthukumar, 2017).

Microdochium bolleyi (syn: *Idriella bolleyi*) is another well-known species of DSE. It has been extensively isolated from roots and stem bases of several cereals and grasses (Domsch *et al.*, 1980; Salt, 1977). Although it has been reported to cause minor damage under particular conditions, it is mainly considered as non-pathogenic (Kirk & Deacon, 1987; Punithalingam *et al.*, 1979), even *M. bolleyi* has been patented as a take-all biocontrol agent in cereals and grasses (Fox-Roberts & Deacon, 1988). Mandyam *et al.* (2010) characterized strains of dark septate endophytes identified as *Microdochium* sp. isolated from sampled roots of C4 grasses in Kansas (USA). These authors have demonstrated that two *Microdochium* sp. isolates used a variety of complex nutrient sources and produced different extracellular enzymes, suggesting the potential role of these fungi in organic matter mineralization and plant nutrition.

Although, DSE studies have focused on descriptive analyses of the colonization and fungal strains, mostly isolated from natural ecosystems (Jumpponen & Trappe, 1998; Newsham, 2011), while, when considering crop species, the information related to their association with DSEs is scarce and limited (Wang *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2010; Rothen *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2015; Muthukumar & Tamilselvi, 2010). Argentina produces approximately 2% of the global wheat production, with an average planting area of 6 million hectares in the last 5 years (Andrade & Satorre, 2015), thus becoming one of the most important crops in the country.

Despite *M. bolleyi* is commonly found associated with cereals and grasses, forming typical DSE structures, few studies have focused on its physiological abilities and none of them have considered its interaction with wheat from an ultra-anatomical point of view. The aims of this work were: *i*) to isolate and identify a strain of *M. bolleyi* from wheat roots and to evaluate physiologically this endophytic fungus and *ii*) to describe the anatomy of the interaction at two levels, optical and ultra-anatomical, based on resynthesis tests 30 days after inoculation.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and culture

The fungal strain was isolated from wheat roots, sampled in a productive field in the location of Ferré (Buenos Aires Province, Argentina 34° 06' S-61° 09' W). This area, known as rolling or central sub-humid Pampas, is one of the most productive agricultural regions in the country. The soil is Argiudoll type (pH 7), the annual rainfall, near 900 mm, is concentrated during spring and summer periods and the mean annual temperature is 16°C. Isolation and culture of endophytic fungi from roots were carried out following the methodology described by Silvani *et al.* (2008). Whole wheat plants (n=15) were sampled in June 2013 and transported to the laboratory within 24hs. The roots were excised and washed prior surface sterilization with 3% NaOCl (v/v) and antibiotics (0.05% w/v Penicillin, 0.05% w/v Ampicillin, 0.05% w/v Streptomycin, 0.05% w/v Tetracycline). The roots were washed with sterile water and cut

into segments of 2-3 mm. Then, each segment was transferred to drops of water-agar medium (Gel-Gro®) and incubated at 25°C in the dark. Emerging hyphae from root ends were checked periodically under a binocular microscope and carefully plated onto malt extract agar (MEA) for further growth and fungal characterization. From 24 fungal isolates, one strain (22-1) corresponding morphologically to the genus *Microdochium* was selected due to observable typical DSE structures. The selection was done through preliminary resynthesis assay with wheat plants.

Morphological and molecular identification

The isolate of *Microdochium* morphotype (strain 22-1) was cultured on MEA medium to characterize vegetative growth and sporulation. In order to approach the species level identification of the strain, descriptions provided by Ellis (1971) and Hernández-Restrepo *et al.* (2016) were considered. For molecular identification, isolate 22-1 was cultured in liquid malt extract 20% (w/v) at 25°C for one week. Genomic DNA was extracted using UltraClean™ Microbial Isolation Kit (MO BIO). The internally transcribed spacer (ITS) region of the fungal rDNA was amplified using the primers ITS1 and ITS4. PCR was performed using iProof™ High Fidelity DNA Polymerase (BIO RAD) in a 50 µl reaction volume containing 5–10 ng DNA under conditions described by Triebel *et al.* (2005). The PCR product was purified with UltraClean™ PCR Clean-up DNA Purification Kit (MO BIO) and sequenced with primers ITS1 and ITS4 on genotyping service provide by Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, (FCEN-UBA). Sequences obtained from pair primers were aligned to obtain a consensus sequence using Bioedit (Hall, 1999) and compared with others present in the 'nr' database with Blastn (Altschul *et al.*, 1990). All sequences were aligned with MAFFT program version 6 (Katoh & Toh 2008) available online (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), assigning a cost to the opening 15 and 6 to the extent of the gaps. To infer the phylogenetic tree, the alignments were subjected to a neighbor-joining analysis using the heuristic search option in MEGA v. 5 (Tamura *et al.*, 2013). The support nodes obtained were calculated by the Bootstrap analysis with 1000 replicates (Felsenstein, 1985).

Indole production

For indole production assessment, the fungal isolate was grown in three replicates 250-ml flasks with broth containing (L⁻¹): glucose 2.5 g; sodium succinate 2.5 g; K₂HPO₄ 6 g; KH₂PO₄ 4 g; KOH 2.1 g; NH₄Cl 1 g; MgSO₄·7H₂O 0.2 g; NaCl 0.1 g; CaCl₂·2H₂O 0.02 g; FeCl₃ 0.01 g; and Na₂MoO₄·2H₂O 0.002 g (Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993). Liquid medium was supplemented with tryptophan (100µg/L), and incubated at 25°C on a rotary shaker in darkness for 7 days. To detect the presence of indole, 1 mL of the medium was centrifuged (10,000 rpm, 10 minutes) and the supernatant was mixed with an equal volume of the Salkowski chromogenic reagent and incubated for 30 min (Ehmann, 1977). The test was considered positive when a pink-red color change of the supernatant was observed.

Phosphorous biosolubilization

To test the ability of *M. bolleyi* for phosphorous solubilization, the fungus was inoculated on Petri dishes containing solid NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium), a medium developed for screening phosphate solubilizing microorganisms (Nautiyal, 1999). This medium contains insoluble calcium phosphate (Ca₃(PO₄)₂) as the only source of phosphorus. Five replicate Petri dishes were incubated in the dark at 25°C for 7 days. Positive solubilizing capacity was determined when a visible halo was evident surrounding the fungal colony on agar plates. The pH of the media was adjusted to 7.0 before autoclaving.

Enzymatic activities

Microdochium bolleyi (strain 22-1) was tested for seven hydrolytic capabilities. These were determined on a basal medium (Caldwell *et al.*, 1991) supplemented with the corresponding substrate for each enzyme and agar 1.5%. All tests were performed in triplicate in Petri dishes of 4.5 cm diameter, containing 10 ml of each medium adjusted to pH 6. Plates were incubated for 1-2 weeks at 25°C. Inoculated basal media plates without test substrate and non-inoculated reaction plates were run as controls. Polysaccharide hydrolysis was determined with 1% starch (SIGMA), 1% carboxymethylcellulose (CMC-SIGMA), 1% xylan (SIGMA), 1% apple pectin and 2.4% chitin

(SIGMA) as the sole carbon source. The chitin solution was prepared following the protocols described by Hankin & Anagnostakis (1975).

Iodine solution 1% was added to the medium to reveal enzymatic activity for starch, and congo red for CMC and xylan (Teather & Wood, 1982). The reaction was considered positive when a translucent halo formed. Chitin utilization was detected when clear zones were observed around colonies in the opaque agar. Hydrolysis of fatty acid esters was determined by the formation of an opaque halo of calcium palmitate crystals in the basal medium supplemented with 1% Tween 40 (Caldwell *et al.*, 1991). Finally, protein hydrolysis was determined by the formation of a clear halo in basal medium with gelatin 3% as the sole nitrogen source (Gerhardt, 1981).

Metabolic profile analysis

Substrate utilization by *M. bolleyi* was tested using pre-made FF microplates (Biolog® catalog #1006) containing 95 different carbon and nitrogen sources. For inoculum preparation, *M. bolleyi* was cultivated in MEA at 25°C. After 1 week the conidia were collected and suspended in a tube containing 5 ml of sterile FF-IF broth (0.25% Phytigel® and 0.03% Tween 40 in DI water). Fungal growth was estimated by measuring turbidity at 750 nm and 490 nm and using the formula: Mycelial Growth = [(abs x 490 nm - abs A1 490 nm) - (abs x 750 nm - abs A1 750 nm)] * 1000. Measurements were made at day 7. Results were graphically presented through a histogram.

Resynthesis and colonization

The resynthesis assay was performed with the identified strain of *M. bolleyi* (strain 22-1). Five pots of 200ml were filled with an autoclaved mixture of soil: vermiculite: perlite in 1: 1: 1 (v/v/v) proportion. Hypochlorite (5%) surface-sterilized wheat seeds were sown in the substrate and inoculated with three 1x1-cm plugs with fungal mycelium, taken from the hyphal edge of a 10-day-old fungal colony culturing on MEA. In order to visualize the fungal root colonization, the plants were harvested after 30 days and the roots were processed following the technique developed by Phillips & Hayman (1970) and observed with a light microscope (LM) at 40x magnification.

Ultra-structural studies

To complement the interaction studies, colonized roots were studied with a transmission electron microscope (TEM). Wheat seedlings cultivated on Murashige-Skoog (MS-Sigma) medium (pH 5.8 at 25°C) were inoculated with *M. bolleyi*. Thirty days later, segments of roots were cut and washed in phosphate buffer, then fixed in 0.25% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4) for 18h at 4°C, rinsed in phosphate buffer under light vacuum and post-fixed in buffered 2% osmium tetroxide for 2h at 4°C, dehydrated in an ethanol-acetone series and included in Durcupan epoxy resin. Thin sections (0.5 µm) were cut with a manual ultramicrotome (Sorvall MT1); these sections were stained with toluidine blue (0.05% [w/v] in benzoate buffer, pH 4.4, for 45 s) and observed with a Zeiss EM 109T transmission electron microscope (service of the Faculty of Medicine (UBA)).

RESULTS

Identity

The morphology of strain 22-1 agrees well with the description of *M. bolleyi* (phylum Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Microdochiaceae) provided by Hernández-Restrepo *et al.* (2016). In pure culture, young colonies were smooth and white-pink in color (Fig. 1A) but later, a melanin-pigmented zone gradually expanded outwards from the colony center. This pigmentation was correlated with the formation of chlamydozoospores that covered the entire Petri dish after 2-3 weeks. *M. bolleyi* (strain 22-1) produced crescent-shaped conidia arising from denticulate loci on hyaline septate hyphae (Fig. 1B). The globose or subglobose conidiogenous cells described by de Hoog & Hermanides-Nijhof (1977) were occasionally observed. In the phylogenetic analysis, strain 22-1 was grouped with members of *M. bolleyi* (100% of bootstrap support) (Fig. 2). The ITS sequence was submitted to NCBI GenBank with the accession number KF600798.

Fungal physiological characterization

Indole production was evident due to the turning of the Salkowski's chromogenic reagent from

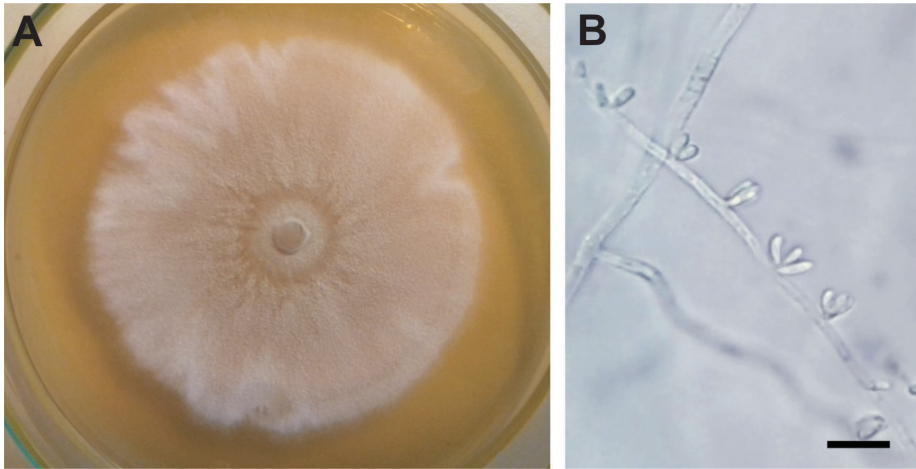


Fig.1. *Microdochium bolleyi*. **A:** Colony general appearance of strain 22-1 grown on MEA at 25°C for 7 days. **B:** Hyaline unicellular conidia on cylindrical conidiogenous cells. The scale bar represents 10µm.

colorless to intense pink color after seven days of fungal incubation. Regarding its P-solubilization ability, the *M. bolleyi* strain isolated from wheat roots did not produce a translucent halo in the tested NBRIP medium. On the other hand, enzyme activity

assays indicated that strain 22-1 produced only amylases, out of the seven enzymatic capacities evaluated.

In the metabolic profile analysis, of the 95 different carbon and nitrogen sources evaluated

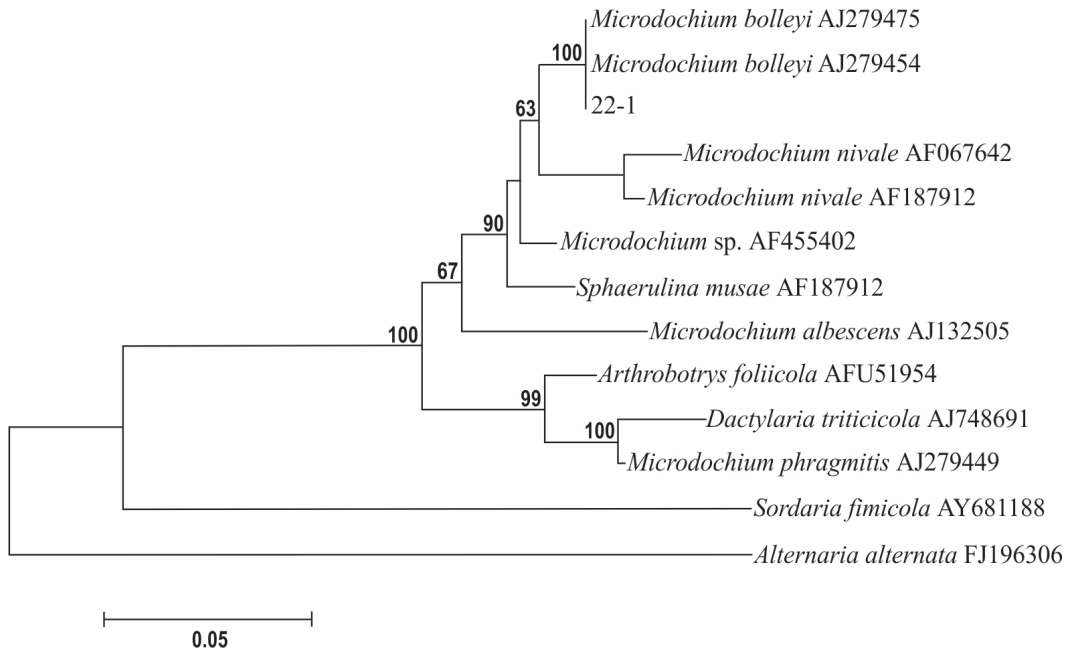


Fig. 2. Strict consensus of the most parsimonious trees resulting from the ITS data matrix analysis. Numbers above branches refer to bootstrap values.

in the BIOLOG® microplates, the histogram displayed five mycelial growth ranges, from R1 (less used substrates) to R5 (more used substrates). According to the histogram, only a few substrates (9, R5) were well used by strain 22-1 (Fig. 3). The most used ones were Adenosine-5-Monophosphate, Putrescine, Glucose-1-Phosphate, 2-Aminoethanol, Glycyl-L-Glutamic Acid, D-Saccharic Acid, L-Serine, L-Ornithine, Adenosine; and the least used ones were B-Cyclodextrin, D-Melibiose, α-D-Lactose, Maltitol, i-Erythriol, m-Inositol, Lactulose, α-Cyclodextrin and Glucoronamide (see attached information for further data). (Table).

Resynthesis and ultra-structural studies

In LM observations, the isolated strain 22-1 showed typical structures of DSE fungi, colonizing the intercellular spaces of wheat root cortical tissue with hyaline hyphae that did not stain with trypan blue. Melanized and compacted chlamydo spores formed inter- and intracellularly in cortical cells and also were frequently found inside the root hairs, occupying the entire space thereof (Fig. 4A-B), but no colonization of the vascular cylinder

or signs of tissue necrosis or disorganization were observed. TEM observations revealed that the hyphal penetration occurred directly at the junction of the epidermal cells, without formation of appressoria. Abundant hyphae in epidermal cells and intercellular space were not associated with the development of papillae or degradation of the plant cell wall (Fig. 4C-D); electronically dense material was observed around these intercellular hyphae.

DISCUSSION

In Argentina, DSE of crops are not well-known yet, their identities are poorly understood, and even less their interaction with cereal species (Rothen *et al.*, 2017). In this work, a strain of a DSE fungus, morphologically identified as *M. bolleyi*, was isolated from wheat roots in agricultural soils in the province of Buenos Aires. Through a phylogenetic analysis, we unequivocally confirmed its identification. *Microdochium bolleyi* is frequently isolated from cereals and grasses in diverse environments (Mandyam *et al.*, 2010;

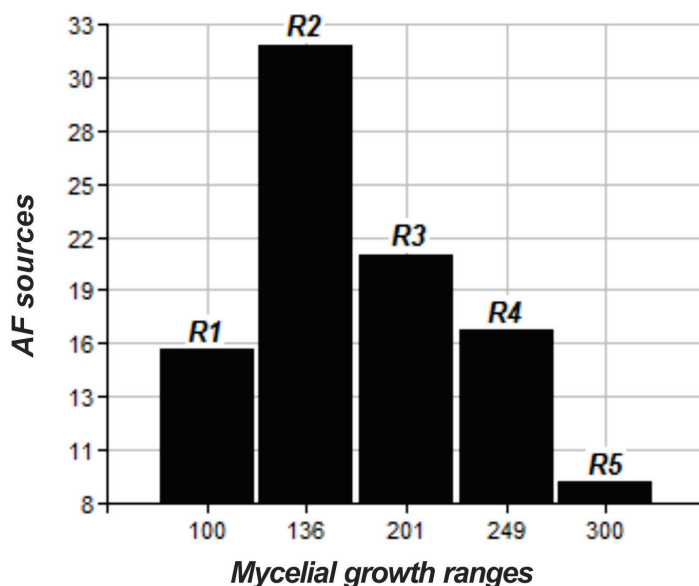


Fig. 3. Histogram representing the absolute frequencies (AF) of substrates used by *M. bolleyi* for five mycelial growth ranges (R1 to R5). The values of mycelial growth were calculated using the following formula: Mycelial Growth = [(abs x 490 nm- abs A1 490 nm) - (abs x 750 nm- abs A1 750 nm)] * 1000.

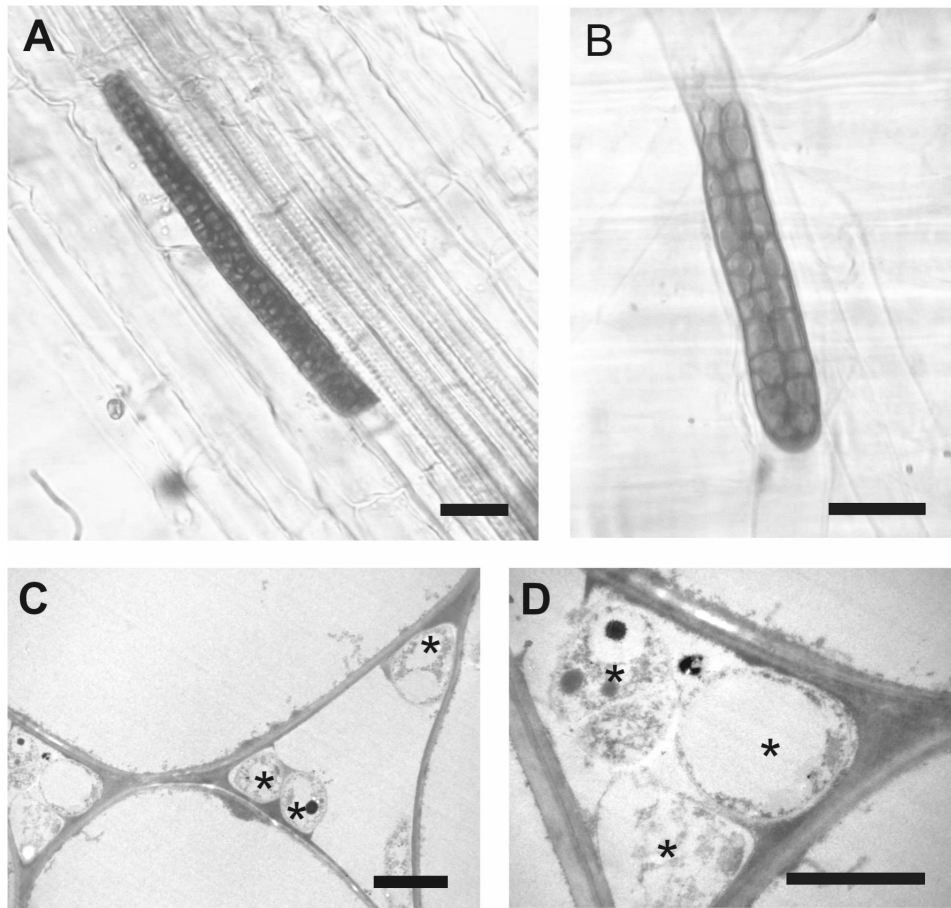


Fig. 4. *Microdochium bolleyi* colonization of wheat roots observed by optical microscope (A-B) and TEM (C-D). **A:** Chlamydospore inside a cortical root cell, scale bar 10 μm. **B:** Chlamydospore inside a root hair, scale bar 10 μm. **C-D:** Hyphae colonizing the intercellular space in the cortical tissue (*) with surrounding electrically dense material, scale bars 1 μm.

Wirsel *et al.*, 2001). Although some studies have shown that this fungus produces weak pathogenic effects (Waller, 1979; Kirk & Deacon, 1987; Hong *et al.*, 2008), it is not considered a pathogenic species and it is even able to control take-all diseases (Fox-Roberts & Deacon, 1988), behaving like a commensalist or as a fungus promoting plant growth (Dawson & Bateman, 2001; Liljeroth & Bryngelsson, 2002; Mandyam *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008).

Physiological characterization

The isolated strain of *M. bolleyi* did not solubilize P when calcium phosphate was used as an insoluble

phosphorus source. The capacity to solubilize P, though, has been shown in others DSE species, using solid and liquid media with three phosphorus sources: calcium, aluminum and iron phosphate (Priyadharsini & Muthukumar, 2017; Spagnoletti *et al.*, 2017). For instance, *Aspergillus ustus*, considered as a DSE fungi (Barrow & Osuna, 2002), and *Curvularia geniculata* (Priyadharsini & Muthukumar, 2017) promote plant growth due to their ability to solubilize P from unavailable phosphate. Further research is needed on this aspect of strain 22-1, using more sensitive methods and different sources of phosphorus.

When considering the enzymatic activities, Cadwell *et al.* (2000) and Mandyam & Jumpponen

(2005) observed a large battery of hydrolytic enzymes in some strains of DSE fungi. In particular, for other *Microdochium* species, Mandyam *et al.* (2010) detected the presence of amylase, cellulase, tyrosinase and gelatinase. The strain of *M. bolleyi* studied here showed positive results just for the amylase test and for a few of the carbon and nitrogen sources evaluated. Some authors have suggested that the capability of DSEs to allow hosts roots to access mineralized nutrients is related to the saprophytic ability (Upson *et al.*, 2010; Usuki & Narisawa, 2007). The few enzymatic abilities and the low proportion of organic compounds used would show a certain limitation by this fungus to mineralize organic sources.

The strain studied produced indole in liquid medium, as has been described for other DSE fungi by Lahlali *et al.* (2014) and Berthelot *et al.* (2016), among others. Some authors suggest that the production of microbial IAA would be of great importance for the establishment of symbiosis (Hilbert *et al.*, 2012; Tranvan *et al.*, 2000), while others propose that microbial IAA may induce the growth of plants and could confer improved stress tolerance (Kazan & Manners, 2009; Shi & Chan, 2014). Further tests are required, under different nutritional and stress conditions, to determine how the production of IAA by *M. bolleyi* may affect its interaction with the host.

Interaction with wheat

By means of the re-synthesis, we confirmed that the strain studied produced typical DSE structures (Sieber & Grünig 2013). Unlike many of these endophytes, its hyphae showed little or no melanization at all, with melanin being only found in chlamydo-spores. This characteristic of the intraradical mycelium has been observed in one strain of *Microdochium* sp. (Kageyama *et al.*, 2008), *Phialophora graminicola* (Newsham, 1999), *Phialocephala fortinii*, and some other DSE as well. Barrow & Aaltonen (2001) consider that the poor melanization of the hyphae in DSE fungi can be attributed to a more active metabolic state in relation to the possible exchange of nutrients with the host, since they observed that melanized hyphae were more extensive in roots of dormant or inactive *Atriplex canescens* plants, while hyaline hyphae were most abundant in roots of physiologically active plants. Murray &

Gadd (1981) examined further the morphology of an isolate of *M. bolleyi* and observed the same pattern of colonization in barley, where the roots remained healthy despite being highly colonized. These authors hypothesize that the asymptomatic colonization is due to the prevalence of chlamydo-spores chains, which are structures of resistance with low metabolic activity. Moreover, intercellular hyphae colonized mainly the cortical parenchyma and root hairs without reaching the vascular cylinder, an aspect that has often been related to non-phytopathogenic fungi (Mandyam & Jumpponen, 2005; Peterson *et al.*, 2008). The pattern of colonization and the lack of typical defense response of host tissues (Morita *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2005) together with the absence of any visible disease symptoms make strain 22-1 a “true endophyte” (Mostert *et al.*, 2000).

There are very few studies that analyze the DSE plant-fungus interaction at the ultrastructural level (Peterson *et al.*, 2008, Tsuneda *et al.*, 2009). Here, no defense responses were found when the interaction between *T. aestivum* and *M. bolleyi* was studied with TEM, only an electronically dense material was observed around the intercellular hyphae. This is similar to fibrillar material observed surrounding the hyphae in Chinese cabbage in the presence of *Heteroconium chaetospora* (Yonezawa *et al.*, 2004) and in *Asparagus officinalis* inoculated with *P. fortinii* (Yu *et al.*, 2001). Although in the current study the fibers were not observed, it could be due to an inefficient fixation of the material.

CONCLUSION

In Argentina, few studies have focused on the relationships between plants and DSE. In this work, a strain of *M. bolleyi* isolated from wheat roots was characterized. This fungus produced IAA, it did not grow in most of the sources of P and N, and only amylase activity was detected, suggesting it has low capacity to mineralize organic sources. When *M. bolleyi* colonized the roots, it formed typical DSE fungal structures and behaved like a “true endophyte” under the conditions evaluated. Further studies are necessary to broaden the knowledge of its role in association with wheat.

BIBLIOGRAPHY

- ADDY, H.D., M.M. PIERCEY & R.S. CURRAH. 2005. Microfungal endophytes in roots. *Can. J. Bot.* 83: 1–13.
- ALTSCHUL, S.F., W. GISH, W. MILLER, E.W. MYERS & D.J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- ANDRADE, J.F. & E.H. SATORRE. 2015. Single and double crop systems in the Argentine Pampas: Environmental determinants of annual grain yield. *F. Crop. Res.* 177: 137–147.
- BARROW, J.R. & E.R. AALTONEN. 2001. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza* 11: : 199–205.
- BARROW, J.R. & P. OSUNA. 2002. Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *J. Arid. Environ.* 51: 449–459.
- BERTHELOT, C., C. LEYVAL, J. FOULON, M. CHALOT & D. BLAUDEZ. 2016. Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92: fiw144.
- BRENN, N., A. MENKIS, C.R. GRÜNIG, T.N. SIEBER & O. HOLDENRIEDER. 2008. Community structure of *Phialocephala fortinii* s. lat. in European tree nurseries, and assessment of the potential of the seedlings as dissemination vehicles. *Mycol. Res.* 112: 650–662.
- CALDWELL, B.A., M.A. CASTELLANO & R.P. GRIFFITHS. 1991. Fatty acid esterase production by ectomycorrhizal fungi. *Mycologia.* 83: 233–236.
- CALDWELL, B.A., A. JUMPPONEN & J. M. TRAPPE. 2000. Utilization of Major detrital substrates by Dark-Septate, Root Endophytes. *Mycologia.* 92: 230–32.
- DAWSON, W.A.J.M. & G.L. BATEMAN. 2001. Fungal communities on roots of wheat and barley and effects of seed treatments containing fluquinconazole applied to control take-all. *Plant. Pathol.* 50: 75–82.
- DELLA MONICA, I.F., M.C.N. SAPARRAT, A.M. GODEAS & J.M. SCERVINO. 2015. The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal. Ecol.* 17: 10–17.
- DOMSCH, K.H., W. GAMS & T.H. ANDERSON. 1980. *Compendium of soil fungi.* Volume 1. London: Academic Press (London) Ltd.
- EHMANN, A. 1977. The van URK-Salkowski reagent a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *J. Chromatogr. A.* 132: 267–276.
- ELLIS, M.B. 1971. *Dematiaceous hyphomycetes.* Kew, London: Commonwealth Mycological Institute.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783–791.
- FERNANDES, E., L.O. PEREIRA, C.C. DA SILVA, C.B. PEREIRA BENTO & M.V. DE QUEIROZ. 2015. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max.* *Microbiol. Res.* 181: 84–92.
- FERNÁNDEZ, E. & M. CAGIGAL. 2017. Dark Septate Endophytes (DSE) in Polluted Areas. In: HUGHES E (ed.), *Endophytic Fungi. Diversity Characterization and Biocontrol*, pp. 125–147. New York.
- FOX-ROBERTS, J.J. & J.W. DEACON. 1988. *Biological control of take-all fungi.* Northern Ireland.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E., T. JIMENEZ-SALGADO, I.R. ABARCA-OCAMPO & J. CABALLERO-MELLADO. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant and Soil.* 154: 145–150.
- GERHARDT, P. *Manual of Methods for General Bacteriology.* Washington.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.
- HANKIN, L. & S.L. ANAGNOSTAKIS. 1975. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia.* 67: 597–607.
- HERNÁNDEZ-RESTREPO, M., J.Z. GROENEWALD & P.W. CROUS. 2016. Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia.* 36: 57–82.
- HILBERT, M., L.M. VOLL, Y. DING, J. HOFMANN, M. SHARMA & A. ZUCCARO. 2012. Indole derivative production by the root endophyte *Piriformospora indica* is not required for growth promotion but for biotrophic colonization of barley roots. *New Phytol.* 196: 520–534.
- HONG, S.K., W.G. KIM, H.W. CHOI & S.Y. LEE. 2008. Identification of *Microdochium bolleyi* associated with basal rot of creeping bent grass in Korea. *Mycobiology* 36: 77–80.
- JUMPPONEN A. 2001. Dark septate endophytes. Are they mycorrhizal? *Mycorrhiza.* 11: 207–211.
- JUMPPONEN, A. & J.M. TRAPPE. 1998. Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.* 140: 295–310.
- KAGEYAMA, S.A., K.G. MANDYAM & A. JUMPPONEN. 2008. Diversity, function and potential applications of the root-associated endophytes BT - In: VARMA A. (ed.), *Mycorrhiza:*

- State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*, pp. 29–57. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- KATOH, K. & H. TOH. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief. Bioinform.* 9: 286–298.
- KAZAN, K., & J.M. MANNERS, 2009. Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends. Plant. Sci.* 14: 373–382.
- KIRK, J.J. & J.W. DEACON. 1987. Control of the take-all fungus by *Microdochium bolleyi*, and interactions involving *M. bolleyi*, *Phialophora graminicola* and *Periconia macrospinosa* on cereal roots. *Plant Soil.* 98: 231–237.
- LAHLALI, R., L. MCGREGOR, T. SONG, B.D. GOSEN, K. NARISAWA, & G. PENG. 2014. *Heteroconium chaetospora* induces resistance to clubroot via upregulation of host genes involved in jasmonic acid, ethylene, and auxin biosynthesis. *PLoS One.* 9: 1–9.
- LILJEROTH, E. & T. BRYNGELSSON. 2002. Seed Treatment of Barley with *Idriella bolleyi* causes Systemically Enhanced Defence against Root and Leaf Infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Biocontrol Sci Technol.* 12: 235–249.
- LORO, V.L., M.B. JORGE, K.R. DA SILVA & C.M. WOOD. 2012. Oxidative stress parameters and antioxidant response to sublethal waterborne zinc in a euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: Protective effects of salinity. *Aquat. Toxicol.* 110: 187–193.
- MANDYAM, K. & A. JUMPPONEN. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud. Mycol.* 53: 173–189.
- MANDYAM, K., T. LOUGHIN & A. JUMPPONEN. 2010. Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia.* 102: 813–821.
- MORITA, S., M. AZUMA, T. AOBA, H. SATOU, K. NARISAWA & T. HASHIBA. 2003. Induced systemic resistance of *Chinese cabbage* to bacterial leaf spot and *Alternaria* leaf spot by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. *J. Gen. Plant. Pathol.* 69: 71–75.
- MOSTERT L., P.W. CROUS & O. PETRINI. 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia.* 52: 46–58.
- MURRAY, D.I.L. & G.M.GADD, 1981. Preliminary studies on *Microdochium bolleyi* with special reference to colonization of barley. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 76: 397–403.
- MUTHUKUMAR, T. & V. TAMILSELVI. 2010. Occurrence and morphology of endorhizal fungi in crop tropical and subtropical agroecosystems. *Trop. Subtrop. Agroecosystems.* 12: 593–604.
- NAUTIYAL C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Letters.* 170: 265–270.
- NEWSHAM K.K. 1999. *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*. *New Phytol.* 144: 517–524.
- NEWSHAM K.K. 2011. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytol.* 190: 783–793.
- PETERSON, R.L., C. WAGG & M. PAUTLER. 2008. Associations between microfungal endophytes and roots : do structural features indicate function? *Botany.* 456: 445–456.
- 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. Br. Mycol. Soc.* 55: 158–IN18.
- PRIYADHARSINI, P. & T. MUTHUKUMAR. 2017. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. *Fungal. Ecol.* 27: 69–77.
- PUNITHALINGAM, E., C. BOOTH & J.M. WALLER. 1979. *C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*. UK CMI, editor.: Nos. 631–640.
- ROTHEN, C., V. MIRANDA, A. ARANDA-RICKERT, S. FRACCHIA & M.A. RODRÍGUEZ. 2017. Characterization of dark septate endophyte fungi associated with cultivated soybean at two growth stages. *Appl. Soil Ecol.* 120: 62–69.
- SALT, G.A. 1977. *Survey of fungi in cereal roots at Rothamsted, Woburn and Saxmundham, 1970–75*. Rep Rothamsted Exp Stn.
- SHI, H. & Z.CHAN, 2014. Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *J. Integr. Plant Biol.* 56: 114–121.
- SHIMIZU, M., N. YUDA, T. NAKAMURA, H. TANAKA & H. WARIISHI. 2005. Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin. *Proteomics.* 5: 3919–3931.
- SIEBER, T.N. & C.R. GRÜNIG. 2013. Biodiversity of Fungal Root-Endophyte Communities and Populations, in Particular of the Dark Septate Endophyte *Phialocephala fortinii* s. l. In: SCHULZ B., C. BOYLE, T. SIEBER (eds.), *Microb Root Endophytes*, pp. 107–132. Zurich: Springer Berlin Heidelberg.
- SILVANI, V. A., S. FRACCHIA, L. FERNÁNDEZ, M. PÉRGOLA & A. GODEAS. 2008. A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil. Biol. Biochem.* 40: 1259–1263.

C. Rothen et al. - *Microdochium bolleyi* as a DSE fungus

- SPAGNOLETTI, F.N., N.E. TOBAR, A. FERNÁNDEZ DI PARDO, V.M. CHIOCCHIO & R.S. LAVADO. 2017. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. *Appl. Soil. Ecol.* 111: 25–32.
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI & S. KUMAR. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- TEATHER, R. & P. WOOD. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777–780.
- TRANVAN, H., Y. HABRICOT, E. JEANNETTE, G. GAY & B. SOTTA. 2000. Dynamics of symbiotic establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*. 1988: 123–129.
- TRIEBEL, D., D. PERSOH, H. WOLLWEBER & M. STADLER. 2005. Phylogenetic relationships among *Daldinia*, *Entonaema*, and *Hypoxyton* as inferred from ITS nrDNA analyses of Xylariales. *Nov. Hedwigia* 80: 25–43.
- TSUNEDA, A., W. WANG, I. TSUNEDA & R.S. CURRAH. 2009. Endomembrane system of aspen root cells plays a key role in defense against a common fungal root endophyte, *Cryptosporiopsis radicola*. *Mycologia* 101: 182–189.
- UPSON, R., D.J. READ & K.K. NEWSHAM. 2010. Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. *Mycorrhiza* 20: 1–11.
- USUKI, F. & K. NARISAWA. 2007. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia* 99: 175–184.
- WALLER, J.M. 1979. Observations on *Pythium* root rot of wheat and barley. *Plant. Pathol.* 28: 17–24.
- WANG, J., T. LI, G. LIU, J.M. SMITH & Z. ZHAO. 2016. Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. *Sci. Rep.* 6: 22028.
- WILCOX, H.E. & C.J.K. WANG. 1987. Mycorrhizal and pathological associations of dematiaceous fungi in roots of 7-month-old tree seedlings. *Can. J. For Res.* 17: 884–899.
- WIRSEL S.G.R., W. LEIBINGER, M. ERNST & K. MENDGEN. 2001. Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytol.* 149: 589–598.
- YU, T., A. NASSUTH & R.L. PETERSON. 2001. Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. *Can. J. Microbiol.* 47: 741–753.
- YUAN, Z.L., C.L. ZHANG, F.C. LIN & C.P. KUBICEK. 2010. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1642–52.
- YONEZAWA, M., F. Usuki, K. NARISAWA, J. TAKAHASHI & T. HASHIBA. 2004. Anatomical Study on the Interaction between the Root Endophytic Fungus *Heteroconium chaetospora* and Chinese cabbage. *Mycoscience* 45: 367–71.
- ZHANG, W., K. KROHN, S. DRAEGER & B. SCHULZ. 2008. Bioactive isocoumarins isolated from the endophytic fungus *Microdochium bolleyi*. *J. Nat. Prod.* 71: 1078–1081.

Recibido el 3 de noviembre de 2017, aceptado el 21 de junio de 2018. Editor: Leopoldo Iannone.

Table. Fungal growth of *M. bolleyi*, in 95 different carbon and nitrogen sources, grouped in five mycelial growth ranges, from R1 (less used substrates) to R5 (more used substrates).

Range of utilization	Source	Mycelial growth
R5	Adenosin-5-Monophosphate	340.67
	Glycyl-L-Glutamic Acid	312.00
	Putrescine	310.33
	Glucose-1-Phosphate	298.67
	L-Serine	294.33
	Quinic Acid	290.67
	D-Saccharic Acid	289.33
	2-Aminoethanol	286.67
	Adenosine	285.33
R4	L-Glutamic Acid	283.33
	L-Ornithine	280.33
	g-Hydroxybutyric acid	271.33
	L-Malic Acid	262.00
	L-Proline	262.00
	Uridine	261.00
	Succinic Acid Mono methyl Ester	249.33
	L-Phenylalanine	249.33
	L-Threonine	249.33
	D-Xylose	243.33
	p-Hydroxy Phenylacetic acid	240.33
	L-Lactic acid	234.33
	a-Ketoglutaric Acid	233.00
	L-Pyroglutamic Acid	232.33
	Succinic Acid	230.33
	b-Hydroxybutyric acid	228.33
	D-Malic Acid	228.33
R3	L-Alaninamide	222.33
	L-Alanyl-Glycine	221.67
	g-Amino Butyric Acid	220.00
	D-Lactic acid Methyl ester	219.00
	L-Alanine	217.00
	N-Acetyl-L-Glutamic Acid	216.67
	Bromo Succinic Acid	213.33
	L-Aspartic Acid	213.33
	2-Keto-D-Gluconic Acid	206.67
	L-Asparagine	204.33
	Xylitol	203.33

C. Rothen *et al.* - *Microdochium bolleyi* as a DSE fungus

Range of utilization	Source	Mycelial growth
R3	D-Gluconic Acid	203.00
	D-Trehalose	200.00
	N-Acetyl-D-Glucosamine	197.00
	D-Sorbitol	195.67
	Fumaric Acid	193.33
	Salicin	189.33
	D-Glucuronic Acid	184.00
	N-Acetyl-D-Mannosamine	181.67
	L-Sorbose	180.00
	Arbutin	176.00
	N-Acetyl-D-Galactosamine	171.33
	R2	D-Tagatose
Tween 80		161.67
Sucrose		161.00
D-Psicose		159.00
D-Raffinose		152.00
D-Ribose		147.00
Sedoheptulosan		146.00
D-Galacturonic Acid		144.67
Succinamic Acid		144.00
Stachyose		143.33
D-Fructose		142.00
Gentobiose		140.00
Maltotriose		139.67
L-Rhamnose		139.00
Palatinose		138.67
b-Methyl-D-Glucoside		135.00
Glycerol		134.67
a-Methyl-D-Galactoside		134.00
Glycogen		131.33
b-Methyl-D-Galactoside		130.33
Turanose		128.67
L-Arabinose		128.00
L-Fucose		126.67
D-Galactose		123.67
a-D-Glucose		122.67
D-Arabinose		121.67
D-Cellobiose		120.67
Dextrin		119.67

Range of utilization	Source	Mycelial growth
R2	D-Arabitol	118.67
	Amygdalin	118.33
	Maltose	118.00
R1	Adonitol	115.67
	D-Glucosamine	114.67
	a-Methyl-D-Glucoside	114.67
	D-Melezitose	111.00
	D-Mannitol	110.67
	Sebacic Acid	109.00
	D-Mannose	108.67
	B-Cyclodextrin	108.00
	D-Melibiose	106.67
	a-D-Lactose	106.33
	Maltitol	102.00
	i-Erythriol	101.33
	m-Inositol	100.00
	Lactulose	86.33
	Glucoronamide	59.33
	a-Cyclodextrin	58.33

HYDROLOGY-DRIVEN SEASONAL CHANGES IN THE PHYTOPLANKTON OF A SUBTROPICAL RIVER (RIACHO FORMOSA, ARGENTINA)

GABRIELA MATALONI^{1,2}, LUCIANA BURDMAN^{1,2}, VALERIA CASA^{1,2}, DANIELA GONZALEZ^{1,2}
and MARÍA CLARA MASETTI¹

Summary: The Riacho Formosa is one of many autochthonous watercourses running along the subtropical region of the Wet Chaco Plains and draining into Paraguay River. Their typical hydrological cycle is characterized by a late winter low phase and a high phase throughout the warm season. As part of a baseline characterization, the composition and structure of the phytoplankton were studied in relation to river depth, water temperature, pH, conductivity and transparency through 4 seasonal samplings between June 2015 and March 2016. A rich phytoplankton community (338 taxa) was revealed in this study. A few species of Cryptophyceae and Euglenophyceae dominated the community, especially during low waters. A cluster analysis showed that community compositions were more dissimilar over time than along the watercourse, and were spatially more homogeneous during high waters. A canonical correspondence analysis showed that environmental features significantly explained 42.6% of the total variance of species data ($p= 0.004$). We conclude that phytoplankton responds to hydrological changes through a high species turnover, with dominance peaks of euryhaline, shadow adapted and organic matter exploiting taxa during low waters.

Key words: Phytoplankton ecology, Formosa, subtropical rivers, hydrological seasonality.

Resumen: Cambios estacionales dependientes de la hidrología en el fitoplancton de un río subtropical (Riacho Formosa, Argentina). El Riacho Formosa es uno de los numerosos cursos de agua que surcan el Chaco Húmedo y desembocan en el río Paraguay. El ciclo hidrológico típico de estos ríos se caracteriza por un estiaje al final del invierno y una creciente durante la época cálida. En una caracterización de línea de base se estudiaron la composición y estructura del fitoplancton en relación con la profundidad, temperatura del agua, pH, conductividad y transparencia mediante 4 muestreos estacionales, entre junio de 2015 y marzo de 2016. La comunidad del fitoplancton fue rica (338 taxa) y dominada por pocas especies de Cryptophyceae y Euglenophyceae, especialmente en aguas bajas. Un análisis de agrupamiento reveló una mayor variación temporal en la composición taxonómica que a lo largo del río, y una mayor homogeneidad espacial durante la fase de inundación. Según un análisis de correspondencia canónica, las variables ambientales explicaron el 42,6% de la varianza total ($p= 0,004$). Concluimos que el fitoplancton responde a los cambios hidrológicos a través de una alta tasa de recambio de especies, con dominancia de taxones eurihalinos, adaptados a la sombra y consumidores de materia orgánica durante el estiaje.

Palabras clave: Ecología del fitoplancton, Formosa, ríos subtropicales, estacionalidad hídrica.

¹ Laboratorio de Biodiversidad, Limnología y Biología de la Conservación – Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental – Universidad Nacional de San Martín

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Corresponding author: Mataloni, G. (gmataloni@unsam.edu.ar)

INTRODUCTION

Among the limnological regions of Argentina defined by Tell *et al.* (2014), the Chaco-Pampa Plain is the most extense, and its northern area overlaps with the Warm climatic region, which reputedly hosts the richest phycoflora and accounts for a large number of probably endemic species (Tell, 2014). Within this area, the ecology of the phytoplankton inhabiting Paraná and Paraguay rivers and their floodplains has deserved much attention over the past 30 years, as comprehensively summarized by Devercelli *et al.* (2014) and Zalocar de Domitrovic *et al.* (2014a), while small local tributaries have been less studied, mostly through single point samplings (Zalocar de Domitrovic *et al.*, 2014b). The phycological overall diversity of the area, in turn, was surveyed over many floristic papers, as detailed in Zalocar de Domitrovic & Forastier (2008). Riacho Formosa –the local name of Formosa River– is a small tributary of the Paraná-Paraguay Corridor, contributing black waters from the Chaco-Pampa Plain to the lower Paraguay River (Minotti, 2016). Although its entering the Paraguay River floodplain, 700 m upstream from the drinking water intake for Formosa City, justifies a thorough ecological study of this river, only water quality in terms of physical, chemical and bacteriological features was surveyed around Formosa City (García & Salinas, 2014).

This paper contributes to the baseline study of the Riacho Formosa through two objectives:

Characterizing the different reaches of the Riacho Formosa over a four-season period based on abiotic features and structural descriptors (taxonomic composition, species richness, diversity) of the phytoplankton community.

Analyzing the seasonal changes of the phytoplankton structure and their relation with the hydrology of the Riacho Formosa.

MATERIAL AND METHODS

Study area

The Riacho Formosa is a 50 km-long lowland stream, whose watershed is located between the Pilagá River to the north, and San Hilario River and Pucú Stream to the south (Fig. 1). Most of its catchment belongs to the Alluvial Fans unit of the

Paraná-Paraguay Corridor (Minotti *et al.*, 2013). Its headwaters are located in a network of tropical swamps (*sensu* Carter & Beadle, 1930) where the alluvial fans of the Bermejo and Pilcomayo rivers meet. The main river starts where a series of paleovalleys coalesce into a single valley, its narrow central channel having small meanders and low levees. In the middle reaches, the river deepens its course and presents irregular meanders, which widen, get more numerous and complex covering the whole paleovalley, as it reaches the Paraguay floodplain (Cucchi, 1973). Natural levees are covered by gallery forest on the inner and steep side and palm trees (*Copernicia alba* Morong) on the outer gentle slopes, while backwaters and old meanders present stands of emergent macrophytes (*Cyperus giganteus* Vahl, *Thalia geniculata* Linneo, *Typha domingensis* Persoon) and open water. Its water regime depends mostly on local precipitation and surface flow, which take place during the austral warm season (November through April). The dry season is in late winter, when the base flow is provided by the local watertable (mostly hyporheic flow) and regional groundwater inputs. The lower reaches of the Riacho Formosa are also affected by Paraguay River floods, which take place during the austral winter due to the Pantanal retardation effect. Extraordinary floods take place during El Niño years, when the waters of the Paraguay River can enter an already high Riacho Formosa during summer.

Sampling and analysis

Six sampling sites were located within the Riacho Formosa main watershed: E1 and E2 in two paleovalleys of the headwaters, R1 and R3 in the middle stretch, and R4 and R5 in the lower reaches, within the Paraguay River floodplain. Four seasonal samplings were carried out between June 2015 (late autumn) and March 2016 (late summer). At each sampling station water temperature, pH, dissolved oxygen and conductivity were measured with a portable multiparametric Hach SensION probe at 20 cm depth, water transparency was estimated with a Secchi disk, and depth was measured with portable sonars (Hawk Eye or Fish Finder, 0.1m precision) or 1 m graduated scale (mm), depending on water height. Data on local Paraguay River water level and precipitation at Formosa city were provided by the Subsecretaría de Recursos Naturales y Ambiente of Formosa Province.

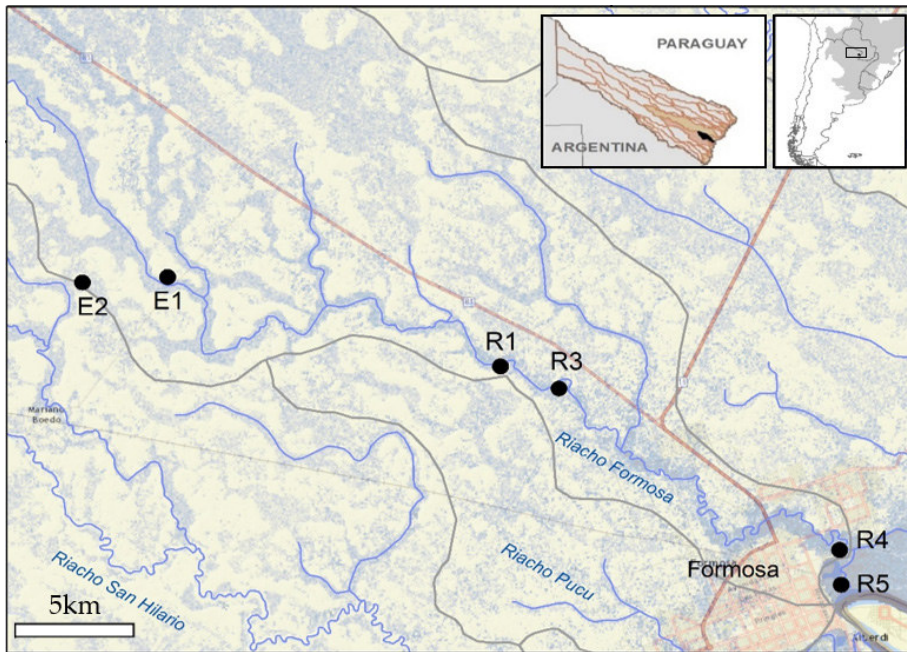


Fig. 1. Map of the Riacho Formosa, showing the location of the sampling points.

Qualitative samples of the nano- and micro-sized fraction of the phytoplankton were collected by repeatedly towing a 15 μm pore size plankton net when possible. In low waters, samples were taken by scooping a bucket and then filtering the contents through the same net. All samples were fixed with 1% formaline. Two replicate samples for the quantitative analyses of taxonomic groups were collected using 100-mL plastic flasks and preserved with 2% acetic Lugol's solution. At the laboratory, distinct morphotypes were photographed using an Olympus BX-41 microscope. Taxonomic identifications were made to the lowest possible level with the aid of a vast amount of literature on general taxonomy and local phycoflora. Replicate 10-mL plankton chambers were left to sediment for at least 24 h and counts performed in an inverted microscope at $\times 400$ magnification according to Utermöhl (Utermöhl, 1958). Abundances of the major taxonomic groups were calculated accepting a maximum counting error of 20% for the dominant taxonomic groups (Venrick, 1978).

The abiotic features of the Riacho Formosa were summarized by means of a Principal Component Analysis (PCA) using CANOCO 4.5 software

(terBraak & Smilauer, 1998). Samples were grouped based on their floristic composition by means of a cluster analysis using Jaccard's distance and weighted average linkage. Shannon's diversity index (Magurran, 2004) was calculated at the taxonomic group level with Infostat Software. In order to assess the influence of abiotic factors on the abundance and composition of the different main taxonomic groups of the phytoplankton, a canonical correspondence analysis (CCA) was performed using CANOCO 4.5 software (ter Braak & Smilauer, 1998). No data transformations were needed to perform this analysis. A forward selection of the variables selected conductivity, Secchi depth, total depth and temperature as the most influential variables for sample ordination.

RESULTS

The Riacho Formosa

Depth of the Riacho Formosa varied along its course, with all sampling points located in the sources and middle stretch showing much lower depths than those located on the alluvial plain of the Paraguay River (R4, R5). Depths at these points were very

similar to the ones simultaneously recorded at the Formosa Port (Fig. 2). During the drought period (precipitation: 55 mm over the previous month to the September sampling) the river lowered its depth. This influence was stronger on the catchment of the Riacho Formosa than on the sampling points located on the alluvial plain of Paraguay River. Heavy rains over the El Niño 2015-2016 summer resulted in an unusual early autumn flood of Paraguay River, whose level surpassed the limit for evacuation of the area. The waters of Riacho Formosa were less transparent, more ion-rich during the dry period, particularly at the middle reach. Mean water temperature of the river varied little, between 22.3°C in September and 27.4°C in March (Table 1). According to the PCA based on abiotic features, the first axis alone explained 56.35% of the total variability, and expressed a temporal rather than spatial pattern, with all late winter (September) samples located to the left side of the diagram (Fig. 3). Although all variables were influential on this

ordination (lowest eigenv. 0.627), transparency was of utmost importance (eigenv. 0.908). The second axis, in turn, explained 19.2% of the recorded variability, mainly due to the influence of temperature (eigenv. 0.593) and depth (eigenv. 0.487).

The phytoplankton

A total number of 338 taxa was recorded, with individual samples hosting between 16 and 84 taxa. The richest group was Conjugatophyceae, entirely composed of desmids, with 36 taxa in a single sample (E1 March), followed by Euglenophyceae (27), Bacillariophyta (24) and Chlorophyta (21). While paleovalleys (E1 and E2) showed minimum values for species richness (S) in June, the medium reach (R1-R3) was poorest during the September drought. Species richness was highest during December at all sites but R5, near the mouth of Riacho Formosa, which showed a strong peak for this parameter in March (Fig. 4).

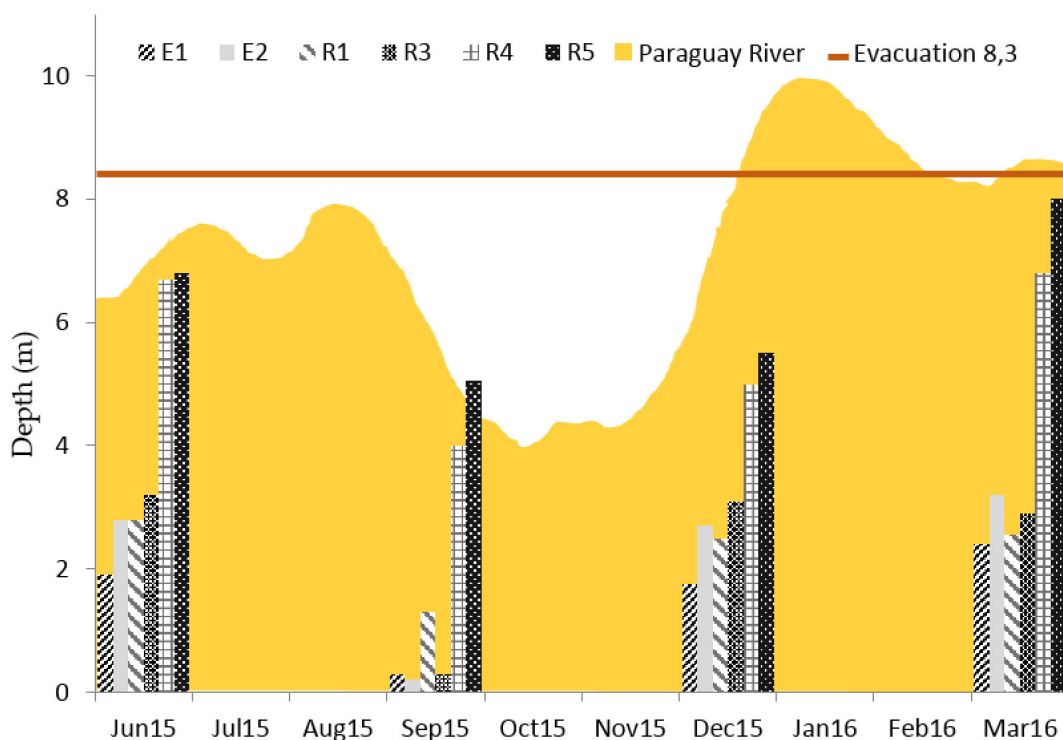


Fig. 2. Depth of Formosa River at each sampling station and date (columns) and depth of Paraguay River over the study period (background). E1 – R5: sampling stations. Jun 15, Sep15, Dec15, Mar16: sampling dates. Horizontal line: Evacuation limit for Paraguay River depth.

Table 1. Values of water temperature (WT), pH, conductivity (Cond), Secchi disk depth (Secchi) and river depth (Depth) at each sampling station over the study period and average values for Riacho Formosa for each season. E1 – R5: sampling stations.

		E1	E2	R1	R3	R4	R5	Average
Latitude		26° 3' 26,62"S	26° 6' 12,81"S	26° 5' 55,25"S	26° 5' 48,21"S	26° 9' 48,67"S	26° 10' 28,46"S	
Longitude		58° 25' 46,19"W	58° 28' 28,33"W	58° 16' 47,15"W	58° 16' 28,65"W	58° 9' 10,43"W	58° 9' 19,32"W	
WT (°C)	June	24.7	25.2	24.2	25.4	23.5	23.8	24.5
	September	20.3	19.8	23.2	24.9	23.0	22.7	22.3
	December	20.2	19.0	26.6	26.4	28.7	26.4	24.6
	March	28.4	29.9	25.6	26.3	26.6	27.4	27.4
pH	June	6.33	6.57	6.43	6.58	6.28	6.23	6.40
	September	6.70	6.70	6.86	6.80	6.38	6.65	6.68
	December	6.21	7.53	6.46	6.24	6.20	4.99	6.27
	March	6.16	6.63	6.15	6.45	6.25	6.66	6.38
Cond (µS/cm)	June	86.0	83.8	73.1	72.4	89.3	87.5	82.0
	September	108.7	124.7	402.0	394.3	258.3	142.6	238.4
	December	60.9	90.7	67.8	67.3	96.2	111.1	82.4
	March	47.9	58.9	49.8	51.3	66.3	89.0	60.5
Secchi (cm)	June	40.0	45.0	26.0	27.5	40.0	30.0	34.8
	September	12.5	3.0	5.0	3.0	15.0	22.5	10.2
	December	53.5	43.0	50.0	68.0	58.0	60.0	55.4
	March	70.0	63.0	60.0	33.0	33.0	65.0	54.0
Depth (m)	June	1.90	2.80	2.80	3.20	6.70	6.80	4.03
	September	0.30	0.20	1.30	0.30	4.00	5.05	1.86
	December	1.75	2.70	2.50	3.10	5.00	5.50	3.43
	March	2.40	3.20	2.55	2.90	6.80	8.00	4.31

The clustering of samples based on floristic composition (Fig. 5) followed a temporal pattern. Samples representing the whole river during the warm, high water period (Dec-Mar) clustered together, later joined by a smaller group comprising late autumn (June) samples, and finally by another cluster composed mainly by the dry winter (September) samples. Although no clear spatial pattern was observed regarding the taxonomic composition of samples, the difference between the total number of species recorded over the whole period for the entire system (338) and each sampling site (113 – 165 spp)

shows a high species turnover along the course of the Riacho Formosa.

Phytoplankton total abundances were generally low (124–1218 ind/ml) and did not show a clear trend either temporally or spatially. Instead, abundances of major taxonomic groups had distinct variation patterns over the study period at the different sites (Fig. 6). Nevertheless, a general trend towards dominance by flagellated Cryptophyta and Euglenophyta all along the river was observed during the winter drought. Consequently, during this season, phytoplankton diversity (H) as per major taxonomic groups showed

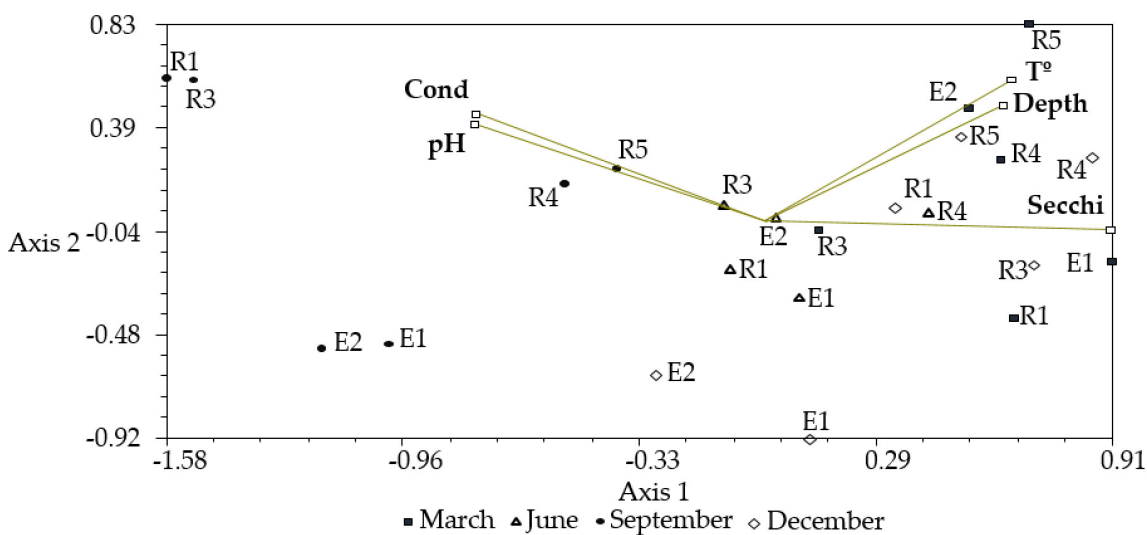


Fig. 3. Plotting of samples according to the results of the Principal Components Analysis. Cond: conductivity, T°: water temperature, Depth: depth of Formosa River, Secchi: depth of the Secchi disk. White triangles: June 2015, black circles: September 2015, white diamonds: December 2015, black squares: March 2016.

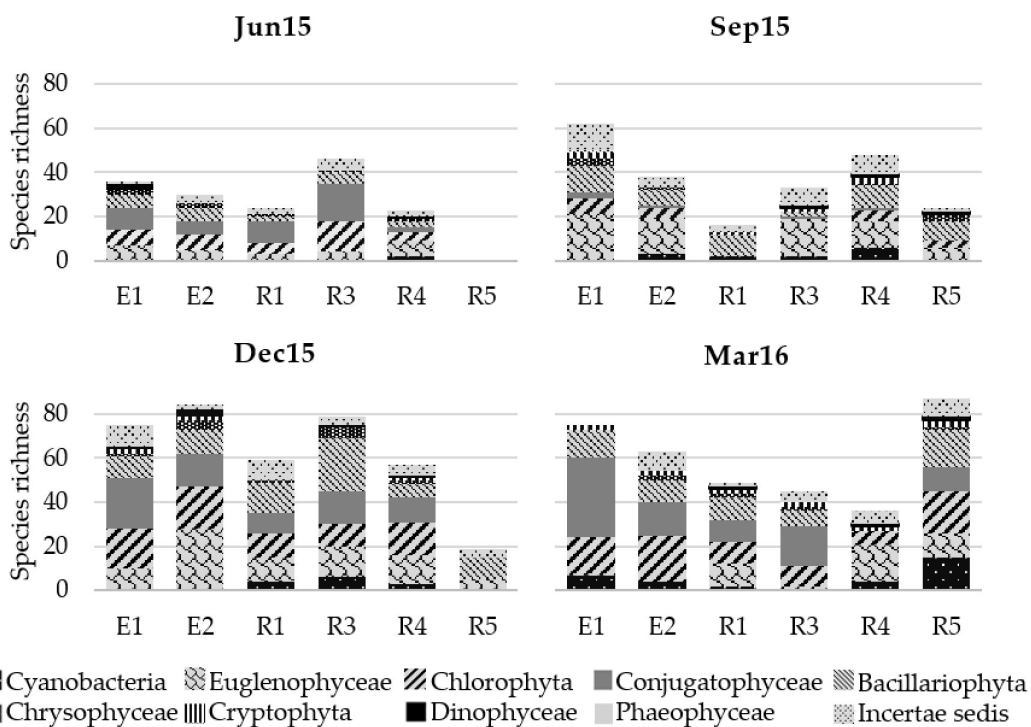


Fig. 4. Species richness for each major taxonomic group at each sampling point over the study period. E1 – R5: sampling stations.

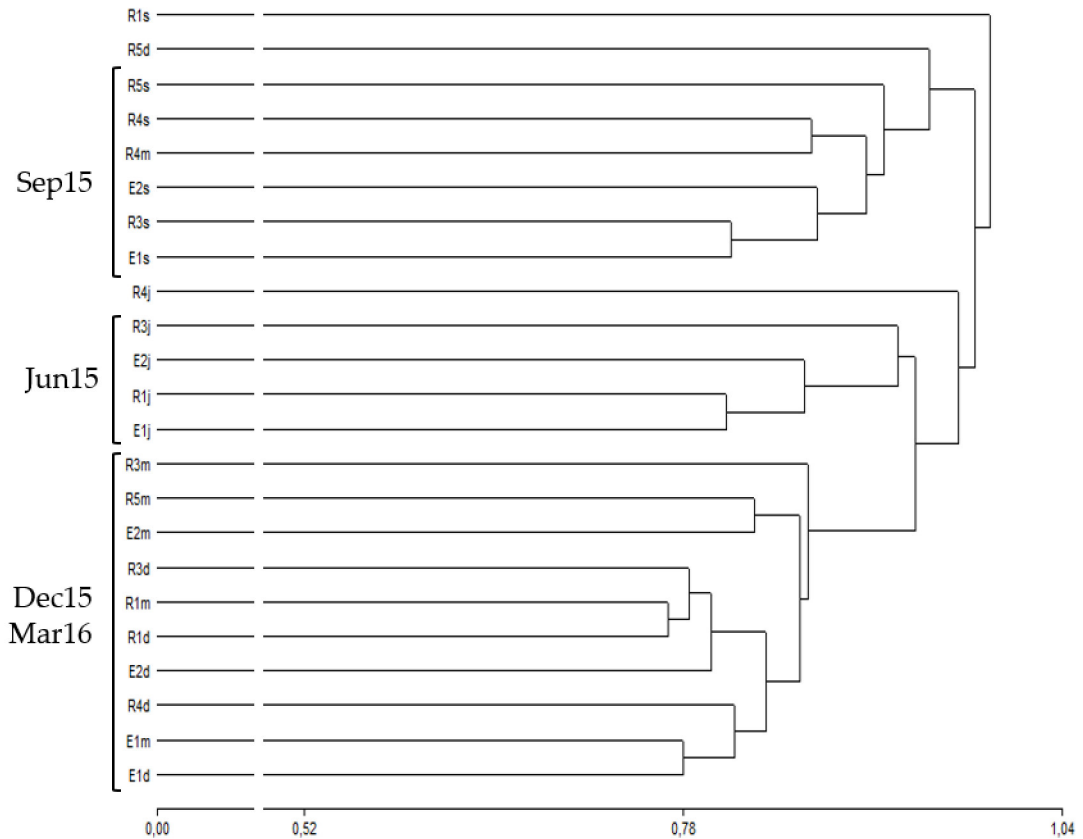


Fig. 5. Clustering of samples based on the taxonomic composition of the phytoplankton. Combinations of letters and numbers show a given sampling event at a given site, e.g. R1s: September sampling at R1 station. Clusters of samples mostly belonging to a given sampling date are shown. Arrows show the directions of the environmental gradients reflected.

its lowest values in all stations except R1 (range 0.95–1.64). Maximum values for this parameter (range 1.66–1.81), in turn, were recorded in December.

According to the results of the canonical correspondence analysis (CCA), four variables exerted a significant influence on the ordination of sampling sites and taxonomic groups (Fig. 7). The first two canonical axes explained 42.6% of the total variance of species data, and accounted for 97.1% of the species-environment relation. The first canonical axis ($p=0.012$) and the sum of all canonical axes ($p=0.004$) were significant, as confirmed by a MonteCarlo test with 499 permutations. The first axis ordinated samples along a drought gradient, with September samples located on the right side of the diagram and characterized by high abundances of Cryptophyceae and Euglenophyceae. Second

canonical axis, in turn, ordinated samples along a spatial gradient, with paleovalleys samples (E1, E2) located in the lower section of the diagram and relating to higher water transparency and abundances of Conjugatophyceae. In turn, sampling sites in the Paraguay River alluvial plain (R4, R5) were located in the upper left quadrant, and reflected the increasing depth of the river and high summer abundances of Cyanobacteria.

Regarding abundances of the taxonomic major groups, Cryptophyceae dominated the phytoplankton in June and September along the high and mid-reaches of the river despite their low species richness, and were mainly represented by *Rhodomonas minuta* Skuja and a few species belonging to the genera *Cryptomonas* Ehrenberg, and *Chroomonas* Hansgirg. While Euglenophyceae were the second dominant

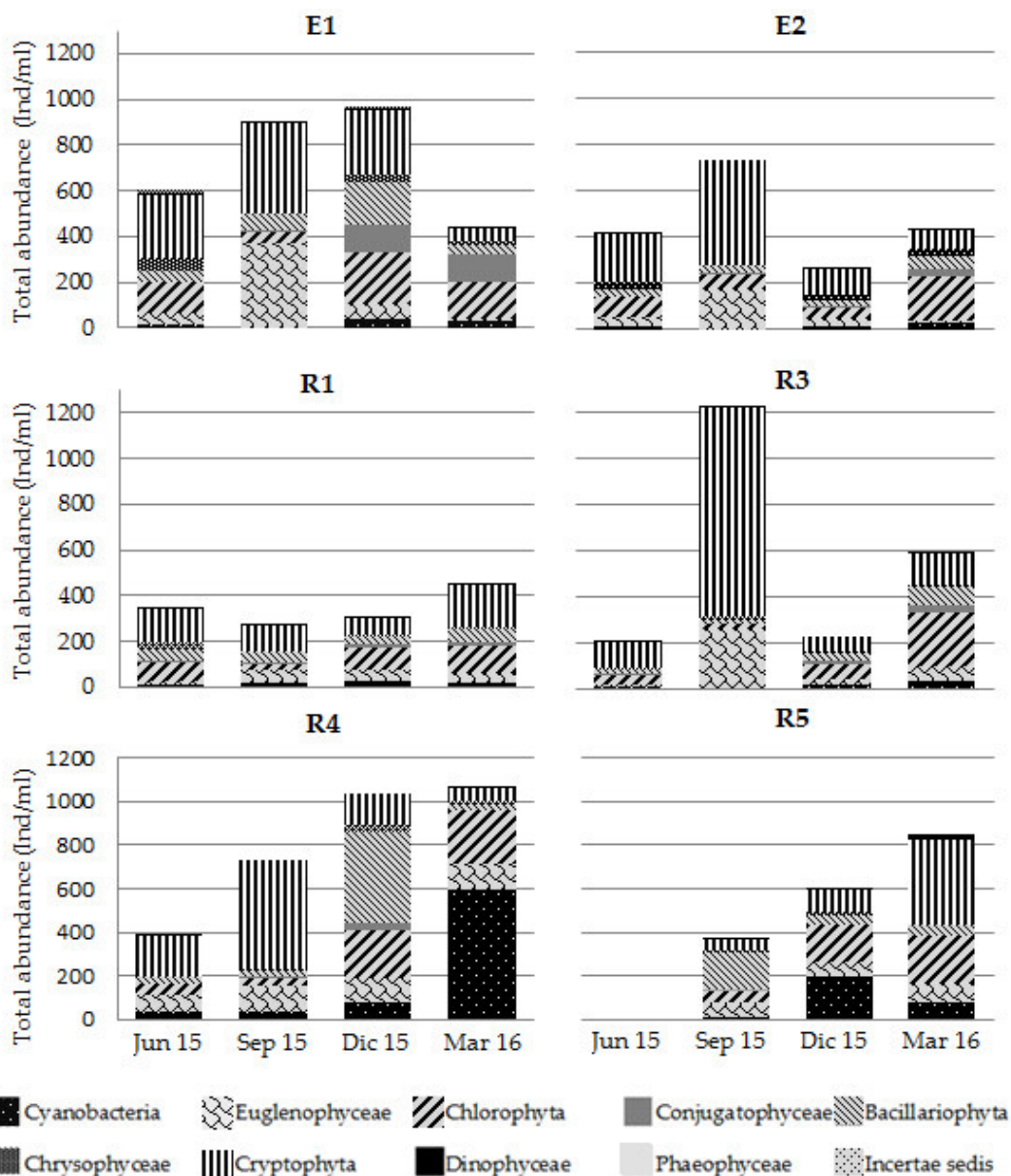


Fig. 6. Abundances for each major taxonomic group at each sampling point over the study period. E1 – R5: sampling stations. Jun 15, Sep15, Dec15, Mar16: sampling dates.

group along this section of the river during the September drought, they instead showed a high species richness, mostly on account of the genera *Trachelomonas* Ehrenberg (with 25 species) and *Lepocinclis* Perty. Opposedly, Conjugatophyceae (desmids) displayed the lowest number of taxa during this period, and their abundances were low throughout

the study. Most representative genera within this group were *Staurodesmus* Teiling (with 13 taxa), *Closterium* Nitzsch ex Ralfs, and *Staurostrum* Meyen ex Ralfs. In turn, half of the thin *Leptolyngbya*-like Oscillatoriales filaments contributing to the richness peak observed in R5 in the latest sampling event were new to the studied flora.

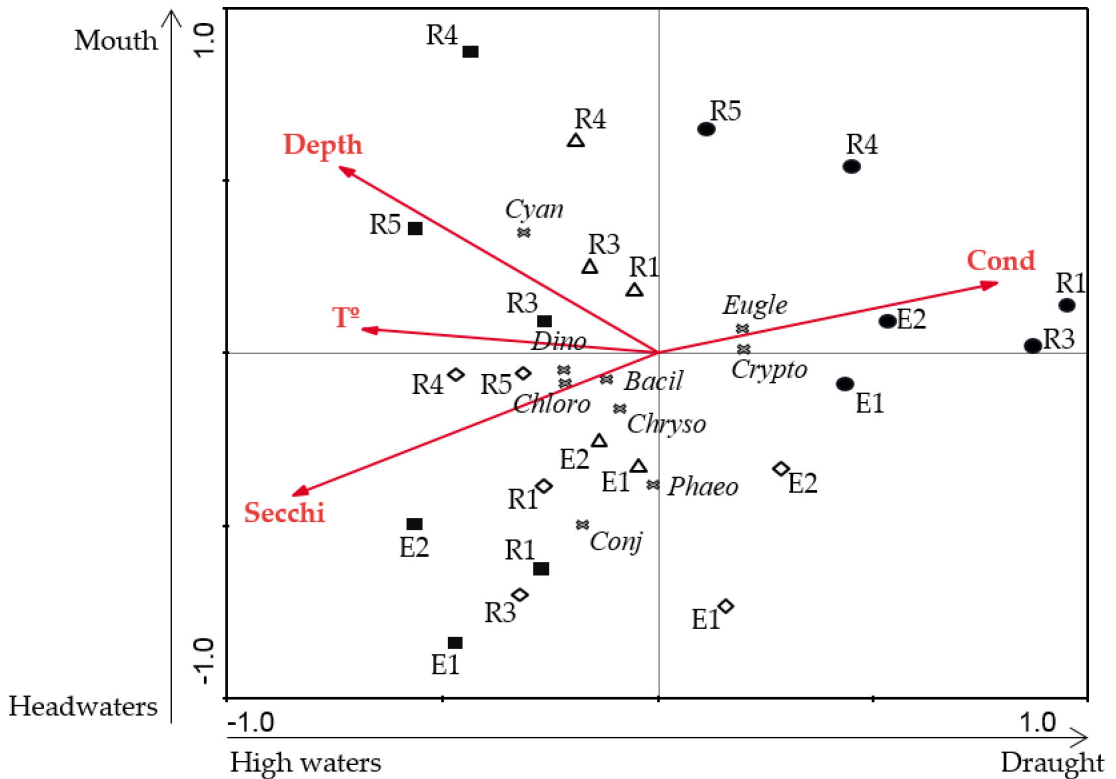


Fig. 7. Ordination of samples according to the values of environmental variables and abundances of major taxonomic groups. Bacil: Bacillariophyta, Cyan: Cyanobacteria, Chlo: Chlorophyta, Crypto: Cryptophyta, Eugle: Euglenophyceae, Phaeo: Phaeophyceae, Conj: Conjugatophyceae, Chryso: Chrysophyceae, Dino: Dinophyceae. Abbreviations of environmental variables and symbols for sampling dates as in Fig. 3.

DISCUSSION

Despite flowing through the capital city of Formosa Province, Formosa River has deserved little attention to present. Yet, its location between the watersheds of Pilagá River to the north and San Hilario river to the south provides an interesting source for comparison, as these waterbodies show similar low conductivity values (less than 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ during low waters in rainy years) as compared to other autochthonous streams located in surrounding catchments and, like the Riacho Formosa, are not covered by aquatic macrophytes (Zalocar de Domitrovic *et al.* 2014b). Among the environmental parameters studied, river depth, transparency and conductivity accurately reflected the hydrological cycles that drive the structure, abundance and composition of the phytoplankton, as described

by Zalocar de Domitrovic *et al.* (1986, 2014b) for other local watercourses in this region. In general, the high water period gives rise to a higher species richness, as the fluvial overflow allows contact with lenitic waterbodies and other streams, thus favouring the exchange of propagules with different survival strategies, as proposed by Zalocar de Domitrovic *et al.* (2014b). Hydrology, in turn, interacts with spatial variation, resulting in physical and chemical features of the headwaters (E1, E2), medium reach (R1, R3) and mouth (R4, R5) responding differently to hydric balance. In particular, the medium reach showed the highest variation in conductivity during low waters, as observed by García & Salinas (2014). This interaction would account for the high species turnover both in space and time of the phytoplankton, which is expected to be more pronounced during dry years.

Headwaters hosted a large number of chlorophytes and desmids, especially under high waters and high transparency conditions. The latter group stands for the functional group N (Reynolds *et al.*, 2002), which is particularly sensitive to stratification. The middle reach showed the most pronounced rise in turbidity and conductivity during the winter drought, and was characterized by a stronger dominance of flagellated Cryptophyceae and Euglenophyceae during this period. The former flagellates (functional group Y *sensu* Reynolds *et al.*, 2002) are tolerant to low light conditions, while euglenoids (W_1 , W_2) thrive in low waters, when stagnation and decomposing organic matter provide a rich substratum. Interestingly, Zalocar de Domitrovic *et al.* (1982, 1986) also found Cryptophyceae to numerically dominate a number of local rivers despite low species richness in Formosa and Chaco plains. Our two last sampling sites, located within the Paraguay floodplain, revealed a strong environmental discontinuity, as the waters partially mix in a system of interconnected ponds and abandoned meanders that regulate the fluctuations of this large river. This fact is reflected by their distinct floristic composition. In particular, the species list of R5 during the March flood includes 5 species of thin filamentous Oscillatoriales belonging to the functional group S_1 , characteristic of turbid mixed layers, which are new to the system, thus suggesting a potamoplanktonic origin. Also, during the low water period this site was clearly dominated by filamentous central diatoms (particularly *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen), as noted by Zalocar de Domitrovic (2002) for the Paraguay River.

In conclusion, the Riacho Formosa shows a behavior typical of the Chaco-Pampean Plain region, where the hydrologic cycle accounts for most of the variation in physical and chemical features. This effect interacts with the watershed features, thus giving rise to distinct environmental variations along the river course. The floristic composition, structure and abundance of the phytoplankton responds to these variations through two main strategies. One of them, previously observed for similar rivers in this area, is the dominance peaks of euryhaline species during low waters, and the other is a high turnover rate, both over space and time, of taxa with distinct ecological preferences.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was part of the project “Línea de base extendida sobre ecosistemas acuáticos y de humedales – NPU Formosa”, directed by M. Sc. Priscilla Minotti, who performed the sampling campaigns together with Lic. María Florencia González. All samples were accessed to by permission of the Ministerio de la Producción y Ambiente (accesion numbers 004770, 005781, 004957, and 004959). The authors are also much indebted to Dr. Yolanda Zalocar de Domitrovic, whom so generously shared with us all of her publications.

BIBLIOGRAPHY

- CARTER, G. S. & L. C. BEADLE. 1930. The fauna of the swamps of the Paraguayan Chaco in relation to its environment. I. Physico-chemical nature of the environment. *Zool.J. Linn. Soc.* 37: 205–258.
- CUCCHI, R. J. 1973. Aspectos geomorfológicos de la llanura formoseña. Los ríos sin proporción y su significado climático. *Rev. Asoc. Geol. Argent.* 28: 156–164.
- DEVERCELLI, M., Y. ZALOCAR DE DOMITROVIC, M. E. FORASTIER & N. MEICHTRY DE ZABURLIN. 2014. Phytoplankton of the Paraná River Basin. In: TELL, G., I. IZAGUIRRE & I. O’FARRELL (Eds.), *Freshwater phytoplankton of Argentina*, pp 39–65. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart.
- GARCIA, L. A. & R. SALINAS. 2014. Estudio de la calidad fisicoquímica y bacteriológica del agua del riacho formosa [online]. Disponible en <https://www.ina.gob.ar/legacy/ifrh-2014/Eje2/2.31.pdf> [Acceso: 3 de abril de 2018].
- MAGURRAN, A. E. 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell Science, Oxford.
- MINOTTI, P. G. 2016. The Paraná-Paraguay Fluvial Corridor, Argentina. In: FINLAYSON, C. M., C. PRENTICE, & R. MILTON (Eds.), *The Wetland Book: Distribution, Description and Conservation*, pp 1–12. Springer Netherlands, Netherlands.
- MINOTTI, P., C. RAMONELL & P. KANDUS. 2013. Regionalización. In: BENZAQUEN, L., D. BLANCO, R. BO, P. KANDUS, G. LINGUA, P. MINOTTI, R. QUINTANA, S. SVERLIJ & L. VIDAL (Eds.), *Inventario de los humedales de Argentina: Sistemas de paisajes de humedales del corredor fluvial Paraná Paraguay*, pp 35–90. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, Buenos Aires.

G. Mataloni *et al.* - Hydrology and phytoplankton of Riacho Formosa

- REYNOLDS, C. S., V. HUSZAR, C. KRUK, L. NASELLI-FLORES & S. MELO. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.* 24: 417–428.
- TELL, G. 2014. Phytoplankton diversity. In: TELL, G., I. IZAGUIRRE & I. O'FARRELL (Eds.), *Freshwater phytoplankton of Argentina*, pp 5–20. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart.
- TELL, G., I. IZAGUIRRE & I. O'FARRELL. 2014. Introduction. In: TELL, G., I. IZAGUIRRE & I. O'FARRELL (Eds.), *Freshwater phytoplankton of Argentina*, pp 1–4. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart.
- TER BRAAK, C. J. F. & P. SMILAUER. 1998. *CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows: software for canonical community ordination (version 4)*. Centre for Biometry, Wageningen.
- UTERMÖHL, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.* 9: 1–18.
- VENRICK, E. L. 1978. How many cells to count? In: SOURNIA A. (Ed.), *Phytoplankton manual*, pp. 167–180. Unesco. París.
- ZALOCAR DE DOMITROVIC, Y. 2002. Structure and variation of the Paraguay River phytoplankton in two periods of its hydrological cycle. *Hydrobiologia*, 2002: 177–196.
- ZALOCAR DE DOMITROVIC, Y., C. A. BONETTO & H. G. LANCELE. 1982. Algunos aspectos limnológicos de la laguna Herradura (Formosa, Argentina). *Ecosur* 9: 171–188.
- ZALOCAR DE DOMITROVIC, Y., M. DEVERCELLI & M. E. FORASTIER. 2014a. Phytoplankton of the Paraguay and Bermejo rivers. In: TELL, G., I. IZAGUIRRE & I. O'FARRELL (Eds.), *Freshwater phytoplankton of Argentina*, pp 67–80. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart.
- ZALOCAR DE DOMITROVIC Y., M. DEVERCELLI & M. E. FORASTIER. 2014b. Phytoplankton of the Chaco-Pampean Plain. In: TELL, G., I. IZAGUIRRE & I. O'FARRELL (Eds.), *Freshwater phytoplankton of Argentina*, pp 81–98. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart.
- ZALOCAR DE DOMITROVIC, Y. & M. E. FORASTIER. 2008. Biodiversidad algal del Nordeste Argentino In: BASTERRA, N. I. & J. J. NEIFF (Eds.), *Manual de Biodiversidad de Chaco, Corrientes y Formosa.*, pp 31–56. EUDENE, Corrientes.
- ZALOCAR DE DOMITROVIC, Y., E. R. VALLEJOS & H. N. PIZARRO. 1986. Aspectos ecológicos de la fitoflora de ambientes acuáticos del Chaco Oriental (Argentina). *Ambiente Subtropical* 1: 92–111.

Recibido el 25 de octubre de 2017, aceptado el 5 de junio de 2018. Editora: Eugenia Alicia Sar.

FIRST RECORD OF *THALASSIOSIRA CATHARINENSIS* (BACILLARIOPHYTA) FROM ARGENTINEAN MARINE COASTAL WATERS

ANDREA S. LAVIGNE¹, INÉS SUNESEN^{1,2} and EUGENIA A. SAR^{1,2*}

Summary: Several ultrastructural analyses of taxa belonging to the genus *Thalassiosira* from Argentinean coastal waters were carried out, nevertheless, the smaller fraction of the nanoplanktonic *Thalassiosira* was frequently overlooked. The aim of this study is to show the morphological variation of *T. catharinensis*, to compare material found in marine coastal waters of Anegada Bay, Province of Buenos Aires, with the material analyzed in the protologue and allied taxa, and to record the species for the first time in Argentina, extending its distribution.

Key words: Anegada Bay, Argentina, diatoms, first record, marine coastal waters, *Thalassiosira catharinensis*.

Resumen: Primer registro de *Thalassiosira catharinensis* (Bacillariophyta) en aguas costeras marinas argentinas. A pesar de que se llevaron a cabo varios estudios ultraestructurales de taxones pertenecientes al género *Thalassiosira* procedentes de las aguas costeras de la Argentina, la fracción más pequeña de los taxones nanoplanctónicos de *Thalassiosira* fue pasada por alto con frecuencia. El objetivo de este estudio es mostrar la variabilidad morfológica de *T. catharinensis*, comparar los materiales encontrados en las aguas marinas costeras de la Bahía Anegada (Provincia de Buenos Aires) con el material analizado en el protólogo y con taxones afines, y registrar la especie por primera vez para Argentina, extendiendo su distribución.

Palabras clave: aguas marinas costeras, Argentina, Bahía Anegada, diatomeas, primer registro, *Thalassiosira catharinensis*

INTRODUCTION

The genus *Thalassiosira* Cleve emend. Hasle (1973) is an important component of the marine phytoplankton in coastal environments worldwide. According to the diatom list in DiatomBase (Kociolek *et al.*, 2017) it comprises 381 specific and infraspecific names, including synonyms. The genus *Thalassiosira* was more or less recently split into new genera: *Roundia* Makarova (1994), *Takanoa* Makarova (1994), *Shionodiscus* Alverson, Kang & Theriot (2006), *Spicaticribr*a Johansen, Kociolek & Lowe (2008) and *Conticribr*a Stachura-Suchoples & Williams (2009).

Ultrastructural analyses of taxa belonging to the genus *Thalassiosira* from Argentinean coastal waters were carried out by Lange *et al.* (1983), Sar & Ferrario (1987), Ferrario & Sar (1988), Gayoso (1989), Sar (1996), Sar *et al.* (2001, 2002, 2011), Sunesen & Sar (2004), Sunesen (2007) and Sar & Sunesen (2017). Some of the taxa analyzed in the mentioned literature were transferred to *Shionodiscus* Alverson, Kang & Theriot in Alverson *et al.* (2006) and *Minidiscus* Hasle emend Park in Park *et al.* (2017), and most part of them corresponds to the microplankton or to the largest fraction of the nanoplankton. By contrast, the smaller fraction of the nanoplanktonic *Thalassiosira* species was frequently overlooked.

Recently, Garcia & Mareschi Bissa (2016) and Garcia & Bärwaldt Dutra (2016) analyzed two small nanoplanktonic species of *Thalassiosira* from the South Atlantic Ocean. Garcia & Bärwaldt Dutra (2016) described *T. catharinensis* Garcia,

¹ División Ficología "Dr. Sebastián A. Guarrera", Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Argentina.

* easar@fchnym.unlp.edu.ar

from Praia do Gi, Laguna, Santa Catarina State, Southern of Brazil.

The aim of this study is to show the morphological variation of *Thalassiosira catharinensis*, a small nanoplanktonic species found for the first time in Argentinean waters, and to compare it with material analyzed in its protologue and other allied taxa.

MATERIAL AND METHODS

The material analyzed was collected at three locations along Anegada Bay: Los Pocitos (40° 25' 47''S-62° 25' 18''W), Ría del Jabalí (40° 25''S-62° 17' 36''W) and Bahía San Blas (40° 32' 49''S-62° 14' 13''W), at the southern coast of Province of Buenos Aires, from May 2008 to December 2017. Qualitative samples were taken from the surface layer of the water column (between 0 and 5 m) with 30 µm net hauls and fixed with 4 % formalin.

In the laboratory, the preserved samples were rinsed with distilled water to remove salt and preservatives, and then the organic matter was oxidized according to Hasle & Fryxell (1970) and Prygiel & Coste (2000). The cleaned material was mounted for light (LM) and scanning electron microscopy (SEM) after Ferrario *et al.* (1995). Permanent mounts were made with Naphrax (Brunel Microscopes, Chippenham, UK).

The raw and treated samples, slides and stubs material were deposited in the Herbarium (index herbariorum LPC), División Ficología "Dr. Sebastián A. Guarrera", Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, under the numbers LPC 11601 to LPC 12146.

Observations were made with a light microscope Zeiss Axiovert 40 CFL (phase contrast and DIC differential interference contrast). Photomicrographs were taken with a Jeol JSM 6360 LV (JEOL, Tokyo, Japan) scanning electron microscope.

Terminology follows Fryxell & Hasle (1979), Ross *et al.* (1979), Syvertsen & Hasle (1984) and Round *et al.* (1990). Considering the very small diameter of the analyzed material, fulportula density in 10 µm was determined following Hasle (1983) as: $n \times 10 / \pi \times d$, where n is the number of marginal fulportulae observed in the valve and d is the valve diameter.

RESULTS

Morphological characterization of Anegada Bay's taxon

Fig. 1 A-D

The material presents circular valves (Fig. 1A, B), 6.2-7.4 µm in diameter. The valve is slightly silicified, the valve surface is frequently collapsed (Fig. 1B) and the valve mantle is shallow, 2-3 areolae in height. The striation pattern is radial, areolae are elliptical, 39-43 in 10 µm, arranged in radial striae, 47-52 in 10 µm. The portula pattern is characterized by one central fulportula, a marginal ring of fulportulae on the valve mantle, 3.0-3.4 in 10 µm (Fig. 1A, B) and a marginal rimoportula (Fig. 1A, arrowhead). The central fulportula has a very short external (Fig. 1A, B) and internal tube (Fig. 1B, D, arrowheads). The marginal fulportulae have cylindrical external tubes, and shorter internal tubes (Fig. 1A, B) surrounded by 3 operculate satellite pores (Fig. 1C). The rimoportula is close to one fulportula of the marginal ring, similar in diameter, with the external tube opening in different direction than the tubes of fulportulae (Fig. 1A, arrowhead).

The comparison of our taxon with the specimens illustrated by Garcia & Bärwaldt Dutra (2016: 62, Figs. 1-14) as *Thalassiosira catharinensis* based on distribution pattern of portulae, density of fulportulae, location, morphology of the external apertures of fulportulae and rimoportula, number of satellite pores of the marginal fulportulae (Table 1), allowed us to determine that both taxa are conspecific. *T. catharinensis* material from Anegada Bay shows subtle differences with that described in the protologue in size (6.2-7.4 vs. 4.4-6.6 µm) and stria density (47-52 vs. 50-60). Valve mantle was described by Garcia & Bärwaldt Dutra (2016) as 1-2 areolae in height, nevertheless protologue's figures 5-8 show mantle is 2-3 areolae height.

Photographed material: LPC 11644, Ría del Jabalí, 18/01/2009.

Distribution: *Thalassiosira catharinensis* was scarce in phytoplankton samples in Ría del Jabalí on summer (waters temperature ranged between 18.5 and 19.5°C). This is the first record of the species in Argentinian coastal waters and extends the distribution given by Garcia & Bärwaldt Dutra

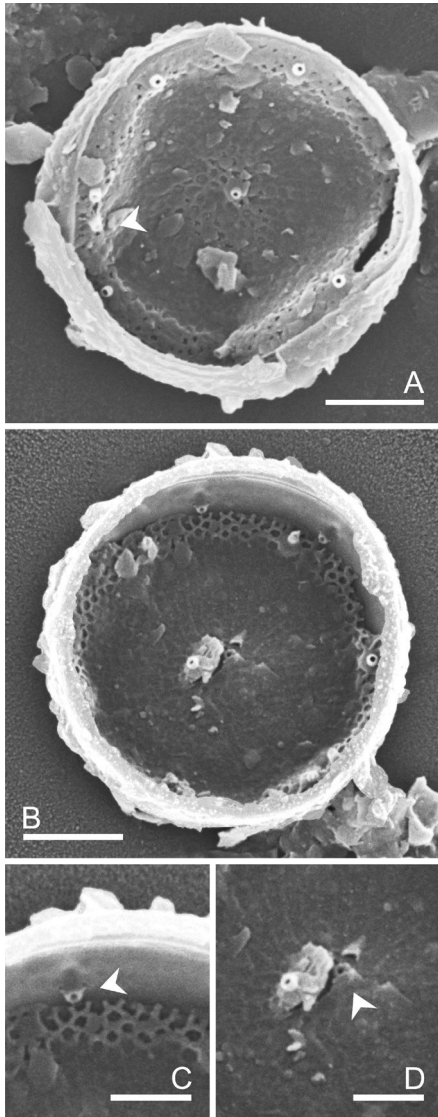


Fig. 1. *Thalassiosira catharinensis*. SEM. **A-D:** Valves in external view. **A:** Frustule showing external tubes of the central fultoportula, the marginal fultoportulae, and a marginal rimoportula close to one fultoportula of the marginal ring (arrowhead), LPC 11644. **B:** Frustule with a collapsed valve showing external tube of one valve (apparently eccentric due to the displacement of the valve towards one side of the frustule) and internal tube of the other valve. Note marginal fultoportulae in internal view at 2 and 12 o'clock, LPC 11644. **C:** Detail of the figure B. Note internal view of a marginal fultoportula showing three satellite pores (arrowhead). **D:** Detail of the broken central area of a valve showing external and internal (arrowhead) tube of the fultoportula. Scale bars: A, B = 2 µm; C, D = 1 µm.

(2016) that described it from Southern Brazil. It occurs in some samples together with *T. laevis*, recently cited by Sar & Sunesen (2017) from northern coastal waters of the Province of Buenos Aires, Argentina, and found for first time from Anegada Bay during this study.

DISCUSSION

Thalassiosira catharinensis belongs to the nanoplanktonic size group of the genus with a central fultoportula, a marginal ring of fultoportulae and a marginal rimoportula. *T. laevis*, *T. mala* Takano, *T. pseudonana* Hasle & Heimdal, *T. allenii* Takano, *T. binata* Fryxell and *T. conferta* Hasle, previously quoted for Argentina, belong to the same group. The comparison between *T. catharinensis* and *T. laevis*, *T. mala*, *T. profunda* (Hendey) Hasle, and *T. pseudonana* was presented by Garcia & Bärwaldt Dutra (2016, Table 1). In this study we added comparisons of *T. catharinensis* with other species previously quoted for Argentina having diameter of less than 10 µm and sharing portulae pattern.

Thalassiosira catharinensis can be distinguished from *T. allenii* (Takano, 1965, figs. 2, 9-11; Hasle & Fryxell, 1978, figs. 100-128) by a higher density of areolae on valve surface, not resolved in LM (39-48 vs. 18-24) and lower density of marginal fultoportulae (3.0-3.4 vs. 5-7).

Thalassiosira binata (Hasle & Fryxell, 1977, figs. 24-38; Sar *et al.*, 2001, figs. 8-10) is easily distinguished from *T. catharinensis* by the height of the valve mantle (6 vs. 2-3 areolae), the length of the external tubes of the marginal fultoportulae (long vs. short), and the presence of a depressed central areola adjacent to the central fultoportula in *T. binata*.

Thalassiosira conferta Hasle (Hasle & Fryxell, 1977, figs. 1-23; Lange *et al.*, 1983, figs. 10-12) differs from *T. catharinensis* by the position and diameter of the rimoportula, placed between two closely located fultoportulae with narrower external tube.

In addition, the comparison was also extended to other members of *Thalassiosira* belonging to the same group, *T. bulbosa* Syvertsen, *T. oceanica* Hasle and *T. partheneia* Schrader, not quoted for Argentina until now.

Table 1. Comparison between *Thalassiosira catharinensis* from Anegada Bay (this study) and Santa Catarina State based on the protologue. Abbreviations: nd, no data; *, measured or observed from the protologue's figures.

<i>Thalassiosira catharinensis</i>	Garcia & Bärwaldt Dutra (2016)	This study (n = 20)
Diameter in μm	4.4-6.6	6.2-7.4
Striation pattern	radial	radial
Valve mantle, areolae in height	1-2	2-3
Striae at the margin of the valve surface in 10 μm	nd ca. 50-60*	47-52
Areolae in 10 μm on valve face	39-48	39-43
Fultoportulae on valve face: number, location, morphology	1 central, with external and internal tube	1 central, with external and internal tube
Marginal fultoportulae in 10 μm , morphology	3.0-3.3, with external and internal tubes	3.0-3.4, with external and internal tubes
Number of satellite pores of the marginal fultoportulae	3, operculate*	3, operculate
Rimoportula	one, close to one fultoportula of the marginal ring, with external tube	one, close to one fultoportula of the marginal ring, with external tube
External aperture of the rimoportula	cylindrical tube, opening in different direction than the tubes of fultoportulae	cylindrical tube, opening in different direction than the tubes of fultoportulae

Thalassiosira bulbosa Syvertsen (Syvertsen & Hasle, 1984, figs. 1-32) has marginal fultoportulae with low bulb-shaped outer tubes while *T. catharinensis* presents cylindrical outer tubes, the marginal fultoportulae are denser in the former than in the latter (4.5 vs. 3.0-3.4) and rimoportula is placed between two fultoportulae in the former and next to one fultoportula in the latter.

Thalassiosira oceanica Hasle (Hasle, 1983, figs. 1-18; Park & Lee, 2010, figs. 15-22) has a marginal ridge structure between the fultoportulae absent in *T. catharinensis* and *Thalassiosira partheneia* Schrader (Schrader, 1972, figs. 1-12; Hasle, 1983, figs. 19-33) has long internal tubes of the marginal fultoportulae with two satellite pores while *T. catharinensis* has short internal tubes of the marginal fultoportulae with three satellite pores.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was supported by a grant from the Universidad Nacional de La Plata 11/N722 and had

the logistical support of the Dirección Provincial de Pesca of the Ministerio de Agroindustria, Province of Buenos Aires.

BIBLIOGRAPHY

- ALVERSON, A. J., S.-H. KANG & E. C. THERIOT. 2006. Cell wall morphology and systematic importance of *Thalassiosira ritscheri* (Hustedt) Hasle, with a description of *Shionodiscus* gen. nov. *Diatom Res.* 21: 251-262.
- FERRARIO, M. E. & E. A. SAR. 1988. Marine diatoms from Chubut (Argentina Republic) Centrales II - *Thalassiosira*. *Rev. Bras. Biol.* 48: 421-429.
- FERRARIO, M. E., E. A. SAR & S. E. SALA. 1995. Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. In: ALVEAL, K., M. E. FERRARIO, E. C. OLIVEIRA & E. SAR (eds.), *Manual de Métodos Ficológicos*, pp. 1-23. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- FRYXELL, G. A. & G. R. HASLE. 1979. The genus *Thalassiosira*: species with internal extensions of strutted processes. *Phycologia* 18: 378-393.

A. S. Lavigne et al. - *Thalassiosira catharinensis* from argentinean marine coastal waters

- GARCIA, M. & D. BÄRWALDT DUTRA. 2016. A new species of nanoplanktonic diatom: *Thalassiosira catharinensis* (Bacillariophyceae) from Southern of Brazil. *Phytotaxa* 288: 61-68.
- GARCIA, M. & W. MARESCCHI BISSA. 2016. First Record of *Thalassiosira laevis* Gao & Cheng for the Southern Hemisphere in the Atlantic Ocean. *Diatom* 32: 33-37.
- GAYOSO, A. M. 1989. Species of the diatom Genus *Thalassiosira* from a coastal zone of the South Atlantic (Argentina). *Bot. Mar.* 32: 331-337.
- HASLE, G. R. 1973. *Thalassiosiraceae*, a new Diatom Family. *Norw. J. Bot.* 20: 67-69.
- HASLE, G. R. 1983. The marine, planktonic diatoms *Thalassiosira oceanica* sp. nov. and *T. partheneia*. *J. Phycol.* 19: 220-229.
- HASLE, G. R. & G. A. FRYXELL. 1970. Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. *Trans. Amer. Microscop. Soc.* 89: 469-474.
- HASLE, G. R. & G. A. FRYXELL. 1977. *Thalassiosira conferta* and *T. binata*, two new diatom species. *Norw. J. Bot.* 24: 239-248.
- HASLE, G. R. & G. A. FRYXELL. 1978. Some *Thalassiosira* species with one central process (Bacillariophyceae). *Norw. J. Bot.* 25: 77-110.
- JOHANSEN, J., P. KOCIOLEK & R. LOWE. 2008. *Spicatricibra kingstonii*, gen. nov. et sp. nov. (Thalassiosirales, Bacillariophyta) from Great Smoky Mountains National Park, U.S.A. *Diatom Res.* 23: 367-375.
- KOCIOLEK, J. P., K. BALASUBRAMANIAN, S. BLANCO, M. COSTE, L. ECTOR, Y. LIU, M. KULIKOVSKIY, N. LUNDHOLM, T. LUDWIG, M. POTAPOVA, F. RIMET, K. SABBE, S. SALA, E. SAR, J. TAYLOR, B. VAN DE VIJVER, C. E. WETZEL, D. M. WILLIAMS, A. WITKOWSKI, & J. WITKOWSKI. 2017. DiatomBase. Available at: <http://www.diatombase.org> [Accessed: 2017-12-18].
- LANGE, C., R. M. NEGRI & H. R. BENAVIDES. 1983. Algunas especies del género *Thalassiosira* (Bacillariophyceae) del Mar Argentino. (Parte 1). *Iheringia, Ser. Bot.* 31: 9-30.
- MAKAROVA, I. V. 1994. The morphology of marine genera of the family Thalassiosiraceae Lebour emend Hasle. In: KOCIOLEK, J. P. (ed.), Proceedings of the 11th International Diatom Symposium. *Mem. Calif. Acad. Sci.* 17: 103-112.
- PARK, J. S. & J. H. LEE. 2010. A study on the fine structure of marine diatoms in Korean coastal waters: Genus *Thalassiosira* 5. *Algae* 25: 121-131.
- PARK, J. S., S. W. JUNG, J.-S. KI, R. GUO, H. J. KIM, K.-W. LEE & J. H. LEE. 2017. Transfer of the small diatoms *Thalassiosira proschkinae* and *T. spinulata* to the genus *Minidiscus* and their taxonomic re-description. *PLOS ONE* 12(9): e0181980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181980>
- PRYGIEL, J. & M. COSTE. 2000. *Guide Méthodologique pour la mise en ouvre de l'Indice Biologique Diatomées*. Agences de l'Eau, Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Direction de l'Eau & CEMAGREF, Cestas.
- ROSS, R., E. J. COX, N. I. KARAYEVA, D. G. MANN, T. B. B. PADDOCK, R. SIMONSEN & P. A. SIMS. 1979. An amended terminology for the siliceous components of the diatom cell. In: SIMONSEN, R. (ed.), Proceedings of the Fourth Symposium on Recent and Fossil Marine Diatoms. *Nova Hedwigia, Beih.* 64: 513-533.
- ROUND, F. E., R. CRAWFORD & D. G. MANN. 1990. *The Diatoms. Morphology and Biology of the Genera*. Cambridge University Press, London.
- SAR, E. A. 1996. Flora diatomológica de Bahía San Antonio (Prov. de Río Negro, Argentina) O. Centrales I. *Rev. Mus. La Plata* (n. s.) 14, *Bot.* 106: 365-400.
- SAR, E. A. & M. E. FERRARIO. 1987. Novedades sobre la distribución de *Thalassiosira curviseriata* Takano y *T. pacifica* Gran et Angst (Bacillariophyceae) en Argentina. *Gayana, Botánica* 44: 89-91.
- SAR, E. A. & I. SUNESEN. 2017. Morphological variability of the nanoplanktonic diatom *Thalassiosira laevis* from coastal waters of Province of Buenos Aires (Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 52: 617-622.
- SAR, E. A., I. SUNESEN & C. CASTAÑOS. 2001. Marine diatoms from Buenos Aires coastal waters (República Argentina). I. Thalassiosiraceae. *Nova Hedwigia* 73: 199-228.
- SAR, E. A., I. SUNESEN & A. S. LAVIGNE. 2002. The diatom genus *Thalassiosira*: species from the northern San Matías Gulf (Río Negro, Argentina). *Nova Hedwigia* 74: 373-386.
- SAR, E. A., I. SUNESEN, A. S. LAVIGNE & S. LOFEUDO. 2011. *Thalassiosira rotula* Meunier a heterotypic synonym of *Thalassiosira gravida* Cleve. Morphological evidence. *Diatom Res.* 26: 109-119.
- SCHRADER, H. J. 1972. *Thalassiosira partheneia*, eine neue Gallertlager bildende zentrale Diatomee. "Meteor" *Forsch. Ergebnisse* D 10: 58-64.
- STACHURA-SUCHOPLES, K. & D. M. WILLIAMS. 2009. Description of *Conticribrina tricircularis*, new genus and species of Thalassiosirales, with a discussion on its relationship to other continuous cribrata species of *Thalassiosira* Cleve (Bacillariophyta) and its freshwater origin. *Eur. J. Phycol.* 44: 477-486.
- SUNESEN, I. 2007. Diatomeas de ambientes costeros de la Provincia de Buenos Aires. Análisis taxonómico de los géneros que incluyen especies productoras de floraciones algales nocivas. Doctoral Thesis, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de la Plata.

SUNESEN, I. & E. A. SAR. 2004. *Thalassiosira fryxelliae* nov. spec. (Bacillariophyceae) from Argentinian coastal waters. *Bot. Mar.* 47: 238-247.

SYVERTSEN, E. E. & G. R. HASLE. 1984. *Thalassiosira bulbosa* Syvertsen, sp. nov., an Arctic marine diatom. *Polar Biol.* 3: 167-172.

TAKANO, H. 1965. New and rare Diatoms from Japanese marine waters - I. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 42: 1-10.

Recibido el 4 de enero de 2018, aceptado el 3 de abril de 2018. Editor: Gabriel Bernardello.

AN IMPROVED STAINING PROTOCOL FOR THE ASSESSMENT OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL IN BRYOPHYTES

AGUSTINA C. COTTET^{1*}, JOSE M. SCERVINO¹ y MARÍA I. MESSUTI¹

Summary: The most accepted method for staining arbuscular mycorrhiza (AM) in vascular plants has been one proposed by Phillips & Hayman in 1970. In particular, for the study of AM in bryophytes (*s.l.*) [Anthocerotophyta, Bryophyta (*s.s.*), Marchantiophyta] some authors have introduced modifications to this technique. Even though all these protocols stain AM, their main disadvantage is related to the result of material maceration (*e.g.* over-softening or completely destroying plant cells due to the high temperatures used, the high concentrations of reagents or the long-term exposure to aggressive chemicals). In order to optimise the results for the observation of AM in this group of plants, a modification is presented to the traditional staining technique. In the protocol here proposed, 70% ethanol is used as fixative and first clarifier, 1% potassium hydroxide (KOH) (80 °C, 20 min) as a second clarifier; 1% hydrochloric acid (HCl) (50 °C, 10 min) as an acidifier and 0.05% trypan blue (60 °C, 20 min) for dyeing. This improved protocol is not destructive, it is fast to perform and it is of wide application since it allows staining the AM in bryophytes.

Key words: Anthocerotophyta, Bryophyta, Marchantiophyta, staining protocol.

Resumen: Un protocolo de tinción mejorado para la visualización de micorrizas arbusculares en briofitas. El método tradicional más aceptado para la tinción de micorrizas arbusculares (MA) en plantas vasculares es el propuesto por Phillips & Hayman en 1970. En particular, para el estudio de las MA en briofitas (*s.l.*) [Anthocerotophyta, Bryophyta (*s.s.*), Marchantiophyta] algunos autores introdujeron modificaciones a esta técnica. Aunque todos estos protocolos tiñen las MA, su principal desventaja está relacionada con el resultado de la maceración del material (*e.g.* reblandecimiento excesivo o destrucción de las células vegetales por altas temperaturas utilizadas, altas concentraciones de reactivos o exposición prolongada a sustancias químicas agresivas). Para optimizar la observación de las MA en briofitas (*s.l.*), se desarrolló una adaptación a la técnica de tinción tradicional y sus modificaciones. En el protocolo aquí propuesto, se usa etanol 70% para fijar y como primer clarificador, hidróxido de potasio (KOH) 1% (80 °C, 20 min) como segundo clarificador; ácido clorhídrico (HCl) 1% (50 °C, 10 min) como acidificante y azul de tripán 0,05% (60 °C, 20 min) para teñir. Este protocolo mejorado no es destructivo, es rápido de realizar y es de amplia aplicación ya que permite teñir las MA en briofitas (*s.l.*).

Palabras clave: Anthocerotophyta, Bryophyta, Marchantiophyta, protocolo de tinción.

INTRODUCTION

The most accepted method for staining arbuscular mycorrhiza (AM) in vascular plants is one proposed by Phillips & Hayman (1970).

These authors, proposed fixation of root samples in formaldehyde-acetic acid-ethanol (FAA), then, clarify with 10% potassium hydroxide (KOH) (90 °C, 1 h); acidify with dilute hydrochloric acid (HCl); and stained with 0.05% trypan blue in lactophenol (room temperature, 5 min). Later, for the study of AM in plants included in bryophytes (*s.l.*), Anthocerotophyta, Bryophyta (*s.s.*) and Marchantiophyta, some authors have introduced modifications to the traditional protocol, such as temperature, time exposure, reagents concentration and type of dyes. For example, those proposed for Anthocerotophyta by Schüßler (2000), for

¹ Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad Nacional del Comahue, Quintral 1250, 8400 San Carlos de Bariloche, Argentina.

*Author for correspondence: agustina.c.cottet@gmail.com

Bryophyta (*s.s.*) by Zhang & Guo (2007), and for Marchantiophyta by Silvani *et al.* (2012).

Even though all these protocols stain AM hyphae, their main disadvantage is related to the result of material maceration (*e.g.* over-softening or plant cell destruction due to the high temperatures used, the reagents high concentrations or the long-time exposure to aggressive chemicals).

The objective of this work was to adapt the traditional technique of Phillips & Hayman (1970), and the subsequent modifications that were used in the study of AM of bryophytes (*s.l.*), allowing non-destructive staining of AM in representatives of this group of plants.

MATERIAL AND METHODS

Collection of materials

The specimens were collected by the random walk method. They were separated from the substrate by the aid of a knife and placed in properly labelled paper bags, and then taken to the laboratory for processing (Frahm, 2003).

Material conditioning

The collected specimens were conditioned with clamps and needles to extract the maximum possible substrate. In order to preserve them, from decomposing agents such as insects, they were placed for 7 days in a freezer at -18 °C (Ardiles Huerta *et al.*, 2008). The voucher specimens were deposited in BCRU herbarium.

Testing of different staining methods

Different proposed dyeing techniques were tested for mycorrhiza staining:

Phillips & Hayman (1970). The fresh roots were rinsed with water and fixed in FAA; later, clarified with 10% KOH (90 °C, 60 min); bleached (for pigmented material) with hydrogen peroxide (H₂O₂) 10 vol (20 °C, 10-60 min); acidified with dilute HCl; and stained with 0.05% trypan blue in lactophenol (at room temperature, 5 min) (Fig. 1 A).

Koske & Gemma (1989). The fresh roots were rinsed with water and fixed in 50% ethanol or isopropyl alcohol; later clarified with 2.5% KOH (121 °C, 3 min or 90 °C, 10-30 min); and, rinsed with water. If the roots have pigments

they are bleached in H₂O₂ for 10-30 min; rinsed with water; acidified with 1% HCl for (room temperature, 1-24 h); stained with trypan blue in acidic glycerol (121 °C, 3 min or 90 °C, 10-30 min) (Fig. 1 B).

Ligrone & Lopes (1989). Portions of the gametophytes were clarified with 10% KOH (90 °C, 1 h); stained with 0.05% trypan blue in lactophenol. Rhizoids are not clarified (Fig. 1 C).

Williams et al. (1994). The gametophytes were preserved in 70% ethanol and later fixed in acetic acid/ethanol (1:3 V/V) (Bryophyta) or frozen at -20 °C (Marchantiophyta); cleaned and subsequently stained with the protocol proposed by Koske & Gemma (1989).

Schüßler (2000). Portions of the gametophytes were extruded in agar/water culture; clarified with 10% KOH (121 °C, 10 min); rinsed three times in water; acidified with 3.7% HCl (at room temperature, 3 min); stained with 0.05% trypan blue in lactophenol (Fig. 1 D).

Zhang & Guo (2007). Whole gametophytes were rinsed and preserved in 50% ethanol; clarified with 10% KOH (92 °C, 20 min); acidified with lactic acid (at room temperature, 3 min); stained with 0.5% acid fuchsin (92 °C, 20 min) (Fig. 1 E).

Fonseca et al. (2009). Segments of culture gametophytes were fixed in the Bouin's fluid; clarified with 10% KOH (80 °C, 20 min); rinsed with distilled water; acidified with 37% HCl; stained with 0.05% trypan blue in aqueous solution (Fig. 1 F).

Hanke & Rensing (2010). Portions of gametophyte's stems were taken from the culture; clarified with 10% KOH (95 °C, several min); rinsed with water; acidified with 5% HCl (at room temperature, 3 min); stained with 1% trypan blue in aqueous solution (at room temperature, 10 min) (Fig. 1 G).

Newsham (2011). The gametophytes were rinsed with water; clarified with 10% KOH (at room temperature, 72 h); rinsed five times in water; acidified with 5% lactic acid (at room temperature, 1 h); stained with 0.01% aniline blue in lactic acid (at room temperature, 24 h) (Fig. 1 H).

Liepina (2012). Whole gametophytes were clarified with 10% KOH (90 °C, 20 min); acidified with lactic acid and stained with 0.5% cotton blue in aqueous solution (at room temperature, 20 min).

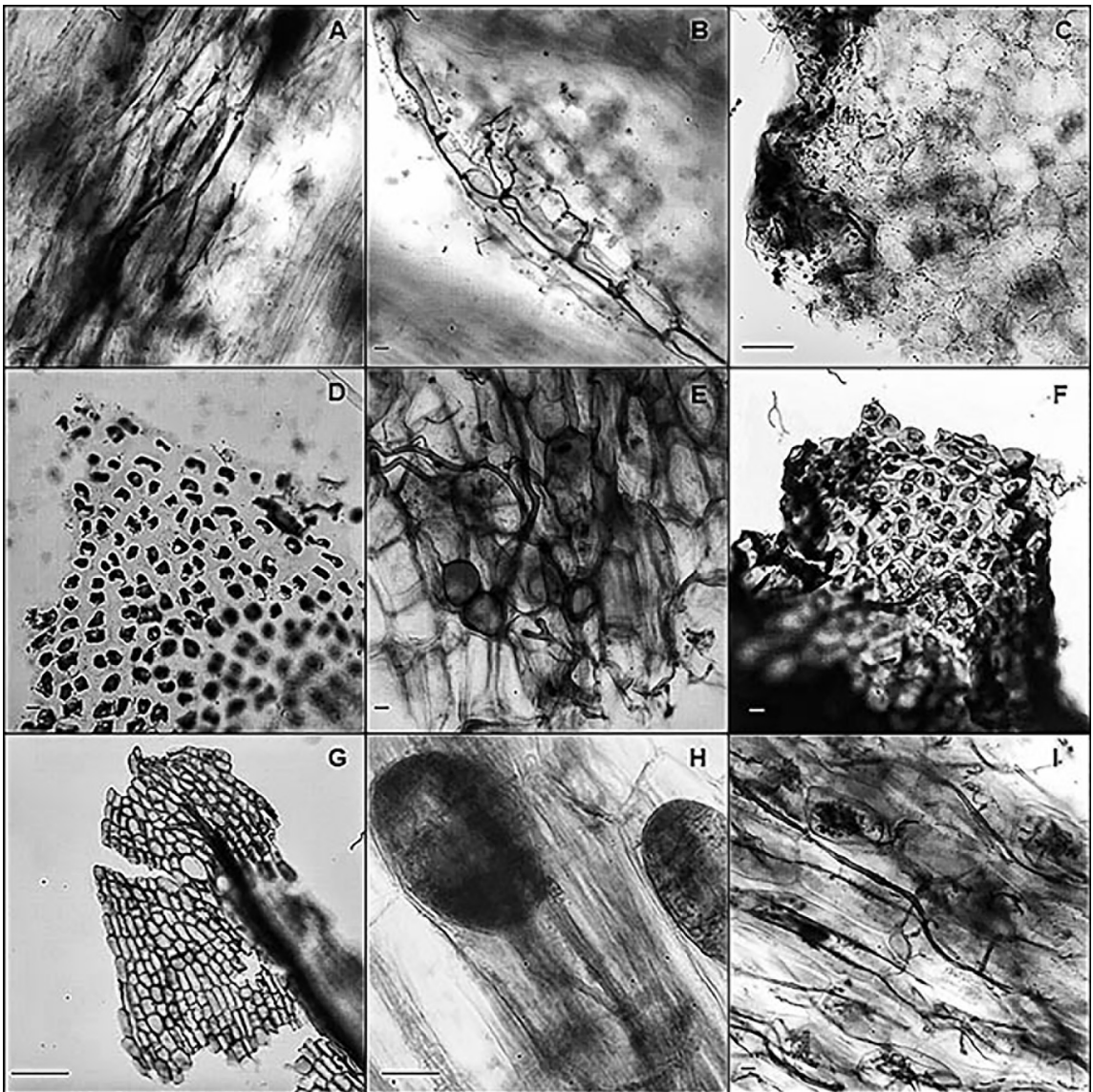


Fig. 1. Examples of testing of different staining methods for arbuscular mycorrhizal in bryophytes (*s.l.*). **A:** According to the protocol Phillips & Hayman (1970), Marchantiophyta. **B:** According to the protocol Koske & Gemma (1989), Bryophyta (*s.s.*). **C:** According to the protocol Ligrone & Lopes (1989), Anthocerotophyta. **D:** According to the protocol Schüßler (2000), Marchantiophyta. **E:** According to the protocol Zhang & Guo (2007), Anthocerotophyta. **F:** According to the protocol Fonseca *et al.* (2009), Marchantiophyta. **G:** According to the protocol Hanke & Rensing (2010), Bryophyta (*s.s.*). **H:** According to the protocol Newsham (2011), Anthocerotophyta. **I:** According to the protocol Fonseca *et al.* (2014), Marchantiophyta. Scale bars= 10 µm (Figs A-G, I); 100 µm (Fig H).

Silvani et al. (2012). Portions of culture gametophytes were clarified with 15% KOH (25 °C, 48 h); acidified with 4% HCl and stained with 0.1% trypan blue in lactic acid.

Fonseca et al. (2014). The gametophytes were fixed in 70% ethanol; clarified with 10% KOH (80 °C, 20 min); rinsed with distilled water; acidified with 37% HCl and stained with

0.05% trypan blue in aqueous solution (60 °C, 20 min) (Fig. 1 D).

Newsham et al. (2014). The gametophytes were clarified with 10% KOH (at room temperature, 24 h); rinsed three times in water; bleached with solution of 7.5% H₂O₂ and 0.7% ammonium hydroxide (at room temperature, 3 min); acidified with 5% lactic acid (at room temperature, 1 h) and stained with 0.01% aniline blue in lactic acid (at room temperature, 24 h).

Verma & Langer (2014). The gametophytes were clarified with 0.01% KOH (100 °C, 2-3 h, and later kept at room temperature, 1 h); rinsed three or four times in water and stained with trypan blue in lactophenol.

Observation of stained gametophytes with the tested protocols

To observe the result obtained after the application of each protocol tested, the gametophytes were cut in sagittal sections with a razor blade, and examined under an optical microscope. All photographs for Figs. 1 and 2 were taken using a compound microscope Olympus BX50, connected to a Lumenera Infinity 1 digital camera.

RESULTS

For the visualization of AM in gametophytes, all the techniques tested in this work showed significant softening of the material and morphological and anatomical modifications of the tissues. Hence, we present a modification to the different techniques used for staining of AM, which allows the visualization of AM in the bryophytes (*s.l.*) (Fig. 2).

The proposed protocol consists of cleaning the gametophytes with water and fixing them in 70% ethanol. Subsequently, clarify them in two steps: first, using the fixing agent at 50 °C until the total evaporation of the liquid, and rinsing the gametophytes once in water; and second, using 1% KOH (80 °C, 20 min); rinse the gametophytes one time in water. Then acidify with 1% HCl (50 °C, 10 min); rinse the gametophytes once in water. Finally stain with 0.05% trypan blue in aqueous solution (60 °C, 20 min); rinse the gametophytes twice in water.



Fig. 2. Examples of gametophytes staining with the new improved protocol for the observation of arbuscular mycorrhizal. **A:** Anthocerotophyta. **B:** Bryophyta (*s.s.*). **C:** Marchantiophyta. Scale bars = 10 µm.

DISCUSSION

While in the past vascular plants roots were fixed in FAA, the gametophytes of bryophytes were fixed with 50% ethanol or 70% ethanol or acetic acid/ethanol (1:3 V/V) or preserved in freezer at -20 °C without fixer. The advantages of working with 70% ethanol are that it preserves the material under optimum conditions, both its morphology and anatomy, and that when it is fixed the process of clarification begins, which is the first step of the staining protocol.

In all tested protocols in this work (see above) the clarification of the material is done with KOH, however there is no regularity regarding the concentration, temperature and time of exposure between them. The concentration ranges from 0.01% to 15%, the temperature from 25 °C (at room temperature) to 121 °C and the exposure time from 3 min to 72 h. Generally speaking, when the concentration (10%) and the temperature (121 °C) increase, the time is reduced (3 to 10 min); this is very harmful for the plant cells, which are partially or totally destroyed, and subsequent visualization of AM cannot be realised. On the other hand, if the concentration (15%) is increased and the temperature is reduced, the exposure time is prolonged (24-72 h); although in this case the cells are not destroyed, this method requires a long-time to be finished. In the method here presented, a first clarification is proposed with 70% ethanol (50 °C, until total liquid evaporation) and a second clarification with 1% KOH (80 °C, 20 min). The first clarification causes a partial decolourization that dehydrates the cells allowing a greater penetration of the KOH in the second clarification; this method is quick to perform and does not destroy the gametophytes.

In order to bleach pigmented plants, some methods propose using H₂O₂ to depigment roots and gametophytes cells. Instead, this new protocol presents two stages of clarification, where this last bleaching step is not necessary, as the cells are sufficiently clarified for the correct visualization of AM.

The acidification process, in the past, employed mainly two acids, HCl and lactic acid, the concentrations of which varied from 1% to 5% and 5% to 85% respectively. Both methods of acidification were performed at room temperature and the exposure time ranged from 3 min to 24 h for HCl and from 3 min to 1 h for lactic acid. The use of HCl presents advantages in that it does not destroy the material, which maintains its original texture, whereas the use of lactic acid converts the material to a “gummy” texture that does not allow precision in the sagittal cutting of the gametophytes. In the past, as for the wide ranges for HCl concentrations, namely 1% to 37%, none of the tested methods deteriorated the material. In this modified staining technique, there is applied only a low concentration of HCl (1%), and the temperature is increased to reduce the exposure time (50 °C, 10 min).

Finally, with regard to the staining stage, the dye commonly used is trypan blue, although others, such as acid fuchsin, aniline blue and cotton blue, are also used less frequently. The main variations regarding the use of trypan blue consist in the compounds in which the solution is made (lactophenol, lactic acid, water and acidic glycerol). For the study of AM in bryophytes it is here proposed to use trypan blue in aqueous solution (0.05%), since the material retains the original texture and the sagittal cuts of the gametophyte can be made for ease of observation of AM.

Although the tested methods have been used previously with some favourable results for the study of bryophytes, they can be destructive or impractical. From our observations, we can say that the protocol here presented is not destructive, it is fast to perform, and it is of wide application since it may be used to stain AM in representatives of the three phyla of bryophytes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and Universidad Nacional del Comahue (UNComahue).

BIBLIOGRAPHY

- ARDILES HUERTA, V., J. CUVERTINO & F. OSORIO. 2008. *Guía de campo briofitas de los bosques templados australes de Chile. Una introducción al mundo de los musgos, hepáticas y antocerotes que habitan los bosques de Chile*. Concepción: Corporación Chilena de la Madera.
- FONSECA, H. M. A. C., R. L. BERBERA & M. L. PEREIRA. 2014. Monoxenic cultures of light sensitive arbuscular mycorrhizal fungi with *Lunularia cruciata* (Marchantiopsida). *Nova Hedwigia* 98: 79-87.
- FONSECA, H. M. A. C., J. I. L. FERREIRA, R. L. L. BERBARA & N. P. ZATORRE. 2009. Dominance of *Paris*-type morphology on mycothallus of *Lunularia cruciata* colonised by *Glomus proliferum*. *Braz. J. Microbiol.* 40: 96-101.
- FRAHM, J. P. 2003. Manual of tropical bryology. *Trop. Bryol.* 23: 1-200.
- HANKE, S. T. & S. A. RENSING. 2010. *In vitro* association of non-seed plant gametophytes with arbuscular mycorrhizal fungi. *Endocytobiosis Cell. Res.* 20: 95-101.

- KOSKE, R. E. & J. N. GEMMA. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92: 486-505.
- LIEPINA, L. 2012. Occurrence of fungal structures in bryophytes of the boreo-nemoral zone. *Environ. Exp. Bot.* 10: 35-40.
- LIGRONE, R. & C. LOPES. 1989. Cytology and development of a mycorrhiza-like infection in the gametophyte of *Conocephalum conicum* (L.) Dum. (Marchantiales, Hepatophyta). *New Phytol.* 111: 423-433.
- NEWSHAM, K. K., M. P. GOODALL-COPESTAKE, R. OCHYRA & J. VÁÑA. 2014. Mycothalli of the hepatic *Barbilophozia hatcheri* in Antarctica: distribution and identities of mycobionts. *Fungal Ecol.* 11: 91-99.
- NEWSHAM, K. K. 2011. Structural changes to a mycothallus along a latitudinal transect through the maritime and sub-Antarctic. *Mycorrhiza* 21: 231-236.
- 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. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- SCHÜßLER, A. 2000. *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* 10: 15-21.
- SILVANI, V. A., C. P. ROTHEN, M. A. RODRÍGUEZ, A. GODEAS & S. FRACCHIA. 2012. The thalloid liverwort *Plagiochasma rupestre* supports arbuscular mycorrhiza-like symbiosis in vitro. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 3393-3397.
- VERMA, M. & A. LANGER. 2014. Studies on AM associations in *Marchantia nepalensis* L. et L. *J. Pharm. Biol. Sci.* 9: 26-29.
- WILLIAMS, P. G., D. J. ROSER & R. D. SEPPELT. 1994. Mycorrhizas of hepatics in continental Antarctica. *Mycol. Res.* 98: 34-36.
- ZANG, Y. & L. D. GUO. 2007. Arbuscular mycorrhizal structure and fungi associated with mosses. *Mycorrhiza* 17: 319-325.

Recibido el 28 de noviembre de 2017, aceptado el 18 de abril de 2018. Editor: Guillermo Suárez.

APPLICATION OF SiO_2 NANOPARTICLES AS PRETREATMENT ALLEVIATES THE IMPACT OF DROUGHT ON THE PHYSIOLOGICAL PERFORMANCE OF *PRUNUS MAHALEB* (ROSACEAE)

PEYMAN ASHKAVAND^{†1}, MEHRDAD ZARAFSHAR^{†2}, MASOUD TABARI¹, JAVAD MIRZAI³, AMIRREZA NIKPOUR⁴, SEYED KAZEM BORDBAR², DANIEL STRUVE⁵ and GUSTAVO GABRIEL STRIKER^{6*}

Summary: We studied the physiological responses of *Prunus mahaleb* (Mahaleb) seedlings to drought stress when previously irrigated (or not) with different concentrations of SiO_2 nanoparticles (SNPs). SNPs were applied at four concentrations (0, 10, 50 and 100 mg L⁻¹) for 45 days, and then seedlings were subjected to three watering treatments including low (300 mL water every 3 d), moderate (150 mL water every 3 d) and severe drought stress (no irrigation) for 19 days. Results showed that gas exchange – photosynthesis, stomatal conductance, and transpiration rate – were significantly less impacted by severe drought stress when seedlings were pretreated with SNPs at high concentrations. Beneficial effects of SNPs pretreatment were evident in the nutritional status of the plants as the concentration of N, P and K, were maintained at similar levels than in well-watered seedlings. Pretreated seedlings were able to maintain the root length and to reduce the impact of severe drought on root dry mass accumulation. Therefore, application of SNPs as pretreatment should be considered as a promising agronomic practice in sites prone to suffer from water deficit.

Key words: Pre-treatment, Silica nanoparticles, drought, stress alleviation, photosynthesis.

Resumen: La aplicación de nanopartículas de SiO_2 como pretratamiento disminuye el impacto de la sequía en la performance fisiológica de *Prunus mahaleb* (Rosaceae). En este trabajo se estudiaron respuestas fisiológicas de *Prunus mahaleb* (Mahaleb) a la sequía luego de la aplicación de diferentes concentraciones de nanopartículas de SiO_2 (SNPs) por irrigación como pretratamientos. Se aplicaron 4 concentraciones de SNPs (0, 10, 50 and 100 mg L⁻¹) durante 45 días y, a posteriori, las plantas fueron sujetas a tres regímenes hídricos que incluyeron control (300 mL cada 3 días), estrés hídrico moderado (150 mL cada 3 días) y estrés hídrico severo (sin riego) por 19 días. El intercambio de gases – fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración – se redujo menos frente a la sequía en las plantas que recibieron pretratamientos con SNPs. El estado nutricional de las plantas tratadas con SNPs visto por la concentración de N, P y K se mantuvo bajo sequía moderada. Las plantas pretratadas con SNPs mantuvieron el largo de sus raíces y sufrieron menor impacto en su biomasa radical ante sequía. Se concluye que la aplicación de SNPs como pretratamiento podría ser una práctica agronómica para sitios propensos a déficit hídricos en épocas cercanas a la plantación.

Palabras clave: Nanopartículas de sílice, fotosíntesis, sequía, pre-tratamiento, mitigación de estrés.

† These authors contributed equally to this work

¹ Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Iran.

² Department of Natural Resources, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Fars, Iran.

³ Department of Forest Sciences, Faculty of Agriculture, University of Ilam, Iran.

⁴ Department of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.

⁵ Department of Horticulture and Crop Science, 2001 Fyffe Ct, The Ohio State University, USA.

⁶ IFEVA, Universidad de Buenos Aires, CONICET, Facultad de Agronomía, Avenida San Martín 4453, CPA 1417, DSE Buenos Aires, Argentina. * Corresponding author e-mail: striker@agro.uba.ar

INTRODUCTION

Drought stress, as multidimensional abiotic stress, strongly affects growth, development, and yield of plants (Mahajan & Tuteja, 2005). Undoubtedly, understanding mechanisms that plants use to deal with drought stress are important. However, equally important are cultural methods enhancing natural drought tolerance (Sacala, 2009). Given that conventional fertilisers can have adverse effects on the environment and potentially on food quality, researchers are now investigating the potential use of nanotechnology to reduce the negative impact of abiotic stresses in plants (Asadzade *et al.*, 2015; Chen & Yada, 2011; Haghighi & Pessarakli, 2013). Nanosciences have led to the development of a wide range of applications for enhancing of plant growth (Nair *et al.*, 2010). Carbon-based, metal oxides, quantum dots, nano-sized polymers and biocomposites materials in plant science are being developed (Khot *et al.*, 2012). Nanomaterials are materials with a particle size between 1 and 100 nm and implicate new physical, chemical and biological properties compared to bulk size materials (Monica & Cremonini, 2009). Also, some researchers think that absorption of nanoparticles in plants is greater than the same chemicals applied to the plant in bulk size (Braunack, 1995; Suriyaprabha *et al.*, 2012). Although some recent studies on the effects of SiO₂ nanoparticles (hereafter SNPs) on plant growth have been performed, these studies are still scarce. For instance, Bao-shan *et al.* (2004) immersed the roots of Changbai larch (*Larix olgensis*) seedlings in 62 to 2000 µl L⁻¹ concentrations of nanosilica for 6 hours and showed positive effects of silicon nanoparticles on seedling's growth. In addition, Haghighi *et al.* (2012) applied nano-silicon to tomato seeds and seedlings subjected to salt stress and concluded that nano-silicon application reduced the deleterious effects of salinity on germination; root length and plant dry weight. Also, Haghighi & Pessarakli (2013) showed that application of silicon in nano and bulk size was beneficial in improving the salt tolerance of tomato plants. SNPs improved seed germination and seedling growth of lentil (*Lens culinaris* Medik) under salinity stress (Sabaghnia & Janmohammadi, 2015). Zarafshar *et al.* (2015) reported no toxic effects of SNPs on pear seedlings even when the seedlings were irrigated with high concentrations of SNPs. Nevertheless, the silicon nanoparticles role on

plant physiological behaviour is poorly understood (Lee *et al.*, 2010; da Silva Lobato *et al.*, 2013). In fact, Si is the second most abundant element in soil, however, is not considered as an essential plant mineral nutrient; but its beneficial effects on growth of many plants, especially growing under biotic and abiotic stress conditions have been demonstrated (Chalmardi *et al.*, 2014; Ma & Yamaji, 2006, 2015). In previous research, investigators have shown that silicon enhances plants resistance to drought, salinity, cold, heat, and metal toxicity. For example, Ashkavand *et al.* (2015) found that SNPs play a positive role in maintaining critical physiological and biochemical functions in Hawthorn seedlings subjected to drought stress. Thus, it seems that the application of silicon nanoparticles looks promising (and non-expensive) agronomic practice to reduce detrimental environmental effects due to drought (Xie *et al.*, 2015; Balakhnina & Borkowska, 2013).

The present study aimed to test the effects of SNPs pre-treatments on subsequent drought stress responses of *Prunus mahaleb* seedlings, a woody species widely distributed in western and central Asia, and Mediterranean countries (Özçelik *et al.*, 2012). Our working hypothesis is that SNPs pretreatment alleviates the detrimental effects of a subsequent drought due to a reduced impact on root growth and elongation (concerning non-SNPs pre-treated seedlings). We expect that under severe drought SNPs pretreated seedlings have a better physiological performance regarding higher photosynthesis and stomatal conductance, lower accumulation of proline, reduced lipid peroxidation and lower chlorophyll degradation concerning that of seedlings non-pretreated with SNPs.

MATERIALS AND METHODS

Experimental materials

In late winter 108 dormant (uniformly-sized) one-year-old Mahaleb seedlings (*Prunus mahaleb* L. or syn. *Cerasus mahaleb* L. Mill. Rosaceae) were obtained from an Iranian forest nursery, and transferred to the experimental garden facility at the Faculty of Natural Resources and Marine Sciences of Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, IRAN (Latitude 35° 43' 46" N, longitude 51° 23' 15" E). The seedlings were transplanted to plastic pots (7 L) containing a mixture of forest brown soil,

river sand, and clay (2:1:1 v/v/v) and grown in a greenhouse with day/night average temperatures of 30/21 °C. The soil contained 28%, 46% and 26% of silt, sand and clay (respectively), 0.87% of organic carbon, and 30 ppm of available phosphorus.

Examined material. IRAN, Mazandaran, Noor, 14-II-2015, P. Ashkavand 81-85 (HKS, Research Center of Agricultural and Natural Resources Kurdistan Province).

Nanoparticles pre-treatments and imposition of drought stress

After potting, SNPs (acquired from Tecnología Navarra de Nanoproductos S.L., Spain) were applied at four concentrations (0, 10, 50 and 100 mg L⁻¹) for 45 d. The SNPs were white coloured, within a size range of 10 to 15 nm, and specific surface area ranging from 180 to 270 m²g⁻¹. The seedlings were irrigated to field capacity (300 mL pot⁻¹) with SNPs suspensions every three days. There were 27 seedlings in each SNPs treatment. At the end of the SNPs treatments (day 45), seedlings in each SNPs treatment were randomly allocated to one of three soil moisture stress groups ($n=9$). Seedlings were then subjected to three watering treatments consisting on irrigation with tap water every three d with (i) 300 mL pot⁻¹ (*i.e.* control/low stress), (ii) 150 mL pot⁻¹ (*i.e.* moderate stress) and (iii) no irrigation (*i.e.* severe stress). The criterion used to finish the experiment was the beginning of leaf rolling in seedlings subjected to severe drought, which occurred after 19 d of treatments.

Plant physiological parameters measurements

Net photosynthesis (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), stomatal conductance (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and transpiration rate (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were measured at 7, 14 and 19 d after the watering treatments began. They were made on 2-3 leaves from the upper third of each plant of six randomly selected individuals. Measurements were done on sunny days (between 09:00 and 11:00h) at temperatures ranging from 22 to 28 °C, using a portable infrared gas analyser (Model LCpro+, ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK). Average values of leaf temperature and internal CO₂ concentrations were 27.5±3.1 °C and 340±11.9 ppm, respectively.

Predawn xylem stem water potential (ψ_{stem} , MPa) was measured with a pressure chamber system supplied with compressed nitrogen (Skye, SKPM 1400, UK) on day 19. Complementarily, relative water

content (RWC) of leaves was determined at midday (from 13 to 15 pm where maximum evaporative demand potentially occur) according to the following description: four leaves (located in the upper third of plants) were removed from randomly selected plants in each treatment, immediately weighed (W_i), and placed in tubes with deionized water for 24 h at room temperature under low light. After that, individual leaves were reweighed to determine their turgid weights (W_f). Finally, the samples were placed in an oven at 60 °C for 48 h and then reweighed to obtain their dry weights (W_d). RWC was calculated by the following equation:

$$\text{RWC} = [(W_i - W_d) / (W_f - W_d)] * 100$$

Plant morphological parameters and growth

At the end of the experiment (*i.e.* day 19 after a drought), the primary stem length, collar diameter, longest root, and root volume of all seedlings were measured. Root length was measured using a scaled ruler, and root volumes were measured through water displacement in graduated cylinders. Afterwards, seedlings were harvested separating roots and shoots (*i.e.* aerial organs), and then all tissues were oven dried for 48 h at 70 °C to obtain their corresponding dry weights.

Determination of thiobarbituric acid-reactive-substances (TBARs) and membrane electrolyte leakage (ELI)

Thiobarbituric acid reaction (TBA) was measured as described by Heath & Packer (1968). Leaf fresh mass (200 mg) was homogenised in 2 ml of 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), followed by centrifugation at 12.000 × g for 20 min. The supernatant (1 mL) was mixed with an equal volume of TCA (10%) containing 0.5% (w/v) TBA or no TBA as the blank and heated at 95°C for 30 min and then cooled in ice. The reaction product was centrifuged at 12.000 × g for 15 min, and the supernatant absorbance was measured at 400, 532 and 600 nm.

Leaves were cut into 1-to-2 cm² pieces and placed in test tubes with 20 mL deionised distilled water (0.5-0.8 g fresh leaf tissue per sample). After vortexing, the samples for 3 s, the initial electrical conductivity (EC_0) of each sample was measured. The samples were stored at 4°C for 24 h, and conductivity (EC_1) was measured again. Samples

were then autoclaved for 15 min, cooled to room temperature, and conductivity (EC_2) was measured for the third time. The electrolyte leakage index (ELI) of cell membranes was calculated using a modification of the method of Zhao *et al.* (1992) as:

$$ELI (\%) = [(EC_1 - EC_0) / (EC_2 - EC_0)] * 100$$

Measurements of biochemical parameters

At the end of the experiment, fresh leaf samples were covered with aluminium foil, frozen in liquid nitrogen and stored at $-85^\circ C$ until used for biochemical analysis. Chlorophylls and carotenoids were extracted from leaf samples in 80% v/v acetone, and their contents were determined by spectrophotometry according to Gholami *et al.* (2012). Free proline content in leaves was quantified following the procedure of Bates *et al.* (1973) as cited by Nikolaev *et al.* (2010).

Microscopic observations

At the end of the experiment, the fresh root sections were taken for microscopic analysis. The adsorption of SNPs to fresh roots was observed by scanning electron microscopy (SEM) (KYKY-EM3200) in the laboratory of Tarbiat Modares University.

Measurements of leaf nutrient elements

Oven-dried leaves were pulverised in an electric mill. The powdered leaf tissues were transmitted to the atomic energy organisation of Iran (AEOI). The concentrations of Si, N, P, and K were detected by X-ray fluorescence analysis (XRF; ED 2000 Oxford Instruments Corporation) following the methodological considerations by Towet *et al.* (2016).

Statistical analysis

Physiological data were analysed through repeated measures ANOVA (rmANOVA). All other variables were assessed using two-way ANOVAs in a fixed factor model. For comparison between groups, Duncan's multiple range tests were applied at 0.05 probability level. In case of percentage data, arcsine transformation was applied before ANOVA analyses. All data were tested for normality, homogeneity of variance and Mauchly's test before ANOVA. Statistical analyses were performed using SPSS software (IBM SPSS Statistics).

RESULTS

Confirmation of the presence of SNPs in treated roots

Elements consistent in size with the SNPs were adsorbed by the roots in the treated seedlings but not in the untreated ones (Data not shown). Observation of the root system of treated plants revealed the presence of nanoparticles attached to the roots at the highest SNPs concentration (100 mg L^{-1}) while few nanoparticles were observed in roots treated with SNPs of 10 and 50 mg L^{-1} .

Effect of SNPs pre-treatments on leaf physiological parameters

There were no differences in leaf physiological parameters between SNP-treated and untreated seedlings before drought stress. The photosynthesis rate (A), stomatal conductance (gs) and transpiration (E) were affected by SNPs treatments after drought stress (repeated measures ANOVA; treatment and treatment x time effect: $P < 0.001$). The positive effect of SNPs pre-treatments on A and gs was evident after 19 days of no irrigation (severe water stress; Fig. 1 right panels), where seedlings pretreated with 50, and 100 mg L^{-1} SNPs registered significantly higher values for such parameters than those of control plants (i.e. with no addition of SNPs). Under moderate water stress (150 mL every 3 d), the beneficial effects of SNPs application were less notorious for all variables than under severe drought. Under well-watered conditions (300 mL every 3 d), application of SNPs did not provoke any significant effect on the physiological parameters measured (Fig. 1 left panels). Responses in E paralleled those of gs in most of the cases under either water treatment condition.

Root morphology and biomass responses to drought as affected by SNPs pre-treatments

Under severe water stress (no irrigation for 19d), seedlings pretreated with any concentration of SNPs had longer roots than those of non treated with SNPs (Fig. 2A). Under moderate stress conditions (150 mL every 3 d) the pattern was less obvious although longer roots were recorded on seedlings pretreated with 50 mg L^{-1} SNPs with respect to all other concentrations. Interestingly, the use of SNPs on well-watered conditions (300 mL every 3 d) was also positive on the length of roots, where longer roots were attained at increasing concentration of SNPs

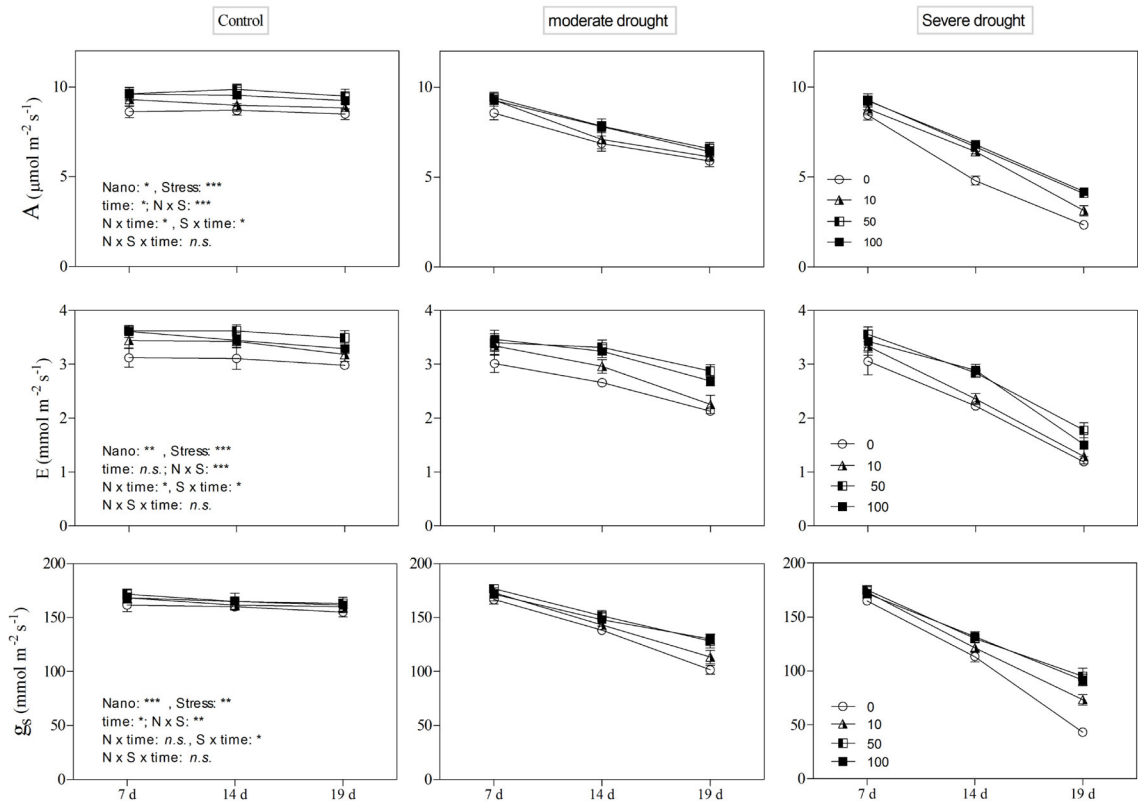


Fig. 1. Responses of photosynthesis rate (A), stomatal conductance (g_s) and leaf transpiration rate (E) of *Prunus mahaleb* seedlings pretreated with different concentration of SNPs during 45 days, and subsequently subjected to 19 days to three irrigation treatments (0, 150 and 300 mL of water every 3 days [severe drought, moderate drought and well-watered controls, respectively]). Gas exchange measurements were done using a portable infrared gas analyser (Model LCpro+, ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK) on fully expanded leaves located in the upper third of the plant of six randomly selected individuals at days 7, 14 and 19 after drought. (Mean \pm SE; n=6). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; n.s.: $P > 0.05$.

applied (Fig. 2A). Root volume of plants subjected to moderate drought was less enhanced by SNPs application than root length, suggesting that these roots also had a lower diameter (Fig. 2B). In contrast, seedlings growing under both moderated stress and well-watered conditions displayed an increase in root volume than root length when SNPs were applied at 50 and 100 mg L⁻¹ (Fig. 2B), which suggest an increase in root diameter. In general, positive effects of SNPs on the whole plant dry weights under three irrigation regimes were observed. Root biomass was slightly higher in plants pretreated with SNPs, but shoot biomass was not (Fig. 2C). These responses viewed in dry mass terms were in line with the better physiological performance and the increase in root

lengthening due to the use of SNPs previous to the drought treatment application.

Water relations and biochemical parameters responses to drought in seedlings pretreated with SNPs

Relative leaf water content (RWC) decreased with increasing severity of the drought, but it was not affected by SNPs pre-treatments (Fig. 3A). Xylem water potential (XWP) was affected by drought depending on SiO₂NPs pre-treatment. On this note, higher XWP was detected in seedlings subjected to severe drought at increasing application of SNPs, thereby a better water status was seen particularly in those seedlings pretreated with 100 mg L⁻¹ of

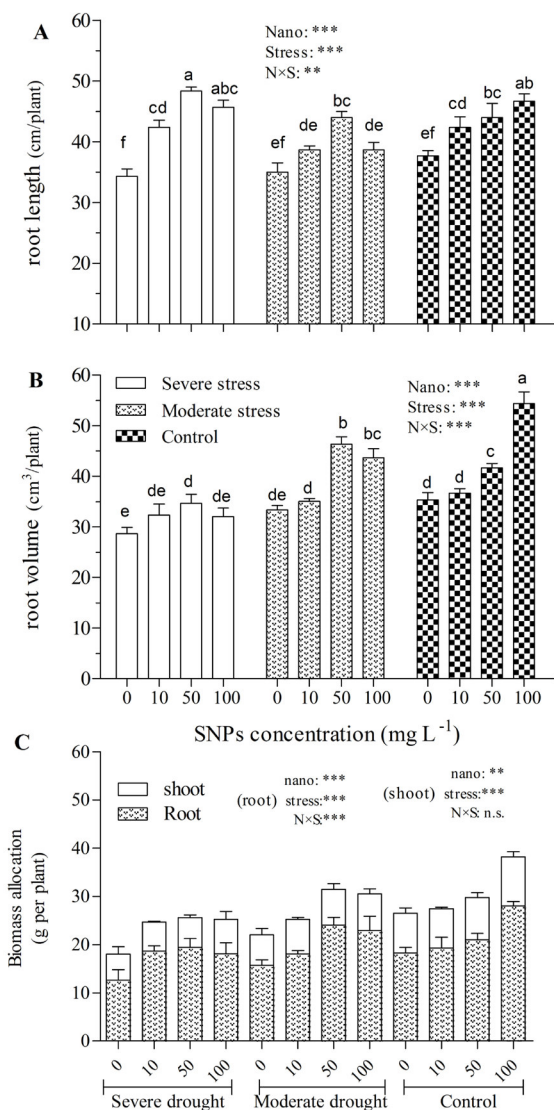


Fig. 2. A: Root length, **B:** root volume, **C:** and biomass allocation of *Prunus mahaleb* seedlings pre-treated with different concentration of SNPs during 45 days, and subsequently subjected to 19 days to three irrigation treatments (0, 150 and 300 mL of water every 3 days [severe drought, moderate drought and well-watered controls, respectively]).

SNPs in the severe drought regime (Fig. 3B). Under moderate stress conditions, the beneficial effect of nanoparticles on XWP was true for those seedling pretreated with 50 and 100 mg L⁻¹ of SNPs under severe or moderate drought. Under well-watered conditions, XWP – naturally higher on average

than under water stress – was similar irrespective of SNPs pretreatment (Fig. 3B). The electrolyte leakage index (ELI) values registered in tissues of seedlings subjected to severe drought were more than 2-fold higher than those of seedlings exposed to moderate stress or irrigated conditions, which did not differ for this parameter (Fig. 3C). Application of SNPs did not change ELI under either irrigation treatment. TBARs in leaf tissues, as an indicator of lipid peroxidation, was affected by SNPs depending on the irrigation regime (see the significant interaction between factors in Fig. 3D). The highest values for TBARs were registered under severe drought in non-SNPs pretreated plants. Also, SNPs application at higher concentration (100 mg L⁻¹) under severe drought determined a significant reduction in TBARs comparable to the values obtained under moderate drought (Fig. 3D). These results are in line with the slightly better water status of plants pretreated with SNPs at higher concentration under stressful drought conditions. It should be noticed that TBARs values allowed to distinguish the protection by SNPs when under severe drought conditions while ELI did not (compare Fig. 3C and Fig. 3D).

Total chlorophyll concentration in non-SNPs pretreated seedlings decreased by 33% under severe drought (Table 1). SNPs pretreatment (50 and 100 mg L⁻¹) enhanced chlorophyll concentration in seedlings subjected to severe drought. Moderate drought conditions did not affect this parameter when SNPs under either concentration was previously applied (Table 1). Under severe drought, carotenoids were progressively higher at increasing SNPs concentrations as pretreatments (1.40 vs 2.77 mg/g in seedlings non-SNPs-treated and treated with 100 mg L⁻¹ of SNPs), even clearer than when under moderate drought conditions (Table 1). The concentration of free proline was highest under severe stress in seedling that did not receive SNPs application. Interestingly, SNPs used as a pretreatment at 50 and 100 mg L⁻¹ determined a 24-27% reduction in proline concentration in leaves (Table 1). Under moderate drought, the values for this parameter were similar than those obtained from control seedlings.

Effect of SNPs pre-treatments on leaf concentrations of N, P, K and Si after drought

To verify the effect of SNPs pretreatments on the nutrient uptake in Mahaleb seedlings, we studied the concentrations of three main mineral elements such

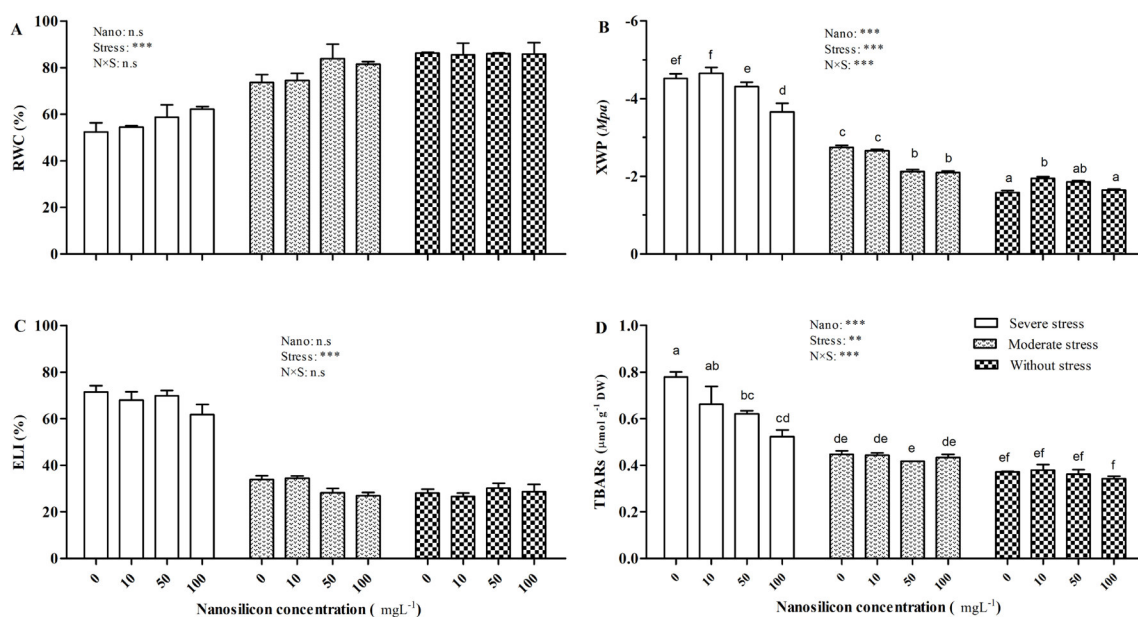


Fig. 3. Water relations parameters (A: relative water content, B: xylem water potential, C: electrolyte leakage index-ELI and D: thiobarbituric acid-reactive-substances (TBARS) of *Prunus mahaleb* seedlings pretreated with different concentration of SNPs during 45 days, and subsequently subjected to 19 days to three irrigation treatments (0, 150 and 300 mL of water every 3 days [severe drought, moderate drought and well-watered controls, respectively]). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments based on the Duncan tests. (Mean \pm SE; $n=6$). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; *n.s.*: $P > 0.05$.

as N, P and K, and also Si in seedlings subjected to severe drought (no irrigation during 19 d) and well-watered control by applying X-ray fluorescence. The concentration of N in leaves under severe drought was higher in seedlings pretreated with 50 and 100 mg L⁻¹ SNPs compared to those non-treated with SNPs (Fig. 4B). Furthermore, improvement in leaf N concentration by SNPs when in severe drought determined that such parameter reached similar values than those of well-watered control seedlings (Fig. 4B). The concentration of P in leaf tissues in seedlings exposed to drought was enhanced by pretreatment with high doses of SNPs (*i.e.* 50 and 100 mg L⁻¹) compared to those non-pretreated with SNPs (Fig. 4C). Interestingly, seedlings growing under well-watered conditions had higher leaf P concentrations when pretreated with either SNPs concentration with respect to those that did not receive SNPs application as a pretreatment (Fig. 4C). In the case of K, SNPs application did not affect the concentration of K in leaves, except 100 mg L⁻¹ SNPs pretreatment of

well-watered seedlings, which attained a slightly higher K concentration with respect to all other treatment combinations (Fig. 4D). Finally, Si concentration in leaf tissues was significantly higher at increasing SNPs concentrations when seedlings grew under control conditions (Fig. 4A) whereas in seedlings subjected to drought a similar increase in leaf Si concentration was observed at either SNPs pretreatment (10, 50 and 100 mg L⁻¹), which was higher than of seedlings non-pretreated with SNPs (Fig. 4A).

DISCUSSION

The application of Si nanoparticles (SNPs) can improve the growth of several crops and increase their tolerance to biotic and abiotic stresses (Richmond & Sussman, 2003; Ma, 2004; Ahmed *et al.*, 2014) but data on woody plants (and particularly in tree fruit species) were scarce. In our research, we have applied different concentrations

Table 1. Total chlorophyll, carotenoids and free proline concentrations (dry weight basis) of *Prunus mahaleb* seedlings pretreated with different concentration of SNPs during 45 days, and subsequently subjected to 19 days to three irrigation treatments (0, 150 and 300 mL of water every 3 days [severe drought, moderate drought, and well-watered controls, respectively]). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among treatments based on the Duncan tests. (Mean \pm SE; $n=6$).

Treatment	Control	Moderate Drought	Severe Drought
Chlorophyll a+b ($\mu\text{g/g}$)			
0 mgL ⁻¹	9.38 \pm 0.34 cd	7.53 \pm 0.52 de	6.26 \pm 0.47 e
10 mgL ⁻¹	10.79 \pm 0.16 bc	10.29 \pm 0.45 ab	7.19 \pm 0.57 de
50 mgL ⁻¹	10.39 \pm 0.32 bc	9.99 \pm 0.3 bc	9.09 \pm 0.52 bc
100 mgL ⁻¹	11.11 \pm 0.09 ab	12.04 \pm 0.35 a	9.76 \pm 0.53 ab
Carotenoid (mg/g)			
0 mgL ⁻¹	2.21 \pm 0.07 ce	1.60 \pm 0.09 g	1.40 \pm 0.06 g
10 mgL ⁻¹	2.63 \pm 0.3 b	1.93 \pm 0.06 ef	1.48 \pm 0.09 fg
50 mgL ⁻¹	2.39 \pm 0.07 bd	2.08 \pm 0.07 e	2.10 \pm 0.15 bc
100 mgL ⁻¹	2.41 \pm 0.08 bd	1.74 \pm 0.08 fg	2.77 \pm 0.08 a
Free proline ($\mu\text{g/g}$)			
0 mgL ⁻¹	105.83 \pm 1.89 ef	108.12 \pm 0.68 cd	141.45 \pm 1.55 a
10 mgL ⁻¹	102.60 \pm 2.65 fg	105.50 \pm 0.57 de	132.87 \pm 0.43 b
50 mgL ⁻¹	109.61 \pm 2.10 de	110.61 \pm 0.07 de	102.81 \pm 0.23 c
100 mgL ⁻¹	99.96 \pm 4.72 g	96.01 \pm 1.74g	106.57 \pm 1.53 c

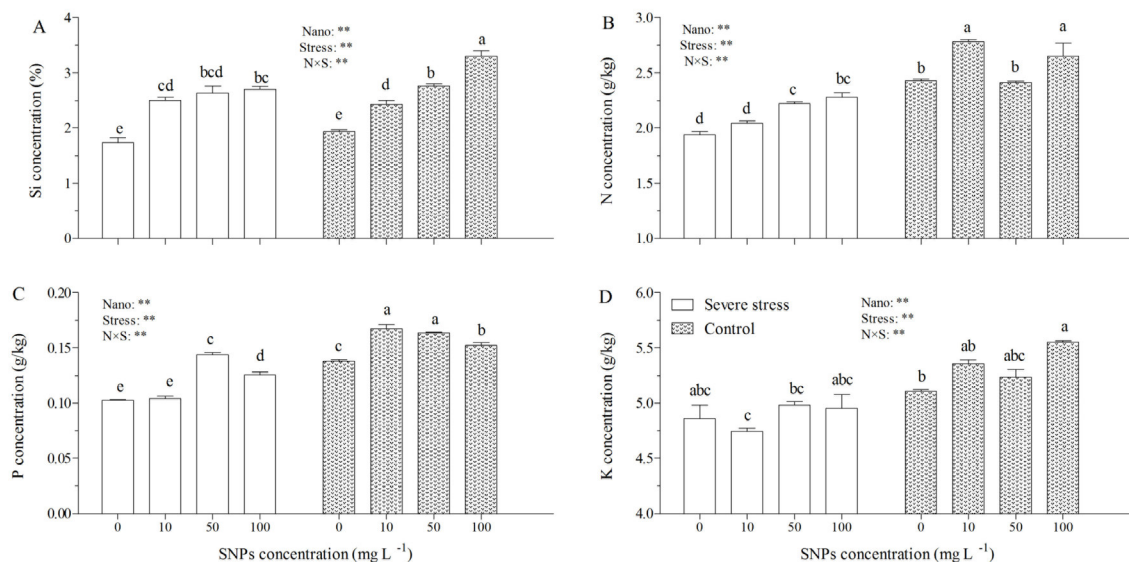


Fig. 4. Concentration of Si, N, P and K in leaf tissues of *Prunus mahaleb* seedlings (dry weight basis) pretreated with different concentration of SNPs during 45 days, and subsequently subjected to 19 days of three irrigation treatments (0, 150 and 300 mL of water every 3 days [severe drought, moderate drought and well-watered controls, respectively]). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments based on the Duncan tests. (Mean \pm SE; $n=6$). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; n.s.: $P > 0.05$.

of SNPs for 45 days to *Prunus mahaleb* (Mahaleb) seedlings, and afterwards, they were subjected to drought to assess the role of SNP pre-treatment on plant physiological responses of this woody species. Based on our results, SNP application at concentrations of 50 and 100 mg L⁻¹ was clearly beneficial to Mahaleb seedlings given the improvement of its drought tolerance. Positive effects of Si were reported in many plant species such as wheat, rice, cucumber, maize and bamboo, in particular, under stressful conditions (Ma & Takahashi, 2002; Shi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Vaculik *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2010; Collin *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015). In the case of *P. mahaleb*, we found that the positive effects of SNPs were evident when seedlings were later exposed to drought stress. Seedlings pretreated with SNPs showed less impact of severe drought (no irrigation) on root length – as an indicator of potential for water and nutrient uptake – and displayed a better physiological behaviour regarding photosynthesis, stomatal conductance, and xylem water potential when compared to seedlings non-pretreated with SNPs. Such better physiological performance of SNPs pretreated seedlings was related to the maintenance of leaf nutritional status, which showed comparable concentrations of N and P than those of never-stressed (control) seedlings. Along the experiment, the improved tolerance by SNPs to drought was reflected in higher biomass accumulation, particularly of roots. Therefore, we can accept our hypothesis by which we proposed that SNPs pre-treatments alleviate the detrimental effects of a subsequent severe drought. Also, it is interesting to notice that there were no apparent associated biological costs of SNPs application regarding growth when plants grew under control conditions as well watered seedlings pretreated with the highest SNPs concentration (100 mg L⁻¹) attained the highest dry mass. The mechanisms underlying this growth promotion even when seedlings were well irrigated deserves further experimental investigation.

Cell expansion and, consequently, shoot and root elongation are sensitive responses to drought stress (Lambers *et al.*, 2008). Important responses to SNPs pretreatment on seedlings exposed to severe drought were the maintenance of the root length and the amelioration of the negative impact of water deficit on root volume and root biomass

accumulation with respect to non-pretreated seedlings. These results are in line with the better physiological water status of seedlings in terms of xylem water potential (XWP) due to the presence of SNPs (100 mg L⁻¹) as shown also in adult plants of this species when subjected to summer drought given its deep roots compared to other coexistent woody species like *Quercus pubescens* and *Ostrya carpinifolia* (see Figure 2 in Nardini *et al.*, 2015). This better water status indicated by XWP was not reflected in improved leaf relative water content (RWC) as could be expected (see also Zarafshar *et al.*, 2014). So, SNPs aided plants to maintain root length and decreased the impact on XWP but not on RWR. In this respect, Zhang *et al.* (2013) found that silicon application did not enhance leaf RWC of Chestnut plants subjected to water deficit as well as it was found by Ashkavand *et al.* (2015) on hawthorn seedlings. Curiously, it seems that SNPs application did not aid to improve leaf RWC in woody plants (*eg.* Zhang *et al.*, 2013; Ashkavand *et al.*, 2015) but it does it in herbaceous crop species such as sorghum (Kafi *et al.*, 2011), cotton, canola, and wheat (Mehrabanjoubani *et al.*, 2015). Gadallah (2000) proposed that RWC improvement could be due to (i) an enhanced water uptake resulting from a more developed root system and (ii) a reduction of water loss by transpiration. In our experiment, RWC was not improved by SNPs application as leaf transpiration was not reduced as stomatal conductance remained higher despite Mahaleb seedlings growing under severe drought developed longer roots, which increased the potential for water uptake and, explained – at least partially - the amelioration of drought impact on XWP.

Leaf gas exchange was negatively affected by drought intensity along time but to a lesser extent when seedlings were pretreated with SNPs at high concentrations (50 and 100 ml L⁻¹ SNPs; Fig. 1). In agreement with findings by Matoh *et al.* (1986) for rice, we found that under severe drought conditions, stomatal conductance was 2-fold higher in seedlings that received SNPs application than those that did not. In this sense, besides the relation between the water status, cell turgor, and stomatal aperture, Agarie *et al.* (1998) reported positive effects of silicon (Si) on stomatal conductance in rice, which likely play a role in the responses of stomata cells to blue light (Agarie *et al.*, 1999). Nevertheless, the

specific mechanism by which Si regulates stomatal responses in woody species remains unclear and needs further experimental investigation (Gao *et al.*, 2005). The magnitude of the retained stomatal conductance of SNPs pre-treated seedlings were the same than the retained capacity for carbon fixation of such seedlings (Figure 2) as it was previously informed for maize (Kaya *et al.*, 2006), cherry tomatoes (Haghighi & Pessarakli, 2013), chestnut (Zhang *et al.*, 2013) and Hawthorn (Ashkavand *et al.*, 2015). Moreover, such less impacted photosynthesis matched with the maintenance of chlorophyll and carotenoids levels when compared to that of controls seedlings (Table 1). Therefore, seedlings pretreated with SNPs displayed a less negative impact on drought on stomatal aperture, carbon fixation, and photosynthetic pigments showing the beneficial effects of SNPs pre-treatments on physiological performance when facing a subsequent drought period.

Alleviation of drought stress by SNP application was also clear in biochemical parameters as free proline, and TBARs had lower concentrations when seedlings were pretreated with SNPs than when they were not (Table 1 and Figure 3D, respectively). In general, we found that free proline in leaves at all watering regimes decreased at increasing of SNPs concentration similarly to what has been documented in soybean plants under salinity stress (Lee *et al.*, 2010) and drought stress (Shen *et al.*, 2010). The accumulation of free proline under stressful conditions (no irrigation plus non-SNPs pretreatment) might be regarded as indicative of the osmotic adjustment capability of this species. Also, seedlings that received an application of SNPs previous to water withholding were less stressed than those without SNPs pretreatment as indicated the leaf gas exchange responses already discussed. On the other hand, TBARs, an indicator of oxidative damage to membrane lipids under stress (Ozkur *et al.*, 2009), was the highest under severe drought conditions in seedlings non-pretreated with SNPs while those pretreated with silicon nanoparticles registered progressively lower concentrations of TBARs at increasing SNPs application. Again, this finding illustrates that exogenous SNPs application relieves drought-induced injury in Mahaleb seedlings. Such relief would be associated with the maintenance of root length and its functionality (Fig. 3A; see also Zarafshar *et al.*, 2015).

The application of SNPs not only alleviated the effects of drought on plant physiological activity but also enable them to continue with nutrient uptaking of N and P and to a lesser extent K, which was reflected in a similar leaf concentration of these nutrients with respect to that of non-stressed seedlings (Fig. 4). The maintenance of the concentration of N and P in high levels of seedlings pretreated with SNPs under drought conditions might explain the lowered impact on photosynthesis and plant growth (see also reviews by Zlatev & Lindon, 2012, and by Ashraf & Harris, 2013). In this sense, the better status of N and P likely to have an important role in sustaining the photosynthetic rate (Lambers *et al.*, 2008). So, the beneficial effects of SNPs application were also evident in the leaf nutritional status of this species.

In conclusion, as discussed above, the application of silica nanoparticles (SNPs in this report) as pre-treatments should be considered as a promising agronomic practice to be tested at field scale in sites prone to suffer from water deficit as SNPs appear to be able to alleviate the common physiological deleterious effects of drought on plants as demonstrated here for Mahaleb.

BIBLIOGRAPHY

- AGARIE, S., H. UCHIDA, W. QGATA, F. KUBOTA & P.B. KAUFMAN. 1998. Effects of silicon on transpiration and leaf conductance in rice plants (*Oryza Sativa* L.). *Proc. Crop. Sci. Soc. Jpn.* 1: 89-95.
- AGARIE, S., H. UCHIDA, W. QGATA & P.B. KAUFMAN. 1999. Effects of silicon on stomatal blue-light response in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant. Prod. Sci.* 2: 232-234.
- AHMED, M., F. UL-HASSAN & M. ASIF. 2014. Amelioration of drought in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) by silicon. *Commun. Soil. Sci. Plant. Anal.* 45: 470-486.
- ASADZADE, N., S.G. MOOSAVI & M.J. SEGHATOLESLAMI. 2015. Effect of low irrigation and Zn and SiO₂ nano-fertilizers and conventional fertilizers on morphophysiological traits and seed yield of sunflower. *Biol. Forum. Int.* 7:357-364.
- ASHKAVAND, P., M. TABARI, M. ZARAFSHAR, I. TOMÁŠKOVÁ & D. STRUVE. 2015. Effect of SiO₂ nanoparticles on drought resistance in hawthorn seedlings. *For. Res. Paper.* 76: 350-359.

- ASHRAF, M. & H.J.C. HARRIS. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51: 163-190.
- BALAKHNINA, T. & A. BORKOWSKA. 2013. Effects of silicon on plant resistance to environmental stresses: review. *Int. Agrophys.* 27: 225–232.
- BAO-SHAN, L., L. CHUN-HUI, F. LI-JUN, Q. SHU-CHUN & Y. MIN. 2004. Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings. *J. For. Res. (Harbin)* 15: 138-140.
- BATES, L.S., R.P. WALDRAN & I.D. TEARE. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant. Soil* 39: 205–208.
- BLOKHINA, O., E. VIROLAINEN & K. V. FAGERSTEDT. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.* 91: 179–194.
- BRAUNACK, M. 1995. Effect of aggregate size and soil water content on emergence of soybean (*Glycine max* L. Merr.) and maize (*Zea mays* L.). *Soil. Till. Res.* 33: 149–161.
- CAMPOS, P. S., V. QUARTIN, J.C. RAMALHO & M.A. NUNES. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Plant. Physiol. Biochem.* 160: 283–292.
- CHALMARDI, Z.K., A. ABDOLZADEH & H.R. SADEGHIPOUR. 2014. Silicon nutrition potentiates the antioxidant metabolism of rice plants under iron toxicity. *Acta. Physiol. Plant.* 36: 493–502.
- CHEN, H. & R. YADA. 2011. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. *Trends. Food. Sci. Technol.* 22: 585–594.
- COLLIN, B., E. DOELSCH, C. KELLER, P. CAZEVIEILLE, M. TELLA, P. CHAURAND, F. PANFILI, J.L. HAZEMANN & J.D. MEUNIER. 2014. Copper distribution and speciation in bamboo exposed to a high Cu concentration and Si supplementation. First evidence on the presence of reduced copper bound to sulfur compounds in Poaceae. *Env. Pollut.* 187: 22–30.
- DA SILVA LOBATO, A. K., E.M.S. GUEDES, D.J. MARQUES & C. F. DE OLIVEIRA NETO. 2013. Silicon: a benefic element to improve tolerance in plants exposed to water deficiency. In *Responses of Organisms to Water Stress*. InTech.
- EGERT, M. & M. TEVINI. 2002. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environ. Exp. Bot.* 48: 43–49.
- EPSTEIN, E. 1999. Silicon. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50: 641–664.
- FAROOQ, M., M. HUSSAIN, A. WAHID & K.H.M. SIDDIQUE. 2012. Drought stress in plants: an overview. In: Aroca R. (ed.), *Plant Responses to Drought Stress*, pp. 1-33. Springer, Berlin, Heidelberg.
- FENG, J., Q. SHI, X. WANG, M. WEI, F. YANG & H. XU. 2010. Silicon supplementation ameliorated the inhibition of photosynthesis and nitrate metabolism by cadmium (Cd) toxicity in *Cucumis sativus* L. *Sci. Hortic.* 123: 521–530.
- GADALLAH, M. A. A. 2000. Effects of indole-3-acetic acid and zinc on the growth, osmotic potential and soluble carbon and nitrogen components of soybean plants growing under water deficit. *J. Arid. Environ.* 44: 451–467.
- GAO, X., C. ZOU, L. WANG & F. ZHANG. 2005. Silicon improves water use efficiency in maize plants. *J. Plant. Nutr.* 27: 1457–1470.
- GHOLAMI, M., M. RAHEMI, B. KHOLDEBARIN & S. RASTEGAR. 2012. Biochemical responses in leaves of four fig cultivars subjected to water stress and recovery. *Sci. Hortic.* 148: 109–117.
- HAGHIGHI, M. & M. PESSARAKLI. 2013. Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Sci. Hortic.* 161: 111–117.
- HAGHIGHI, M., Z. AFIFIPOUR & M. MOZAFARIAN. 2012. The effect of N-Si on tomato seed germination under salinity levels. *J.B.E.S.* 6: 87–90.
- HEATH, R. & P. PACKER. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189–198.
- HU, Y. C. & U. SCHMIDHALTER. 2005. Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168: 541–549.
- KAFI, M., J. NABATI, A. MASOUMI & M.Z. MEHRGERDI. 2011. Effect of salinity and silicon application on oxidative damage of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) monech.]. *Pak. J. Bot.* 43: 2457–2462.
- KARMOLLACHAAB, A., A. BAKHSHANDEH, M.H. GHARINEH, M.R. MORADITELAVAT & G. FATHI. 2013. Effect of silicon application on physiological characteristics and grain yield of wheat under drought stress condition. *I.J.A.P.P.* 4: 30–37.
- KAYA, C., L. TUNA & D. HIGGS. 2006. Effect of silicon on plant growth and mineral nutrition of maize grown under water-stress conditions. *J. Plant Nutr.* 29: 1469–1480.
- KHOT, L.R., S. SANKARAN, J.M. MAJA, R. EHSANI, & E.W. SCHUSTER. 2012. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop Prot.* 35: 64-70.

- LAMBERS, H., F.S. CHAPIN & T.L. PONS. 2008. *Plant physiological ecology*. New York, NY, USA: Springer-Verlag.
- LEE, S. K., E.Y. SOHN, M. HAMAYUN, J.Y. YOON & I.J. LEE. 2010. Effect of silicon on growth and salinity stress of soybean plant grown under hydroponic system. *Agrofor. Syst.* 80: 333-340.
- LIANG, Y. C., Q. CHEN, Q. LIU, W.H. ZHANG & R.X. DING. 2003. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barely (*Hordeum vulgare* L.). *Plant. Physiol. Biochem.* 160: 1157-64.
- MA, J.F. & E. TAKAHASHI. 2002. *Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan*. Elsevier.
- MA, J. F. & N. YAMAJI. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends. Plant. Sci.* 11: 392-397.
- MA, J.F. 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil. Sci. Plant. Nutr.* 50: 11-18.
- MAHAJAN, S. & N. TUTEJA. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139-158.
- MATOH, T., P. KAIRUMMEE & E. TAKAHASHI. 1986. Salt-induced damage to rice plants and alleviation effect of silicate. *Soil. Sci. Plant. Nutr.* 32: 295-304.
- MCCUTCHAN, H. & K.A. SHACKEL. 1992. Stem-water potential as a sensitive indicator of water stress in Prune trees (*Prunus domestica* L. cv. French). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 117: 607-611.
- MEHRABANJOUANI, P., A. ABDOLZADEH, H.R. SADEGHIPOUR & M. AGHDASI. 2015. Silicon affects transcellular and apoplastic uptake of some nutrients in plants. *Pedosphere* 25: 192-201.
- MONICA, R.C. & R. CREMONINI. 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62: 161-165.
- NAIR, R., S.H. VARGHESE, B.G. NAIR, T. MAEKAWA, Y. YOSHIDA & D.S. KUMAR. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant. Sci.* 179: 154-163.
- NARDINI, A., V. CASOLO, A. DAL BORGIO, T. SAVI, B. STENNI, P. BERTONCIN, L. ZINI & N.G. MCDOWELL. 2015. Rooting depth, water relations and non-structural carbohydrate dynamics in three woody angiosperms differentially affected by an extreme summer drought. *Plant. Cell. Environ.* 39: 618-627.
- NIKOLAEVA, M.K., S.N. MAEVSKAYA, A.G. SHUGAEV & N.G. BUKHOV. 2010. Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Russ. J. Plant Physiol.* 57: 87-95.
- ÖZÇELİK, B., U. KOCA, D.A. KAYA & N. ŞEKEROĞLU. 2012. Evaluation of the in vitro bioactivities of Mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.). *Rom. Biotechnol. Lett.* 17: 7863-7872.
- OZKUR, O., F. OZDEMIR, M. BOR & I. TURKAN. 2009. Physicochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. *Environ. Exp. Bot.* 66: 487-492.
- PEI, Z.F., D.F. MING, D. LIU, G.L. WAN, X.X. GENG, H.J. GONG & W.J. ZHOU. 2010. Silicon improves the tolerance to water-deficit stress induced by polyethylene glycol in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J. Plant. Growth. Regul.* 29: 106-115.
- PESSARAKLI, M. 2014. *Handbook of plant and crop physiology*. CRC Press.
- RICHMOND, K.E. & M. SUSSMAN. 2003. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6: 268-272.
- SABAGHNIA, N. & M. JANMOHAMMADI. 2015. Effect of nano-silicon particles application on salinity tolerance in early growth of some lentil genotypes. *Ann. Univ. Mariae.* 69: 39-55.
- SACALA, E. 2009. Role of silicon in plant resistance to water stress. *J. Elementol.* 14: 619-630.
- SEYYEDNEJAD, S. & H. MOTAMEDI. 2010. A review on native medicinal plants in Khuzestan, Iran with antibacterial properties. *Int. J. Immunopharmacol.* 6: 551-560.
- SHAMS, K.A. & R. SCHMIDT. 2007. Lipid fraction constituents and evaluation of anti-anaphylactic activity of *Prunus mahaleb* l. Kernels. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 4: 289-293.
- SHEN, X., Y. ZHOU, L. DUAN, Z. LI, A.E. ENEJI & J. LI. 2010. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. *Plant. Physiol. Biochem.* 167: 1248-1252.
- SHI, Q., Z. BAO, Z. ZHU, Y. HE, Q. QIAN & J. YU. 2005. Silicon-mediated alleviation of Mn toxicity in *Cucumis sativus* in relation to activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry* 66: 1551-1559.
- SURIYAPRABHA, R., G. KARUNAKARAN, R. YUVAKKUMAR, V. RAJENDRAN & N. KANNAN. 2012. Silica nanoparticles for increased silica availability in maize (*Zea mays* L.) seeds under hydroponic conditions. *Curr. Nanosci.* 8: 902-908.
- TOWETT, E.K., K.D. SHEPHERD & B.L. DRAKE. 2016. Plant elemental composition and portable X-ray fluorescence (pXRF) spectroscopy: quantification under different analytical parameters. *Xray. Spectrom.* 45: 117-124.
- VACULIK, M., A. LUX, M. LUXOVA & L. TANIMOTO. 2009. Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. *Environ. Exp. Bot.* 67: 52-58.

- WEI, C., Y. ZHANG, J. GUO, B. HAN, X. YANG & J. YUAN. 2010. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. *J Environ. Sci. (China)*. 22: 155–160.
- XIE, Z., R. SONG, H. SHAO, F. SONG, H. XU & Y. LU. 2015. Silicon Improves Maize Photosynthesis in Saline-Alkaline Soils. *Sci. World J.* Article ID 245072. DOI 10.1155/2015/245072.
- XU, C.X., Y.P. MA & Y.L. LIU. 2015. Effects of silicon (Si) on growth, quality and ionic homeostasis of aloe under salt stress. *S. African J. Bot.* 98: 26-36.
- YUVAKKUMAR, R., V. ELANGO, V. RAJENDRAN, N.S. KANNAN & P. PRABU. 2011. Influence of nanosilica powder on the growth of maize crop (*Zea mays* L.). *Int. J. Electron.* 3: 180–190.
- ZARAFSHAR, M., M. AKBARINIA, H. ASKARI, S.M. HOSSEINI, M. RAHAIE, D. STRUVE & G.G. STRIKER. 2014. Morphological, physiological and biochemical responses to soil water deficit in seedlings of three populations of wild pear tree (*Pyrus boissieriana*). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18: 353–366.
- ZARAFSHAR, M., M. AKBARINIA, H. ASKARI, S.M. HOSSEINI, M. RAHAIE & D. STRUVE. 2015. Toxicity assessment of sio₂ nanoparticles to pear seedlings. *I.J.N.N.* 11: 13-22.
- ZHANG, C., J.M. MOUTINHO-PEREIRA, C. CORREIA, J. COUTINHO, A. GONÇALVES, A. GUEDES & J. GOMES-LARANJO. 2013. Foliar application of Sili-K® increases chestnut (*Castanea* spp.) growth and photosynthesis, simultaneously increasing susceptibility to water deficit. *Plant Soil.* 365: 211–225.
- ZHANG, C., L. WANG, Q. NIE, W. ZHANG & F. ZHANG. 2008. Long-term effects of exogenous silicon on cadmium translocation and toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Exp. Bot.* 62: 300–307.
- ZHAO, Y., D. ASPINALL & L.G. PALEG. 1992. Protection of membrane integrity in *Medicago saliva* L. by glycinebetaine against the effects of freezing. *J. Plant Physiol.* 140: 541–543.
- ZLATEV, Z. & F. C. LINDON. 2012. An overview ondrought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *J. Food Agric.* 24: 57-72.
- ZUCCARINI, P. 2008. Effects of silicon on photosynthesis, water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. *Biol. Plant.* 52: 157–160.

Recibido el 22 de agosto de 2017, aceptado el 19 de marzo de 2018. Editor: Federico Mollard.

VIVIPARIDAD EN *GOEPPERTIA INOCEPHALA* (MARANTACEAE)

MARÍA DEL PILAR SEPÚLVEDA-NIETO¹, ÁNGELA MARÍA MORALES-TRUJILLO¹ y
LILIANA KATINAS^{2,3}

Summary: Vivipary in *Goepertia inocephala* (Marantaceae). Viviparous germination is a phenomenon known only for 0.1% of the total species, being less frequent in monocots. In the Marantaceae family it had only been mentioned for a single species, *Marantochloa congensis*. This work presents the first record of plants originated from viviparous seeds of *Goepertia inocephala* (Marantaceae) found in the understory of a mixed forest of the Andean region of the department of Quindío, Colombia. The vivipary of this species is discussed in the context of the mechanisms of adaptation to the current environmental conditions and pre-conditioning of paleotropical ancestors.

Key words: Germination, sexual reproduction, monocots.

Resumen: La viviparidad es un fenómeno conocido sólo para un 0,1 % del total de especies, siendo menos frecuente en monocotiledóneas. En la familia Marantaceae solo había sido mencionado para la especie *Marantochloa congensis*. En este trabajo se presenta el primer registro de plantas originadas de semillas vivíparas de *Goepertia inocephala* (Marantaceae) encontradas en el sotobosque de un bosque mixto de la región andina del departamento del Quindío, Colombia. La viviparidad de esta especie se discute en el contexto de los mecanismos de adaptación a las actuales condiciones ambientales y de pre-acondicionamiento de los ancestros paleotropicales.

Palabras clave: Germinación, reproducción sexual, monocotiledóneas.

INTRODUCCIÓN

Uno de los variados mecanismos reproductivos en angiospermas es la viviparidad, que involucra el crecimiento precoz y continuo de descendientes cuando aún se encuentran unidos al parental, e implica la formación de la semilla y el crecimiento de un embrión generado por reproducción sexual (Farnsworth, 2000). Uno de los casos de viviparidad más conocidos es el de los manglares, en las familias Rhizophoraceae y Avicenniaceae (van der Pijl, 1982; Elmqvist & Cox, 1996).

La viviparidad habría surgido como respuesta a factores potencialmente perjudiciales para el desarrollo de los embriones en el suelo tales como temperaturas extremas, impredecibilidad ambiental, entornos demasiado secos, y vulnerabilidad de las semillas a depredación y ataques microbianos (Elmqvist & Cox, 1996). El 89% de las especies con germinación vivípara ocupa bosques húmedos, laderas, o ambientes inundados y muchas especies (ca. 79%) son nativas de los trópicos (Farnsworth, 2000).

La germinación vivípara es un fenómeno escaso en angiospermas, documentado solamente para 143 géneros y 195 especies, lo que representa aproximadamente el 0,1 % del total de plantas con flores (Cota-Sánchez & Abreu, 2007). Parece ser menos frecuente en monocotiledóneas en relación a las restantes angiospermas, y ha sido registrada en unos pocos miembros de las familias Amaryllidaceae, Araceae, Arecaceae, Asparagaceae, Bromeliaceae, Cymodoceaceae, Cyperaceae, Juncaceae, Liliaceae, Marantaceae, Poaceae y Zingiberaceae (van der

¹ Programa de Biología, Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío, Apdo. Postal 2639 Armenia, Quindío, Colombia.

² División Plantas Vasculares, Museo de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina.

³ Autor para correspondencia: katinas@fcnym.unlp.edu.ar

Pijl, 1982; Elmqvist & Cox, 1996; Bhadra *et al.*, 2013). En Marantaceae, Kennedy (2000) registró la aparición de plántulas vivíparas en plantas cultivadas de *Marantochloa congestis* (K. Schum.) J. Léonard & Mullend. Ese sería hasta el momento el único registro en la familia, aunque la autora no profundizó en el estudio de este fenómeno.

La familia Marantaceae (31 géneros, ca. 550 especies) es pantropical, con unas 450 especies distribuidas en el Nuevo Mundo (Kennedy *et al.*, 1988; Borchsenius *et al.*, 2012; APG, 2016). La mayoría de las especies (ca. 248) pertenecen al género *Goepertia* Nees, caracterizado por sus especies herbáceas con inflorescencias simples y lóbulos corolinos erectos o extendidos (Borchsenius *et al.*, 2012; Saka & Lombardi, 2015). Los miembros de esta familia generalmente viven en el sotobosque de bosques semidecíduos, selvas lluviosas y selvas nubladas hasta los 1500 metros, raramente superan los 2000 metros (Kennedy, 2000).

Goepertia inocephala (Kuntze) Borsch. & S. Suárez (Marantaceae) es una especie acaulescente de hasta 3 m de alto, rizomatosa, con vástagos foliares frondosos y una inflorescencia glomerulosa, ovoide a cilíndrica, terminal, sostenida por un eje áfido (Fig. 1A). Se distribuye en los bosques húmedos de América Central y América del Sur hasta Ecuador.

Hasta ahora, poco se conocía de la reproducción de esta especie. Los únicos estudios sobre *Goepertia inocephala* se refieren a breves descripciones (bajo el nombre *Calathea inocephala* (Kuntze) H. Kenn. & Nicolson) en floras (e.g., Croat, 1978; Hammel, 1986) y a menciones en estudios sobre dispersión de semillas (Horvitz, 1981; Horvitz *et al.*, 2002). Observaciones de las inflorescencias de *G. inocephala* en el sotobosque de un área de Colombia llamaron nuestra atención como un posible caso de viviparidad. El objetivo de este trabajo es reportar la viviparidad en *Goepertia inocephala*.

MATERIAL Y MÉTODO

Para la nomenclatura se sigue a Borchsenius *et al.* (2012). Se estudiaron dos poblaciones silvestres de *Goepertia inocephala* del sotobosque de un bosque mixto, con predominio de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae), situado en la zona de transición entre un bosque húmedo premontano y un bosque muy húmedo premontano, de acuerdo a la clasificación de Holdridge

(2000). La zona de estudio se encuentra ubicada en la vertiente occidental de la Cordillera Central de Colombia, en altitudes entre 1100 y 1270 m, en lo que se conoce administrativamente como Reserva La Montaña del Ocaso del municipio de Quimbaya, departamento del Quindío (4°34'08" N, 75°51'03" W). Los suelos de esta zona corresponden a la unidad Malabar formado por material parental de cenizas volcánicas que han evolucionado intensamente, con alto contenido de materia orgánica (Patiño-González *et al.*, 2006; Aguilar-Isaza *et al.*, 2010). Esta zona tiene una temperatura promedio de 24° C, humedad relativa de 76 % y unos 1690 mm³ de precipitación anual. El muestreo se realizó al inicio del período de lluvias comprendido entre los meses de septiembre-octubre.

Se recolectaron infrutescencias provenientes de las dos poblaciones de *G. inocephala* separadas unos 1000 m una de la otra. Cada población estaba compuesta por varios individuos con 4 a 6 ejes con infrutescencias maduras cada uno. Se extrajeron tres infrutescencias de la primera población y dos de la segunda. El material fue analizado en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad del Quindío-CIBUQ, Colombia, donde se hidrataron las inflorescencias con agua corriente por un período de 24 horas. Posteriormente se extrajeron las semillas germinadas y se realizaron mediciones de sus partes.

Material estudiado. *Goepertia inocephala*. COLOMBIA. Dpto. Quindío: Mun. Quimbaya, Vereda El Laurel, Reserva La Montaña del Ocaso, 1133 m, 8-VI-2007, P. Sepúlveda *et al.* 182 (HUQ).

RESULTADOS

Las infrutescencias tienen la capacidad de almacenar una considerable cantidad de humedad, fenómeno observado tanto en su ambiente natural como en el laboratorio cuando se sometieron a hidratación. Ello ocasiona que en la madurez se tornen fétidas, laceradas en fibras y con numerosos invertebrados en su interior. Las brácteas que rodean a los frutos son de disposición espiralada e imbricada (Fig. 1B), papiráceas, amarillas cuando jóvenes y castañas a la madurez. El fruto es una cápsula trilocular, obovada, de superficie rugosa, color naranja, que alberga tres semillas gibosas, de color púrpura (marrón oscuro a la

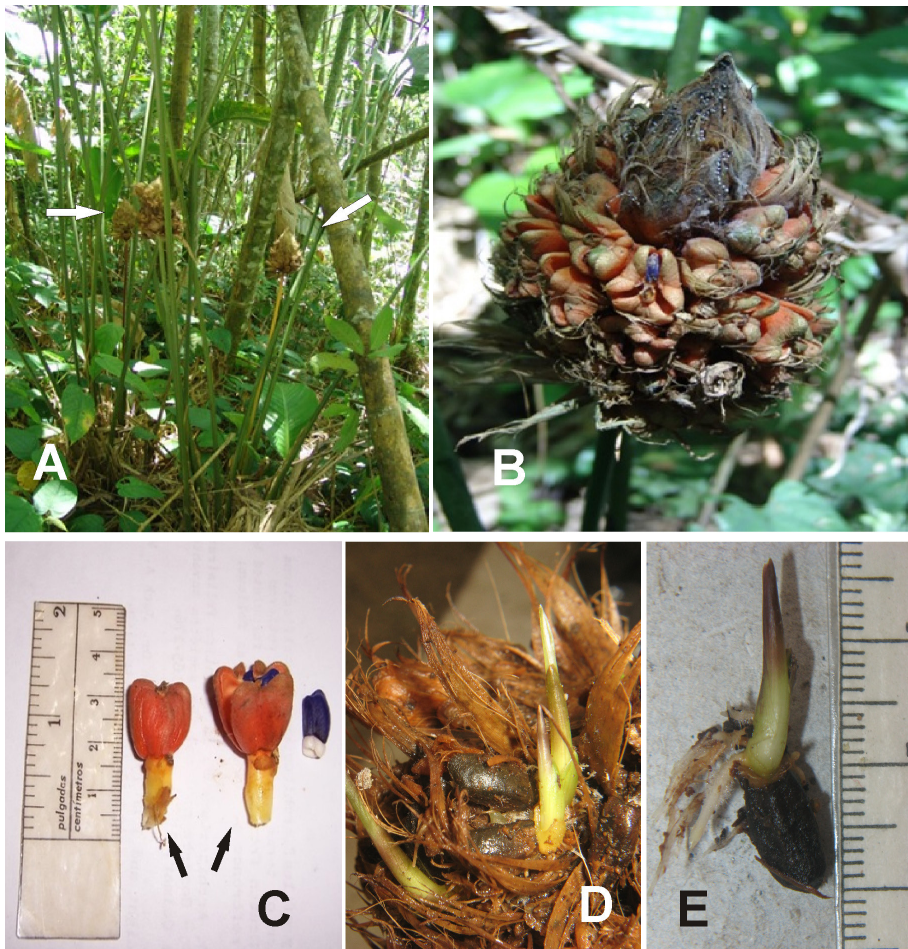


Fig. 1. *Goeppertia inocephala*. **A:** Planta con inflorescencias (flechas). **B:** Detalle de una infrutescencia. **C:** Fruto cápsula y semilla púrpura con arilo carnoso blanco; las flechas señalan las raíces de las semillas germinadas. **D:** Semillas germinadas en las cápsulas dentro de la infrutescencia, entremezcladas con las brácteas. **E:** Propágulo con desarrollo del sistema radicular.

madurez), con un arilo blanco, carnoso (Fig. 1C). Las semillas germinadas en fruto, maduras, tienen 0,9-12 mm de longitud, testa de color marrón oscuro y el arilo desintegrado. Se observaron coleóptilos de 7-14 mm de largo, cotiledones de 1,6-3,0 cm de largo, y un sistema radicular bien desarrollado (Fig. 1D, E).

Cada infrutescencia de *G. inocephala* tiene entre 25 a 30 cápsulas, y cada cápsula contiene tres semillas. En las cinco infrutescencias recolectadas se observó que, dado el estado avanzado de madurez de las mismas, muchas semillas habían caído al suelo. Por ello, en las cinco infrutescencias sólo se hallaron 77

cápsulas que aún contenían semillas en su interior. Se observó un total de 231 semillas, de las cuales 84 estaban germinadas en la infrutescencia y el resto sin germinar.

DISCUSIÓN

Se confirma en este trabajo el primer caso de viviparidad para el género *Goeppertia*, constituyendo este el segundo registro para Marantaceae, después de *Marantochloa congensis* (Kennedy, 2000).

Bhadra *et al.* (2013) consideran que la viviparidad no es una tendencia natural en Zingiberales, orden al que pertenece la familia Marantaceae, y que solo ocurre en condiciones excepcionales como consecuencia de los climas extremos y estacionales de las regiones tropicales donde habitan estos taxones. Las plantas vivíparas de *Goepertia inocephala* se hallaron en el bosque mixto asociado a la bambúsea *Guadua angustifolia* en los meses posteriores a un período seco, cuando se inician las lluvias de septiembre-octubre. La gran cantidad de hojarasca caída de *Guadua* durante la sequía tarda mucho tiempo en descomponerse generando suelos que no proveen las condiciones óptimas para el desarrollo de los propágulos de *G. inocephala*. Por otro lado, las inflorescencias de esta especie tienen la peculiaridad de acumular gran cantidad de agua entre sus brácteas, favoreciendo las condiciones de humedad adecuadas para la maduración y germinación de las futuras semillas dentro de los frutos. Este fenómeno ha sido registrado en especies de Fabaceae donde la humedad en las inflorescencias sería el factor desencadenante de la germinación vivípara (Majumdar *et al.*, 2004). Incluso, el arilo carnoso de las semillas de *G. inocephala* podría considerarse, además de una atracción para las hormigas y las aves (Horvitz, 1981; Horvitz *et al.*, 2002), otra fuente de reserva de agua para el embrión. En otras especies vivíparas se ha encontrado que ciertas características de las semillas contribuirían a la reserva de agua para el embrión, como tegumentos gruesos o el endosperma constituido por tejidos con gran contenido de agua (van der Pijl, 1982). El beneficio que otorga a las semillas la humedad contenida en las inflorescencias de *G. inocephala* se corrobora por el visible desarrollo de los embriones y sus raíces en la planta materna, donde hallan su fuente principal de nutrientes hasta alcanzar el nivel de plántula antes de iniciar el proceso de dispersión. Ello le facilitaría a las nuevas plantas la competencia entre los individuos al llegar al suelo.

Desde un punto de vista evolutivo, la distribución tropical actual del clado compuesto por las familias Cannaceae, Costaceae, Marantaceae y Zingiberaceae (Kress & Specht, 2005) habría surgido como un proceso de diversificación a partir de un ancestro americano

donde algunos miembros de este grupo, en su proceso de dispersión hacia nuevos hábitats tropicales, debieron soportar alta radiación solar y extensos períodos de sequía. Tal sería el caso de algunas especies de Zingiberaceae que debieron adaptarse al régimen marcadamente estacional de los monzones del sudeste asiático (Wood *et al.*, 2000; Kress & Specht, 2005). Entre las adaptaciones en estos grupos a dichas condiciones se encuentran la capacidad de permanecer en estado de dormancia por períodos de cuatro a seis meses, la propagación vegetativa por rizomas y la viviparidad (Kress & Specht, 2005).

Algunos autores (Elmqvist & Cox, 1996; Ferriere, 2000) no consideran a la viviparidad como una ventaja pues disminuiría la capacidad de dispersión de los individuos, que persisten más tiempo en la planta madre y por lo tanto no ocupan nuevos hábitats. Sin embargo, en ciertos casos como el aquí estudiado de *Goepertia inocephala*, la viviparidad representa un cambio en la reproducción hacia un mecanismo más eficiente que favorecería la germinación en condiciones óptimas de humedad y un mejor establecimiento de las plántulas al caer a un suelo que no es totalmente favorable.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos las sugerencias de los editores y revisores y el apoyo brindado por el Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología y a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Quindío-CIBUQ, al CONICET (PIP 5604), ANPyCT (PICT 01683), y a la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR-ISAZA, N., D. LÓPEZ-OBANDO, A. BOTERO-BOTERO & G. GÓMEZ-MARÍN. 2010. Zonificación paisajística de la hacienda El Ocaso, Quimbaya, Quindío. *RIUQ* 20: 9-17.
- APG (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP). 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181: 1-20.

- BHADRA, S., M. GHOSH, A. MUKHERJEE & M. BANDYOPADHYAY. 2013. Vivipary in *Hedychium elatum* (Zingiberaceae). *Phytotaxa* 130: 55-59.
- BORCHSENIUS, F., L. S. SUÁREZ SUÁREZ & L. M. PRINCE. 2012. Molecular phylogeny and redefined generic limits of *Calathea* (Marantaceae). *Syst. Bot.* 37: 620-635.
- COTA-SÁNCHEZ, J. H. & D. D. ABREU. 2007. Vivipary and offspring survival in the epiphytic cactus *Epiphyllum phyllanthus* (Cactaceae). *J. Exp. Bot.* 58: 3865-3873.
- CROAT, T. B. 1978. *Flora of Barro Colorado Island*. Stanford University Press, Stanford, California.
- ELMQVIST, T. & P. A. COX. 1996. The evolution of vivipary in flowering plants. *Oikos* 77: 3-9.
- FARNSWORTH, E. 2000. The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: 107-138.
- FERRIERE, R. 2000. *Adaptive responses to environmental threats: Evolutionary suicide, insurance, and rescue*. Options Spring 2000, pp. 12-16. International Institute for Applied Systems Analysis, Laxenburg, Austria.
- HAMMEL, B. E. 1986. The Vascular Flora of La Selva Biological Station, Costa Rica - Marantaceae. *Selbyana* 9: 234-242.
- HOLDRIDGE, L. 2000. *Ecología basada en zonas de vida*. Quinta reimpresión. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica.
- HORVITZ, C. C. 1981. Analysis of how ant behaviors affect germination in a tropical myrmecochores *Calathea microcephala* (P. & E.) Koernicke (Marantaceae): Microsite selection and aril removal by neotropical ants, *Odontomachus*, *Pachycondyla*, and *Solenopsis* (Formicidae). *Oecologia* 51: 47-52.
- HORVITZ, C. C., M. A. PIZO, B. BELLO Y BELLO, J. LECORFF & R. DIRZO. 2002. Are plant species that need gaps for recruitment more attractive to seed-dispersing birds and ants than other species? In: D. J. LEVEY, W. R. SILVA & M. GALETTI (eds.), *Dispersal and frugivory: Ecology, evolution, and conservation*, pp.145-159. CABI Publishing, Oxon, UK and New York.
- KENNEDY, H., L. ANDERSSON & M. HAGBERG. 1988. Marantaceae. In: HARLING, G. & A. LENNART (eds.), *Flora of Ecuador*, vol. 32, pp. 14-193. Gleerup Publ., Utrecht.
- KENNEDY, H. 2000. Diversification in pollination mechanisms in the Marantaceae. In: WILSON, K. L. & D. A. MORRISON (eds.), *Monocots: Systematics and evolution*, pp. 335-343. Morrison, CSIRO, Melbourne.
- KRESS, W. J. & C. D. SPECHT. 2005. Between Cancer and Capricorn: Phylogeny, evolution and ecology of the primarily tropical Zingiberales. *Biol. Skr.* 55: 459-478.
- MAJUMDAR, S., S. BANERJEE & K. K. DE. 2004. Vivipary in white clover (*Trifolium repens* L.). *Curr. Sci.* 86: 29-30.
- PATÍÑO-GONZÁLEZ, M. A., S. SADEGHIAN-KHALAJABADI & E. C. MONTOYA-RESTREPO. 2006. Caracterización de la fertilidad del suelo en la zona cafetera del Valle del Cauca mediante registros históricos. *Cenicafé* 57: 7-16.
- SAKA, M. N. & J. A. LOMBARDI. 2015. Nomenclatural notes on *Goepertia* (Marantaceae). *Phytotaxa* 222: 155-158.
- VAN DER PIJL, L. 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. 3rd ed. Springer, Berlin.
- WOOD, T. H., W. M. WHITTEN & N. H. WILLIAMS. 2000. Phylogeny of *Hedychium* and related genera (Zingiberaceae) based on ITS sequence data. *Edinburgh J. Bot.* 57: 261-270.

Recibido el 19 de diciembre de 2017, aceptado el 27 de febrero de 2018. Editora: Ana Calviño.

ANÁLISIS DE LOS SILICOFITOLITOS PRESENTES EN ESPECIES DE LAS FAMILIAS CANNABACEAE, MORACEAE Y URTICACEAE DEL SE BONAERENSE Y ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS CISTOLITOS

MARIANA FERNÁNDEZ HONAINÉ^{1,2,4*}, MARA DE RITO^{3,4} y MARGARITA OSTERRIETH^{1,2}

Summary: Silicophytolith analyses in species of Cannabaceae, Moraceae and Urticaceae from SE Buenos Aires province and a comparative study of their cystoliths. Numerous families produce silicophytoliths in their tissues, which constitute a relevant taxonomic and palaeobotanical tool. Cystoliths are one of the morphologies produced by dicotyledons, and they are defined as deposits of amorphous calcium carbonate with a silica stalk. This amorphous silica stalk remains on soils and sediments, and constitutes a diagnostic morphology for palaeoenvironmental and archaeological phytolith studies. In this work, the phytoliths of six species of Cannabaceae, Moraceae and Urticaceae, all cystolith producers, were analyzed. Phytoliths were extracted through a calcination technique, and the description of the morphologies and the measurements on cystoliths were carried on through optic and scanning electron microscopes. Statistical tests were applied in order to analyze differences. All the species analyzed produced phytoliths. The first descriptions for three species of Urticaceae and one of Moraceae were shown. Cystoliths, hairs and polyhedral phytoliths were described, and differentiation was achieved at family level. *Celtis* spp (Cannabaceae) and *Morus alba* L. (Moraceae) produce phytoliths different from Urticaceae species, and they present a hair associated, they are thinner and shorter. These features, as well as the morphometric measured variables, could be used for taxa differentiation in fossil phytolith record.

Key words: Amorphous silica biomineralization, *Morus alba*, *Celtis* spp., *Parietaria* spp., *Urtica urens*, SE Pampean region.

Resumen: Numerosas familias producen silicofitolitos en sus tejidos, los cuales constituyen una herramienta de importancia taxonómica y paleobotánica. Una de las morfologías producidas en dicotiledóneas son los cistolitos, definidos como concreciones de carbonato de calcio con un esqueleto silíceo. Este esqueleto silíceo puede quedar preservado en suelos y sedimentos, constituyendo una morfología diagnóstica para estudios fitolíticos paleoambientales y arqueológicos. En este trabajo se analizaron silicofitolitos de seis especies de las familias Cannabaceae, Moraceae y Urticaceae, todas productoras de cistolitos. Los silicofitolitos se extrajeron mediante técnicas de calcinación; se describieron las morfologías y realizaron mediciones a los cistolitos, bajo microscopios óptico y electrónico de barrido. Se aplicaron tests estadísticos para evaluar diferencias. Todas las especies estudiadas producen silicofitolitos, reportándose las primeras descripciones en tres especies de Urticaceae y una de Moraceae. Se describieron cistolitos de variada forma, pelos y fitolitos poliédricos, y fue posible la diferenciación, al menos a nivel de familia. *Celtis* spp (Cannabaceae) y *Morus alba* L. (Moraceae) producen cistolitos diferentes a las especies de Urticaceae y presentan una protuberancia o pelo asociado, son más angostos y más cortos. Estas características, así como las variables morfométricas medidas, podrían ser utilizadas para la diferenciación de estos taxa en el registro fitolítico fósil.

Palabras clave: Biomineralizaciones de sílice amorfo, *Morus alba*, *Celtis* spp., *Parietaria* spp., *Urtica urens*, SE pampeano.

¹ Instituto de Geología de Costas y del Cuaternario, Universidad Nacional de Mar del Plata-CIC, CC 722, Correo Central, 7600 Mar del Plata, Argentina.

² Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC), Universidad Nacional de Mar del Plata- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Mar del Plata, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Agrarias-EEA INTA, Balcarce. Grupo de Estudio de Agroecosistemas y Paisajes Rurales, Ruta 226 Km 73,5, Balcarce, Argentina.

⁴ CONICET.

* E-mail: fhonaine@mdp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los silicofitolitos son biomineralizaciones de sílice amorfo (SiO_2) depositados en espacios intra o intercelulares de los tejidos vegetales (Parry & Smithson, 1964; Bertoldi de Pomar, 1975; Jahren, 1996; Osterrieth, 2004). La formación de estos depósitos de sílice está ampliamente difundida en todos los niveles taxonómicos dentro de las plantas, incluyendo briofitos, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas (Piperno, 2006; Mazumdar, 2011; Benvenuto *et al.*, 2013). Los silicofitolitos tienen un alto valor taxonómico, ya que a partir de sus morfologías (que muchas veces copian la forma de las células que los contienen), es posible identificar tejidos y a partir de ellos, las familias y, en algunas ocasiones, los géneros productores (Twiss, 1992; Piperno, 2006; Gomes Coe *et al.*, 2014). Una vez que los órganos vegetales mueren, caen al suelo y se descomponen, los silicofitolitos pasan a formar parte de la fracción mineralógica de los mismos. Dada su alta perdurabilidad en suelos y sedimentos, y su importancia taxonómica, estas biomineralizaciones han sido extensamente utilizadas como indicadoras de las comunidades vegetales del pasado, tanto en estudios paleoambientales y paleobotánicos, como arqueológicos (e.g. Prasad *et al.*, 2011; Mercader *et al.*, 2013; Osterrieth *et al.*, 2014; 2016; Ball *et al.*, 2016).

Las familias Arecaceae, Cyperaceae y Poaceae son las principales productoras de morfologías diagnósticas de silicofitolitos, permitiendo su aplicación como indicadoras de comunidades en el pasado (e.g. Bremond *et al.*, 2005; Strömberg & Mc Inermy, 2011; Osterrieth *et al.*, 2016). Dentro de las dicotiledóneas, una de las morfologías características a nivel familia o género la constituyen los cistolitos. Desde el punto de vista anatómico, los cistolitos han sido definidos como concreciones de carbonato de calcio formadas sobre excrecencias de la membrana interior de las células (Font Quer, 2001; Metcalfe, 1985). Varios autores han identificado la presencia de un pie o esqueleto silíceo (“silica stalk”) sobre el cual se produce el depósito de carbonato de calcio y sin el cual no sería posible el desarrollo del cistolito (Watt *et al.*, 1987; Gal *et al.*, 2012). Este pie o esqueleto silíceo es el que puede quedar preservado en suelos y sedimentos, constituyendo una morfología silicofitolítica de interés para estudios paleoambientales, paleobotánicos y

arqueológicos (Osterrieth *et al.*, 2008; Iriarte & Paz, 2009). Existen varios estudios, tanto anatómicos como fitolíticos, que han identificado y descrito cistolitos en diversos géneros como *Celtis* y *Trema* (Dottori, 1976; Bozart, 1992; Wallis, 2003; Iriarte & Paz, 2009; Watling & Iriarte, 2013). En particular en nuestro país, se han realizado estudios fitolíticos en ejemplares de *Celtis ehrenbergiana* (Klotzsch) Liebm. y *Celtis occidentalis* L. desarrollados en bosques naturales del sudeste bonaerense (Fernández Honaine *et al.*, 2005; De Rito *et al.*, 2015). Sin embargo, si bien los cistolitos son comunes en Cannabaceae, y han sido atribuidos a esta familia cuando son identificados en sedimentos o suelos, es conocido que éstas estructuras silico-cálcicas también están presentes en especies de Moraceae, Urticaceae, entre otras (Metcalfe, 1985; Okazaki *et al.*, 1986; Watt *et al.*, 1987; Gal *et al.*, 2012). Es así que conocer las asociaciones fitolíticas de estos grupos vegetales y analizar si existe diferenciación entre los cistolitos producidos por las distintas familias, resulta relevante a la hora de la interpretación paleoambiental del registro fitolítico fósil. De esta manera, se plantea el presente estudio, cuyos objetivos son: 1) analizar la asociación fitolítica de seis especies pertenecientes a tres familias del orden Rosales, con presencia de cistolitos y desarrolladas en el sudeste bonaerense; 2) realizar un análisis de las formas y medidas de los cistolitos producidos por las especies; 3) analizar comparativamente las morfologías fitolíticas, en particular los cistolitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de especies y extracción de silicofitolitos: Se seleccionaron seis especies desarrolladas en distintos ambientes del sudeste bonaerense: *Parietaria debilis* G. Forst., *P. judaica* L. (ex *Parietaria officinalis* auct. non L.), *Morus alba* L., *Urtica urens* L., *Celtis ehrenbergiana* (Klotzsch) Liebm. y *Celtis occidentalis* L. (Tabla 1). Parte de la toma de muestras fue realizada en el herbario de la Unidad Integrada, Facultad de Ciencias Agrarias-UNMdP/EEA Balcarce, INTA (BAL), y parte en la Reserva Integral Laguna de los Padres y Reserva del Puerto, Partido de Gral. Pueyrredón, Buenos Aires. Si bien las asociaciones fitolíticas de *Celtis ehrenbergiana* y *C. occidentalis*

Tabla 1. Especies seleccionadas para el estudio.

Familia	Especie	Herbario y n° de colección	Fecha y lugar de recolección	Colector
Cannabaceae	<i>Celtis ehrenbergiana</i> (Klotzsch) Liebm.	Herbario Geoecología de Ambientes Sedimentarios, IGCyC, UNMdP (n° 39)	28/3/2004, Laguna de los Padres, Buenos Aires	Fernández Honaine, M.
Cannabaceae	<i>Celtis occidentalis</i> L.	Herbario Geoecología de Ambientes Sedimentarios, IGCyC, UNMdP (n° 479)	13/2/2014, Laguna de los Padres, Buenos Aires	de Rito, M.
Moraceae	<i>Morus alba</i> L.	Herbario BAL, INTA Balcarce, (BAL2069)	15/9/96, Parque de la Compañía Hewlett Packard, Capital Federal, Bs. As.	Azo 1175
Moraceae	<i>Morus alba</i> L.	Herbario BAL, INTA Balcarce, (BAL5184)	14/10/75, Ruta 226, frente Lag. La Brava, Balcarce, Bs.As.	herbario viejo n° 229
Moraceae	<i>Morus alba</i> L.	Herbario BAL, INTA Balcarce, (CAB401)	17/10/1983, Ruta 226, km 62, pie Co. Bachicha, Balcarce, Bs.As.	LM 612
Urticaceae	<i>Urtica urens</i> L.	Herbario BAL, INTA Balcarce (BAL4370)	14/9/71, EEA Balcarce, Buenos Aires	Okada 4091
Urticaceae	<i>Urtica urens</i> L.	Herbario BAL, INTA Balcarce (BAL6846)	Balcarce, Buenos Aires	herbario viejo n° 306
Urticaceae	<i>Parietaria debilis</i> G. Forst.	Herbario BAL, INTA Balcarce (BAL4368)	31/6/66, Sa de la Ventana, Bs As.	Okada 2517
Urticaceae	<i>Parietaria debilis</i> G. Forst.	Herbario BAL, INTA Balcarce (BAL4369)	20/5/64, Cerro Bachicha, Balcarce, Bs.As.	Okada 1685
Urticaceae	<i>Parietaria debilis</i> G. Forst.	Herbario BAL, INTA Balcarce (BAL5844)	sin datos	herbario viejo n° 991
Urticaceae	<i>Parietaria judaica</i> L. (ex <i>Parietaria officinalis</i> auct. non L.)	Herbario Geoecología de Ambientes Sedimentarios, IGCyC, UNMdP (n° 350)	17/11/2009, Reserva del Puerto Mar del Plata, Buenos Aires	Alvarez, Borrelli, Fernández Honaine

han sido reportadas previamente (Fernández Honaine *et al.*, 2005; De Rito, 2015; De Rito *et al.*, 2015), en el presente trabajo se analizaron en detalle los cistolitos y se compararon las asociaciones fitolíticas con el resto de las especies.

De cada especie se colectaron hojas de dos a tres individuos, las cuales se lavaron en ultrasonido y con agua destilada para eliminar posibles contaminantes. Las muestras se secaron en estufa a 65°C por 24hs. Para la extracción de silicofitolitos las muestras se sometieron a la técnica de calcinación de Labouriau (1983) (Fernández Honaine *et al.*, 2005). Esta técnica consiste en una calcinación inicial a 200°C por 2 hs, una digestión con HCl 5N y calor para eliminar los carbonatos, y una calcinación final a 800°C por 2,5-3 hs. Como resultado, se obtienen cenizas compuestas exclusivamente por sílice amorfo, ya que los carbonatos y la materia orgánica son eliminados o digeridos por el HCl y la temperatura, respectivamente.

Descripción de las morfologías fitolíticas: Las cenizas obtenidas por la técnica de Labouriau (1983) fueron montadas en aceite de inmersión para su posterior observación al microscopio óptico Zeiss Axiostar Plus, con 40x de magnificación. Se contaron entre 200- 250 silicofitolitos en cada muestra, se describieron las morfologías, utilizando trabajos de referencia (Madella *et al.*, 2005; Fernández Honaine *et al.*, 2005) y se calcularon las frecuencias relativas de cada una de ellas. Las fotografías fueron tomadas mediante una cámara digital (Canon Powershot G10, Canon Inc., Tokyo, Japón).

Asimismo, para un mejor detalle de las morfologías fitolíticas y de su composición elemental, las cenizas fueron observadas al microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6460 LV; Tokyo, Japan), de la Universidad Nacional de Mar del Plata, y microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) (Modelo

FEI ESEM Quanta 200) del LIMF (Universidad Nacional de la Plata). A su vez, para identificar la composición química de los cistolitos, las muestras se analizaron a través de un espectrómetro de rayos X dispersivo en energías (Modelo: EDAX SDD Apollo 40) del LIMF (Universidad Nacional de la Plata).

Para un análisis en detalle de los cistolitos, se midieron entre 25 y 30 de estas morfologías en cada muestra de cada especie estudiada. Las variables que se midieron en los cistolitos fueron: ancho del tricoma o base (a), largo total del cistolito (b), ancho del pie (si existiere) (c) y diámetro mayor del cistolito (parte globular) (c') (Fig. 1).

Análisis estadísticos: Con el objeto de analizar si es posible la diferenciación de las especies estudiadas, en base a su asociación fitolítica y al tamaño (largo y ancho, variables b y c', respectivamente) de los cistolitos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), donde se utilizó una matriz de correlación (PC-ORD, versión 6, McCune & Mefford, 2011). Para analizar si existían diferencias en los tamaños (largo y ancho) de los cistolitos se realizaron tests de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples (Zar, 1984).

RESULTADOS

Descripción de asociaciones fitolíticas

Celtis spp (Cannabaceae)

De acuerdo a lo detallado en la sección anterior, las especies de *Celtis* han sido descritas por Fernández Honaine *et al.* (2005) y De Rito (2015). Estos trabajos indican que la asociación fitolítica de *Celtis ehrenbergiana* está dominada por cistolitos (88%), pelos (5%), células poliédricas articuladas (4%) y estomas (Fig. 2 A-C). Mientras que *Celtis occidentalis* está caracterizado por cistolitos (44%), pelos silicificados (37%) y células epidérmicas silicificadas (18%) (Fig.2 D-F, 4 I).

Morus alba (Moraceae)

Las asociación fitolítica de hoja está dominada por cistolitos (86,4%), y en menor proporción por pelos (6,3%), partes de cistolitos (porción de epidermis solamente 2,7%; sector globular 1,9%) y fitolitos poliédricos articulados (que derivan de la silicificación de células epidérmicas, 2,1%) (Fig. 2 G-L, 4 A-C).

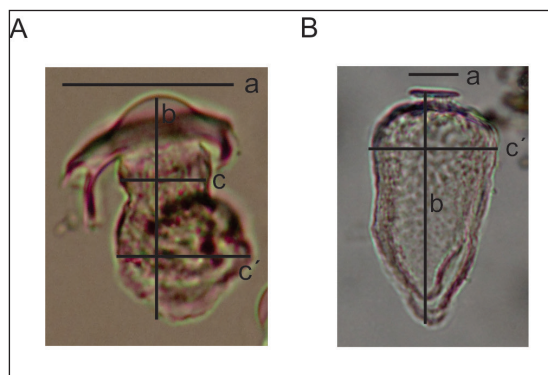


Fig. 1. Fotografías de los dos tipos de cistolitos descriptos en *M. alba* (A) y *U. urens* (B) y las variables medidas en este trabajo. a: ancho del tricoma o base epidérmica, b: largo total del cistolito, c: ancho del pie del cistolito, c': ancho máximo parte globular del cistolito.

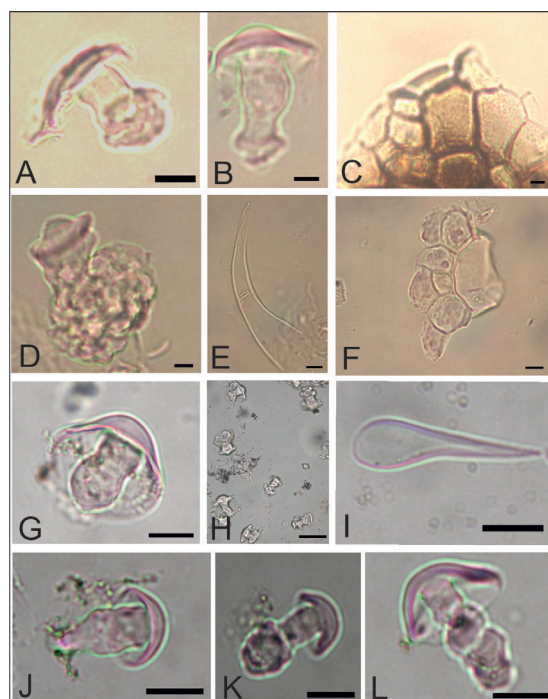


Fig. 2. Silicofitolitos en hoja de Cannabaceae y Moraceae. **A-B:** Cistolitos de *C. ehrenbergiana*. **C:** fitolitos poliédricos derivados de silicificación de células epidérmicas en *C. ehrenbergiana*. **D:** Cistolito en *C. occidentalis*. **E:** Pelo silicificado en *C. occidentalis*. **F:** Fitolito poliédrico en *C. occidentalis*. **G, H, J-L:** Cistolitos en *M. alba*. **I:** Pelo silicificado en *M. alba*. Escala 10 µm.

***Parietaria debilis* y *P. judaica* (Urticaceae)**

En ambas especies los pelos silicificados fueron los dominantes, siendo más abundantes en *P. judaica* (71,4%) que en *P. debilis* (54,3%). Los fitolitos globulares, correspondientes al sector globular de los cistolitos, fueron observados en mayor porcentaje en *P. debilis* (43,3%) en relación a *P. judaica* (24,4%) (Fig. 3 A-F, 4 G-H). En muy bajos porcentajes (1 y 2%) se observaron fitolitos globulares rotos que correspondían al sector globular de los cistolitos.

***Urtica urens* (Urticaceae)**

Los silicofitolitos más dominantes fueron los globulares alargados, correspondientes a la base globular de los cistolitos (58,6%), seguidos por los pelos (19,2%) y cistolitos completos con pelos (9,8%). Por último, también se observaron fitolitos poliédricos articulados, derivados de la silicificación de células epidérmicas (5,9%) (Fig. 3 G-I, 4 D-F).

Con el objeto de interpretar si era posible la diferenciación de las especies analizadas,

considerando no solo su asociación fitolítica, sino también los tamaños de los cistolitos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 5). Los resultados obtenidos indican que los tres primeros ejes acumulan el 87% de la variabilidad de los datos (51% para el eje 1, 21% para el eje 2 y 15% para el eje 3). Las principales variables que aportan al eje 1 son la abundancia de cistolitos completos, la abundancia de fitolitos globulares, el ancho y el largo de los cistolitos. Es así que este eje separa a *Celtis* spp. y *Morus alba* (mayor abundancia de cistolitos completos, en general más angostos y cortos) de *Urtica urens* y *Parietaria* spp. (mayor abundancia de fitolitos-cistolitos globulares, más anchos y largos). Al eje 2 aportan mayoritariamente las variables abundancia de fitolitos elongados y fitolitos globulares rotos, presentes en *Urtica urens* y *Parietaria* spp., respectivamente. Los fitolitos poliédricos articulados son los que mayoritariamente aportan al eje 3.

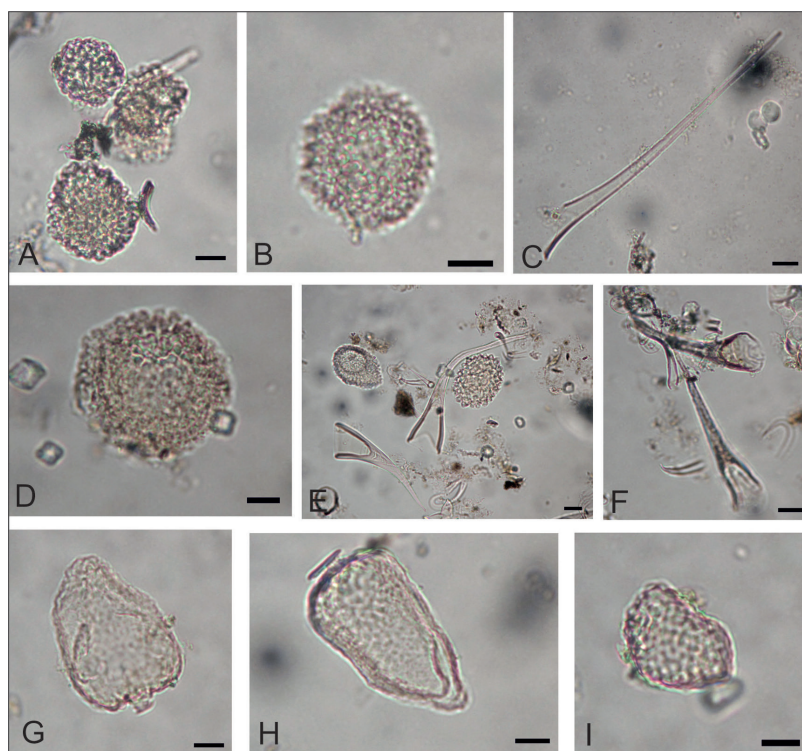


Fig. 3. Silicofitolitos en hoja de Urticaceae. **A-B:** Cistolitos en *P. debilis*. **C:** Pelo en *P. debilis*. **D-E:** Cistolitos en *P. judaica*. **F:** Pelo en *P. judaica*. **G-I:** Cistolitos en *U. urens*. Escala 10 μ m.

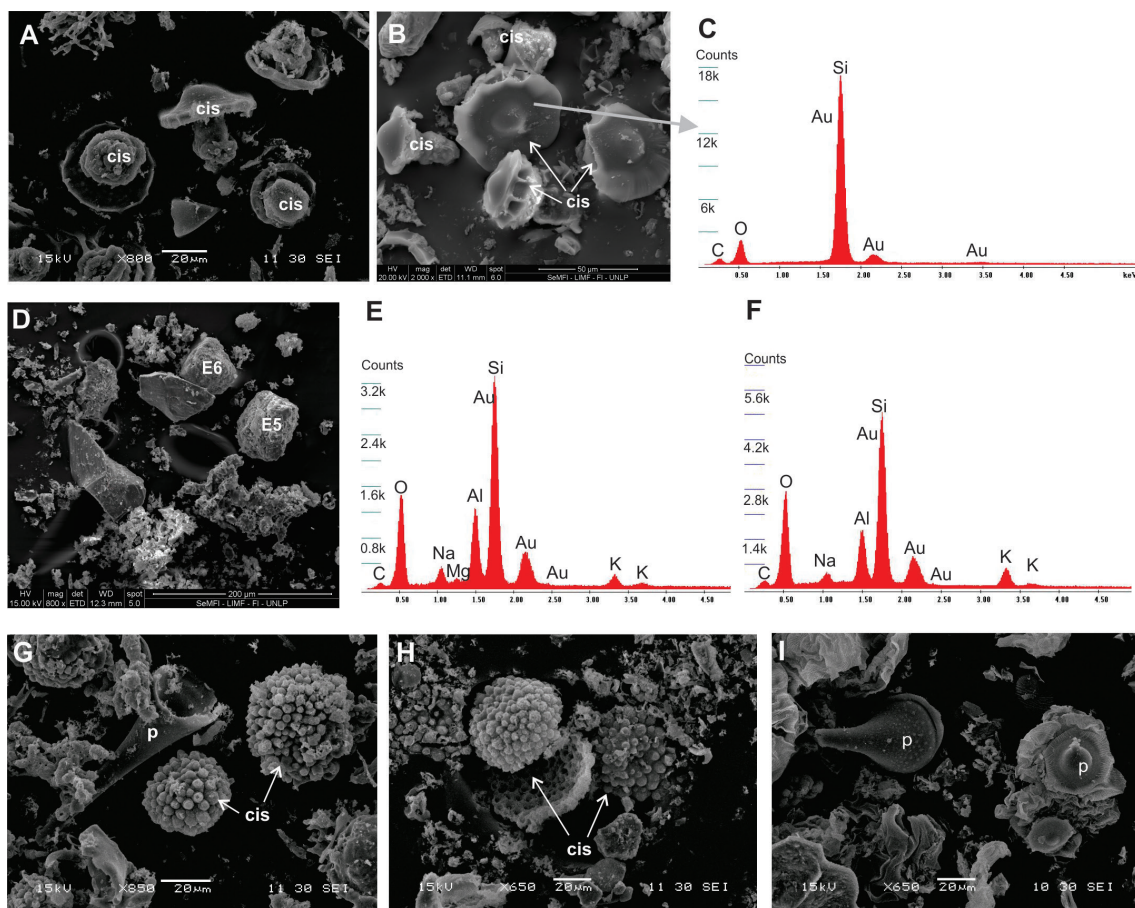


Fig 4. Fotografías obtenidas a partir del microscopio electrónico de barrido de silicofitolitos en hoja, y sus respectivos análisis mediante EDAX. **A-B:** Cistolitos (cis) en *M. alba*. **C:** Análisis de EDAX en cistolito fotografiado en B, donde se observa su composición silícea. **D:** Cistolitos (cis) en *U. urens*. **E:** Análisis de EDAX en cistolito fotografiado en D (E5), donde se observa su composición silícea y de otros elementos. **F:** Análisis de EDAX en cistolito fotografiado en D (E6), donde se observa su composición silícea y de otros elementos. **G:** Cistolitos (cis) y pelos (p) en *P. debilis*. **H:** Cistolitos en *P. judaica*. **I:** Pelos (p) en *C. occidentalis*.

Análisis de los cistolitos

Las observaciones permitieron distinguir dos tipos de cistolitos. El primer tipo está formado por una base de contorno poligonal a elíptico sobre la cual puede desarrollarse un pelo externo, un pie cilíndrico y un cuerpo globoso, de forma ovoide a redondeada. Este tipo de cistolito está presente en *Celtis* spp. y *Morus alba* (Fig. 1 A, 2). El segundo tipo de cistolito está representado por cuerpos globosos, en general con una base y pie nulos o apenas desarrollados en relación al cuerpo del cistolito. Está presente en *Parietaria* spp. y *Urtica urens* (Figs. 1 B, 3). Es

posible diferenciar los cistolitos de estas últimas tres especies por la rugosidad del cuerpo globular. En *Parietaria* spp. el cuerpo del cistolito presenta una superficie granular, mientras que en *Urtica urens* el cuerpo es apenas rugoso (Figs. 3, 4 D-H). Los análisis de EDAX permitieron corroborar la composición silícea de los cistolitos, y detectar la presencia de otros elementos, como Al, K y Na.

En la Tabla 2 se describen las medidas de las diferentes variables analizadas en cada tipo de cistolito. De los análisis estadísticos efectuados surge que existen diferencias significativas en el largo

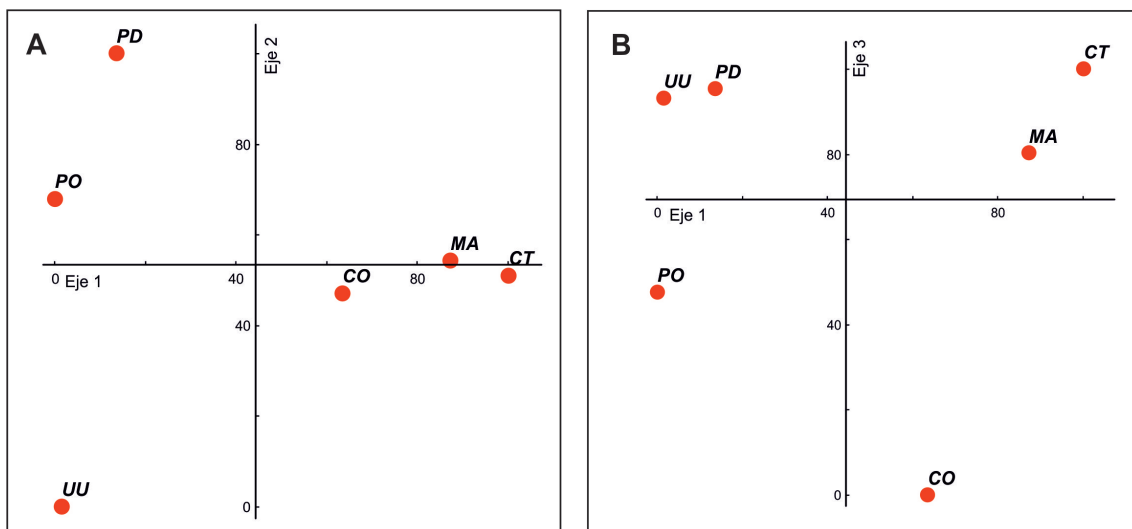


Fig. 5. Análisis de componentes principales, mostrando los tres primeros ejes. CT: *Celtis ehrenbergiana*, CO: *Celtis occidentalis*, MA: *Morus alba*, PD: *Parietaria debilis*, PO: *Parietaria judaica*, UU: *Urtica urens*.

total de los cistolitos entre las especies (Kruskal-Wallis chi-squared = 160,8, $p < 0,01$), siendo mayores los de *Urtica urens* y *P. judaica* (54,8 y 52,4 μm , respectivamente) y los menores los de *P. debilis*, *Morus alba* y *Celtis ehrenbergiana* (37,1, 34,3 y

34 μm , respectivamente). Asimismo, el ancho de los cistolitos es significativamente diferente entre las 6 especies analizadas (Kruskal-Wallis chi-squared = 250,82, $p < 0,01$), siendo mayores en *Parietaria* spp y *Urtica urens* (Tabla 2).

Tabla 2. Valores medios, mínimos (Mín.) y máximos (Máx.) de las distintas variables medidas en los cistolitos (ver figura 1) (valores en μm). Letras distintas (considerando una misma variable) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). *Indica que solo se pudieron medir en 7 (*U. urens*) y en 2 (*P. judaica*) cistolitos, ya que el resto presentaba solo el sector globular.

Especie	Variables medidas en los cistolitos											
	Ancho de la base del cistolito (variable a)			Largo total (variable b)			Ancho del pie (variable c)			Ancho máximo sector globular (variable c')		
	Mín.	Media	Máx.	Mín.	Media	Máx.	Mín.	Media	Máx.	Mín.	Media	Máx.
<i>Morus alba</i>	10	29,42	45	20	34,29c	50	7.5	13.75	20	7.5	18,83e	35
<i>Urtica urens</i>	12.5	23,21*	32.5	20	54,80a	90	-	-	-	20	41,35b	67.5
<i>Parietaria debilis</i>	-	-	-	25	37,11c	55	-	-	-	20	34,42c	52.5
<i>Parietaria judaica</i>	17.5	21,25*	25	30	52,44a	80	-	-	-	20	49,14a	77.5
<i>Celtis occidentalis</i>	10	29.79	75	25	40,86b	72.5	0	14.13	25	7.5	25,39d	50
<i>Celtis ehrenbergiana</i>	10	27.58	50	17.5	33,97c	87.5	5	12.07	22.5	7.5	23,87d	75

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Todas las especies estudiadas en el presente trabajo producen silicofitolitos, los cuales incluyen cistolitos de variada forma, pelos y fitolitos poliédricos, principalmente. Estas morfologías son el resultado de la silicificación de distintas células del tejido epidérmico (estomas, células epidérmicas en sentido estricto y pelos).

En las especies pertenecientes a la familia Urticaceae (*Urtica urens* y *Parietaria* spp.) las morfologías silicofitolíticas dominantes fueron los pelos unicelulares y los cistolitos. Bozarth (1992) describe para *Urtica dioica* y *Parietaria pennsylvanica* cistolitos similares a los observados en el presente estudio, así como fitolitos derivados de la epidermis (poliédricos y en puzzle). Canti (2003) observa cistolitos en *Urtica dioica* y *Parietaria diffusa* semejantes a los aquí estudiados. Collura & Neumann (2017) describen silicofitolitos en maderas de Urticaceae (*Musanga cecropioides*), mientras que Bonsen & ter Welle (1984) mencionan la presencia de cistolitos en tallos y maderas de esta familia. Por su parte, Gal *et al.* (2012) describen la formación de los cistolitos en *Urtica urens* bajo distintas condiciones de crecimiento. La familia Moraceae ha sido más ampliamente estudiada desde el punto de vista fitolítico, incluyendo a *Morus alba* y *Ficus* spp., entre otras. Kealhofer & Piperno (1998) describen en estas especies células epidérmicas silicificadas, bases de pelos, estomas y xilema. Bozarth (1992) describe en *Morus rubra* cistolitos similares a los observados en el presente trabajo. Tsutsui *et al.* (2016) analizan la presencia de sílice en forma de papilas en la superficie de hojas de *Morus alba*, pero no se refieren a los cistolitos. Estas papilas representarían los tricomas bajo los cuales se desarrollan los cistolitos observados en este trabajo. Los antecedentes en silicofitolitos en Cannabaceae son numerosos, e incluyen estudios en hojas, maderas y frutos de especies de *Celtis* y *Trema* (Bozarth, 1992; Cowan *et al.*, 1997; Kealhofer & Piperno, 1998; Wallis, 2003; Iriarte & Paz, 2009; Collura & Neumann, 2017). Todos estos antecedentes, junto a los resultados obtenidos en este trabajo reflejan la alta producción de depósitos de sílice amorfo (ya sea en cistolitos como en células epidérmicas y pelos), en especies de estas familias relacionadas (Moraceae, Urticaceae y Cannabaceae), ahora incluidas dentro del orden Rosales. Asimismo, en otra familia emparentada

con las anteriores (familia Cecropiaceae), también se han identificado y descrito idioblastos con Si, y en menor porcentaje Ca, sin desarrollo de cistolitos (Setoguchi *et al.*, 1993).

Los cistolitos constituyen una estructura única, compuesta por dos elementos distintos: sílice amorfo y carbonato de calcio (Gal *et al.*, 2012). Originariamente, los cistolitos habían sido definidos como estructuras de carbonato de calcio, depositados en células específicas, denominadas litocistes o litocistos, de origen epidérmico que luego intruyen en el mesófilo (Metcalfé, 1985; Okazaki *et al.*, 1986; Watt *et al.*, 1987; Gal *et al.*, 2012). Sin embargo, estudios más recientes, especialmente el de Gal *et al.* (2012), confirman la presencia de un esqueleto o pie de sílice amorfo, sin el cual el desarrollo del cistolito no es posible (Watt *et al.*, 1987; Gal *et al.*, 2012). Incluso, estos autores han observado que la falta de disponibilidad de Si impide la formación de ese pie y, como consecuencia, la formación del cistolito (Gal *et al.*, 2012). La estructura de sílice amorfo imita la forma típica de los cistolitos, es decir que aún sin la presencia del depósito calcáreo es posible su identificación como tal, constituyendo una morfología de importancia para los estudios fitolíticos (Bozarth, 1992; Wallis, 2003; Fernández Honaine *et al.*, 2005; Iriarte & Paz, 2009). Los resultados obtenidos en el presente trabajo reafirman lo observado por los autores antes mencionados, ya que la metodología utilizada elimina los carbonatos presentes en los cistolitos, quedando en las cenizas solo la estructura de sílice amorfo (Labouriau, 1983).

La presencia de cistolitos ha sido registrada y descrita en diversas familias como Acanthaceae, Cannabaceae, Moraceae, Ulmaceae y Urticaceae (Metcalfé, 1985; Setoguchi *et al.*, 1993; Gal *et al.*, 2012). En general, los estudios fitolíticos en estas familias son escasos, y más aún el estudio de los cistolitos (como estructura de sílice amorfo). Los resultados aquí presentados muestran por primera vez las asociaciones fitolíticas de tres especies de Urticaceae y una de Moraceae, todas comunes de la provincia de Buenos Aires. En particular, y comparando con las especies de *Celtis* analizadas previamente (Fernández Honaine *et al.*, 2005; De Rito, 2015), los resultados indican que si bien las morfologías producidas son cistolitos, pelos y fitolitos poliédricos articulados, es posible la diferenciación, al menos a nivel de familia. Las especies de *Celtis* spp. (Cannabaceae) y *Morus alba*

(Moraceae), producen cistolitos con una estructura diferente a las tres especies de Urticaceae, los cuales en general presentan una protuberancia o pelo asociado y son más angostos y más cortos. Estas características, así como las variables medidas en los cistolitos, podrían ser utilizadas para la diferenciación de los cistolitos en el registro fósil. Los estudios de morfometría aplicado a los silicofitolitos son escasos, pudiendo mencionarse los realizados en silicofitolitos de palmeras de interés comercial (Fenwick *et al.*, 2011), en fitolitos globulares (silicofitolitos característicos de Arecaceae y otras monocotiledóneas nativas de Argentina) (Benvenuto *et al.*, 2015; Patterer, 2014), en ciperáceas del sudeste bonaerense (Fernández Honaine *et al.*, 2009) y en gramíneas (Fahmy, 2008). Este trabajo constituye una contribución a este tipo de estudios, los cuales representan una útil herramienta para la interpretación del registro fitolítico fósil.

AGRADECIMIENTOS

A las responsables del herbario BAL INTA, la curadora Ing. Sara Alonso y la Ing. Agr. Ma. Lis Echeverría, quienes permitieron el acceso a las muestras de las especies estudiadas. El trabajo fue financiado por proyectos de la Universidad Nacional de Mar del Plata (EXA 839/17), FONCyT (PICT 1583/13) y CONICET (PIP 0145).

BIBLIOGRAFÍA

- BALL T., K. CHANDLER-EZELL, R. DICKAU, N. DUNCAN, T.C. HART, J. IRIARTE, C. LENTFER, A. LOGAN, H. LU, M. MADELLA, D.M. PEARSALL, D.R. PIPERNO, A.M. ROSEN, L. VRYDAGHS, A. WEISSKOP & J. ZHANG. 2016. Phytoliths as a tool for investigations of agricultural origins and dispersals around the world. *J. Archaeol. Sci.* 68: 32-45.
- BENVENUTO, M.L., M. FERNÁNDEZ HONAINÉ & M. OSTERRIETH. 2013. Amorphous silica biomineralizations in *Polytrichum strictum* Menzies ex Brid. (Bryophyta). *J. Bryol.* 35: 112-118.
- BENVENUTO, M.L., M. FERNANDEZ HONAINÉ, M. OSTERRIETH & E. MOREL. 2015. Globular phytoliths differentiation in Arecaceae and other monocotyledons: morphological description for palaeobotanical application. *Turk. J. Bot.* 39: 341-353.
- BERTOLDI DE POMAR, H. 1975. Los silicofitolitos: Sinopsis de su conocimiento. *Darwiniana* 19: 173-206.
- BONSEN, K.J. & B.J.H. TER WELLE. 1984. Systematic wood anatomy and affinities of the Urticaceae. *Bot. Jahrb. Syst.* 105: 49-71.
- BOZARTH, S. R. 1992. Classification of opal phytoliths formed in selected dicotyledons native to the Great Plains. In: RAPP, G. & S. C. MULHOLLAND (eds.), *Phytolith Systematics*, pp. 193-214. Plenum Press, Nueva York.
- BREMOND, L., A. ALEXANDRE, C. HELY & J. GUIOT. 2005. A phytolith index as a proxy of tree cover density in tropical areas: Calibration with Leaf Area Index along a forest-savanna transect in southeastern Cameroon. *Global and Planetary Change* 45: 277-293.
- CANTI, M.G. 2003. Aspects of the chemical and microscopic characteristics of plant ashes found in archaeological soils. *Catena* 54: 339 - 361.
- COLLURA, L.V & K. NEUMANN. 2017. Wood and bark phytoliths of West African woody plants. *Quarter. Int.* 434: 142-159.
- COWAN, M. R., M. C. GABEL, A. H. JAHREN & L. L. TIESZEN. 1997. Growth and biomineralization of *Celtis occidentalis* (Ulmaceae) pericarps. *Am. Midl. Nat.* 137: 266-273.
- DE RITO, M. 2015. Relación entre las asociaciones fitolíticas de especies vegetales y suelos asociados a talares en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Mar del Plata, pp 78.
- DE RITO, M., M. FERNANDEZ HONAINÉ, M. OSTERRIETH & E. MOREL. 2015. Análisis fitolítico de especies vegetales y suelos asociados a talares en el sudeste bonaerense. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 50 (supl.): 241.
- DOTTORI, N.M. 1976. Morfología foliar en *Celtis tala* y *Celtis pallida* con especial referencia a los domacios. *Kurtziana* 9: 63-80.
- FAHMY, A.G. 2008. Diversity of lobate phytoliths in grass leaves from the Sahel region, West Tropical Africa: Tribe Paniceae. *Pl. Syst. Evol.* 270: 1-23.
- FENWICK, R., C. LENTFER & M. WEISLER. 2011. Palm reading: a pilot study to discriminate phytoliths of four Arecaceae (Palmae) taxa. *J. Archaeol. Sci.* 38: 2190-2199.
- FERNANDEZ HONAINÉ, M., A.F. ZUCOL & M. OSTERRIETH. 2005. Biomineralizaciones de sílice en *Celtis tala* (Cannabaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 40 (34): 229-239.
- FERNANDEZ HONAINÉ, M., A.F. ZUCOL & M. OSTERRIETH. 2009. Phytolith analysis of Cyperaceae from the Pampean Region, Argentina. *Aust. J. Bot.* 57: 512-523.

- FONT QUER, P. 2001. *Diccionario de Botánica. Editorial Península, 2º Edición, Barcelona, España.*
- GAL, A., A. HIRSCH, S. SIEGEL, C. LI, B. AICHMAYER, Y. POLITI, P. FRATZL, S. WEINER & L. ADDADI. 2012. Plant Cystoliths: A Complex Functional Biocomposite of Four Distinct Silica and Amorphous Calcium Carbonate Phases. *Chem. Eur. J.* 18: 10262-10270.
- GOMES COE, H.H., M. OSTERRIETH & M. FERNÁNDEZ HONAINE. 2014. Phytoliths and their applications. In: GOMES COE, H. & M. OSTERRIETH (Eds.) *Synthesis of some phytolith studies in South America (Brazil and Argentina)*, pp. 1-26. Series Botanical research and practices. Nova Science Publishers, Inc.
- IRIARTE, J. & E. PAZ. 2009. Phytolith analysis of selected native plants and modern soils from southeastern Uruguay and its implications for paleoenvironmental and archeological reconstruction. *Quater. Int.* 193: 99-123.
- JAHREN, A. H. 1996. How and why do phytoliths form?: Biomineralization. *The Phytolitharien* 9: 2-10.
- KEALHOFFER, L. & D.R. PIPERNO. 1998. *Opal phytoliths in Southeast Asian flora*. Smithsonian Contributions to Botany, (88), pp 39. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- LABOURIAU, L. G. 1983. Phytolith work in Brazil: a minireview. *The Phytolitharien*, 2: 6-10.
- MADELLA, M., A. ALEXANDRE & T. BALL. 2005. Internacional code for phytolith nomenclature 1.0. *Ann. Bot.* 96: 253-260.
- MAZUMDAR, J. 2011. Phytoliths of pteridophytes. *S. Afr. J. Bot.* 77: 10-19.
- MCCUNE, B. & M. J. MEFFORD. 2011. PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 6.0 MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A.
- MERCADER J., T. BENNETT, C. ESSELMONT, S. SIMPSON & D. WALDE. 2013. Phytoliths from Middle Stone Age habitats in the Mozambican Rift. *J. Hum. Evol.* 64: 328-336.
- METCALFE, C. R. 1985. Secreted mineral substances. Crystals. In: METCALFE, C.R. & L. CHALK (eds.) *Anatomy of the Dicotyledons Vol II. Wood structure and conclusion of the general introduction*, pp: 82-97. Ed. Clarendon Press, Oxford.
- OKAZAKI, M., H. SETOGUCHI, H. AOKI & S. SUGA. 1986. Application of soft x-ray microradiography to observation of cystoliths in the leaves of various higher plants. *Bot. Mat.* 99: 281-287.
- OSTERRIETH, M., 2004. Biominerales y Biomineralizaciones. In: GARCÍA CALDERÓN N. (ed.) *Cristalografía de Suelos*, pp. 206- 218. Sociedad Mexicana de Cristalografía. México.
- OSTERRIETH, M., M.F. ÁLVAREZ, M. FERNANDEZ HONAINE & G. ERRA. 2016. Silicophytolith studies in South America and Argentina: scope and limitations for paleoenvironmental reconstruction of the marine isotope stage 3 (MIS3). In: GERMÁN M. GASPARINI, J. RABASSA, C. DESCHAMPS & E. TONNI (eds). *Marine Isotope Stage 3 in Southern South America*, pp. 321-352. Springer.
- OSTERRIETH, M., M. FERNANDEZ HONAINE, N. BORRELLI & M.F. ALVAREZ. 2014. Silicophytoliths in representative soils of the southeast Pampean Plains, Argentina. In: GOMES COE, H. & M. OSTERRIETH (eds.) *Synthesis of some phytolith studies in South America (Brazil and Argentina)*, pp 215-241. Series Botanical research and practices, Nova Science Publishers, Inc.
- OSTERRIETH, M., G. MARTINEZ, M.A. GUTIERREZ & M.F. ALVAREZ. 2008. Biomorfos de sílice en la secuencia pedosedimentaria del sitio arqueológico Paso Otero 5, Buenos Aires, Argentina. In: KORSTANJE, A. & P. BABOT (Eds.) *Matices interdisciplinarios en estudios fitolíticos y de otros microfósiles*, pp. 77-90. BAR International Series S1870, Oxford, Inglaterra.
- PARRY, D. W. & F. SMITHSON. 1964. Types of opaline silica depositions in the leaves of British grasses. *Ann. Bot.* 28: 169-185.
- PATTERER, N.I. 2014. Análisis fitolíticos de las principales especies de palmeras (Arecaceae) presentes en regiones subtropicales de América del Sur. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 49 (4): 491-502.
- PIPERNO, D., 2006. *Phytoliths. A Comprehensive Guide for Archaeologist and Paleoecologist*, pp. 248. Altamira Press.
- PRASAD V., C.A.E. STRÖMBERG, A.D. LEACHÉ, B. SAMANT, R. PATNAIK, L. TANG, D.M. MOHABEY, S. GE & A. SAHNI. 2011. Late Cretaceous origin of the rice tribe provides evidence for early diversification in Poaceae. *Nature communications* 2: 480.
- SETOGUCHI, H., H. TOBE, H. OHBAAND & M. OKAZAKI. 1993. Silicon-accumulating idioblasts in leaves of Cecropiaceae (Urticales). *Plant Res.* 106: 327-335.
- STRÖMBERG, C. A. & F.A. MC INERNEY. 2011. The Neogene transition from C3 to C4 grasslands in North America: assemblage analysis of fossil phytoliths. *Paleobiology* 37: 50-71.
- TSUTSUI, O., R. SAKAMOTOA, M. OBAYASHIA, S. YAMAKAWAA, T. HANDAA, D. NISHIOHAMANE, & I. MATSUDA. 2016. Light and SEM observation of opal phytoliths in the mulberry leaf. *Flora* 218: 44-50.

M. Fernández Honaine *et al.* - Silicofitolitos en Cannabaceae, Moraceae y Urticaceae

- TWISS, P.C. 1992. Predicted world distribution of C3 and C4 grass phytoliths. In: RAPP, G. & S. C. MULHOLLAND (eds.), *Phytolith systematics*, pp. 113-128. Plenum Press, New York.
- WALLIS, L. A. 2003. An overview of leaf phytolith production patterns in selected northwest Australian flora. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 125: 201-248.
- WATLING, J. & J. IRIARTE. 2013. Phytoliths from the coastal savannas of French Guiana. *Quater. Int.* 287: 162-180
- WATT, W. M., C. K. MORRELL, D. L. SMITH & M. W. STEER. 1987. Cystolith development and structure in *Pilea cadieri* (Urticaceae). *Ann. Bot.* 60: 71-84.
- ZAR, JH. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.

Recibido el 12 de octubre de 2017, aceptado el 8 de noviembre de 2017. Editora: Georgina M. Del Fueyo.

GENERAL CHARACTERISTICS OF AIRBORNE POLLEN IN MONTEVIDEO CITY, URUGUAY

LETICIA TEJERA¹, ÁNGELES BERI¹ and XIMENA MARTÍNEZ BLANCO¹

Resumen: Características generales del polen aéreo en Montevideo, Uruguay. Este trabajo analiza las variaciones diarias y estacionales y la influencia de las condiciones meteorológicas en las concentraciones de polen en el período de junio de 2011 a mayo de 2014. Fueron identificados noventa y tres taxones polínicos, correspondientes a 49 tipos arbóreos y a 44 tipos polínicos herbáceos. Los tipos polínicos más importantes fueron Poaceae, *Platanus*, Cupressaceae/Taxaceae, Eupatorieae type, *Celtis*, Urticaceae, Myrtaceae, *Casuarina*, Amaranthaceae, Cyperaceae, *Fraxinus*, Arecaceae, *Ricinus communis*, Moraceae, *Myrsine*, *Ambrosia*, *Quercus* y Pinaceae. Se registró polen todos los días del año, pero el período de polinización principal se registró desde agosto a abril. Se observaron diferencias interanuales en los índices polínicos, en las fechas y concentraciones diarias máximas, así como en las concentraciones mensuales acumuladas. La temperatura media, la humedad relativa del aire y la dirección y velocidad del viento fueron las variables meteorológicas con mayor influencia sobre el polen aéreo. Las concentraciones polínicas excedieron los umbrales considerados como moderados o altos un promedio de 182 días al año.

Palabras clave: Polen aéreo, meteorología, umbrales de concentración, viento, Montevideo, Uruguay.

Summary: This paper analyses daily and seasonal variations on pollen concentrations and the influence of meteorological conditions on the airborne pollen from June 2011 to May 2014. Data is also compared with results from a previous pollen survey from 2000-2001. Ninety-three taxa were identified, belonging to 49 trees and shrub taxa and 44 herbaceous taxa. The most important pollen sources were Poaceae, *Platanus*, Cupressaceae/Taxaceae, Eupatorieae type, *Celtis*, Urticaceae, Myrtaceae, *Casuarina*, Amaranthaceae, Cyperaceae, *Fraxinus*, Arecaceae, *Ricinus communis*, Moraceae, *Myrsine*, *Ambrosia*, *Quercus*, and Pinaceae. Pollen was recorded all year round but the main pollen season was from August to April. Inter-annual differences were observed on pollen indexes, dates and values of daily peak concentrations and monthly accumulated concentrations. Temperature, relative air humidity and wind speed and direction seem to be the most influential meteorological variables on pollen concentrations. The number of days that pollen concentrations are above moderate and high thresholds levels is estimated and woody and non-woody pollen concentrations would be above moderate levels on average 182 days per year.

Key words: Airborne pollen, meteorology, threshold levels, wind, Montevideo, Uruguay.

INTRODUCTION

Airborne pollen is a common component of atmospheric aerosols and knowing its content in the atmosphere has ecological, agronomic, climatic and clear clinical interests. In particular, pollen allergy has a great impact on public health due to its high prevalence and associated costs.

Allergic diseases like asthma and rhinitis can affect up to 30% of population in industrialized countries (Asher *et al.*, 2006) and its prevalence seems to be on the increase (D'Amato *et al.*, 2007). Therefore, for allergic patients and allergists it is relevant to know the pollen types present in a particular area at a particular time of the year and the concentrations these taxa achieve (Gentile *et al.*, 2013). Moreover, during this globalization era this information is also relevant for allergic people travelling around the world. Furthermore, long-term airborne pollen records may provide information about plant responses to climate

¹ Laboratorio de Palinología, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay.

* Corresponding author: lete@fcien.edu.uy

change (Ziello *et al.*, 2012; Frei & Gassner, 2007) and its impact on the allergic population (Cecchi *et al.*, 2010). Pollen counts, usually expressed as pollen grains m^{-3} , are still frequently communicated to the population as pollen levels that correspond to different concentration ranges usually based on percentile values, not on health effects (AAAAI 2016). Despite several studies have related pollen concentrations with the development of allergic symptoms (e.g. Breton *et al.*, 2006; Fuhrman *et al.*, 2007), threshold values vary among studies due to several factors and concentration levels for sensitization remain unknown (de Weger *et al.*, 2013).

The aerobiological process includes the production, liberation, transport and impact of pollen grains, fungal spores and other particles (Gregory, 1973). Several meteorological and ecological factors affect this process at different spatial and temporal scales, days to years for pollen preconditioning and impact, minutes to weeks for transport and seconds to hours for liberation, ascent and deposition (Edmonds, 1979). Meteorological conditions may have different effects on atmospheric pollen values, affecting positively or negatively different parts of the aerobiological pathway. Temperature and relative humidity affect anthers formation and dehiscence, thus influencing the amount of pollen produced and liberated (Spieksma *et al.*, 1989). Wind speed favors pollen shedding from anthers and pollen dispersion (Damialis *et al.*, 2005) but has a dilution impact on pollen concentration. Rainfall can also have a positive or negative effect on atmospheric pollen concentrations whether it happens during plant growth, when it has a positive influence on plant physiology, increasing pollen production (Recio *et al.*, 2010) or during the pollination period when it has a washout effect on the atmosphere and decreases the pollen content (Pérez *et al.*, 2009).

Airborne pollen monitoring in Uruguay airborne was first done in 2000 for just one year (Tejera & Beri, 2003; 2005) and restarted in June 2011. In the region monitoring programs have been done in several cities in Argentina such as Mar del Plata (Bianchi, 1992; Latorre, 1997; Latorre & Caccavari, 2009; Latorre & Pérez, 1997; Pérez *et al.*, 2001; 2003), Buenos Aires (Noetinger *et al.*, 1994; Nitui *et al.*, 2003), La Plata (Nitui, 2006; Nitui & Mallo, 2011; Mallo *et al.*, 2011), Bariloche

(Bianchi & Olabuenaga, 2006) and Bahía Blanca (Murray *et al.*, 2002; 2007; 2008; 2010; 2016). Research programs are ongoing in Caxias do Sul (Lorscheitter *et al.*, 1986; Vergamini *et al.*, 2006) in Brazil and mainly in Santiago de Chile in Chile (Toro *et al.*, 2015). The relative low number of aerobiological studies performed in the region strongly contrast with the very broad range of environmental gradients present in temperate South America (Olson *et al.*, 2001). Therefore, this study would represent a relevant contribution to aerobiological studies in the region.

The aim of the present study is to analyze the main characteristics of atmospheric pollen in Montevideo city in terms of total, non-woody and woody- plants pollen values and assess the influence of meteorological conditions on pollen concentrations from June 2011 to May 2014.

MATERIALS AND METHODS

Study area and plant cover

Montevideo (34°56'S-56°09'W) the capital and most populated city in Uruguay, with about 1.5 million inhabitants, is located on the Río de la Plata estuarine coast (Fig. 1). The climate is temperate-subtropical humid, with rainfalls throughout the year (1098 mm), mean annual temperature of 16.5 °C and relative humidity of 75%. Rainfalls are basically

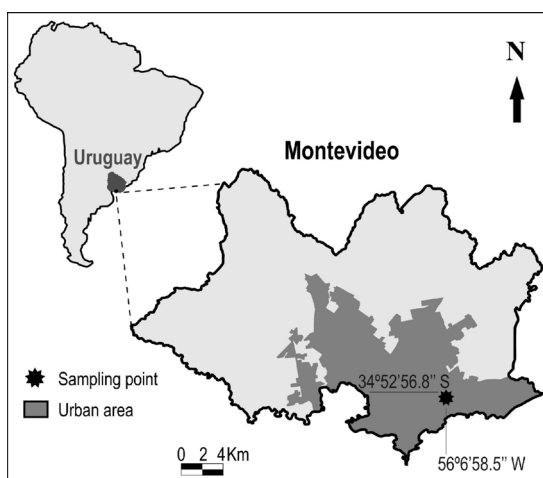


Fig. 1. Location of sampling site at Montevideo, Uruguay.

controlled by the interaction between the South Atlantic and South Pacific Anticyclones. The region belongs to the Pampa Province, “Uruguayense” District (Cabrera & Willink, 1973). This “campos” landscape is dominated by grasslands although native woodlands are found along water courses and hills (Soriano, 1992). Montevideo’s urban flora is mainly composed of exotic trees and shrub species cultivated for ornamental purposes along streets, avenues, parks and cemeteries over the city. The most abundant trees and shrubs cultivated in public areas of the city are *Melia azedarach*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Eucalyptus globulus*, *E. camaldulensis* and *Platanus x acerifolia*, other important species are *Pinus pinaster*, *Tipuana tipu*, *Fraxinus excelsior*, *F. lanceolata* and *Acer negundo*. Tree species like *Nerium oleander*, *Schinus molle*, *Jacaranda mimosifolia*, *Phoenix canariensis*, *Casuarina cunninghamiana*, *Populus deltoides*, *Ligustrum lucidum*, *Ulmus procera*, *Eucalyptus globulus*, *Acer saccharium*, *Ceiba speciosa*, *Salix babilonica* and *S. elegantissima*, *Arecastrum romanzoffianum*, *Washingtonia filifera* and *W. robusta* are also very frequent in public spaces (Lombardo 1979, Arcos & Pose 2008). Herbaceous vegetation is cultivated in parks and private gardens or occurs spontaneously in open areas of the city. The most important herbaceous pollen sources belong to the families Apiaceae, Amaranthaceae, Asteraceae, Poaceae and Urticaceae (Lombardo 1982; 1983; 1984).

Airborne pollen

Daily pollen concentration was sampled during three years from June 2011 to May 2014. The periods were defined as seasonal years and not to calendar years, and correspond to June 2011- May 2012, June 2012- May 2013 and June 2013- May 2014 sampling periods, respectively. A Rotorod sampler Model 40 (Sampling Technologies Inc.) was used to recover airborne pollen. The sampler was installed on the roof of the Faculty of Science (34°52'56.8"S, 56°06'58.5"W) in an open area at ca. 12 m above ground level, complying with requirements for the installation of Rotorod samplers (Brown *et al.*, 1993). Nomenclature follows the recommendations of the International Association of Aerobiology (Galán *et al.*, 2017).

Daily data were obtained according to standard methods (Brown *et al.*, 1993). The rods were

collected daily and all pollen grains were counted and analyzed under 400 x magnification. Pollen was identified with the aid of the reference collection of the Palynology laboratory and specific bibliography (Bassett *et al.*, 1978; Markgraf & D’Antoni, 1978; Lewis *et al.*, 1983).

Monthly and total pollen values were estimated by the sum of daily pollen concentration values. Pollen types were grouped according to the growing form of species that produce them in non-woody (NW) and woody (W) pollen types. Data were collected following exactly the same methodology and pollen was identified and counted by the same person as in the present dataset.

Taxa representing at least 0.5% of total pollen of the period were selected as important taxa and their mean daily pollen concentration and standard deviation were estimated for the whole sampling period.

To look for statistical differences between airborne pollen from all sampled periods and due to the lack of normality of data, Kruskal-Wallis analysis of variance were performed on daily, weekly and monthly values.

Meteorological data used for site characterization corresponds to the historical period 1971-1990. On the other hand, daily data during the studied period were supplied by the Dirección Nacional de Meteorología and correspond to the nearest meteorological station at Carrasco Airport (34°50'S, 56°00'W) located 4 km apart from the sampling point. Kruskal-Wallis analyses of variance were performed on annual means and monthly values in order to assess for differences between years.

To analyze the correlation between woody and non-woody pollen and meteorological data the Spearman Rank non parametric correlation coefficient and multiple linear regression analysis, considering daily values of the whole sampled period, were performed. In order to assess the influence of wind speed and direction on pollen concentrations, bivariate polar plots of mean pollen concentrations by wind direction and speed for the study site and sampling were done on the R package Openair (Carslaw 2015).

Missed sampling days were excluded from all statistics analyses. A total of 14 days of sampling were lost due to a failure of the sampler and saturation of rods with volcanic ash coming from the Puyehue–Cordón Caulle Volcanic Complex

in southern Chile that erupted on June 4 and September 24, 2011 and remained in the atmosphere for months.

In order to estimate the average number of days pollen concentration was above moderate and high levels, pollen thresholds levels indicated by the AAAAI's National Allergy Bureau (AAAAI 2016) were used. Local pollen threshold levels were estimated for woody and non-woody plants pollen types at Montevideo city considering percentile 50 as the inferior threshold for moderate concentrations and 75 percentile as the inferior threshold for high concentrations. Thresholds were estimated using data of the whole sampled period (3 years) and averaged values of the most important woody and non-woody plant pollen types.

RESULTS

General pattern

In Montevideo atmosphere a similar total Annual Pollen Integral was obtained for all sampled periods, with the highest value recorded in 2000-2001 (12792 pollen grains m^{-3}) and the lowest registered in 2012-2013 (11659 pollen grains m^{-3}) while 2011-2012 and 2013-2014 12568 and 12193 pollen grains m^{-3} respectively were recorded. Daily pollen totals also showed a similar pattern along all sampling periods where a main pollen season, representing 97% of annual totals on average, can be established from August to April (Fig. 2). Moreover, the period of lowest pollen concentration is observed from May to July (Fig. 2), when the minimum pollen values of the period were recorded and monthly totals did not exceed 2% of total pollen (TP). In general, daily pollen concentrations rise at the end of July-early August, reaching higher values in September, November-December and late February-March.

Despite this similar general pattern some differences are appreciated. For instance, the highest peaks were registered in November-December for 2000-2001, March for 2011-2012, August-September for 2012-2013 and February for 2013-2014 (Fig. 2).

Non-woody pollen contributed similarly to Annual Pollen Integral during all periods analyzed. However, during 2013-14 period non-woody plants pollen was significantly higher ($p < 0.01$) and explained the higher pollen index registered that

year. The highest monthly non-woody totals were reached in different months and December 2000 and February 2013-14 concentrations were significantly higher ($p < 0.01$) (Fig. 3).

Woody pollen showed a similar pattern and roughly similar monthly values all years analyzed, with the highest concentrations recorded in September (Fig. 3). However, statistically significantly higher monthly totals were observed in November 2011-12, August 2012-13, February and March 2013-14 ($p < 0.01$). In addition, March 2000-01 showed the lowest accumulated concentrations for that month ($p < 0.01$).

Ninety-three pollen taxa were identified at family, genus and, occasionally, species level, where 49 correspond to tree and shrub taxa (woody-pollen) and 44 to herbaceous taxa (herbaceous-pollen). Although 93 pollen taxa were recorded, only few were registered frequently or in high concentrations. On average, 18 taxa exceeded 0.5% of total pollen concentration and represent 90% of total pollen. Figure 4 shows the variation in daily pollen concentrations from year to year. Poaceae was the main and most important contributor to the airborne pollen, accounting for 45.7% of TP (Total Pollen) in 2000-2001, 47% of TP in 2013-14, 40% of TP in 2012-13 and just 32.6% of TP in 2011-12. Other important taxa, ordered according their first appearance in the year, considering 1 of June as the start of the calendar year, were: *Fraxinus*, Cupressaceae/Taxaceae, Pinaceae, Moraceae, *Platanus*, *Quercus*, *Celtis*, Myrtaceae, Urticaceae, Amaranthaceae, *Ricinus*, Cyperaceae, *Myrsine*, *Casuarina*, Arecaceae, *Ambrosia* type and Eupatorieae type. The first peaks on TP registered in June correspond to Cupressaceae (10.5% TP) and *Fraxinus* (1.3% TP) (Fig. 4). The former reached its higher concentration in August while the latter increased its concentration at the end of August-start of September together with Pinaceae (0.5% TP), Moraceae (0.6%), *Platanus* (8.5% TP) and *Quercus* (1.1% TP) (Fig. 4). Pollen concentrations of these winter taxa decreased gradually in October and spring while other woody taxa, in particular, *Celtis* (0.7% TP) (Fig. 4) but also *Salix*, *Olea* and Anacardiaceae showed its highest values in October and November. Myrtaceae pollen grains (2.1% TP) were recorded almost all year round, reaching moderate concentrations from November to January, with another period of moderate concentrations

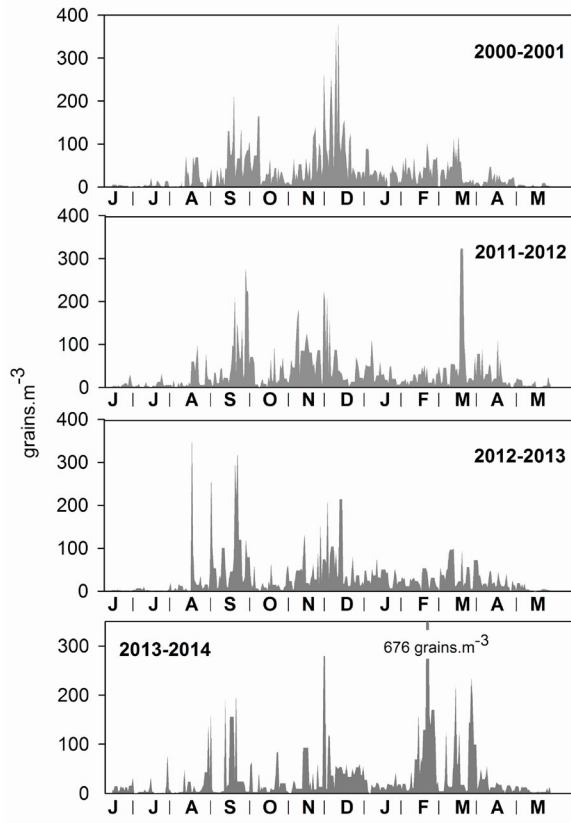


Fig. 2. Daily total pollen concentration per sampling year, expressed as pollen grains m^{-3}

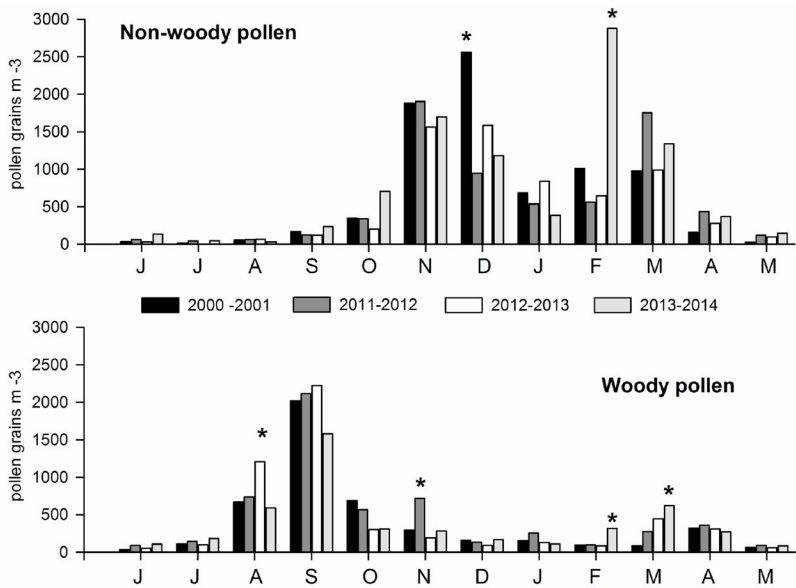


Fig. 3. Accumulated monthly pollen totals of non-woody and woody pollen. * Months with significant differences on pollen concentration.

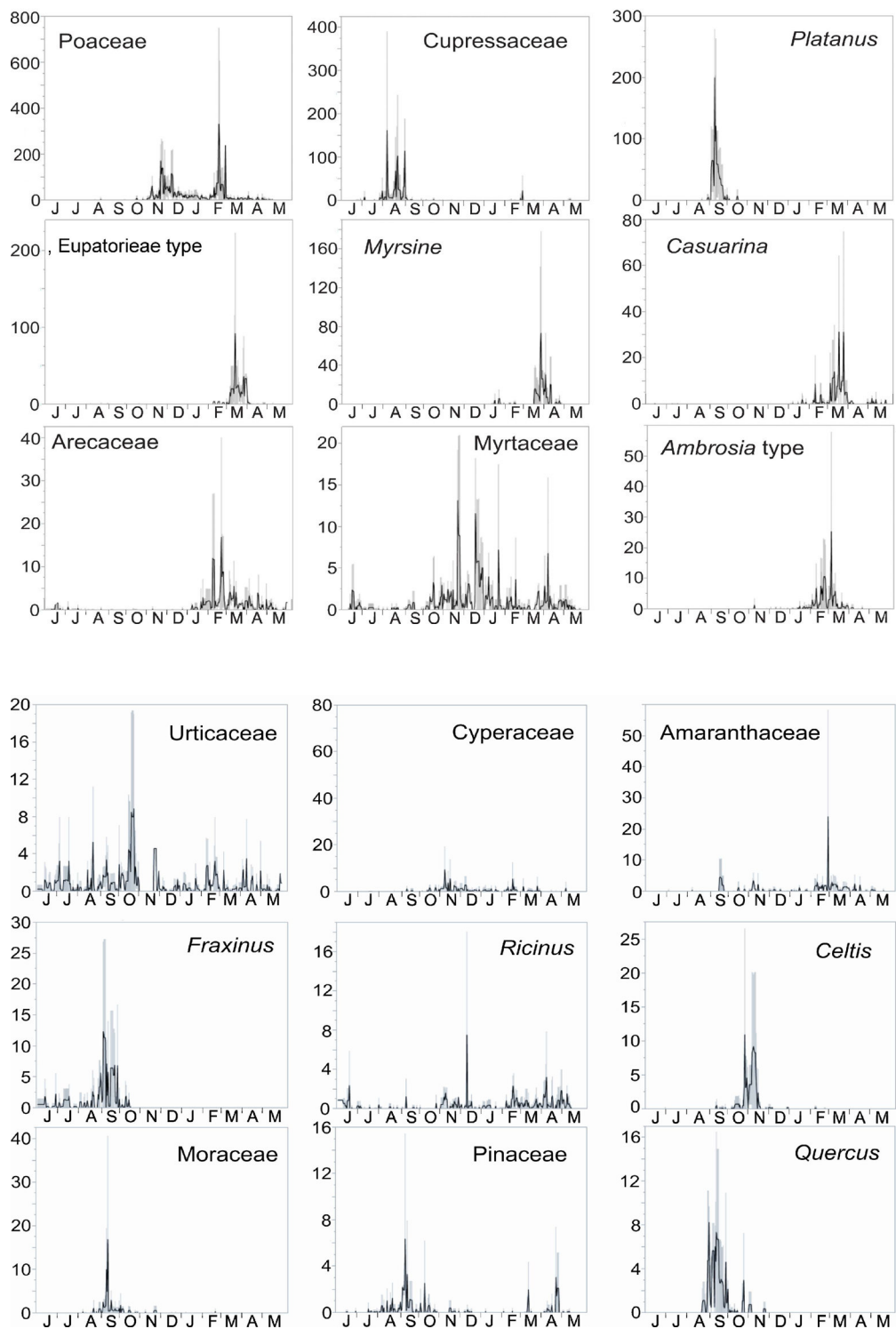


Fig. 4. Average daily counts of the most important pollen types with their corresponding standard deviations for the three year study period, expressed as pollen grains m^{-3} . Note the different scale on the y-axis.

in March (Fig. 4). Non-woody taxa pollen concentrations began to increase in spring. Poaceae and Urticaceae (1.8% TP) despite being recorded all year, reached high concentrations in October and November-December, respectively (Fig. 4). In fact, Poaceae concentrations remained in high values until the end of summer, recording another period of very high concentrations in February (Fig. 4). Other non-woody taxa with very long pollination periods and contributing with moderate or high concentrations in spring and summer were Amaranthaceae (1.5% TP), *Ricinus* (0.8% TP) and Cyperaceae (1.7% TP) (Fig. 4). In January, summer woody taxa such as *Myrsine* 3.8% TP), *Casuarina* (2.4% TP) and Arecaceae (2.3% TP) began their pollination periods (Fig. 4). Non-woody taxa representing the Asteraceae family, in particular *Ambrosia* (1.9% TP) (Fig. 4), also contribute to the airborne pollen recorded on January. Total pollen concentrations remained slightly lower during February and increased again in March, mainly due to high concentrations of Eupatoriaceae type (5.3% TP), *Myrsine* and *Casuarina* (Fig. 4). Some taxa exhibited little inter-annual variation, like *Platanus* and Myrtaceae, but in general considerable differences were observed, for instance, in the value and dates of peak concentrations (Fig. 4).

In general, considering the pollen thresholds levels indicated by the AAAAI's National Allergy Bureau (AAAAI 2016), pollen concentrations were above moderate levels an average of 74 days for woody pollen and 265 days for non-woody taxa (Table 1, Fig. 2). However, if thresholds are established using Montevideo percentile values (Table 1), woody and non-woody pollen concentrations would be above

moderate levels (above percentile 50) an average of 182 days per year. Although, non-woody pollen concentrations exceeded high levels approximately the same days per year independently of the threshold value used. On the other hand, the high concentration threshold estimated in Montevideo (percentile 75) had a much lower value (12 pollen grains m^{-3}) than that established by the NAB (90 pollen grains m^{-3}). Therefore the average number of days above high concentration levels varied according the threshold used (I).

Relationship with meteorological data

Mean annual temperature values showed some differences between the periods (Fig. 5A). 2000-2001 annual average mean temperature was 0.88 °C above historical values mainly due to warmer end of summer and autumn seasons. In addition, except for January, April and September all monthly mean temperatures showed significant differences between the sampled periods analyzed.

As expected, daily total pollen and non-woody pollen values showed a strong positive correlation with mean daily temperatures (Table 2).

Accumulated rainfall values showed some differences between the years considered. In 2000-2001 and 2013-2014 higher total rainfalls were registered and in particular the summer of these periods showed larger rainfalls (Fig. 5C). Daily accumulated rainfall values showed a very weak correlation with total daily and non-woody pollen, while total and non-woody pollen concentrations were positively correlated with accumulated rainfalls of previous weeks (Table 2).

Table 1. Pollen concentration thresholds according to NAB and estimated for Montevideo.

Threshold		National Allergy Bureau		Montevideo	
		non-woody	woody	non-woody	woody
Moderate	concentration ¹	5	15	6	4
	days per year ²	265	74	182	182
High	concentration	20	90	23	12
	days per year	97	12	91	88

¹ Concentration as grains. m^{-3} . ² Average number of days per year above threshold levels.

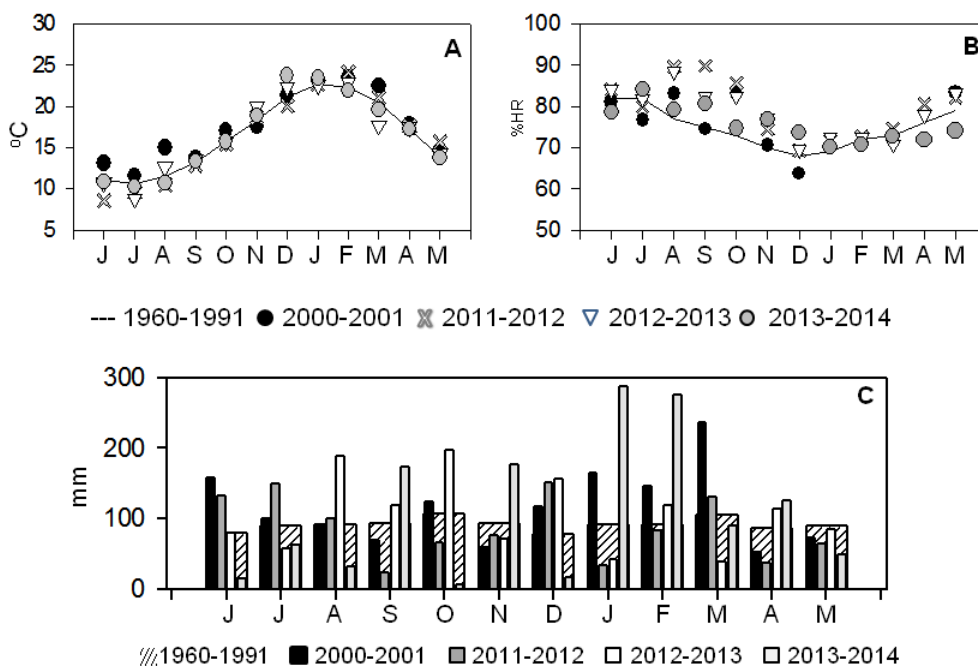


Fig. 5. Meteorological variables of periods analyzed and historical values. **A:** Average mean monthly temperatures. **B:** Average relative air humidity. **C:** Accumulated monthly rainfall.

No significant differences were observed on monthly air relative humidity average values between the years considered and this variable showed a negative correlation with all pollen variables (Table 2).

The prevailing wind directions in Montevideo airport were N, NNE and SE (Fig. 6A) but moderate and high pollen values were also recorded when

wind blew from other quadrants (Fig. 6B). Highest mean total pollen values were observed from the NNE at wind speeds above 6m.s⁻¹(Fig. 6B). Non-woody pollen showed maximum concentrations with winds from the north-east quadrant at speeds above 4m.s⁻¹ (Fig. 6C) while woody mean pollen concentrations showed highest values with N-NNE winds above 6 m.s⁻¹ (Fig. 6D). Moderate pollen

Table 2. Spearman rank correlation coefficients between pollen and meteorological variables.

	total	non-woody	woody
T°C	0.48**	0.71**	ns
RH	-0.32*	-0.3**	-0.12*
Rf	-0.14**	-0.11**	-0.09*
Rf ^l	0.21*	0.17*	ns
ws	0.14**	0.18**	0.08**
wd	-0.16**	-0.15**	-0.112**

Significance level *p<0.01, ** p<0.001.

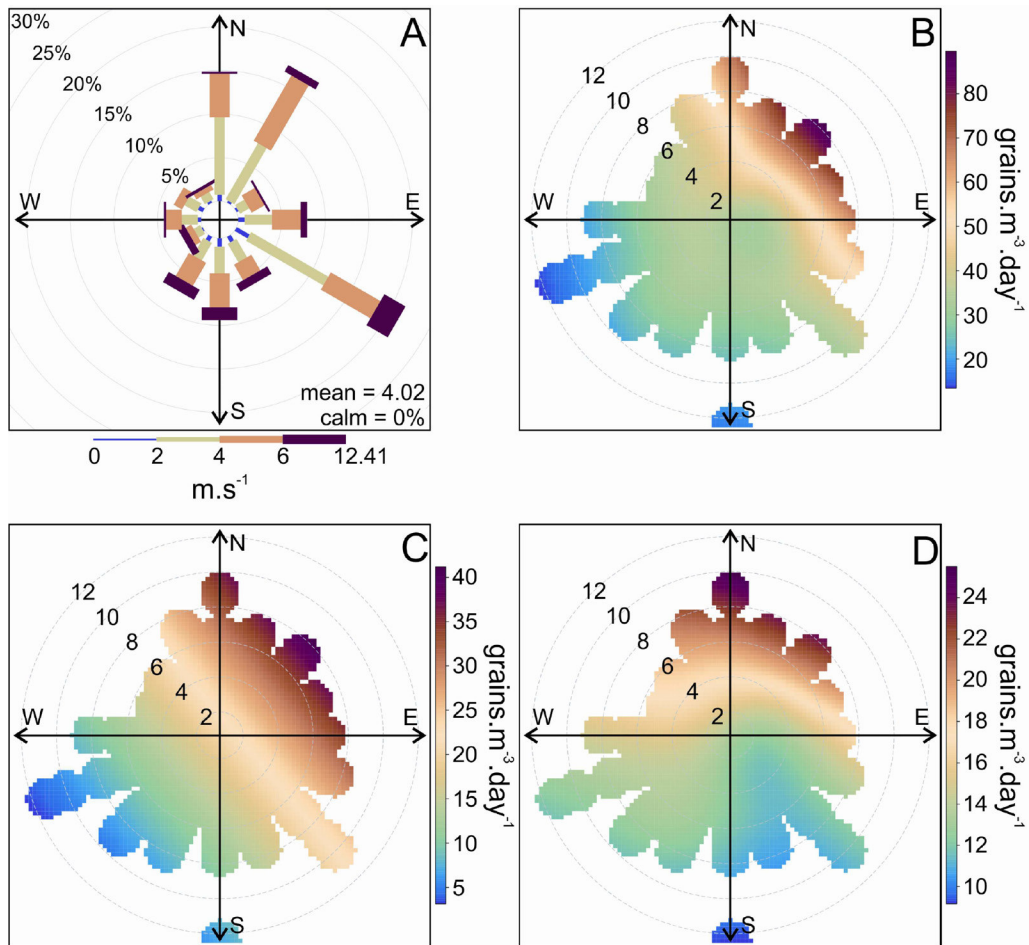


Fig. 6. A: Frequency of wind direction and speed over the study period. Bivariate polar plot of mean pollen concentrations by wind direction and speed for the study site and sampling period (concentric circles represent wind speed in m s^{-1}) **B:** Total pollen. **C:** Non-woody pollen. **D:** woody pollen.

values were observed at lower wind speeds and covering a wider range of wind directions, from the west-north quadrant for woody-pollen (Fig. 6D) and from the NW to the SE for non-woody pollen (Fig. 6C). Therefore, concerning wind intensity and direction, intensity showed very low but significant influence over pollen concentration values, mainly for total and woody pollen values (Table 2).

Given the high correlation between total daily pollen and non-woody pollen values with mean temperatures and relative humidity, multiple linear regression analysis were performed in order to assess the predictive value of such variables. Average daily temperatures and relative air humidity

explained 28% of total daily pollen concentrations ($r=0.529$, $R^2=0.28$, $p<0.001$) and 51 % of non-woody pollen concentrations ($r=0.714$, $R^2=0.51$, $p<0.001$) while daily average temperatures alone explained 47.1% of all variation.

DISCUSSION

The annual pollen pattern observed in Montevideo is consistent with seasonal fluctuations described in other cities with temperate climate, where maximum values are recorded in spring and early summer while lower values are registered

in autumn and winter. The period of major pollen concentration corresponds to the flowering period of most species growing in the city (Lombardo, 1979; 1982; 1983; 1984). In particular, in Mar del Plata and Bahía Blanca maximum concentrations were also recorded from August to April, and relatively low monthly concentrations were observed from January to April (Latorre & Caccavari, 2009; Murray *et al.*, 2010). However, in other cities such as Buenos Aires (Nitiu *et al.*, 2003) the main emission period ends a month earlier, in March, as it was the case for the period 2000-2001 in Montevideo. The period of minimum pollen values, called residual period in some cases, corresponds to the very end or start of pollen periods of some taxa. Pollen taxa that include several species with very long pollen periods are present all year round e.g. Urticaceae (mainly *Parietaria*), Myrtaceae, Poaceae and Amaranthaceae.

During the studied period, an average of 12150 pollen grains m³ per year were recorded, similar to total pollen indexes recorded in Caxias (Vergamini *et al.*, 2006) and slightly lower than in Bahía Blanca (Murray *et al.*, 2010) and Santiago de Chile (Rojas & Roure, 2001). However, Montevideo airborne pollen index is lower than those recorded in other cities of the region such as La Plata (Nitiu, 2006), Buenos Aires (Nitiu *et al.*, 2003), Mar del Plata (Latorre & Pérez, 1997; Pérez & Páez, 1998). Even considering the relative higher efficiency of suction samplers (Peel *et al.*, 2014), those indexes are higher than in Montevideo. Furthermore, when overrepresented taxa are excluded from the sum (Latorre & Caccavari, 2009) total pollen values resemble those of Montevideo. However, in those cities, urban flora is mainly represented by several species of Cupressaceae and *Platanus x acerifolia*, trees that release vast numbers of pollen grains per pollination season (Tormo *et al.*, 1996; Hidalgo *et al.*, 1999). In Montevideo city some abundant trees present in public areas are entomophilous and low pollen producers like *Melia azedarach*, and *Tipuana tipu* while *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* trees despite being considered mainly entomophilous, produce and liberate high amounts of pollen. Nevertheless, anemophilous trees as *Fraxinus pennsylvanica*, *F. lanceolata*, *Platanus x acerifolia*, *Pinus pinaster* and *Cupressus sempervirens* are also abundant in public areas in the city (Arcos & Pose, 2008). It should be considered

that these values represent the percentage of trees present in public areas but plants are also cultivated in private gardens and parks.

Non-woody pollen contributed slightly more than woody pollen to Total Pollen in Montevideo atmosphere. Conversely, woody pollen dominates the spectra in other cities of Southern South America like Santiago de Chile (Rojas & Roure, 2001; Toro *et al.*, 2015), Mar del Plata (Latorre & Caccavari, 2009), La Plata (Nitiu, 2006) and Caxias (Vergamini *et al.*, 2006). In Montevideo, Poaceae is the most important pollen contributor. Its dominance could be related to the influence of local vegetation on the spectra since the area around the sampling point is an open and grass covered zone. In addition, extra-local (avenues, parks, private gardens) and regional (rural areas) contribution to the spectra could be relevant given that Uruguay belongs to the phytogeographical zone Campos del Río de la Plata (Soriano, 1992) where grasslands are the dominant vegetation. In fact, bivariate analysis of pollen concentration per wind direction and speed support this hypothesis. Despite that moderate concentrations recorded at low wind speed (<2 m.s⁻¹) would indicate local origin, higher pollen concentrations observed at higher wind speed may represent an important contribution from more distant grass pollen sources. In fact, rural areas that are potential grass pollen sources are located in the north-east quadrant at 6 km from the sampling point (Fig. 1). However, if Poaceae is removed from the analysis, woody pollen acquires more importance in the spectra resembling pollen assemblages of all cities of the region.

No significant differences were observed between Annual Pollen Integrals in Montevideo city. Nevertheless, significant inter-annual differences were noticed in monthly total concentrations in August, October, November, December, February and March. In addition, many important taxa also exhibited variations in dates and peak concentrations from year to year. The higher total pollen observed at the end of October-early November 2011-12 and 2013-14 periods seems to be an early equivalent of the peaks observed in December 2000-2001 and December 2012-13 and seems to be an indication of an early start of the pollen season for non-woody pollen. No major land use changes have occurred around the sampling point or in the city from 2001 that could explain the

pollen variations observed. Inter-annual differences in airborne pollen concentration is a widely known phenomena and has been explained by a number of events like differences in meteorological conditions (McLauchlan *et al.*, 2011), episodes of long-range transport (Mahura *et al.*, 2007; Cecchi *et al.*, 2007) or inter-annual variation of plant reproductive efforts (Ranta *et al.*, 2008). The main objective the present study was to analyze the main characteristics of atmospheric pollen and therefore more analyses are needed to identify other factors that could explain the inter-annual differences observed. For instance, analyses regarding the individual behavior of pollen types are required.

The diversity of pollen taxa recorded in Montevideo atmosphere represents the floral diversity and the abundance of the anemophilous species growing in the city. The pollination sequence observed was as expected: 1. introduced and native temperate trees flowering at the end of winter with a peak during spring, 2. subtropical trees in summer and autumn, 3. grasses in spring and summer, 4. weeds in summer and early autumn. The most important species recorded in Montevideo's atmosphere are either introduced taxa cultivated for ornamental purposes along public and private spaces or adventitious plants growing in green areas. The predominance of introduced taxa on the pollen spectra seems to be a general characteristic of urban areas where exotic flora is preferred over native taxa. This feature is observed in cities of the region such as Mar del Plata (Latorre & Pérez, 1997), and Buenos Aires (Nitiu *et al.*, 2003). Despite this, pollen from native taxa such as those from the genus *Celtis* (mainly *Celtis spinosa* and *Celtis tala*), Anacardiaceae (*Schinus*, *Lithraea*), *Dodonaea viscosa* and *Myrsine* (from *Myrsine coriacea*, *Myrsine laetevirens*, *Myrsine parvula*) were recorded in the atmosphere. In addition, other native types accounted for low values, representing all together a sort of geographic signature on the atmospheric spectra. *Celtis* was also recorded in cities of the same biogeographic region such as Mar del Plata (Latorre & Pérez, 1997), La Plata (Nitiu, 2003), Buenos Aires (Nitiu *et al.*, 2003) and Bahía Blanca (Murray *et al.*, 2010). *Schinus* was recorded in La Plata (Nitiu, 2003) and Bahía Blanca (Murray *et al.*, 2010) while *Myrsine* was registered in Caxias do Sul (Brasil) (Vergamini *et al.*, 2006) and La Plata (Nitiu, 2003).

It must be highlighted that many important taxa recorded in this study, in particular Poaceae, Cupressaceae, *Platanus*, *Quercus*, Urticaceae, Chenopodiaceae and *Ambrosia*, are cited as the most aeroallergenic pollen types in Europe (Baroni *et al.*, 2008; D'Amato *et al.*, 2007). In addition, many of them exceeded moderate and high concentrations thresholds during considerable periods of time along the year. Grasses could be particularly important in Montevideo since they are the major cause of pollinosis in Europe (D'Amato *et al.*, 2007) and represented up to 47 % of total pollen in Montevideo. Furthermore, Poaceae pollen concentrations exceeded during weeks threshold levels indicated in other countries as responsible for triggering allergic responses in sensitive individuals (Feo Brito *et al.*, 2011). However, the potential impact of allergenic airborne pollen in public health has not been evaluated in Uruguay and should be addressed in further investigations.

Regarding the meteorological influence on the airborne pollen, mean daily temperature showed a positive influence on pollen values, in particular, over non-woody pollen mainly due to most non-woody plants flower during spring and summer. In addition, high temperatures, may have prompted not only anthesis, and therefore pollen emission, but, together with moderate winds and low relative humidity, also pollen dispersion (Helbig *et al.*, 2004).

The washout effect of rainfall on pollen concentrations can be difficult to establish. This effect could explain some differences, for instance, March 2001 was rainier than other periods and rainfall could have washed out airborne pollen, bringing also the pollen season to an end. Even though, on the studied periods, rainfalls during summer were similar to the average values for the 1961-1990 period, while very low rainfalls were recorded in January 2011-12 when a severe summer drought was experienced. This could explain the low non-woody pollen recorded in January and February 2011-12 since herbaceous vegetative growth could have been severely affected because of the drought. On the other hand, higher accumulated rainfall values previous to pollination period can have a positive effect on non-woody pollen concentration values (Cariñanos *et al.*, 2004; McLauchlan *et al.*, 2011). Higher rainfalls recorded weeks before February and March 2013-14 may have prompted higher non-woody pollen concentrations recorded during these months. The influence of

meteorological conditions on pollen concentrations, previous and during the pollination periods, could be veiled by the fact that non-woody and woody categories include a wide range of species that have different climatic requirements and will be the subject of further analysis.

CONCLUSIONS

The marked seasonality observed on the pollen spectra of Montevideo city is determined by the flowering periods of the plants that are sources of most abundant pollen types, in particular, anemophilous species.

Woody pollen dominated the spectra by the end of winter and spring while non-woody pollen accounted for most of anemophilous pollen by the end of spring and summer. The most important contributor to total pollen was Poaceae, a well represented pollen type since species of this family are dominant in the local and regional vegetation.

Inter-annual differences were observed in terms of pollen concentration, and peak concentration dates. Temperature, relative humidity and accumulated rainfalls of previous weeks were the most important parameters influencing pollen concentrations.

Bivariate analysis of wind speed and direction suggest that rural areas are potential sources of pollen and have some influence on the pollen concentrations recorded in Montevideo.

Allergenic taxa were registered in high concentrations in Montevideo city, highlighting the relevance of aeropalynological studies for public health and urban planning.

This study spanned only four year and just three of them consecutive; therefore, more data are needed to evaluate inter-annual and seasonal variations, to elaborate predictive models for particular pollen taxa and to assess the influence of meteorological variables on pollen values at species level, issues that are the focus of further studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge CSIC I+D (2010), PEDECIBA and ANII for their financial support. We also thank INUMET for providing the meteorological data from Carrasco Airport meteorological station.

BIBLIOGRAPHY

- AAAAI. 2016. NAB pollen and mold spore levels. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*. Available: http://pollen.aaaai.org/nab/index.cfm?p=reading_charts3&statid=85.
- ARCOS, A. & R. POSE. 2008. *Informe preliminar del censo de arbolado público*. Montevideo, Intendencia Municipal de Montevideo.
- ASHER, M.I., S. MONTEFORT & B. BJORKSTEN 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet* 368: 733-743.
- BARONI, M.V., D.A. ALVAREZ, G.A. WUNDERLIN & G.A. CHIABRANDO. 2008. Analysis of IgE binding proteins of *Celtis tala* pollen. *Food and Agricultural Immunology* 19: 187-194.
- BASSETT, I.J., C.W. CROMPTON & J.A. PARMELEE. 1978. *An atlas of airborne pollen grains and common fungus spores of Canada*. Ottawa: Department of Agriculture.
- BIANCHI, M.M. 1992. Calendario polínico de la ciudad de Mar del Plata (Agosto 1987-Agosto 1989). *Archivos Argentinos de Alergia Inmunología. Clínica* 23: 73-86.
- BIANCHI, M.M. & S.E. OLABUENAGA. 2006. A 3-year airborne pollen and fungal spores record in San Carlos de Bariloche, Patagonia, Argentina. *Aerobiología* 22: 247-257.
- BRETON, M.C., M. GARNEAU, I.FORTIER, F. GUAY & J. LOUIS. 2006. Relationship between climate, pollen concentrations of *Ambrosia* and medical consultations for allergic rhinitis in Montreal, 1994–2002. *Science of the Total Environment* 370: 39-50.
- BROWN, T., D.A. FRENZ & T.L. WIMPSETT. 1993. *Operating instructions for the Rotorod Sampler*. Minnetonka: Sampling Technologies, Inc, USA.
- CABRERA, A.L. & A. WILLINK. 1973. *Biogeografía de América Latina*. Washington, D.C., Secretaría de la OEA.
- CARIÑANOS, P., C. GALAN, P. ALCAZAR & E. DOMINGUEZ. 2004. Airborne pollen records response to climatic conditions in arid areas of the Iberian Peninsula. *Environmental and Experimental Botany* 52: 11-22.
- CARSLAW, D.C. 2015. *The openair manual - open-source tools for analyzing air pollution data*. Manual for version 1.1-4, King's College London.
- CECCHI, L., T.T. MALASPINA, R. ALBERTINI, M. ZANCA, E. RIDOLO, I. USBERTI, M. MORABITO, P. DALL'AGLIO & S. ORLANDINI. 2007. The contribution of long-distance transport to the presence of *Ambrosia* pollen in central northern Italy. *Aerobiología* 23: 145-151.

- CECCHI, L., G. D'AMATO, J.G. AYRES, C. GALAN, F.FORASTIERE, B. FORSBERG, J. GERRITSEN, C. NUNES, H. BEHRENDT, C. AKDIS, R. DAHL & J. ANNESI-MAESANO. 2010. Projections of the effects of climate change on allergic asthma: The contribution of aerobiology. *Allergy* 65: 1073-1081.
- D'AMATO, G., L. CECCHI, S. BONINI, C. NUNES, I. ANNESI-MAESANO, H. BEHRENDT, G. LICCARDI, T. POPOV & P. VAN CAUWENBERGE. 2007. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 62: 976-990.
- DAMIALIS, A., D. GIOULEKAS, C. LAZOPOULOU, C. BALAFOUTIS & D. VOKOU. 2005. Transport of airborne pollen into the city of Thessaloniki: the effects of wind direction, speed and persistence. *International Journal of Biometeorology* 49: 139-145.
- DE WEGER, L.A., K.C. BERGMANN, A. RANTIO-LEHTIMÄKI, Å. DAHL, J. BUTERS, CH. DÉCHAMP, J. BELMONTE, M. THIBAUDON, L. CECCHI, J.P. BESANCENOT, C. GALÁN & Y. WAISEL. 2013. IMPACT OF POLLEN. IN: SOFIEV M, BERGMANN K. (eds.) *Allergenic Pollen. A Review of the Production, Release, Distribution and Health Impacts*. Dordrecht, Springer Science+Business Media. p. 161-215
- EDMONDS, R.L. 1979. *Aerobiology: The Ecological Systems Approach*. Stroudsburg (PA), Dowden, Hutchinson and Ross.
- FEO BRITO, F., P. MUR GIMENO, J. CARNÉS J, E. FERNÁNDEZ CALDAS & A.M. ALONSO, GARCIA, R. & M. GUERRA. 2011. Grass pollen, aeroallergens and clinical symptoms in Ciudad Real, Spain. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 20: 295-302.
- FREI, T. & E GASSNER. 2007. Climate change and its impact on birch pollen quantities and the start of the pollen season an example from Switzerland for the period 1969-2006. *International Journal of Biometeorology* 52: 667-674.
- FUHRMAN, C., H. SARTER, M. THIBAUDON, M.C. DELMAS, A. ZEGHOUN & J. LECADET. 2007. Short-term effect of pollen exposure on anti-allergic drug consumption. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 99: 225-231.
- GALÁN, C., A. ARIATTI, M. BONINI, B. CLOT, B. CROUZY, A. DAHL, D. FERNANDEZ-GONZÁLEZ, G. FRENGUELLI, R. GEHRIG, S. ISARD, E. LEVETIN, D.W. LI, P. MANDRIOLI, C.A. ROGERS, M. THIBAUDON, I. SAULIENE, C. SKJOTH, M. SMITH & M. SOFIEV. 2017. Recommended terminology for aerobiological studies. *Aerobiologia*, 33, 293-295.
- GENTILE, D., A. BARTHOLOW, E. VALOVIRTA, G. SCADDING & D. SKONER. 2013. Current and Future Directions in Pediatric Allergic Rhinitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 1: 214-226.
- GREGORY, P.H. 1973. *The Microbiology of the Atmosphere*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- HELBIG, N., B. VOGEL, H. VOGEL & F. FIEDLER. 2004. Numerical modelling of pollen dispersion on the regional scale. *Aerobiologia* 20: 3-19.
- HIDALGO, P.J., C. GALÁN & E. DOMÍNGUEZ. 1999. Pollen production of the genus *Cupressus*. *Grana* 38: 296-300.
- LATORRE, F. 1997. Comparison between phenological and aerobiological patterns of some arboreal species of Mar del Plata (Argentina). *Aerobiologia* 13: 49-59.
- LATORRE, F. & C. PÉREZ. 1997. One year of airborne pollen sampling in Mar del Plata (Argentina). *Grana* 36: 49-53.
- LATORRE, F. & M.A. CACCAVARI. 2009. Airborne pollen patterns in Mar del Plata atmosphere (Argentina) and its relationship with meteorological conditions. *Aerobiologia* 27: 297-312.
- LEWIS, W.H., P. VINAY & V.E. ZENGER. 1983. *Airborne and allergenic pollen in North America*. Baltimore, The Johns Hopkins University Press.
- LOMBARDO, A. 1979. *Los árboles cultivados en los paseos públicos*. Montevideo, Intendencia Municipal de Montevideo.
- LOMBARDO, A. 1982. *Flora Montevidensis. Vol. I*. Montevideo, Intendencia Municipal de Montevideo.
- LOMBARDO, A. 1983. *Flora Montevidensis. Vol. II Gamopétalas*. Montevideo, Intendencia Municipal de Montevideo.
- LOMBARDO, A. 1984. *Flora Montevidensis. Vol. III Monocotiledoneas*. Montevideo, Intendencia Municipal de Montevideo.
- LORSCHREITER, M.L., F. MACHADO VIEIRA & F. DE OLIVERA. 1986. Conteúdo polínico atmosférico na cidade de Caixas do Sul, Rio Grande do Sul (Brasil), e sua correlação alérgica. *Paleobotânica e Palinolinológica América do Sul*, Boletim IG-USP, Instituto Geociências, Universidade de São Paulo 17: 131-140.
- MAHURA, A.G., U.S. KORSHOLM, A.A. BAKLANOV & A. RASMUSSEN. 2007. Elevated birch pollen episodes in Denmark: Contributions from remote sources. *Aerobiologia* 23: 171-179.
- MALLO, A.C., D.S. NITIU & M.C. GARDELLA SAMBETH. 2011. Airborne fungal spore content in the atmosphere of the city of La Plata, Argentina. *Aerobiologia* 27: 77-84.

- MARKGRAF, V. & H.L. D'ANTONI. 1978. *Pollen flora of Argentina. Modern spore and pollen types of Pteridophyta, Gymnospermae and Angiospermae*. Tucson, The University Press.
- MCLAUCHLAN, K.K., CH.S. BARNES & J.M. CRAINE. 2011. Interannual variability of pollen productivity and transport in mid-North America from 1997 to 2009. *Aerobiologia* 27: 181-189.
- MURRAY, M.G., M.I. SONAGLIONI & C.B. VILLAMIL. 2002. Annual variation of airborne pollen in the city of Bahía Blanca, Argentina. *Grana* 41: 183-189.
- MURRAY, M.G., R.L. SCOFFIELD, C. GALÁN & C.B. VILLAMIL. 2007. Airborne pollen sampling in a Wildlife Reserve in the south of Buenos Aires province, Argentina. *Aerobiologia* 23: 107-117.
- MURRAY, M.G., C. GALÁN & C.B. VILLAMIL. 2008. Aeropalynological research in Salitral de la Vidriera, Buenos Aires province, Argentina. *Aerobiologia* 24: 181-190.
- MURRAY, M.G., C. GALÁN & C.B. VILLAMIL. 2010. Airborne pollen in Bahía Blanca, Argentina: seasonal distribution of pollen types. *Aerobiologia* 26: 195-207.
- MURRAY, M.G. & C. GALÁN. 2016. Effect of the meteorological parameters on the *Olea europaea* L. pollen season in Bahía Blanca (Argentina). *Aerobiologia* 32:541-553.
- NILSSON, S. & S. PERSSON. 1981. Tree pollen spectra in the Stockholm region (Sweden), 1973-1980. *Grana* 20:179-182.
- NITIU, D.S., A.C. MALLO & E.J. ROMERO. 2003. Quantitative aeropalynology in the atmosphere of Buenos Aires city, Argentina. *Aerobiologia* 19: 1-10.
- NITIU, D.S. 2006. Aeropalynologic analysis of La Plata City (Argentina) during a 3-year period. *Aerobiologia* 22: 79-87.
- NITIU, D.S & A.C. MALLO. 2011. Seasonal variation of pollen and fungal spores in the atmosphere of Plata city (Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 46: 297-304
- NOETINGER, M., E.J. ROMERO & F.D. MAJAS. 1994. Airborne pollen and spores monitoring in Buenos Aires City: A preliminary report. Part II. Herbs, weeds (NAP) and spores. General discussion. *Aerobiologia* 10: 129-139.
- OLSON, D.M., E. DINERSTEIN, E.D. WIKRAMANAYAKE, N.D.BURGESS, G.V.N. POWELL, E.C. UNDERWOOD, J.A. D'AMICO, I. ITOUA, H.E. STRAND, J.C. MORRISON, C.J. LOUCKS, T.F. ALLNUTT, T.H. RICKETTS, Y. KURA, J.F. LAMOREUX, W.W. WETTENGEL, P. HEDAO & K.R. KASSEM. 2001. Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on Earth. *BioScience* 51: 933-938.
- PEEL, R.G., R. KENNEDY, M. SMITH & O.HERTEL. 2014. Relative efficiencies of the Burkard 7-Day, Rotorod and Burkard Personal samplers for Poaceae and Urticaceae pollen under field Conditions. *Ann. Agr. Environ. Med.* 21: 745-752.
- PÉREZ, C. & M.M. PÁEZ. 1998. Seasonal airborne pollen pattern in Mar del Plata City, Argentina. *Aerobiologia* 14: 383-389.
- PÉREZ, C.F., J.M. GARDIOL & M.M. PÁEZ. 2001. Comparison of intradiurnal variation of airborne pollen in Mar del Plata (Argentina). Non-arboreal pollen. *Aerobiologia* 17: 151-163.
- PÉREZ, C.F., J.M. GARDIOL & M.M. PÁEZ. 2003. Diurnal variation of airborne pollen in Mar del Plata (Argentina). Arboreal pollen. *Grana* 42: 161-167.
- PÉREZ, C., M.I. GASSMANN, M.COVI. 2009. An evaluation of the airborne pollen-precipitation relationship with the superposed epoch method. *Aerobiologia* 25: 313-320.
- RANTA, H.,T. HOKKANEN, T. LINKOSALO, L. LAUKKANEN, K.BONDESTAM & A. OKSANEN. 2008. Male flowering of birch: Spatial synchronization, year-to-year variation and relation of catkin numbers and airborne pollen counts. *Forest Ecol. Manag.* 255: 643-650.
- RECIO, M., S. DOCAMPO, J. GARCÍA-SÁNCHEZ, M.M TRIGO, M. MELGAR & B. CABEZUDO. 2010. Influence of temperature, rainfall and wind trends on grass pollination in Malaga (western Mediterranean coast). *Agr. Forest Meteorol.* 150: 931-940.
- ROJAS, G., J.M. ROURE. 2001. Atmospheric pollen in Santiago, Chile. *Grana* 40: 126-132.
- Soriano, A. 1992. The Río de la Plata Grasslands. In: COUPLAND RT. (ed.) *Natural grasslands. Introduction and Western hemisphere*. Amsterdam, Elsevier. p. 367-407.
- SPIEKSMAN, F.T.H., G. D'AMATO, J. MULLINS, N. NOLARD, R. WACHTER & E.R. WEEK. 1989. City spore concentrations in the European Economic Community (EEC). VI. Poaceae (Grasses) 1982-1986. *Aerobiologia* 5: 38-43.
- TEJERA, L. & A. BERI. 2003. Estudio palinológico de la ciudad de Montevideo, R.O.del Uruguay. Análisis preliminar. *Polen* 12: 107-115.
- TEJERA, L. & A. BERI. 2005. First volumetric airborne pollen sampling in Montevideo City, Uruguay. *Aerobiologia* 21: 33-41.
- TORMO MOLINA, R., A. MUÑOZ, I. SILVA & F. GALLARDO. 1996. Pollen production in anemophilous trees. *Grana* 35: 38-46.
- TORO, A.R., J.A. CÓRDOBA, M. CANALES, S.R.G. MORALES, P.P. MARDONES & G.M.A. LEIVA. 2015. Trends and thresholds exceedances analysis

- of airborne pollen concentrations in Metropolitan Santiago Chile. *PLoS ONE* 10(5): e0123077. doi:10.1371/journal.pone.0123077
- VERGAMINI, S.M., R.M. VALENCIA-BARRERA, B.C. DE ANTONI ZOPPAS, C. PÉREZ MORALES & D. FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ. 2006. Pollen from tree and shrub taxa in the atmosphere of Caxias do Sul (Rio Grande do Sul, Brazil). *Aerobiologia* 22: 141-148.
- ZIELLO, C., T.H. SPARKS, N. ESTRELLA, J. BELMONTE, K.C. BERGMAN, E. BUCHER, M.A. BRIGHETTI, A. DAMIALIS, M. DETANDT, C. GALÁN, R. GEHRIG, L. GREWLING, A.M. GUTIÉRREZ BUSTILLO, M. HALLSDÓTTIR, M.C. KOCKHANS-BIEDA, C. DE LINARES, D. MYSZKOWSKA, A. PÁLDY, A. SÁCHEZ M. SMITH, M. THIBAUDON, A. TRAVAGLINI, A. URUSKA, R.M. VALENCIA-BARRERA, D. VOKOU, R. WACHTER, L.A. DE WEGER & A. MENZEL. 2012. Changes to Airborne Pollen Counts across Europe. *PLoS ONE* 7(4): <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034076>
- Recibido el 4 de diciembre de 2017, aceptado el 3 de abril de 2018. Editor: Gonzalo J. Márquez.

TAMAÑO DEL GENOMA, CARACTERÍSTICAS CARIOTÍPICAS Y TAMAÑO DEL POLEN EN ESPECIES ARGENTINAS DE *SPERGULA* (CARYOPHYLLACEAE)

MARTA CAROLINA BREM^{1*}, JUAN PABLO COULLERI¹, CAROLA REGINA VOLPONI² y
MARÍA SILVIA FERRUCCI¹

Resumen: El objetivo de este trabajo fue estimar el contenido de ADN (2C) en cuatro especies de *Spergula* que habitan Argentina y analizar la variación del tamaño del genoma (Cx) en relación con las características cariotípicas y palinológicas. Se analizó por primera vez el contenido de ADN de cinco taxones y el tamaño del genoma de cuatro, que variaron muy poco entre las especies, desde Cx= 0,458 pg (*S. salina*, 4x) a Cx= 0,856 pg (*S. arvensis*, 2x). Se registraron dos nuevos recuentos cromosómicos para el género y el tamaño del polen varió de pequeños a medianos. Los coeficientes de regresión sugieren que el número de cromosomas varía de manera inversamente proporcional al tamaño del genoma, mientras que el tamaño del genoma presenta una baja relación con la longitud cromosómica total (LCT) del genoma diploide, aunque muestra una alta relación con respecto a la longitud cromosómica promedio (LCP). En tanto, el tamaño del polen varía independientemente con respecto al tamaño del genoma. La variación cariotípica detectada podría deberse a cambios numéricos y estructurales durante la evolución del género, mientras que el tamaño del polen podría estar relacionado con presiones de selección asociadas a estrategias de dispersión.

Palabras clave: *Spergula*, Argentina, contenido de ADN, nivel de ploidía, tamaño cromosómico, tamaño del polen.

Summary: Genome size, karyotypic features and pollen size in Argentinian species of *Spergula* (Caryophyllaceae). The objective of this work was to estimate the DNA content (2C) in four species of *Spergula* that inhabit Argentina and to analyze the variation of genome size (Cx) in relation to karyotypic and palynological features. The DNA content of five taxa and the genome size of four, which varied very little between species, were analyzed for the first time from Cx= 0.458 pg (*S. salina*, 4x) to Cx= 0.856 pg (*S. arvensis*, 2x). Two new chromosomal counts were recorded for the genus and the pollen size varied from small to medium. The regression coefficients suggest that the chromosome number varies inversely proportional in regards to the genome size, while the genome size presents a low relation with the total chromosome length (TCL) of the diploid genome, although it shows a high relation with respect to the average chromosome length (ACL). Meanwhile, the pollen size varies independently regarding to the genome size. The detected karyotypic variation could be due by numerical and structural changes during the genus evolution, while the pollen size could be related with selection pressures associated with dispersal strategies.

Key words: *Spergula*, Argentina, DNA content, ploidy level, chromosome size, pollen size.

¹ Instituto de Botánica del Nordeste, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas –Universidad Nacional del Nordeste, Sargento Cabral 2131, Corrientes, Capital, Argentina.

² Comisión de Investigaciones Científicas, prov. de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, Avenida 122 y 60, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*Autor correspondiente: martacarolinabrem@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Spergula L. pertenece a la familia Caryophyllaceae Juss., subfamilia Paronychoideae (A. L. Juss.) Meisn., son hierbas anuales, raramente perennes. Comprende alrededor de 70 especies de distribución casi cosmopolita, cuyos centros de diversidad se localizan en la región del Mediterráneo y en Chile (Pedersen, 1984). En Argentina, *Spergula* se halla representada por 12 especies, dos subespecies y dos variedades (Zuloaga *et al.*, 2008; Brem, 2017), éstas son mayoritariamente halófitas, comunes en pastizales y algunas de alta montaña (Pedersen, 1984; Volponi, 1994).

Spergularia (Pers.) Pers. ex J. Presl & C. Presl es un género muy afín a *Spergula*, su estatus taxonómico ha sido controvertido debido a la presencia de caracteres superpuestos o graduales con *Spergula* (Pedersen, 1984; González, 2010; Brem, 2017); tal es así que actualmente varias especies de *Spergularia* se circunscriben a *Spergula*, como *S. bocconii* (Scheele) Pedersen, *S. diandra* (Guss.) Murb. y *S. salina* (J. Presl & C. Presl) D. Dietr., entre otras.

La poliploidía es una alteración cromosómica en la cual un organismo posee más de dos juegos cromosómicos completos, pudiendo ser $2n=14$ (diploide), 28 (tetraploide), 42 (hexaploide), 56 (octoploide), etc., donde n representa el número de cromosomas en los gametos. Los números somáticos se basan en el número de cromosomas gaméticos de las especies diploides, que se conoce como el número cromosómico básico (x); en una especie diploide $n=x$, pero en una especie poliploide n es un múltiplo de x . La inferencia del número básico de una serie poliploide es un paso importante para la comprensión del número cromosómico en la formulación de una hipótesis evolutiva (Kenyon, 1997). La evolución del número cromosómico en Caryophyllaceae fue investigada por Fernandes & Leitão (1971), estos autores suponen que Caryophyllaceae desciende de Phytolaccaceae vía Molluginaceae con un número básico principalmente de $x=9$, considerando a éste ancestral para la familia. A partir de este número básico ocurre una serie descendente en Paronychoideae de $x=5$ y en Alsinoideae de $x=6$; y una serie ascendente hasta $x=12$ en Caryophylloideae. Respecto a las subfamilias,

Paronychoideae es la menos variable, caracterizada por los números básicos $x=8$ y $x=9$, y menos frecuente $x=7$ en algunas especies de *Paronychia* Mill. y *Chaetonychia cymosa* (L.) Sweet, o incluso $x=5$ en *Illecebrum verticillatum* L., la principal causa de variación es la poliploidía (Ratter, 1976; Bittrich, 1993).

La cantidad de ADN en un genoma nuclear gamético no replicado se conoce como el “valor 1C” o “valor C”, comúnmente llamado tamaño del genoma (Soltis *et al.*, 2003). Esta magnitud es igual al contenido de ADN nuclear 2C dividido por el nivel de ploidía (Bennett *et al.*, 1998). Sin embargo, la terminología presenta dificultades en su uso en organismos de diferentes niveles de ploidía, por ello Greilhuber *et al.* (2005) proponen una terminología unificada que describe el tamaño del genoma con facilidad y sin ambigüedad. Estos autores sugieren el término completo “tamaño del genoma monoploide” y el término abreviado “valor Cx” para el contenido de ADN del genoma monoploide en poliploides y no poliploides, sosteniendo que el valor C y el valor Cx son congruentes.

La estimación del contenido de ADN ha facilitado los estudios de evolución y especiación en numerosos grupos de plantas debido a que tanto el número cromosómico como el tamaño del genoma varían considerablemente en las plantas con flores (Soltis *et al.*, 2003). En las angiospermas, el contenido de ADN nuclear (2C) varía entre 1 y 125 pg por núcleo diploide (Bennett & Leitch, 2012), dicha variabilidad llevo a Leitch *et al.* (2005) a proponer 5 categorías para tamaño del genoma: muy pequeños ($\leq 1,4$ pg), pequeños ($\leq 3,5$ pg), intermedios ($> 3,5$ a < 14 pg), grandes (≥ 14 pg) y muy grandes (≥ 35 pg). El tamaño del genoma ha sido estimado en aproximadamente 8510 especies (Bennett & Leitch, 2012), entre las cuales sólo se conoce para *Spergula* el valor C de *S. arvensis* correspondiente a $1C=1,05$ pg (Bennett *et al.*, 1998).

Respecto al conocimiento citogenético en *Spergula*, este es muy escaso, solo registrándose los siguientes números cromosómicos: *Spergula arvensis* L. $2n=18$ (Arohonka, 1982; Sidhu & Bir, 1983; Runemark, 1996); *S. bocconii* $2n=36$ (Dalgaard, 1985; Runemark, 1996); *S. diandra*: $n=9$ (Humphries *et al.*, 1978; Kaur & Singhal, 2012), $n=18$ (Kaur & Singhal, 2012); y *S. salina*: $2n=18$ (Probatova, 2006), $2n=36$ (Petrova, 1995; Lifante *et al.*, 1992).

En relación al estudio palinológico en *Spergula*, los granos de polen de *S. arvensis* han sido los más estudiados. Se destacan, los trabajos realizados por Sáenz (1980) quien analiza el polen de esta especie de tres provincias de España, y lo caracteriza como suboblato, exarrugado, con aperturas dispuestas globalmente, y de exina muy delgada, con gránulos esferoidales y diminutos poros homogéneos. Taia (1994) describe para *S. arvensis* granos subprolato, 4–6–8 colpados, con presencia de membrana y tectum granuloso. Erdtman (1966) referencia para la especie granos 6 colpados, mientras que Perveen & Qaiser (2006) describe la especie sobre material de Pakistán, con granos 3–4–10 colpados. Para Argentina, Volponi (2013) analiza 5 especies de *Spergula*: *S. arvensis*, *S. laevis* (Cambess.) D. Dietr., *S. platensis* (Cambess.) Shinnars var. *balansae* (R. Rossbach) Pedersen, *S. platensis* (Cambess.) Shinnars var. *platensis* Phil., *S. ramosa* (Cambess.) D. Dietr. ssp. *ramosa* y *S. villosa* Pers., las cuales agrupa bajo el Tipo *Spergula* ramosa. Este tipo polínico incluye granos 3–colpados (algunos granos en *Spergula arvensis* son 4–colpados); predominantemente pequeños; prolato–esferoidales a oblato–esferoidales, de ámbito subcircular; colpos largos, de 1,8–4 µm de ancho; exina de 0,5–1,3 µm de espesor, adelgazada hacia las aperturas, algo más gruesa en los polos, granos tectados microequinados, imperforados o punteados.

Recientes estudios han encontrado una fuerte relación positiva entre el tamaño del genoma y el tamaño de las células, dejando abierta la posibilidad de que el tamaño del genoma puede determinar en parte, o correlacionarse, con el tamaño de polen (Beaulieu *et al.*, 2008; Knight *et al.*, 2010). En concordancia, existen estudios que sugieren que el tamaño del polen aumenta con la ploidía (Gould, 1957; Johansen & von Bothmer, 1994; Knight *et al.*, 2010).

La falta de conocimiento sobre el tamaño del genoma, los escasos datos cromosómicos y su relación con el tamaño del polen en *Spergula* nos llevó a plantear los siguientes objetivos: (1) estimar el tamaño del genoma; (2) estudiar la relación entre el tamaño del genoma y las características cariotípicas; y (3) analizar la relación entre la variación del tamaño del genoma y el tamaño del polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

El material analizado en la estimación del contenido de ADN, los recuentos cromosómicos y la estimación tamaño del polen se presenta en la Tabla 1. Los ejemplares correspondientes fueron depositados en el herbario del Instituto Botánica del Nordeste (CTES). Las muestras palinológicas se obtuvieron de ejemplares de los herbarios BAB, CTES y SI.

Estimación del tamaño del genoma

El contenido de ADN (2C) fue estimado usando un citómetro PA flow (Partec GmbH, Germany) en núcleos aislados de tejido foliar. Las muestras fueron analizadas a partir de material fresco o de material conservado en sílica-gel a -10°C. Una hoja completa fue molida finamente con hoja de afeitar en 0,5 mL de buffer de extracción (CyStain® UV Precise P), y se filtró a través de una malla de nylon de 40 µm para separar la suspensión de núcleos del material grueso. Posteriormente, éstos fueron teñidos con una solución de yoduro de propidio, luego de una hora de incubación las muestras fueron examinadas.

Se llevaron a cabo tres estimaciones de ADN para cada muestra (5.000 núcleos por análisis), siendo representada ésta por un individuo para cada taxón (Tabla 1), y se utilizó como estándar interno a *Paspalum dilatatum* Chirú (2n= 6x= 60= 3,57 pg) (Vaio *et al.*, 2007). El contenido de ADN nuclear (2C) desconocido se calculó mediante la fórmula: 2C contenido de ADN de la muestra= (Media del pico de la muestra/Media del pico del estándar) × 2C contenido de ADN del estándar. Las medias y los desvíos estándar fueron estimados en cada medida del contenido de ADN de la muestra.

Los valores Cx, que representan el contenido de ADN de un genoma monoploide no replicado con el número cromosómico x (Greilhuber *et al.*, 2005), se calcularon dividiendo la cantidad de ADN nuclear 2C por el nivel de ploidía.

Características cariotípicas

Números cromosómicos. – Los recuentos cromosómicos fueron realizados a partir de meristemas radicales de semillas germinadas en cajas de Petri. Los ápices radicales fueron pretratados con 8-hidroxiquinoleína 0,002 M

Tabla 1. Material estudiado de *Spergula* para el análisis del tamaño del genoma (Cx), contenido de ADN (2C), estudios citogenéticos y tamaño del polen, se indican: taxones, coleccionista, número y herbario, localidad, Valor Cx (pg), 2C (contenido de ADN) y su error estándar, nivel de ploidía y número cromosómico, longitud cromosómica total (LCT), longitud cromosómica promedio (LCP) y longitud del eje polar (P), su promedio y medidas mínimas y máximas. Se define con un asterisco (*) el primer recuento para la especie.

Taxones	Coleccionista, número y herbario	Localidad	Valor Cx (pg)	2C±SE (pg)	Nivel de ploidía y N° cromosómico	LCT (µm)	LCP (µm)	P (µm)
<i>S. arvensis</i>	Schinini 9597 (CTES)	Corrientes. BellaVista, Bella Vista.						
<i>S. arvensis</i>	Pedersen 3944 (CTES)	Corrientes. Mburucuyá, Mburucuyá.						29,8 (27-36)
<i>S. arvensis</i>	Brem 15 (CTES)	Corrientes. Empedrado, Riachuelo.	0,856	1,712 ± 0,036	2n = 2x = 18	44,96	2,49	
<i>S. platensis</i> var. <i>balansae</i>	Schulz 16008 (CTES)	Chaco. 1° de Mayo, 1° de Mayo.						
<i>S. platensis</i> var. <i>balansae</i> *	Brem 6a (CTES)	Chaco. 1° de Mayo, Colonia Benítez.	0,665	1,33 ± 0,026	2n = 2x = 18	43,18	2,35	19,9 (18-22)
<i>S. platensis</i> var. <i>balansae</i>	Krapovickas & Cristóbal 13015 (CTES)	Corrientes. San Cosme, San Cosme.						
<i>S. platensis</i> var. <i>platensis</i>	Schulz 12317 (CTES)	Chaco. 1° de Mayo, 1° de Mayo.						
<i>S. platensis</i> var. <i>platensis</i>	Tressens <i>et al.</i> 540a (CTES)	Corrientes. Curuzú Cuatiá, Curuzú Cuatiá.						19,2 (17-22)
<i>S. platensis</i> var. <i>platensis</i>	Brem 6b (CTES)	Chaco. 1° de Mayo, Antequera.	-	1,297 ± 0,026	2n = 2x = ?	-		
<i>S. ramosa</i> ssp. <i>ramosa</i> *	Brem & Volponi 5 (CTES)	Buenos Aires. La Plata, Villa Elisa.	0,511	2,045 ± 0,147	2n = 4x = 36	56,97	1,57	
<i>S. ramosa</i> ssp. <i>ramosa</i>	Schinini <i>et al.</i> 19183 (CTES)	Corrientes. Lavalle, Yataity Calle.						21,8 (20-23)
<i>S. ramosa</i> ssp. <i>ramosa</i>	Schinini 22652 (CTES)	Buenos Aires. General Donovan, La Verde.						
<i>S. salina</i>	Corra <i>et al.</i> 4122 (BAB)	Chubut. Sarmiento, Sarmiento.						
<i>S. salina</i>	Brem & Volponi 14 (CTES)	Buenos Aires. La Plata, Villa Elisa.	0,458	1,834 ± 0,056	2n = 4x = 36	57,38	1,61	22,93 (20-28)
<i>S. salina</i>	Prina <i>et al.</i> 1826 (SI)	Mendoza. Malargüe, Laguna del Azufre.						
<i>S. villosa</i>	Pedesen 11366 (CTES)	Corrientes. Paso de los Libres. Paso de los Libres.						
<i>S. villosa</i>	Brem 7 (CTES)	Buenos Aires. La Plata, Villa Elisa.	-	1,550 ± 0,267	2n = 2x = ?	-	-	21,8 (19-24)
<i>S. villosa</i>	Pedersen 7095 (CTES)	Corrientes, Mburucuyá, Mburucuyá.						

durante cuatro horas a temperatura ambiente, fijados en una mezcla de 5:1 (etanol: ácido láctico) por 24 horas (Fernández, 1973) y luego teñidos mediante la técnica de Feulgen (Jong, 1997). Posteriormente los meristemas fueron aplastados en una gota de orceína lacto-propiónica; los preparados se hicieron permanentes con Euparal (Asco Laboratories, Manchester, UK). Las microfotografías fueron tomadas a través de un microscopio Zeiss Axioplan con una cámara Canon Powershot A640 de las cinco mejores metafases por individuo (Tabla 1) y se realizaron los conteos cromosómicos.

Tamaño cromosómico. –Debido al reducido tamaño de los cromosomas resultó imposible la confección de idiogramas, aunque se pudo obtener los parámetros: longitud cromosómica total del genoma diploide (LCT) y longitud cromosómica promedio (LCP). Para ello, fueron medidos los cromosomas de cinco metafases completas con un estado de condensación similar utilizando el software ImageJ (Rasband, 1997-2016).

Tamaño del polen

Se estudió el polen de 3 ejemplares de cada especie, los granos de polen se prepararon utilizando la técnica de acetólisis (Erdtman, 1960) y se montaron en gelatina glicerizada. Posteriormente los preparados palinológicos permanentes se depositaron en la Palinoteca de la Universidad Nacional del Nordeste (PAL-CTES). Las mediciones se llevaron a cabo sobre un total de 20 granos por muestra de flores en anthesis con microscopio óptico Leica DM LB2. Además, el estudio se complementó con microscopio electrónico de barrido (MEB) en un equipo JEOL 5800 LV de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste operando a 15 kV. Para este análisis los granos de polen fueron montados sobre un disco de aluminio de 5 cm de diámetro, luego se metalizaron con un delgado baño de oro-paladio y se obtuvieron fotomicrografías.

Análisis estadístico

Para evaluar la relación entre el tamaño del genoma y las características cariotípicas se llevó a cabo un análisis de regresión lineal, utilizando el valor Cx como variable independiente y número cromosómico, valores de LCT y LCP como variables dependientes. Además, se realizó otro

análisis similar para conocer la correspondencia entre el tamaño del genoma y el tamaño del polen (longitud del eje polar), siguiendo el criterio propuesto por Knight *et al.* (2010), considerando al grano de polen como “unicelular”. El promedio de la longitud del eje polar fue utilizado en el análisis de regresión.

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

RESULTADOS

Tamaño del genoma

El valor Cx y el valor 2C con los errores estándar de las especies estudiadas se detallan en la Tabla 1. El tamaño del genoma varía muy poco entre las especies estudiadas (Fig. 1), correspondiendo el valor más pequeño a *Spergula salina* 4x (Cx= 0,458 pg) mientras que el valor más alto corresponde a *S. arvensis* (Cx= 0,856 pg).

Números cromosómicos

En la Tabla 1 se detallan los números cromosómicos obtenidos a partir del análisis mitótico. Entre los recuentos de las cuatro especies de *Spergula*, dos registran número cromosómico diploide de $2n=2x=18$ (*S. arvensis* y *S. platensis* var. *balansae*) mientras que las otras dos presentan una dotación tetraploide de $2n=4x=36$ (*S. ramosa* ssp. *ramosa* y *S. salina*), siendo el número básico $x=9$, ilustrándose las correspondientes metafases mitóticas en la Fig. 2.

Tamaño cromosómico

La longitud cromosómica total del genoma diploide (LCT) varió de 57,38 μm (*S. salina*) a 43,18 μm (*S. platensis* var. *balansae*) mientras que la longitud cromosómica promedio (LCP) varió de 2,49 μm (*S. arvensis*) a 1,57 μm (*S. ramosa* spp. *ramosa*) Tabla 1.

Relación tamaño del genoma (Cx) y número cromosómico

El análisis de regresión lineal entre el tamaño del genoma y el número cromosómico (Fig. 3) mostró una relación lineal negativa y significativa ($R^2=0,79$; $p<0,05$), el diagrama de dispersión muestra que las variables son inversamente proporcionales.

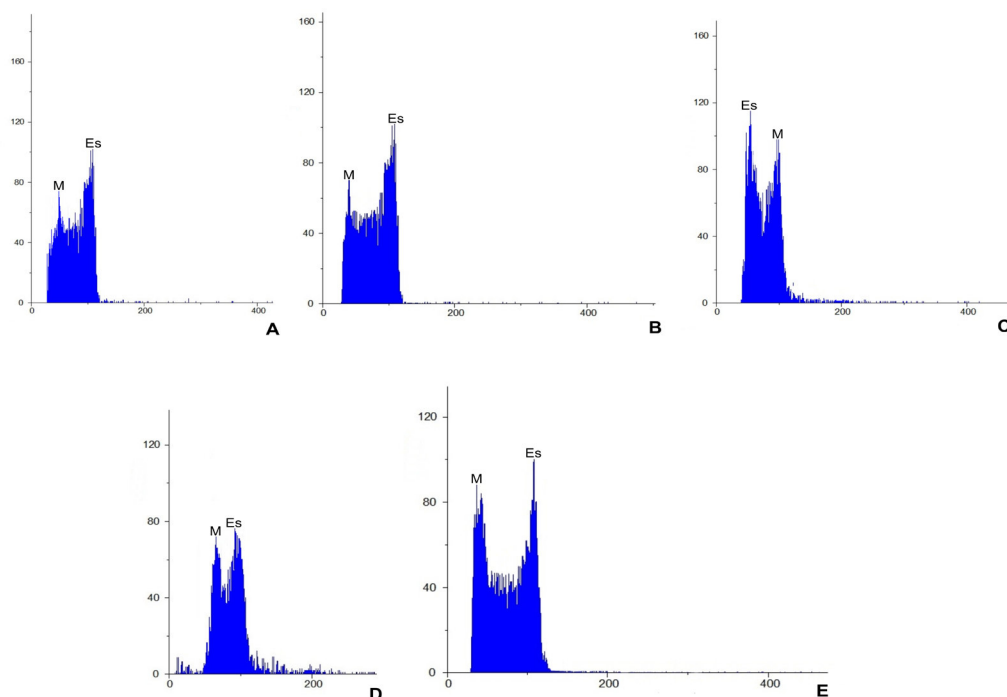


Fig. 1. Histogramas de ADN obtenidos con citometría de flujo: **A:** *S. platensis* var. *balansae*. **B:** *S. platensis* var. *platensis*. **C:** *S. ramosa* ssp. *ramosa*. **D:** *S. salina*. **E:** *S. villosa*. El eje "x" representa la fluorescencia de yoduro de propidio (PI) (es decir, la cantidad relativa de ADN) y el eje "y" representa el número de núcleos medidos ($\times 100$). M, muestra medida en cada histograma; Es, estándar interno.

Casi el 80% de la variabilidad del número de cromosomas se explica a través del tamaño del genoma, a mayor número cromosómico menor tamaño del genoma y viceversa.

Relación tamaño del genoma (Cx) y longitud cromosómica total del genoma diploide (LCT)

El análisis de regresión lineal entre el tamaño del genoma y la longitud cromosómica total del genoma diploide (Fig. 4) mostró una relación lineal positiva significativa ($R^2= 0,13$; $p<0,050$) pero muy baja, la pendiente muestra que las variables guardan poca relación entre sí.

Relación tamaño del genoma y longitud cromosómica promedio (LCP)

El análisis de regresión lineal entre el tamaño del genoma y la longitud cromosómica promedio (Fig. 5) mostró una relación lineal positiva y significativa ($R^2= 0,84$; $p<0,05$), el diagrama de dispersión muestra que las variables son directamente proporcionales. Los resultados indican que la longitud cromosómica

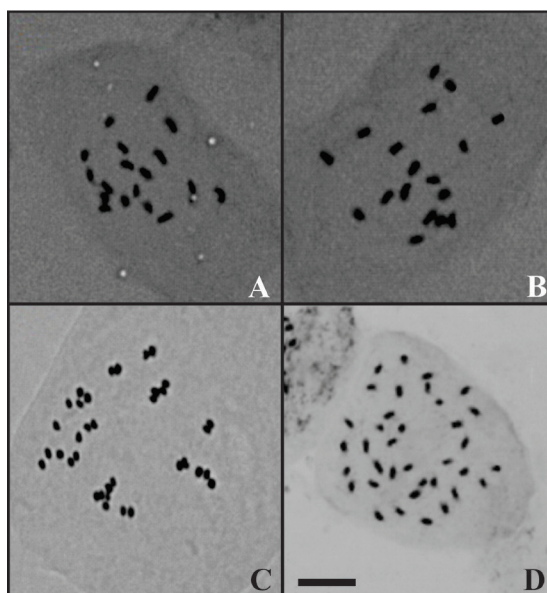


Fig. 2. Fotomicrografías de metafases mitóticas. **A:** *Spergula arvensis*. **B:** *S. platensis* var. *balansae*. **C:** *S. ramosa* ssp. *ramosa*. **D:** *S. salina*. Escala: 10 μ m.

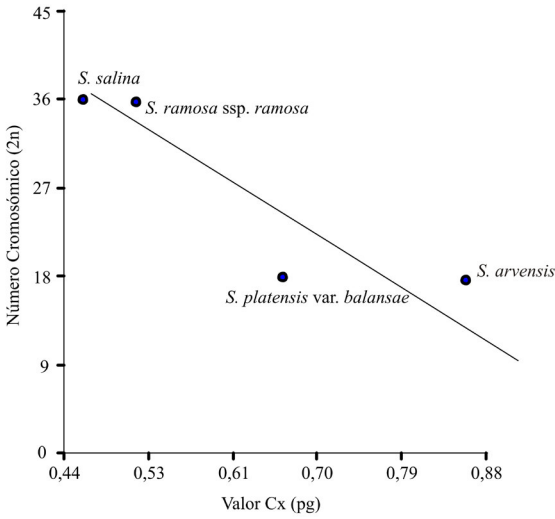


Fig. 3. Análisis de regresión lineal mostrando una relación lineal negativa y significativa entre el tamaño del genoma (Valor Cx) y el número cromosómico en cuatro taxones de *Spergula*.

es dependiente del tamaño del genoma en las especies estudiadas. Las especies diploides (*S. arvensis* y *S. platensis var. balansae*) poseen cromosomas de mayor longitud y mayor contenido de ADN respecto de las especies poliploides (*S. ramosa ssp. ramosa* y *S. salina*) (Tabla 1).

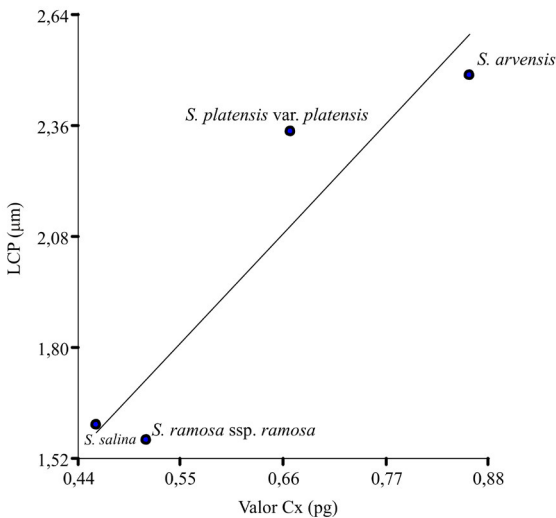


Fig. 5. Análisis de regresión lineal mostrando una relación lineal positiva y significativa entre el tamaño del genoma (Valor Cx) y la longitud cromosómica promedio (LCP) en cuatro taxones de *Spergula*.

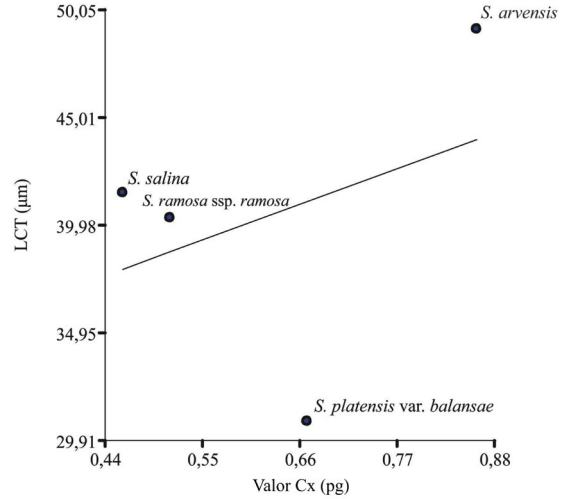


Fig. 4. Análisis de regresión lineal mostrando una relación lineal muy baja positiva y significativa entre el tamaño del genoma (Valor Cx) y el longitud cromosómica total del genoma diploide (LCT) en cuatro taxones de *Spergula*.

Relación tamaño del genoma y tamaño del polen

El tamaño del polen varía entre 17 a 36 micras (Tabla 1, Fig. 6), los granos medianos corresponden a *S. arvensis*, granos medianos a pequeños en *S. salina* mientras que las restantes especies poseen granos pequeños.

El análisis de regresión lineal entre el tamaño del genoma y el tamaño del polen (Fig. 7) mostró una relación lineal baja positiva, no significativa ($R^2 = 0,48$; $p > 0,05$).

DISCUSIÓN

En las Angiospermas, la variación del contenido nuclear de ADN ocurre en todos los niveles taxonómicos incluso en especies muy relacionadas entre sí (Price, 1988). Sobre la base de la información disponible acerca del tamaño del genoma, la familia Caryophyllaceae se caracteriza por presentar genomas muy pequeños a intermedios cuyo valor Cx oscila entre 0,42 - 4,33 pg (Bennett & Leitch, 2012).

Respecto a *Spergula*, existe un solo registro del tamaño del genoma y corresponde a *S. arvensis*, $1C = 1,05$ pg (Bennett *et al.*, 1998), el cual es muy similar al aquí obtenido. La totalidad de los genomas analizados en este trabajo presentan

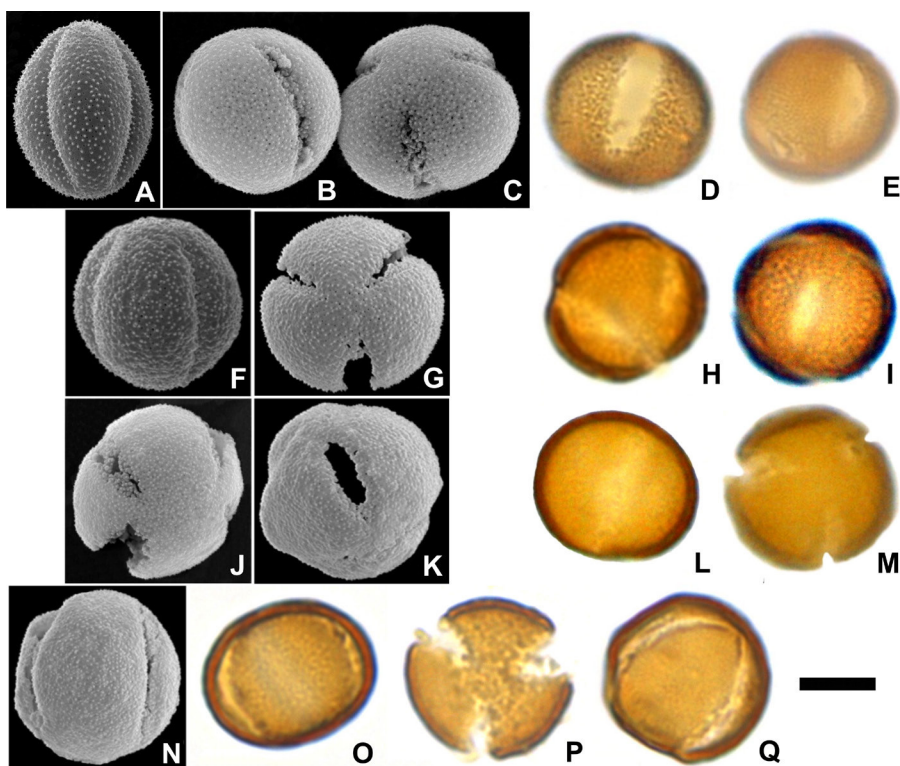


Fig. 6. Microfotografías obtenidas con microscopio electrónico de barrido (MEB) y microscopio óptico (MO). **MEB:** **A:** Vista ecuatorial de *S. arvensis*. **B:** Vista ecuatorial y **C:** Vista subpolar de *S. platensis* var. *balansae*. **F:** Vista ecuatorial de *S. platensis* var. *platensis*. **G:** Vista polar de *S. ramosa* ssp. *ramosa*. **J:** Vista subpolar de *S. salina*. **K** y **N:** Vista ecuatorial de *S. villosa*. **MO:** **D:** Vista ecuatorial y **E:** Vista subecuatorial de *S. arvensis*. **H:** Vista subecuatorial e **I:** Vista ecuatorial de *S. platensis* var. *balansae*. **L:** Vista ecuatorial y **M:** Vista polar de *S. platensis* var. *platensis*. **O:** Vista ecuatorial de *S. ramosa* ssp. *ramosa*. **P:** Vista polar de *S. salina*. **Q:** Vista ecuatorial de *S. villosa*: Escala= 12µm.

una tendencia muy conservadora a mantener su tamaño muy pequeño (i.e., $Cx < 1,4$ pg), tendencia que se condice con aquellas reconstruidas por Leitch *et al.* (1998) y Soltis *et al.* (2003) en las angiospermas ancestrales. Sin embargo, Coulleri *et al.* (2014) han enfatizado que la evolución del genoma más que ser conservadora presenta una naturaleza dinámica, en la cual algunos linajes que poseen grandes tamaños de genoma se caracterizan por tasas más lentas de diversificación y mayores tasas de extinción que los linajes con tamaño de genoma medio a muy pequeño. Por lo tanto, y de acuerdo Leitch *et al.* (1998) y Soltis *et al.* (2003), la selección natural podría favorecer la reducción del tamaño del genoma, hecho que se evidencia en que la mayoría de las angiospermas tienen

genomas pequeños o muy pequeños al igual que los presentados por las especies objeto de este estudio.

En poliploides, se espera que el valor $2C$ sea mayor al de sus progenitores diploides de manera proporcional a su nivel de ploidía, sin embargo el valor Cx se espera que sea similar (Leitch & Bennett, 2004). Esta expectativa se observa en algunas series poliploides, especialmente las recién formadas (Urdampilleta *et al.*, 2016), pero hay ejemplos que sugieren que los valores Cx en poliploides particulares son menores que lo esperado (Leitch & Bennett, 2004; Zenil-Ferguson *et al.*, 2016; Simonin & Roddy, 2018), dada la tendencia a la reducción del tamaño del genoma favorecida por la selección natural.

Evolución cromosómica

El aporte realizado en relación a los recuentos cromosómicos más lo conocido para el género constituye casi el 43% del total de las especies de *Spergula* que habitan la Argentina. La variabilidad en el número cromosómico registrado a partir de nuestros resultados detallan la existencia de algunos poliploides, característica frecuente en especies de Paronychioideae (Bittrich, 1993) que explica en parte la evolución del número cromosómico en el género *Spergula*. En la familia se registran cambios numéricos en relación a la evolución cariotípica, es decir variaciones en el número de cromosomas, ya sea por la presencia o ausencia de cromosomas (aneuploidía) tal como fue demostrado en *Silene* por Melzheimer (1974), o por aumento en el juego completo de cromosomas (poliploidía). Numerosos autores sugieren que los poliploides muestran un mejor rendimiento y más bajas tasas de extinción en ambientes nuevos, extremos o cambiantes (Hagerup, 1932; Stebbins, 1970; Brochmann *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2009; Soltis *et al.* 2014). De hecho, *S. salina* y *S. ramosa* ssp. *ramosa*, son ejemplos de poliploides eficientes con distribución amplia, capaces de conquistar ambientes muy variables (Brem, 2017).

En cuanto a los cambios estructurales, si bien no pudieron ser determinadas las características morfológicas de los cromosomas, nuestros resultados evidencian una ligera variación en la longitud cromosómica total (LCT). Autores como Flavell (1986) y Uozu *et al.* (1997) proponen que la presencia de variaciones en secuencias repetitivas dispersas o dispuestas en bloques se evidencia en los cambios en la LCT y en el tamaño del genoma. Esto pareciera indicar una compensación entre el número cromosómico *vs.* el tamaño del cromosoma y del genoma, ya que las especies tetraploides analizadas (*S. ramosa* ssp. *ramosa* y *S. salina*) muestran cromosomas y tamaño del genoma más pequeño comparativamente con las especies diploides (*S. arvensis* y *S. platensis* var. *balansae*). Dicha tendencia ésta en concordancia con la reducción del tamaño del genoma en poliploides señalado por Leitch & Bennett (2004), Zenil-Ferguson *et al.* (2016) y Simonin & Roddy (2018); los primeros autores sugieren que la selección natural opera en favor de: aquellos individuos eficientes en mecanismos de eliminación del ADN en relación a la idea del “nucleotipo” (Bennett,

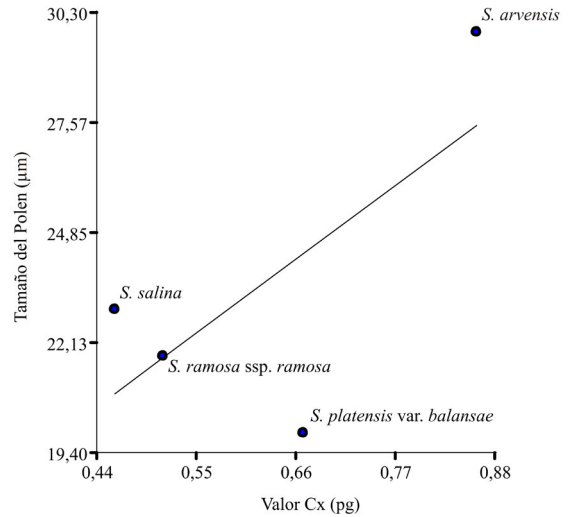


Fig. 7. Análisis de regresión lineal mostrando una relación lineal baja positiva y no significativa entre el tamaño del genoma (Valor Cx) y el tamaño del polen (P) en cuatro taxones de *Spergula*.

1987); la reducción de los costos bioquímicos inherentes a la síntesis, replicación y transcripción de ADN asociados al ADN extra; y a la mejora en el apareamiento entre homólogos y posterior estabilización del poliploide (Feldman *et al.*, 1997), dando lugar a la reducción del genoma a gran escala en poliploides.

Relación entre el tamaño del polen y el tamaño del genoma

El tamaño del polen de las especies analizadas son coincidentes, en su mayoría, con lo sugerido por Erdtman (1966) para la tribu Sperguleae (Paronychioideae) y por Punt & Hoen (1995), Perveen & Qaiser (2006) y Volponi (2013) para el género.

Dada la fuerte tendencia positiva entre el tamaño celular y el tamaño del genoma reportado por Beaulieu *et al.* (2008), especulamos que el tamaño del genoma podría estar correlacionado en parte con el tamaño del polen. En Caryophyllaceae, un grano de polen consiste en una célula vegetativa y dos células generativas; o sea el polen es tricelular (Saito *et al.*, 2002). Para este análisis, como se citó anteriormente seguimos a Knight *et al.* (2010), quienes se refirieron al polen como “unicelular”. Nuestros resultados

mostraron una relación débil entre el tamaño del genoma y el tamaño del polen (Fig. 6), esto podría deberse a que el polen no es metabólicamente activo después de la dehiscencia o liberación, sino más bien hasta su momento de imbibición y germinación, cuando alcanza el volumen máximo en la etapa de la formación del tubo polínico, tal como lo advirtió Knight *et al.* (2010) en varias familias de plantas con semillas. Entonces, es posible que esta correlación débil surgiera a partir del análisis en una etapa incorrecta del desarrollo del polen. Por otra parte, estudios similares realizados en Sapindaceae (Coulleri *et al.*, 2014) explican la débil relación entre ambos parámetros a través de la selección natural actuando a favor de granos pequeños en relación con estrategias de dispersión, teniendo un grano pequeño mayor probabilidad de transporte a un estigma receptivo tanto por el viento como por insectos, que granos grandes. Ésta fuerte selección natural puede oscurecer cualquier relación entre el tamaño del polen y el tamaño del genoma tal como lo propusieron Leitch *et al.* (2005).

El mecanismo de dispersión del polen en *Spergula* es principalmente entomófila mediada por sírfidos, que toman el néctar de las flores adoptando el aspecto de himenópteros (abejas y avispas) con las que fácilmente se confunden (New, 1961; Bittrich, 1993; Brem, 2017). Así entonces, teniendo en cuenta lo planteado por Leitch *et al.* (2005), la selección natural en *Spergula* podría estar favoreciendo en gran medida un pequeño tamaño del polen en relación a la estrategia de dispersión.

CONCLUSIONES

En este trabajo se reportan por primera vez dos recuentos cromosómicos (*S. platensis* var. *balansae* y *S. ramosa* ssp. *ramosa*), uno de los cuales resultó ser un poliploide. Además, se confirmó el número cromosómico en *S. arvensis* y se determinó que el citotipo tetraploide de *S. salina* habita en la República Argentina.

Por otro lado, se obtuvieron para *Spergula* las primeras estimaciones del contenido de ADN (2C) de cinco taxones y el tamaño del genoma (Cx) de cuatro, los cuales constituyen una novedad para la familia.

Se demostró la relación inversamente proporcional entre el número cromosómico y

el tamaño del genoma, lo cual indicaría una tendencia evolutiva a la reducción del tamaño del genoma en las especies poliploides.

El análisis de la relación entre el tamaño del genoma y el tamaño del polen demostró que estas características varían de manera independiente entre sí en el género, probablemente debido a presiones de selección en contra de granos de polen grandes como estrategia de dispersión.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Dra. Myriam Carolina Peichoto, al Dr. Pablo Ortega-Baes y al Dr. Gabriel Bernardello, por la lectura crítica y las sugerencias realizadas sobre el manuscrito preliminar. Este trabajo ha sido subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICTO-UNNE, 2011-0202) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional del Nordeste (SGCyT PI15-P001).

BIBLIOGRAFIA

- AROHONKA, T. 1982. Chromosome counts of vascular plants of the island Seili in Nauvo, southwestern Finland. *Turun Yliopiston Biologian-Laitoksen Julkaisuja* 3: 1-12.
- BEAULIEU, J. M., I. J. LEITCH, S. PATEL, A. PENDHARKAR & C. A. KNIGHT. 2008. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytol.* 179: 975-986.
- BENNETT, M. D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytol.* 106: 177-200.
- BENNETT, M. D., I. J. LEITCH & L. HANSON. 1998. DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Ann. Bot.* 82: 121-134.
- BENNETT, M. D. & I. J. LEITCH. 2012. Plant DNA C-values database (release 6.0, Dec. 2012) <http://www.kew.org/cvalues/>
- BITTRICH, V. 1993. Caryophyllaceae. En Kubitzki, K., Bittrich, V., Rohmer, J. (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants* 2: 212-221.
- BREM, M. C. 2017. Estudios biodistemáticos en las especies argentinas del género *Spergula* L. (Caryophyllaceae). Tesis doctoral. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes.

- BROCHMANN, C., A. K. BRYSTING, I. G. ALSOS, L. BORGES, H. H. GRUNDT, A. C. SCHEEN & R. ELVEN. 2004. Polyploidy in arctic plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 82: 521-536.
- COULLERI, J. P., J. D. URDAMPILLETA & M. S. FERRUCCI. 2014. Genome size evolution in Sapindaceae at subfamily level: a case study of independence in relation to karyological and palynological traits. *Bot. J. Linn. Soc.* 174: 589-600.
- DALGAARD, V. 1985. Chromosome studies in flowering plants from Madeira. *Willdenowia* 137-156.
- DI RIENZO, J. A., F. CASANOVES, M. G. BALZARINI, L. GONZÁLEZ, M. TABLADA & C. W. ROBLEDO. 2011. InfoStat, versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- ERDTMAN, G. 1960. The acetolysis method. *Svensk Bot. Tidskr.* 54: 561-564.
- ERDTMAN, G. 1966. *Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms.* Hafner Publ Co, New York & London.
- FELDMAN, M., B. LIU, G. SEGAL, S. ABBO, A. A. LEVY & J. M. VEGA. 1997. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147: 1381-1387.
- FERNANDES, A. & M. T. LEITÃO. 1971. Contribution a la connaissance cytotoxonomique des Spermatophyta du Portugal. III. Caryophyllaceae. *Bol. Soc. Brot.* 45: 167-176.
- FERNÁNDEZ, A. 1973. El ácido láctico como fijador cromosómico. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 15: 287-290.
- FLAVELL, R. B. 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 312: 227-242.
- GONZÁLEZ, G. L. 2010. Sobre el género *Spergula* L. [incl. *Spergularia* (Pers.) Pers. ex J. Presl & C. Presl, nom. cons.] (Caryophyllaceae) y sus especies en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Lagascalia* 30: 7-18.
- GOULD, F. W. 1957. Pollen size as related to polyploidy and speciation in the *Andropogon saccharoides* - *A. barbinodis* complex. *Brittonia* 9: 71-75.
- GREILHUBER, J., J. DOLEŽEL, M. A. LYSÁK & M. D. BENNETT. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot.* 95: 255-260.
- HAGERUP, O. 1932. Über polyploidie in beziehung zu klima, ökologie und phylogenie. *Hereditas* 16: 19-40.
- HUMPHRIES, C. J., B. G. MURRAY, G. BOCQUET & K. N. VASUDEVAN. 1978. Chromosome numbers of phanerogams from Morocco and Algeria. *Bot. Not.* 131: 391-406.
- JOHANSEN, B. & R. VON BOTHMER. 1994. Pollen size in *Hordeum* L.: correlation between size, ploidy level, and breeding system. *Sex. Plant Reprod.* 7: 259-263.
- JONG, J. 1997. Laboratory manual of plant cytological techniques. Royal Bot. Garden, Edinburgh.
- KAUR, D. & V. K. SINGHAL. 2012. Phenomenon of cytotoxicity and intraspecific polyploidy (2x, 4x) in *Spergularia diandra* (Guss.) Heldr. & Sart. in the Cold Desert Regions of Kinnaur District (Himachal Pradesh). *Cytologia* 77: 163-171.
- KENYON, J. C. 1997. Models of reticulate evolution in the coral genus *Acropora* based on chromosome numbers: parallels with plants. *Evolution* 51: 756-767.
- KNIGHT, C. A., R. B. CLANCY, L. GÖTZENBERGER, L. DANN & J. M. BEAULIEU. 2010. On the relationship between pollen size and genome size. *J. Bot.* 2010: 1-7.
- LEITCH, I. J. & M. D. BENNETT. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 82: 651-663.
- LEITCH, I. J., M. W. CHASE & M. D. BENNETT. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Ann. Bot.* 82: 85-94.
- LEITCH, I. J., D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS & M. D. BENNETT. 2005. Evolution of DNA amount across land plants (Embryophyta). *Ann. Bot.* 95: 207-217.
- LIFANTE, Z. D., T. LUQUE & C. S. BÁRBARA. 1992. Chromosome numbers of plants collected during Iter Mediterraneum II in Israel. *Bocconea* 3: 229-250.
- MELZHEIMER, V. 1974. Bemerkungen zur cytologie einiger arten der gattung *Silene* L. von der Balkan-Halbinsel. *Candollea* 29: 337-343.
- NEW, J. K. 1961. *Spergula arvensis* L. *Journal of Ecology* 49: 205-215.
- PEDERSEN, T. M. 1984. Caryophyllaceae. En Correa, M. N. (ed.), *Flora Patagónica*, Colec. Cient. I.N.T.A. 8: 253-267.
- PERVEEN A. & M. QAISER. 2006. Pollen flora of Pakistan-LI-Caryophyllaceae. *Pak. J. Bot.* 38: 901-915.
- PETROVA, A. 1995. Mediterranean chromosome number reports 5 (415-434). *Fl. Medit.* 5: 279-288.
- PRICE, H. J. 1988. Nuclear DNA content variation within angiosperm species. *Evol. Trend. Plant.* 2: 53-60.
- PROBATOVA, N. S. 2006. Chromosome numbers of plants of the Primorsky Territory, the Amur River basin and Magadan region. *Bot. Zhurn. (Moscow & Leningrad)* 91: 491-509.
- PUNT W. & P.P. HOEN. 1995. Caryophyllaceae. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 88: 83-272.

- RASBAND, W. S. 1997-2016. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>
- RATTER, J. A. 1976. Cytogenetic studies in *Spergularia*: IX. Summary and conclusions. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 34: 411-428.
- RUNEMARK, H. 1996. Mediterranean chromosome number reports 6 (590–678). *Fl. Medit.* 6: 223-243.
- SÁENZ, C. 1980. Polen de la flora de Doñana (Huelva, España). *Lazaroo* 2: 191-270.
- SAITO, C., N. NAGATA, A. SAKAI, K. MORI, H. KUROIWA & T. KUROIWA. 2002. Angiosperm species that produce sperm cell pairs or generative cells with polarized distribution of DNA-containing organelles. *Sex. Plant Reprod.* 15: 167-178.
- SIDHU, M. & S. S. BIR. 1983. Karyological studies on weeds on cultivable lands in Punjab, India. *Trop. Life Sci. Res.* 1: 1-13.
- SIMONIN, K. A. & A. B. RODDY. 2018. Genome downsizing, physiological novelty, and the global dominance of flowering plants. *PLoS Biol.* 16: e2003706.
- SOLTIS, D. E., P. S. SOLTIS, M. D. BENNETT & I. J. LEITCH. 2003. Evolution of genome size in the angiosperms. *Am. J. Bot.* 90: 1596-1603.
- SOLTIS, D. E., C. J. VISGER & P. S. SOLTIS. 2014. The polyploidy revolution then... and now: Stebbins Revisited. *Am. J. Bot.* 101: 1057-1078.
- STEBBINS, G. L. 1970. 1970. Variation and evolution in plants: progress during the past twenty years. In: Hecht M. K. & W. C. Steere (Eds.), *Essays in Evolution and Genetics in Honor of Theodosius Dobzhansky. A Supplement to Evolutionary Biology*, pp. 173-208. Appleton-Century-Crofts, N.Y.
- TAIA, W. K. 1994. On the pollen morphology of some Egyptian Caryophyllaceae. *J. King Saud Univ.* 6: 149-165.
- UOZU, S., H. IKEHASHI, N. OHMIDO, H. OHTSUBO, E. OHTSUBO & K. FUKUI. 1997. Repetitive sequences: cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza*. *Plant Mol. Biol.* 35: 791-799.
- URDAMPILLETA, J. D., J. P. COULLERI & M. S. FERRUCCI. 2016. Insights into the Andean genera *Bridgesia* and *Guindilia* (Sapindaceae): an integrated approach. *Syst. Biodivers.* 14: 583-598.
- VAIO, M., C. MAZZELLA, V. PORRO, P. SPERANZA, B. LOPEZ-CARRO, E. ESTRAMIL & G. A. FOLLE. 2007. Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. *Plant Syst. Evol.* 265: 109-121.
- VOLPONI, C. R. 1994. Caryophyllaceae. En R. Kiesling. (ed.), *Flora de San Juan* 1: 175-178.
- VOLPONI, C. R. 2013. Caryophyllaceae. En PIRE, S. M., L. M. ANZÓTEGUI & G. A. CUADRADO (eds.) *Flora Polínica del Nordeste Argentino IV*: 51–58 EUDENE, Corrientes, Argentina.
- WOOD, T. E., N. TAKEBAYASHI, M. S. BARKER, I. MAYROSE, P. B. GREENSPOON & L. H. RIESEBERG. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 13875-13879.
- ZENIL-FERGUSON, R., J. M. PONCIANO & J. G. BURLEIGH. 2016. Evaluating the role of genome downsizing and size thresholds from genome size distributions in angiosperms. *Am. J. Bot.* 103: 1175-1186.
- ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. BELGRANO. 2008. Caryophyllaceae. En ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. BELGRANO (eds.), *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur Vol. 2. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 107: 1894-1896.

Recibido el 1 de julio de 2017, aceptado el 6 de abril de 2018. Editora: Viviana Solís Neffa.

VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE *ELIONURUS MUTICUS* (POACEAE) DE CORRIENTES, ARGENTINA, A PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES DE ADN NUCLEAR Y CLOROPLÁSTICO

ERCILIA M. SARA MORENO^{1*}, NOELIA E. A. ALMIRÓN¹, M. CAROLINA PEICHOTO^{3, 4} y VIVIANA G. SOLÍS NEFFA^{1, 2}

Resumen: *Elionurus muticus* constituye un valioso recurso renovable; utilizado como forraje, fijador del suelo, aromatizante de ropa, para ahuyentar polillas, como antiséptica, contra la gonorrea y problemas urinarios, para la bronquitis, para curar la lepra, entre otros usos. Además, por su contenido en citral, se lo ha propuesto como sucedáneo de aceites esenciales, como la citronela. No obstante su potencial, se cuenta con escasos trabajos de caracterización genética de la especie. En este trabajo caracterizamos genéticamente poblaciones de *E. muticus* de Corrientes (Argentina), empleando marcadores moleculares RAPD y de ADNcp. Los resultados evidencian variabilidad genética en las poblaciones, y serían el resultado de la deriva genética, la historia de reducción poblacional de la especie y los modos de reproducción de la especie. Dado que en trabajos previos en poblaciones de Argentina, se observó variabilidad morfológica y en la capacidad de producir aceites, un análisis conjunto de variabilidad morfológica, genética y química en un mayor número de poblaciones, representativo de toda el área de distribución de la especie, enriquecerá el conocimiento sobre el estado de los recursos genéticos actuales de *E. muticus*, y contribuirá a la puesta en valor de la especie como recurso natural y como potencial cultivo de uso comercial sostenible.

Palabras clave: ADNcp, *Elionurus muticus*, RAPD, variabilidad genética.

Summary: Genetic variability in populations of *Elionurus muticus* (Poaceae) from Corrientes, Argentina, based on molecular markers of nuclear and chloroplast DNA. *Elionurus muticus* constitutes a valuable renewable resource; it is used as forage, soil fixer, clothing flavoring, to drive away moths, as antiseptic, against gonorrhoea and urinary problems, for bronchitis, to cure leprosy, among other uses. In addition, due to its citral content, it has been proposed as a surrogate for essential oils, such as citronella. Despite its potential, there are few works of genetic characterization of this species. In this work, we genetically characterize populations of *E. muticus* from Corrientes (Argentina), using molecular markers RAPD and cpDNA. Results show genetic variability in populations, which would be the results of genetic drift, a history of population reduction and the reproduction types of the species. Since, in previous works in Argentinian populations, it was found morphological variability and in the ability to produce oils, a joint analysis of morphological, chemical and genetic variability, in a bigger number of populations, representative of the entire area of distribution of the species, will enrich the knowledge about the state of the current genetic resources of *E. muticus*, and will contribute to the enhancement of the species as a natural resource and as a potential crop for sustainable commercial use.

Key words: ADNcp, *Elionurus muticus*, genetic variability, RAPD.

¹ Laboratorio de Citogenética y Evolución Vegetal. Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET). C.C. 209, 3400, Corrientes, Argentina.

² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE).

³ Laboratorio de Taxonomía. Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET). C.C. 209, 3400, Corrientes, Argentina.

⁴ Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE).

*e-mail: emsaramoreno@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Elionurus Humb. & Bonpl. ex Willd. (Andropogoneae, Poaceae) comprende 15 especies distribuidas en áreas tropicales y subtropicales de África, Australia y América (Renvoize, 1978; Clayton & Renvoize, 1986; Watson & Dallwitz, 1992). El género *Elionurus* pertenece a la tribu Andropogoneae Dumort. y fue asignada a la subtribu Rottboliinae J. Presl en base a su morfología (Watson & Dallwitz, 1992) y a estudios de filogenia molecular (Soreng *et al.*, 2015). Sin embargo, una actualización reciente de la filogenia sitúa a *Elionurus* en la subtribu Tripsacinae Dumort. (Soreng *et al.*, 2017).

En América habitan 7 taxones y para la Argentina se mencionan 2 especies *E. muticus* (Spreng.) Kuntze y *E. tripsacoides* Humb. & Bonpl. ex Willd. (Denham, 2012). *Elionurus muticus* es la especie del género más ampliamente distribuida. Habita desde Brasil hasta la Argentina, como así también en África. En Argentina, es posible encontrarla en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, La Pampa, Misiones, Salta, Santa Fe y Santiago del Estero. Allí se la conoce con nombres comunes tales como “pasto amargo”, “pasto bravo”, “espartillo”, “espartillo guazú”. Crece en suelos pobres y arenosos (Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987); se la encuentra comúnmente en bosques abiertos del centro-oeste de Santa Fe, donde forma praderas, y en dunas y regiones arenosas de la región semiárida Pampeana, donde constituye un valioso recurso como fijadora de suelos (Anónimo, 1985). Además, es una especie dominante de las sabanas del Chaco Húmedo y de los aybales del Chaco Semiárido. En la provincia de Corrientes se la encuentra en los bosques mesófilos donde forma espartillares (Fontana, 2008).

Elionurus muticus presenta una gran variabilidad morfológica. Bajo este nombre se involucra a una serie de binomios que incluye a *E. adustus* (Trin.) Ekman, *E. candidus* (Trin.) Hack., *E. latiflorus* (Nees ex Steud.) Hack., *E. megapotamicus* (Spreng.) Herter, *E. rostratus* Nees y *E. viridulus* Hack. (Renvoize, 1978), entre otros nombres, en algunos casos sólo reconocidos por ciertos autores de trabajos regionales.

Elionurus muticus constituye un valioso recurso renovable. Con un manejo apropiado, puede emplearse como especie forrajera para alimentar

el ganado (Castro & Ramos, 2003; Hess *et al.*, 2007). Además, se han reportado diferentes usos de esta especie en medicina popular debido a sus propiedades sudoríficas, febrífugas, afrodisíacas y antioxidantes (Dzingirai *et al.*, 2007; Muchuweti *et al.*, 2007). Las partes aéreas brindan un aceite esencial aromático que posee acción analgésica y antibacteriana (Tredgold, 1986). Con sus hojas se realizan infusiones utilizadas para curar la lepra (Guenther, 1950). Sus espiguillas se utilizan en infusiones contra la gonorrea y problemas urinarios, así como en forma de jarabe para la bronquitis crónica de los niños (Stuckert, 1904). Presenta también actividad antifúngica, citotóxica e insecticida, por lo que se sugirió que podría emplearse en la agroindustria (Stuckert, 1904; Vidal, 1954; Cacciabue *et al.*, 2005; Sabini *et al.*, 2006; Dzingirai *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2007; Füller *et al.*, 2014; Colpo *et al.*, 2014). Otra característica interesante de *E. muticus* es que más del 80 % de la resina de sus aceites aromáticos está compuesta por citral (Scramin *et al.*, 2000; Füller *et al.*, 2014). Este compuesto posee un fuerte aroma cítrico (Fester *et al.*, 1961; Elechosa *et al.*, 1986), motivo por el cual fue propuesto como un sucedáneo de la citronela (Fester *et al.*, 1961; Kolb *et al.*, 2007; Füller *et al.*, 2014), de gran valor en las industrias aromáticas, de alimentos, cosmética y farmacéutica (Heydorn *et al.*, 2003; Koshima *et al.*, 2006; Hess *et al.*, 2007; Colpo *et al.*, 2014). Asimismo, la composición química de los aceites esenciales es muy variable en *E. muticus* (Chagonda *et al.*, 2000), habiéndose observado diferencias en sus principales componentes en relación a los cambios estacionales (Hess *et al.*, 2007) y a la procedencia geográfica de las plantas (Füller *et al.*, 2010, 2014). La presencia del citral ha sido detectada en plantas provenientes del centro-oeste de Brasil, aunque sería más abundante en algunas poblaciones del sur de Brasil y en particular, en el nordeste argentino (Scramin *et al.*, 2000; Cacciabue *et al.*, 2005; Sabini *et al.*, 2006; Kolb *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2007; Füller *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de poseer un gran potencial para su explotación comercial (Kolb *et al.*, 2012), esta especie aún permanece subexplotada.

En este contexto, a fin de contribuir a la puesta en valor de esta especie como recurso natural y como potencial cultivo de uso comercial sostenible, hemos iniciado estudios focalizados en la caracterización

morfológica y química de esta especie. En particular, se ha puesto un especial interés en las poblaciones del nordeste argentino (NEA), dado que en estudios preliminares se ha detectado una gran variación tanto morfológica (González *et al.*, 2016) como en la producción de aceites aromáticos (Elechosa, 1986; Kolb *et al.*, 2012). Además, debido que el éxito de cualquier programa de domesticación y premejoramiento depende de la variabilidad genética de las poblaciones parentales involucradas (Nodari & Guerra, 2000), también resulta imprescindible caracterizar la variabilidad genética de las poblaciones de *E. muticus*. Sin embargo, la información acerca de la variabilidad genética de esta especie es aún escasa (Füller *et al.*, 2010, 2015) y no se cuenta con datos de las poblaciones del NEA.

Sobre la base de estos antecedentes, y dado que los marcadores moleculares han contribuido con métodos efectivos para detectar diferenciación genética a nivel intra e interpoblacional en varias especies (Masi *et al.*, 2006; Yamamoto, 2006), el objetivo del presente trabajo fue caracterizar genéticamente poblaciones naturales de *Elionurus muticus* de la provincia de Corrientes, Argentina, a través del uso de marcadores moleculares de ADN nuclear (ADNn) y cloroplástico (ADNcp).

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN

Un total de 24 individuos fueron muestreados en 4 poblaciones naturales de *E. muticus* de la provincia de Corrientes, Argentina (Fig. 1 y Tabla 1). Se colectaron hojas jóvenes y se conservaron con sílica-gel para su deshidratación y subsecuente extracción del ADN. Para cada población se obtuvieron las coordenadas geográficas utilizando una unidad de sistema de posicionamiento global (GPS). Los ejemplares de referencia fueron depositados en el herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES).

El ADN total se extrajo usando un protocolo modificado de extracción con CTAB tomado de Doyle & Doyle (1987) y Cullings (1992).

RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)

Un total de 20 cebadores universales de RAPD (OPO-1 al OPO-20) de Operon Technologies

(Alameda, CA, USA) fueron evaluados. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 8 μ l con 12,5 ng/ μ l de ADN, 0,2 μ M de cebador, 0,10 mM de cada dNTP, 0,19 U de Taq polimerasa y 0,75 mM de MgCl₂ en una solución tampón de reacción. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador con gradiente Eppendorf Mastercycler programado con un ciclo a 94 °C (2 min), 35 ciclos a 94 °C (30 seg), 37 °C (1 min), 72 °C (2 min), y un paso final de extensión a 72 °C (5 min). Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % a 2,3 V/cm por 160 min en una solución tampón TAE 1 \times . Luego de la electroforesis, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml), enjuagados por 30 min en agua deionizada, y fotografiados bajo luz UV. Un control negativo se incluyó en todas las reacciones.

Los productos de PCR fueron registrados como presencia (1) o ausencia (0) para construir una matriz binaria. La diversidad genética fue estimada por el número total de bandas (NTB), número de bandas exclusivas (NBE), el porcentaje de loci polimórficos (PLP), la heterocigosis esperada (He) y el índice de diversidad de Shannon (Sh) (Shannon & Weaver, 1949). Se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) y las relaciones entre individuos fueron estudiadas con un análisis de componentes principales (PCoA) a partir de los valores de las distancias de Nei. Todos los análisis fueron llevados a cabo con el programa GenAlEx 6.3 (Peakall & Smouse, 2006).

Identificación de poblaciones mediante análisis de agrupación Bayesiana a partir de marcadores RAPD

Se utilizaron métodos de agrupación Bayesiana para inferir la estructuración genética en las poblaciones estudiadas. Estos métodos permiten asignar probabilísticamente los individuos a diferentes grupos sin necesidad de conocer *a priori* las unidades y/o límites poblacionales (Guillot *et al.*, 2009). Para tal fin, se aplicaron métodos basados en modelos empleando el programa STRUCTURE versión 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Se identificaron individuos agregados o mezclados (“admixed”) en cada población, calculando su proporción de pertenencia a cada grupo, con un modelo de frecuencias correlacionadas (Falush *et al.*, 2003). El

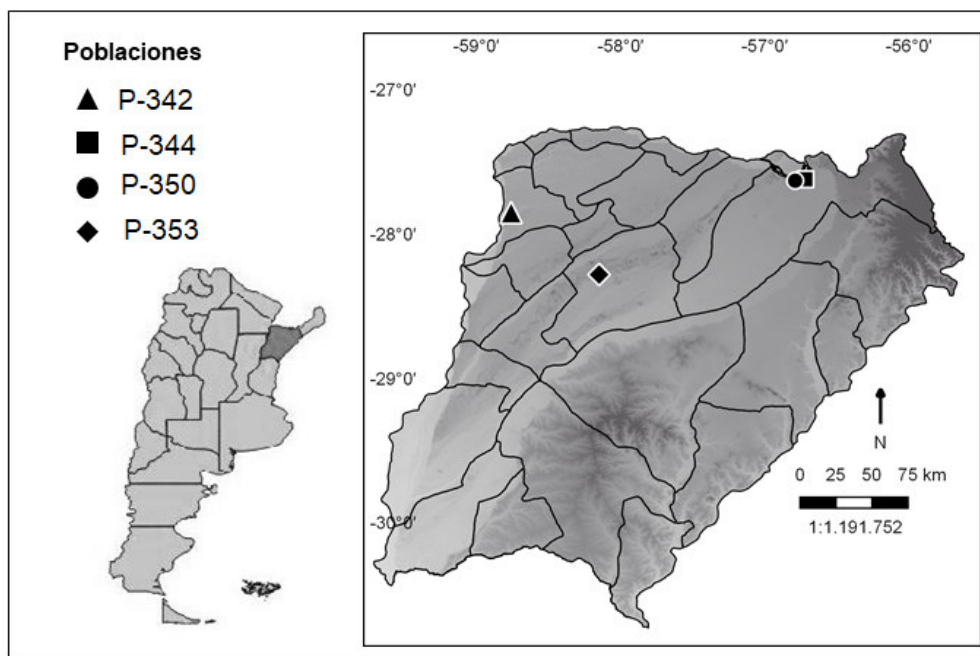


Fig. 1. Distribución de las poblaciones de *Elionurus muticus* de Corrientes (Argentina) analizadas.

rango de grupos posibles (K) analizados fue de 2 a 10, llevando a cabo 3 repeticiones independientes por cada estimación de K para verificar la consistencia de los resultados entre los diferentes análisis. La longitud de las iteraciones de MCMC

y el proceso de burn-in se fijaron en 1.000.000 y 100.000, respectivamente. El mejor valor de ΔK se estimó mediante el método de Evanno *et al.* (2005) mediante el programa STRUCTURE HARVESTER versión 6.94 (Dent & Von Holdt, 2012).

Tabla 1. Información de las poblaciones de *Elionurus muticus* analizadas y estadísticos de resumen obtenidos del análisis de marcadores moleculares RAPD y secuencias de ADNcp. NTB: número total de bandas; NBE: número de bandas exclusivas; PLP: porcentaje de loci polimórficos; He: heterocigosis esperada; Sh: índice de Shanon; P: número de sitios polimórficos; h: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica; DE: desvío estándar.

Población	Lugar de colección, coleccionista y número de colección (herbario)	RAPD					ADNcp		
		NTB	NBE	PLP %	He (DE)	Sh (DE)	P	h (DE)	π (DE)
P-342	Corrientes. Dpto. Empedrado (-58,76; -27,85). Peichoto M.C. & J.A. González 342 (CTES)	58	4	49,57	0,18 (0,02)	0,27 (0,03)	3	0,6 (0,22)	0,0012 (0,0012)
P-344	Corrientes. Dpto. Ituzaingó (-56,71; -27,62). Peichoto M.C. 344 (CTES)	59	5	50,43	0,14 (0,02)	0,22 (0,02)	3	0,73 (0,16)	0,0016 (0,0015)
P-350	Corrientes. Dpto. Ituzaingó (-56,79; -27,63). Peichoto M.C. 350 (CTES)	70	7	58,26	0,18 (0,02)	0,28 (0,03)	1	0	0
P-353	Corrientes. Dpto. Concepción (-58,15; -28,28). Peichoto M.C. 353 (CTES)	50	11	40,87	0,15 (0,02)	0,22 (0,03)	1	0	0

Secuencias de ADN cloroplástico

La región correspondiente al espaciador intergénico del ADN cloroplástico matK5'R-matK6 fue amplificada por medio de reacciones de PCR y empleando los cebadores de Shaw *et al.* (2005). Las PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 9 ng / μ l de ADN, 0,1 μ M de cada cebador, 200 μ M de cada dNTP, 3 mM MgCl₂ y 2 U de Taq polimerasa en una solución tampón de reacción 1 \times . El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 31 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50,2 °C y 1 min a 72 °C, seguido por un paso de extensión final de 4 min a 72 °C. Las amplificaciones fueron confirmadas por electroforesis en geles de agarosa 1,4 % en solución tampón TAE 1 \times , teñidos en bromuro de etidio (10 mg/ml) y fotografiados bajo luz UV.

Los productos de los cebadores directo y reverso fueron enviados a secuenciar a MacroGen © (Seúl, Corea del Sur). Todas las secuencias fueron depositadas en el GenBank (Números de acceso: MH285961 al MH285974). Los cromatogramas fueron editados manualmente con Chromas 2.33 (<http://www.technelysium.com.au>). Las secuencias fueron alineadas de manera automática con MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) usando el método Clustal W. Todas las posiciones polimórficas detectadas en el alineamiento fueron chequeadas con los cromatogramas originales, con el fin de asegurar que dichas bases realmente constituyen posiciones variables. Debido a que la dinámica mutacional de las inserciones/deleciones (indels) involucrando poli-T/A no puede ser determinada (Aldrich *et al.*, 1988; Kelchner, 2000), estos eventos no fueron considerados para los análisis posteriores. Aquellos indels contiguos fueron tratados como un único evento mutacional (Simmons & Ochoterena, 2000).

A partir de las secuencias de ADNcp se calcularon los estadísticos descriptivos estándar para diversidad molecular: número de sitios polimórficos (P), diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π). La estructura genética poblacional fue establecida con un AMOVA. Se utilizó el programa Arlequin v. 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Se determinaron los haplotipos con el programa DnaSP v.5.0 (Librado & Rozas, 2009) y las relaciones evolutivas entre los mismos

se establecieron mediante la construcción de una red de haplotipos con el método median-joining ($\epsilon = 0$, Bandelt *et al.*, 1999), empleando el programa NETWORK 4.5.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>).

RESULTADOS*RAPD*

Cuatro cebadores fueron seleccionados para el análisis (OPO-1, -3, -10, -12) por mostrar mayor polimorfismo y calidad de las bandas, registrándose un total de 115 bandas. Los índices de diversidad genética calculados se muestran en la Tabla 1. Se detectaron entre 50 (P-353) y 70 (P-350) bandas a nivel poblacional. Todas las poblaciones mostraron bandas exclusivas, desde 4 (P-342) hasta 11 bandas (P-353). El PLP total fue de 49,78 %, encontrándose valores desde 40,87 % (P-353) hasta 58,26 % (P-350); la He total fue de 0,16, con valores de 0,18 (P-342 y P-350) hasta 0,14 (P-344); el índice de Shannon total fue de 0,25, con un rango de variación desde 0,22 (P-353) hasta 0,28 (P-350).

Del total de la variabilidad genética encontrada, 79 % pertenece a cada población, mientras que 21 % corresponde a la variabilidad interpoblacional. En cuanto al AMOVA, el índice de fijación Φ_{ST} fue significativo e igual a 0,21 (Tabla 2). Todos los valores de distancia genética entre poblaciones fueron estadísticamente significativos (Tabla 3), y variaron entre 0,088 y 0,361. La menor distancia genética se observó entre las poblaciones P-342 y P-350. Mientras que las poblaciones genéticamente más distantes fueron P-342 y P-353.

Las primeras dos coordenadas del PCoA representaron el 30,53 % de la variabilidad (17,60 y 12,93 % respectivamente). Los individuos de la población P-353 fueron los únicos que se agruparon claramente, aunque muy relacionados con algunos individuos de la población P-344. Los individuos de las demás poblaciones formaron dos grupos separados, uno conteniendo individuos de las poblaciones P-342 y P-350, y otro con individuos de todas las poblaciones excepto P-353 (Fig. 2).

La agrupación Bayesiana arrojada por STRUCTURE fue concordante con los resultados del PCoA en cuanto a la agrupación de los individuos de la población P-353 y su cercanía con algunos individuos de la población P-344. No

Tabla 2. Resultados del AMOVA basado en marcadores RAPD y secuencias de ADNcp de poblaciones naturales de *Elionurus muticus*. g.l.: grados de libertad. *significativo $P < 0,05$.

Marcador	Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
RAPD	Entre poblaciones	3	109,08	3,74	21
	Dentro de poblaciones	20	278,17	13,91	79
	Total	23	387,25	17,65	
	Índice de fijación $\Phi_{ST} = 0,21^*$				
ADNcp	Entre poblaciones	3	3,71	0,17	47,59
	Dentro de poblaciones	20	3,83	0,19	52,41
	Total	23	7,54	0,37	
	Índice de fijación $\Phi_{ST} = 0,48^*$				

obstante separó a las poblaciones analizadas en dos grupos ($K= 2$; Fig. 3), a diferencia del PCoA donde se observaron tres grupos. Un grupo compuesto por los individuos de la población P-350 y la mayoría de los individuos de la población P-344, y otro grupo conformado por las poblaciones P-342, P-350, y los dos individuos restantes de la población P-344.

Secuencias de ADN cloroplástico

Las secuencias alineadas presentaron 555 posiciones. Se observaron 3 sitios polimórficos (posiciones nucleotídicas: #250 – #392 – #468); se obtuvieron valores de diversidad haplotípica relativamente altos ($h= 0,59$), y valores bajos de diversidad nucleotídica ($\pi= 0,0012$) (Tabla 1). Dos poblaciones no mostraron variabilidad genética (P-350 y P-353), y las dos restantes (P-342 y P-344) mostraron valores similares de diversidad (Tabla 1). El AMOVA fue estadísticamente significativo y reveló que el 52,42 % de la variabilidad es explicada por las diferencias dentro de las poblaciones (Tabla 2). La reconstrucción de los haplotipos para el total de individuos analizados resultó en 4 haplotipos diferentes (Fig. 4). Sólo dos poblaciones presentaron

haplotipos exclusivos, es decir, presentes sólo en esa población. El haplotipo H1 fue exclusivo de la población P-342, y el haplotipo H4 fue exclusivo de la población P-344. Las poblaciones P-350 y P-353 presentaron un solo haplotipo cada una, H3 y H2 respectivamente. La red de haplotipos presentó forma de estrella, con un haplotipo central del cual derivan los demás haplotipos, y con un único paso mutacional separando a cada uno de los haplotipos.

Tabla 3. Matriz de distancias genéticas entre las poblaciones de *Elionurus muticus* analizadas en base a los datos del marcador molecular RAPD. Por encima de la diagonal se muestran los valores P de significancia en base a 999 permutaciones.

P-342	P-344	P-350	P-353	Poblaciones
0	0,006	0,034	0,001	P-342
0,188	0	0,009	0,003	P-344
0,088	0,129	0	0,003	P-350
0,361	0,198	0,283	0	P-353

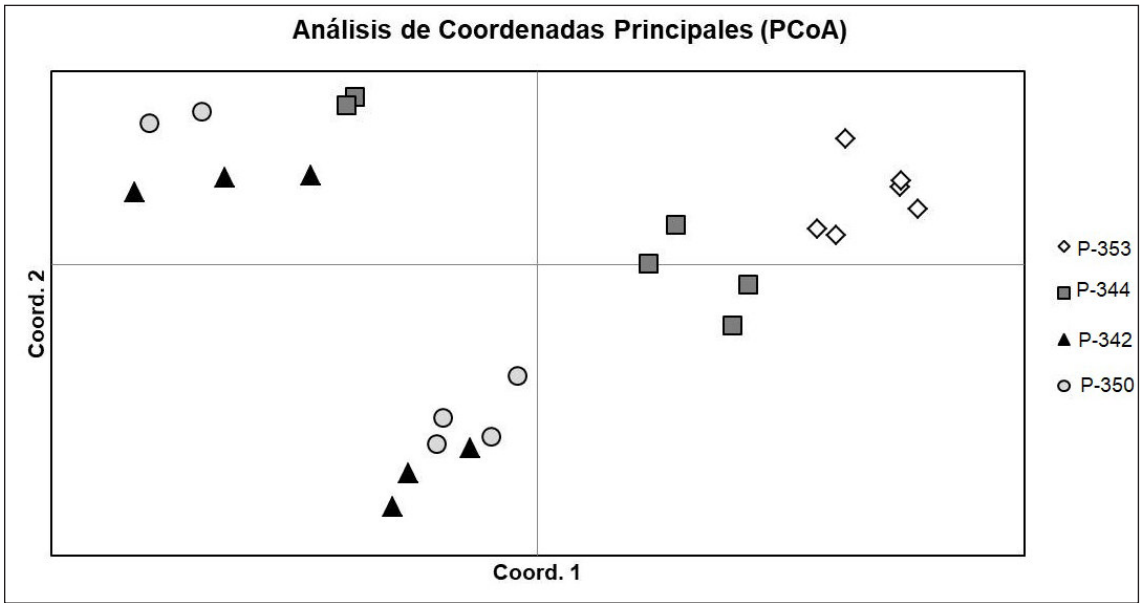


Fig. 2. Gráfico resultante del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) obtenido a partir de los patrones de marcadores RAPD de los individuos de *Elionurus muticus* analizados. Cada población se encuentra diferenciada por un símbolo.

DISCUSIÓN

La caracterización de la variabilidad genética de las poblaciones de especies con potencial valor económico constituye una información básica para el desarrollo de programas de domesticación y premejoramiento (Nodari & Guerra, 2000). Si bien existe un creciente interés en develar la variabilidad y estructura genética de plantas bioactivas (Shasany *et al.*, 2005; Muchugi *et al.*, 2008; Domyati *et al.*, 2011; Azizi *et al.*, 2012), esta información muchas veces resulta escasa. En particular, en *E. muticus*, la única información disponible respecto a su variabilidad genética corresponde a investigaciones llevadas a cabo en poblaciones de Rio Grande do Sul, Brasil (Füller *et al.*, 2010, 2015). Por lo tanto, nuestro análisis de poblaciones naturales de *E. muticus* de la provincia de Corrientes empleando marcadores moleculares nucleares (RAPD) y secuencias de regiones no codificantes de ADNcp, constituye el primer aporte al conocimiento de la variabilidad y estructura genética de poblaciones de Argentina y aporta información para futuros estudios aplicados en esta especie.

Todos los valores de diversidad genética obtenidos en el presente trabajo a partir de marcadores RAPD resultan más bajos respecto de los obtenidos por Füller *et al.* (2010) empleando los mismos marcadores en poblaciones de Brasil. En cuanto a la distribución de la variabilidad genética, el análisis de coordenadas principales sólo arrojó un grupo relativamente homogéneo que incluyó todos los individuos de la población de Concepción (P-353), que es la población que presentó el mayor número de bandas exclusivas (NBE = 11 vs. NBE = 4-7), junto con la mayoría de individuos de una población de Ituzaingó (P-344). Los restantes individuos conformaron otros dos grupos heterogéneos.

En cuanto al análisis de secuencias de ADNcp, los valores relativamente elevados de diversidad haplotípica y bajos de diversidad nucleotídica detectados en las poblaciones polimórficas de *E. muticus*, son indicativos de un rápido crecimiento poblacional, un tamaño efectivo (N_e) bajo o de poblaciones con poco tiempo de separación (Schaal *et al.*, 1998).

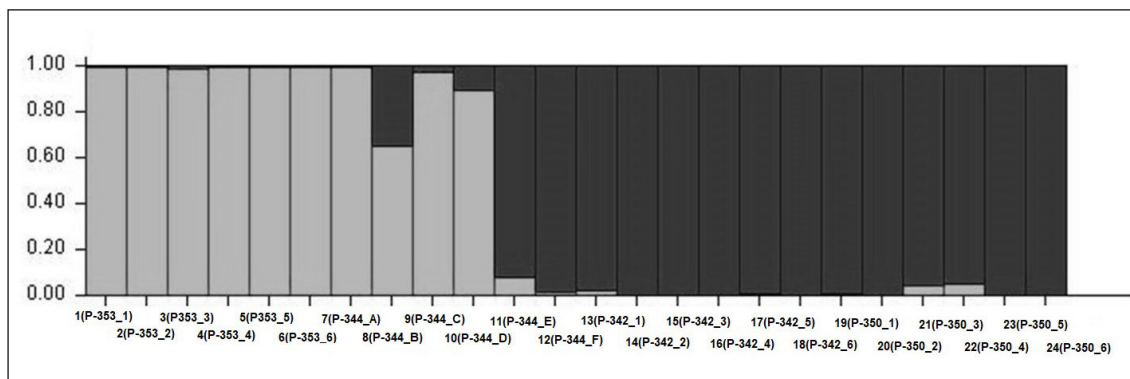


Fig. 3. Representación de las agrupaciones Bayesianas para K= 2. Cada tono de gris indica un grupo genético. Las poblaciones se indican entre paréntesis.

Con respecto a la estructuración de la variabilidad genética, el mayor porcentaje de variabilidad intrapoblacional que inter poblacional detectada para ambos marcadores en las poblaciones de

Corrientes de *E. muticus* es similar al observado en las poblaciones de Rio Grande do Sul (Füller *et al.*, 2010, 2015). Los resultados obtenidos en las poblaciones estudiadas de Corrientes sustentan la ocurrencia de alogamia en *E. muticus* como también fuera propuesto para las poblaciones brasileras en base a los índices de diversidad obtenidos a partir de marcadores AFLP (Füller *et al.*, 2015). No obstante, los valores de Φ_{st} para ambos marcadores moleculares aquí estudiados también evidenciaron un alto grado de diferenciación genética entre las poblaciones de Corrientes. Asimismo, y contrariamente a lo observado en las poblaciones de Brasil, en las cuales era de esperarse un valor de Φ_{st} relativamente elevado debido a las distancias geográficas entre las poblaciones analizadas (Füller *et al.*, 2015), en el presente trabajo los valores de distancia genética no reflejaron las distancias geográficas entre las poblaciones, ya que las dos poblaciones geográficamente más cercanas mostraron valores más altos de distancia genética que aquellas geográficamente más distantes. Por lo tanto, la diferenciación genética observada actualmente entre las poblaciones estudiadas de *E. muticus* en Corrientes no puede ser explicada por un modelo de flujo génico de aislamiento por distancia. Dado que las regiones de ADN no codificante, como las analizadas en este trabajo, pueden acumular cambios mutacionales de manera neutral de modo tal que únicamente la deriva génica influye en los niveles de polimorfismo en una población (Parker *et al.*, 1998), la diferenciación observada entre las poblaciones de Corrientes podría ser el resultado

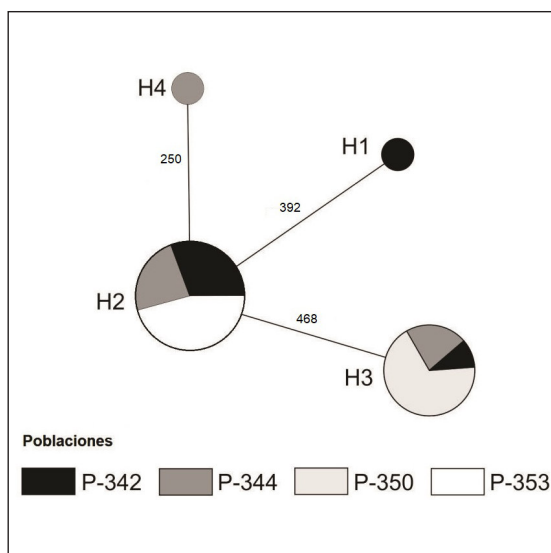


Fig. 4. Red de haplotipos obtenida a partir del análisis de secuencias de ADNcp no codificantes, mostrando las relaciones evolutivas entre los haplotipos hallados en las poblaciones de *Elionurus muticus* analizadas. Cada círculo representa un haplotipo, su tamaño es proporcional a su frecuencia. Las líneas que unen a los haplotipos representan sus relaciones evolutivas. Los números sobre las líneas indican la posición nucleotídica en la que se encuentra la mutación.

de la deriva génica. Además, se ha sugerido que el modo de reproducción afecta la estructura genética de las plantas, dentro y entre poblaciones (Loveless & Hamrick, 1984). Si bien *E. muticus* se propaga por semillas, también puede multiplicarse vegetativamente por división de rizomas (Davies *et al.*, 2004; da Silva Nunes, 2008), de modo que las poblaciones estarían integradas por una cierta proporción de plantas clonales, hecho que también pudo contribuir al grado de estructuración genética observado.

A su vez, la estructuración genética detectada en las poblaciones de *E. muticus* estudiadas a partir del análisis de las secuencias de ADNcp fue mayor que la detectada a partir de marcadores nucleares. En la mayoría de las Angiospermas el ADNcp es heredado por vía materna, este hecho puede limitar el flujo génico interpoblacional a través de las semillas, contribuyendo así a mantener la estructura genética establecida durante la supervivencia en refugios y/o la colonización de nuevos hábitats (Petit *et al.* 1993; Comès & Kadereit, 1998). Por lo tanto, además de poseer una baja tasa mutacional, el ADNcp puede reflejar procesos históricos, como migraciones pasadas o dinámicas de colonización durante largos períodos de tiempo (ej. Magri *et al.*, 2006; Eidesen *et al.*, 2007). Sumado a esto, el menor tamaño efectivo (N_e) del genoma plastidial comparado con el del genoma nuclear, puede contribuir a incrementar la acción de la deriva génica (Ennos, 1994; Mc Cauley, 1995; El Mousadik & Petit, 1996). Dichas características explicarían las diferencias en la estructuración genética detectada en las poblaciones estudiadas de *E. muticus* a partir del análisis de las secuencias de ADNcp y de marcadores nucleares.

Por otra parte, el análisis de la red de haplotipos de ADNcp evidencia un origen genético común de las poblaciones de *E. muticus*, con un haplotipo central (H2), el que podría señalarse como el haplotipo ancestral a partir del cual surgieron los demás haplotipos. Además, los resultados aquí obtenidos sugieren un origen muy reciente de los haplotipos, ya que un único paso mutacional separa a cada uno de ellos, siendo la mayoría haplotipos de punta. Estos resultados son consistentes con los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica obtenidos y reflejan una historia evolutiva reciente para las poblaciones analizadas, o bien un proceso de rápida expansión poblacional, luego de que

poblaciones con un N_e pequeño atravesaran un evento tipo cuello de botella.

En síntesis, los resultados aquí obtenidos evidencian la presencia de variabilidad genética en las poblaciones naturales estudiadas de *E. muticus* de la provincia de Corrientes. Los valores de variabilidad genética observados podrían ser el reflejo tanto de una historia de reducción poblacional de la especie, como de sus modos de reproducción.

Asimismo, dado que en estudios preliminares se distinguieron grupos de poblaciones en la provincia de Corrientes que diferían en la longitud de las espiguillas y en el diámetro de las cañas (González *et al.*, 2016) y que, aparentemente, dichas poblaciones también diferirían en su capacidad de producir aceites esenciales (Peichoto *et al.*, inéd.), un análisis conjunto de la variación morfológica, genética y química, de un número mayor de poblaciones representativa de toda el área de distribución geográfica de la especie, podría contribuir al conocimiento sobre el estado de los recursos genéticos presentes en las poblaciones naturales de *E. muticus*, y posteriormente aplicar dicho conocimiento a planes de pre-mejoramiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen las sugerencias realizadas por los revisores que contribuyeron a mejorar el manuscrito. Este trabajo fue financiado por P004/14 (SGCyT-UNNE), PI A013-2013 (SGCyT-UNNE) y PICT 2012 N° 1812 (ANPCyT-FONCyT). M. C. Peichoto y V. G. Solís Neffa son miembros de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- ALDRICH, J., B. W. CHERNEY, E. MERLIN & L. CHRISTOPHERSON. 1988. The role of insertion/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Curr. Genet.* 14: 137-46.
- ANÓNIMO. 1985. Uso del "pasto amargo" forrajero. *Diario Clarín*, 3-VIII.
- AZIZI, A., J. HADIAN, M. GHOLAMI, W. FRIEDT & B. HONERMEIER. 2012. Correlations between genetic, morphological, and chemical diversities in a germplasm collection of the medicinal plant *Origanum vulgare* L. *Chem. Biodivers.* 9: 2784-2801.

- BANDELT, H. J., P. FORSTER & A. RÖHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- CACCIABUE, M., N. GALLUCCI, G. P. CORDERO, N. KOLB, M. DEMO & L. SABINI. 2005. *Elionurus muticus* from north of Argentina: evaluation of the antibacterial activity of three essential oil chemotypes. *Biocell* 29: 223-226.
- CASTRO, L. O. & R. L. D. RAMOS. 2003. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus*, capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palmarosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack., capim-limão, *Vetiveria zizanioides* Nash, vetiver. *Fepagro* 11: 1-31.
- CHAGONDA, L. S., C. MAKANDA & J. C. CHALCHAT. 2000. The essential oils of wild and cultivated *Cymbopogon validus* (Stapf) Stapf ex Burt Davy and *Elionurus muticus* (Spreng.) Kunth from Zimbabwe. *Flavour Frag. J.* 15: 100-104.
- CLAYTON, W. D. & S. A. RENVOIZE. 1986. *Genera Graminun. Grasses of the World*. Kew Bull., Additional Series XIII. Her Majesty's Stationery Office, London.
- COLPO J. F., S. M. JAHNKE & T. FÜLLER. 2014. Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) *Revista Bras. Pl. Med.* 16: 182-188.
- COMES, H. P. & J. W. KADEREIT. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Plant Sci.* 3: 432-438.
- CULLINGS, K. W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol. Ecol.* 1: 233-240.
- DA SILVA NUNES, A. C. G. 2008. Coleta, prospecção em herbários e estudos sobre propagação vegetativa de capim limão (*Elionurus* sp.). Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia Área de Concentração Horticultura. Porto Alegre (RS).
- DAVIES, P., J. J. VILLAMIL & R. ASHFIELD. 2004. Fichas técnicas de cultivo. En: Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Serie FPTA-INIA. Canelones, Uruguay. 6: 35-115.
- DENHAM, S. S. 2012. *Elionurus*. En: ZULOAGA, F. O., Z. E. RÚGOLO & A. M. ANTON (Eds.). *Flora Argentina. Plantas Vasculares de la República Argentina. Monocotiledoneae: Poaceae: Aristidoideae-Pharoidae*. 3: 514-516.
- DENT, A. E. & B. M. VON HOLDT. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359-361.
- DOMYATI, F. M., R. A. A. YOUNIS, S. EDRIS, A. MANSOUR, A. SABIR & A. BAHIELDIN. 2011. Molecular markers associated with genetic diversity of some medicinal plants in Sinai. *J. Med. Plant Res.* 5: 200-210.
- DOYLE, J. J. & J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- DZINGIRAI, B., M. MUCHUWETI, T. MURENJE, C. CHIDEWE, M. A. N. BENHURA & L. S. CHAGONDA. 2007. Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. *Afr. J. Biochem. Res.* 1: 137-41.
- EIDENSEN, P. B., I. G. ALSOS, M. POPP, Ø. STRENSRUD, J. SUDA & C. BROCHMANN. 2007. Nuclear versus plastid data: complex Pleistocene history of a circumpolar key species. *Mol. Ecol.* 16: 3902-3925.
- ELECHOSA M., I. MIZRAHI, M. JUAREZ & A. BANDONI. 1986. Composición del aceite esencial de un espartillo (*Elionurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze) tipo geraniol proveniente de Corrientes. *S.A.I.P.A.* 7: 25-39.
- EL MOUSADIK, A. & R. J. PETIT. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Mol. Ecol.* 5: 547-555.
- ENNOS R. A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250-259.
- EVANNO, G., S. REGNAUT & J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- EXCOFFIER, L., P. E. SMOUSE & J. M. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-494.
- EXCOFFIER, L. & H. E. L. LISCHER. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* 10: 564-567.
- FALUSH, D., M. STEPHENS & J. K. PRITCHARD. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- FESTER, G. A., E. A. MARTINUZZI, J. A. RETAMAR & A. RICCIARDI. 1961. *Aceites esenciales de la República Argentina*. Academia nacional de Ciencias, Cordoba.
- FONTANA, J. L. 2008. Vegetación y diversidad de ambientes en la Reserva Natural Isla Apipé Grande, Provincia de Corrientes, Argentina. *INSUGEO, Miscelánea*, 17: 407-424.

- FÜLLER, T. N., C. TESSELE, I. B. I. DE BARROS & J. F. BARBOSA-NETO. 2010. Phenotypical, phytochemical and molecular characterization of capim carona [*Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze] populations. *Revista Bras. Plantas Med.* 12: 261-268.
- FÜLLER, T. N., C. BERTRAND, A. SIMON, I. B. I. DE BARROS & J. F. BARBOSA-NETO. 2014. *Elionurus muticus* as an alternative source of citral from Pampa biome, Brazil. *J. Oleo Sci.* 63: 1109-1116.
- FÜLLER, T. N., D. GUERRA, M. T. SCHIFINOWITTMANN, C. TESSELE, I. BERGMAN INCHAUSTI DE BARROS & J. FERNANDES BARBOSA NETO. 2015. Genetic and cytogenetic structure of wild lemon grass (*Elionurus muticus*) populations. *Crop Breed Appl. Biotechnol.* 15: 272-277.
- GONZALEZ, J. A., N. E. A. ALMIRÓN, E. M. S. MORENO, S. I. VASQUEZ, V. G. SOLÍS NEFFA & M. C. PEICHOTO. 2016. Variabilidad morfológica y genética en *Elionurus muticus* (Poaceae, Panicoideae, Andropogoneae). Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión, Facultad de Ciencias Agrarias-UNNE, Corrientes.
- GUENTHER, E. 1950. The essential oil. IV D. Van Nostrand Company, New York.
- GUILLOT, G., R. LEBLOIS, A. COULON & A. C. FRANTZ. 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Mol. Ecol.* 18: 4734-4756.
- HESS, S. C., M. T. L. P. PERES, A. L. BATISTA, J. P. RODRIGUES, S. C. TIVIROLI, L. G. L. OLIVEIRA, C. W. C. SANTOS, L. E. S. FEDEL, S. A. M. CRISPIM, A. SMANIA JUNIOR, E. F. A. SMANIA, A. FLACH & S. PANTAROTO. 2007. Evaluation of seasonal changes in chemical composition and antibacterial activity of *Elionurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). *Quim. Nova.* 30: 370-373.
- HEYDORN, S., T. MENNÉ, K. E. ANDERSEN, M. BRUZE, C. SVEDMAN & I. R. WHITE. 2003. Citral, a fragrance allergen and irritant. *Contact dermatitis* 49: 32-36.
- KELCHNER, S. A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 87: 482-298.
- KOLB, N., D. FERRERA, E. KOLB, R. RODRIGUEZ, L. VIVERO. 2007. Evaluación de la aptitud del espartillo para su explotación comercial. Misiones: Universidad Nacional de Misiones. Available at: <http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=243&Itemid=123>.
- KOLB, E., N. KOLB, D. J. FERREYRA, R. F. ULIANA, L. S. CELAYA, C. PUGLISI, R. A. MIÑO & J. HUK. 2012. Poaceas de Misiones: quimiotipos de *Elionurus muticus*. *Dominguezia* 28: 76.
- KOSHIMA, F. A. T., L. C. MING & M. O. M. MARQUES. 2006. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. *Revista Bras. Pl. Med.* 8: 112-116.
- LIBRADO, P., & J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- LOVELESS, M. D. & J. L. HAMRICK. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- MAGRI, D., G. G. VENDRAMIN, B. COMPS, I. DUPANLOUP, T. GEBUREK, D. GÖMÖRY, M. LATALOWA, T. LITT, L. PAULE, J. M. ROURE, I. TANTAU, W. O. VAN DER KNAAP, R. J. PETIT & J. BEAULIEU. 2006. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytol.* 171: 199-221.
- MASI, L., P. SIVIERO, C. ESPOSITO, D. CASTALDO, F. SIANO & B. LARATTA. 2006. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 223: 273-281.
- MC CAULEY, D. E. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* 10: 198-202.
- MUCHUGI, A., G. M. MULUVI, R. KINDT, C. A. C. KADU, A. J. SIMONS & R. H. JAMNADASS. 2008. Genetic structuring of important medicinal species of genus *Warburgia* as revealed by AFLP analysis. *Tree Genet. Genomes.* 4: 787-795.
- MUCHUWETI, M., E. KATIVU, A. R. NDHLALA, C. MUPURE, C. CHIDEWE & M. A. N. BENHURA. 2007. Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. *Afr. J. Biochem. Res.* 1: 137-141.
- NICORA, E. G. & Z. RÚGOLO DE AGRASAR. 1987. *Los géneros de gramíneas de América Austral*. Ed. Hemisfério Sur, Buenos Aires.
- NODARI, R. O. & M. P. GUERRA. 2000. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. En: SIMÕES, C. M. O. *et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento*: pp. 25.38. 2.ed. Editora da UFSC, Florianópolis.
- PARKER, P. G., A. A. SNOW, M. D. SCHUG, G. C. BOOTOM & P. A. FUERST. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- PEAKALL, R. & P. E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6: 288-295.

- PETIT, R. J., A. KREMER & D. B. WAGNE. 1993. Finite island model for organelle nuclear genes in plants. *Heredity* 71: 630-641.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS & P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- RENVOIZE, S. A. 1978. Studies in *Elionurus* (Gramineae). *Kew Bull.* 32: 665-672.
- SABINI, L. I., P. CORDERO GABRIELI, C. V. TORRES, F. M. ESCOBAR, M. CACCIABUE, M. ROVERA & N. KOLB. 2006. Study of the citotoxic and antifungal activity of the essential oil of *Elionurus muticus* against *Candida* spp. *Mol. Med. Chem.* 11: 31-3.
- SCHAAL B. A., D. A. HAYWORTH, K. M. OLSEN, J. T. RAUSCHER & W. A. SMITH. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol. Ecol.* 7: 465-474.
- SCRAMIN S., M. L. SAITO, A. POTT & M. ORTIZ MAYO MARQUES. 2000. Essential oil of *Elionurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). *JEOR.* 12: 298-300.
- SHANNON, C. & W. WEAVER. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- SHASANY, A. K., M. P. DAROKAR, S. DHAWAN, A. K. GUPTA, S. GUPTA, A. K. SHUKLA, N. K. PATRA & S. P. S. KHANUJA. 2005. Use of RAPD and AFLP markers to identify inter and intra-specific hybrids of *Mentha*. *J. Hered.* 96: 542-549.
- SHAW, J., E. B. LICKY, J. T. BECK, S. B. FRAMER, W. LIU, J. MILLER, K. C. SIRIPUN, C. T. WINDER, E. E. SCHILLING & R. L. SMALL. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92: 142-166.
- SIMMONS, M.P. & H. OCHOTERENA. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 49: 369-381.
- SORENG, R. J., P. M. PETERSON, K. ROMASCHENKO, G. DAVIDSE, F. O. ZULOAGA, E. J. JUDZIEWICZ, T. S. FILGUEIRAS, J. I. DAVIS & O. MORRONE. 2015. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *J. Syst. Evol.* 53: 117-137.
- SORENG, R. J., P. M. PETERSON, K. ROMASCHENKO, G. DAVIDSE, J. K. TEISHER, L. G. CLARK, P. BARBERA, L. J. GILLESPIE & F. O. ZULOAGA. 2017. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: and update and a comparison of the two 2015 classifications. *J. Syst. Evol.* 55: 259-290.
- STUCKERT, T. 1904. Primera contribución al conocimiento de las Gramináceas Argentinas. *Anales Mus. Nac. Buenos Aires* 11: 43-161.
- TAMURA K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI & S. KUMAR. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- TREDGOLD, M. H. 1986. *Food plants of Zimbabwe*. Mambo Press, Zimbabwe.
- VIDAL, A. A. 1954. Estudio químico de una gramínea argentina "*Elionurus viridulus* Hackel". *Revista Fac. Agr.* 302: 167-180.
- WATSON, L. & J. M. DALLWITZ. 1992. *The grass genera of the World*. CAB International, Wallingford.
- YAMAMOTO, P. Y. 2006. Interação genótipo × ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônômico, Campinas.

Recibido el 27 de diciembre de 2017, aceptado el 15 de mayo de 2018. Editor: Gabriel Bernardello.

IMPACTOS DE LA FRAGMENTACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN FLORÍSTICA EN BOSQUES PANTANOSOS DEL CENTRO-SUR DE CHILE

JONATHAN URRUTIA-ESTRADA^{1,2*}, ANDRÉS FUENTES-RAMÍREZ³, FRANCISCO CORREA-ARANEDA⁴ y ENRIQUE HAUENSTEIN¹

Summary: Impacts of fragmentation on floristic composition of swamp forests in south-central Chile. The swamp forests of south-central Chile have been greatly altered by the fragmentation of the landscape, which is mainly derived from anthropogenic activities. Despite their high ecological and conservation value for the biodiversity, these ecosystems have been scarcely studied. The main goal of this study was to evaluate the richness of vascular plants in different fragments of swamp forests in the Araucanía region (38° S, Chile). A total of 11 fragments were studied, in which edge and core zones were defined. Floristic transects were established, and we recorded and identified all species of vascular plants. Differences in the floristic composition between the edge and the core zones were determined, and we performed a GLM to model the response of species richness according to the area of the fragments and the geographical origin of the plants. A total of 123 species of plants were found across all fragments, of which 76 were native and 47 were non-native species. The floristic composition differs significantly between edge and core zones, and the GLM revealed that species richness is influenced by the area of the fragments and the geographical origin of the plants. Our study concludes that the size of the fragments, as well as by the characteristics of the surrounding matrix are fundamental variables that influence the floristic composition of swamp forests in south-central Chile.

Key words: Edge zone, core zone, richness, native species, non-native species, anthropogenic matrix, fragment size.

Resumen: Los bosques pantanosos del centro-sur de Chile han sido fuertemente alterados por la fragmentación del paisaje, derivada principalmente de actividades antrópicas. A pesar de su alto valor ecológico y de conservación para la biodiversidad, estos ecosistemas han sido poco estudiados. El objetivo de este estudio fue evaluar la riqueza de plantas vasculares en distintos fragmentos de bosque pantanoso de la región de La Araucanía (38° S, Chile). Se estudiaron 11 fragmentos en total, en los cuales se definieron zonas de borde y núcleo. Se levantaron transectos florísticos y se identificaron todas las especies de plantas vasculares. Se determinaron diferencias en la composición florística entre el borde y núcleo, y se realizó un GLM para modelar la respuesta de la riqueza de especies en función de la superficie de los fragmentos y el origen geográfico de las plantas. Los resultados mostraron un total de 123 especies de plantas, de las cuales 76 son nativas y 47 son no-nativas. La composición florística difiere significativamente entre zonas de borde y núcleo, y la riqueza de especies está influenciada por la superficie de los fragmentos y el origen geográfico de las plantas. Nuestro estudio concluye que el tamaño de los fragmentos y las características de la matriz circundante son variables fundamentales que influyen la composición florística de los bosques pantanosos en el centro-sur de Chile.

Palabras clave: Zona borde, zona núcleo, riqueza, especies nativas, especies no-nativas, matriz antropogénica, tamaño de los fragmentos.

¹ Escuela de Ciencias Ambientales, Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco, Casilla 15-D, Temuco, Chile.

² Laboratorio de Invasiones Biológicas, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

³ Laboratorio de Biometría, Departamento de Ciencias Forestales, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.

⁴ Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

Autor de correspondencia: jurrutiaestrada@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los bosques templados del sur de Sudamérica son mundialmente reconocidos como un hotspot de la biodiversidad global (Armesto *et al.*, 1998), debido principalmente a los altos niveles de biota endémica que en ellos existe, y también a las amenazas a las cuales se encuentran expuestos (Myers *et al.*, 2000). En las últimas décadas, sin embargo, estos ecosistemas han sido fuertemente alterados debido a procesos históricos de habilitación de terrenos para agricultura, ganadería y plantaciones forestales (San Martín *et al.*, 1988; Armesto *et al.*, 1998), generando procesos de fragmentación a gran escala. Además, en muchos de estos bosques ha existido una extracción constante y creciente de leña y otros productos forestales para uso doméstico, lo que ha modificado de manera considerable la estructura vegetacional del bosque (Benfield *et al.*, 2005; Walters, 2005). Todos estos procesos de degradación (histórica y reciente) han derivado en un aumento de la fragmentación del bosque, y en consecuencia de los hábitats que provee, situación considerada en la actualidad como una de las principales amenazas para la conservación de la biodiversidad (Fischer & Lindenmayer, 2007).

La degradación del hábitat puede ocurrir tanto en ambientes continuos como en bosques fragmentados, y los efectos sobre los mismos se reflejan en su biodiversidad (i.e., disminución de la riqueza florística) y cambios estructurales (i.e., densidad, área basal), los cuales ocurren a raíz de actividades de despeje, tala selectiva, pastoreo de ganado e incendios forestales (Lindenmayer & Fischer, 2006). En tal sentido, son los fragmentos más pequeños los mayormente afectados (Melo *et al.*, 2016), donde dichas acciones tienen mayor impacto (Cochrane, 2001; Hobbs, 2001; Jaña *et al.*, 2007). Lo anterior se debe principalmente a que dichos fragmentos se encuentran rodeados por amplias matrices agrícolas, cultivos forestales y/o caminos, las cuales actúan como fuentes y vectores de especies exóticas, que paulatinamente se establecen al interior de los fragmentos de bosque nativo (Hobbs, 2001; With, 2002).

La fragmentación del bosque a menudo se relaciona con importantes cambios en la comunidad vegetal, tales como disminución de la riqueza y abundancia de especies nativas (Echeverría *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2010), y al mismo tiempo un

incremento en la proporción de plantas introducidas (Pauchard & Alaback, 2004; Sax *et al.*, 2005). Los cambios en la composición de especies (i.e., nativas vs. no-nativas) están en directa relación con los cambios micro-ambientales que se generan en los bordes de los fragmentos a medida que el proceso de fragmentación avanza. Estos cambios incluyen, el incremento en la intensidad lumínica, el aumento de temperatura y la liberación potencial de recursos en el suelo (Hobbs, 2001). Una consecuencia importante de la disminución de especies nativas en ambientes fragmentados es la potencial reducción de la resistencia biótica frente a procesos de invasiones biológicas (Brothers & Spingarn, 1992). Adicionalmente, se ha demostrado que los bosques fragmentados son fácilmente invadidos por especies exóticas, especialmente si son de tamaño reducido (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2010). De esta manera, un disturbio ambiental, como lo es la apertura del dosel debido a floreo o tala selectiva, puede crear condiciones micro-ambientales óptimas para la germinación y establecimiento de especies no-nativas, las que potencialmente pueden convertirse en invasoras (Sakai *et al.*, 2001). Tanto la fragmentación, como el cambio composicional de especies pueden poner en riesgo la estabilidad del ecosistema y su sustentabilidad en el tiempo, ya que se ha demostrado que las especies no-nativas, una vez establecidas pueden ser más exitosas en la competencia por recursos bajo condiciones de perturbación (With, 2004), lo que favorece aún más los potenciales procesos de invasión y degradación del bosque nativo (Sakai *et al.*, 2001; Teo *et al.*, 2003).

Los bosques pantanosos del centro-sur de Chile son ecosistemas importantes y de alto valor de conservación, ya que actúan como áreas de amortiguamiento (*buffer*) en periodos de inundación, protegen las napas freáticas de la radiación solar, y aportan suministro de agua para consumo en localidades rurales (Mitsch & Gosselink, 2007). Además, en la región de La Araucanía estos bosques presentan un fuerte acervo cultural, principalmente con el pueblo Mapuche, ya que son entendidos como lugares sagrados en donde habitan energías o fuerzas naturales y espirituales, son fuente importante de plantas medicinales y se les considera como lugares de nacimiento de agua (vertientes), (Correa-Araneda *et al.*, 2011). Por último, los bosques pantanosos albergan un

número importante de especies de flora y fauna, algunas de las cuales presentan graves problemas de conservación. En este grupo destaca la güiña (*Leopardus guigna*) y el huillín (*Lontra provocax*), cuyas categorías corresponden a "Vulnerable" y "En Peligro", respectivamente (IUCN, 2010).

En Chile, a la fecha no existen estudios que relacionan la fragmentación del hábitat con la riqueza de plantas vasculares en ecosistemas de bosques pantanosos. Sólo para bosques templados andinos (e.g., bosques de *Nothofagus*) se ha demostrado que la fragmentación afecta de manera negativa la riqueza y abundancia de plantas nativas (Rojas *et al.*, 2011). Más aún, es escaso el conocimiento que existe hoy en día respecto de los impactos de disturbios generados por actividades antrópicas sobre los ecosistemas naturales en la región de La Araucanía, y en particular en bosques pantanosos de la depresión central y el área costera (Hauenstein *et al.*, 2014). Así, el objetivo principal de este trabajo fue: (i) evaluar la riqueza de especies de plantas vasculares en fragmentos de bosques pantanosos de la región de La Araucanía, determinando el potencial cambio en la composición florística entre zonas de borde y núcleo de los fragmentos; y (ii) establecer relaciones entre el tamaño de los fragmentos y la presencia de especies de plantas nativas y no-nativas. Un elemento particular de esta investigación es que se ha llevado a cabo en un área altamente degradada por distintas actividades antrópicas y la información actual que se tiene del bosque pantanoso remanente aún es limitada, siendo muy necesaria para la toma de decisión en el manejo y conservación de estos ecosistemas. En esta investigación se hipotetiza que (i) los fragmentos más pequeños albergarán una mayor riqueza de especies no-nativas, en tanto que en los fragmentos más grandes habrá mayor cantidad de especies nativas; y (ii) que el borde los fragmentos exhibirá una mayor proporción de especies no-nativas, mientras que el núcleo presentará un predominio de especies nativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Los fragmentos de bosque pantanoso estudiados se distribuyen en la depresión central y el borde costero de la región de La Araucanía, en el

centro-sur de Chile (38° S; Fig. 1). Estos bosques corresponden a la asociación vegetal *Blepharocalyo-Myrceugenetium exsuccae* (Oberdorfer, 1960), se caracterizan por ser siempreverdes, presentan sólo un estrato vertical y desarrollan un dosel arbóreo cerrado (Ramírez *et al.*, 1995). Los bosques pantanosos son considerados como vegetación azonal, ya que su presencia depende principalmente de variables edáficas y microclimáticas (San Martín *et al.*, 1990). Estos bosques generalmente ocupan suelos con mal drenaje, dependiendo del aporte de aguas subterráneas (Villa-Martínez & Villagrán, 1997). Más antecedentes respecto de la flora, vegetación y estructura de estos sistemas boscosos pueden ser consultados en Ramírez *et al.* (1983), Correa-Araneda *et al.* (2011) y Urrutia & Hauenstein (2017).

Los fragmentos seleccionados para el presente estudio, varían en superficie, perímetro y uso de suelo de la matriz circundante (Tabla 1). En relación a la caracterización de los fragmentos, se tiene que el fragmento de Petrengo posee la mayor superficie con 136,1 ha y el mayor perímetro con 739,7 km. Por el contrario, el fragmento de Molonhue muestra la superficie más pequeña con 4,1 ha y un perímetro de 55,7 km. El uso de suelo predominante de las microcuencas asociadas a los fragmentos estudiados corresponde en su mayoría a cultivos agrícolas (6.874,5 ha), le siguen las plantaciones forestales (1.045,3 ha) y finalmente el renoval de bosque nativo (754,3 ha).

Diseño de muestreo y colecta de datos

Se trabajó con un total de 11 fragmentos, cuyo criterio principal de selección fue la superficie (en ha) de cada uno. De este modo, se estableció un gradiente ambiental considerando el tamaño de los fragmentos, el cual va desde las 4 ha para el más pequeño hasta las 136 ha para el más grande. La distancia mínima entre cada uno de los fragmentos fue de 9 km, y fueron delimitados a través de imágenes satelitales georreferenciadas provenientes de Google Earth, siguiendo la metodología propuesta por Visser *et al.* (2014). A partir de lo anterior, se caracterizó cada uno de los fragmentos respecto de su superficie, perímetro y usos de suelo de las respectivas microcuencas aledañas. Los procedimientos antes descritos se llevaron a cabo con el programa ArcGis 9.3.

En cada uno de los fragmentos se definieron dos zonas de muestreo: borde y núcleo. El borde fue

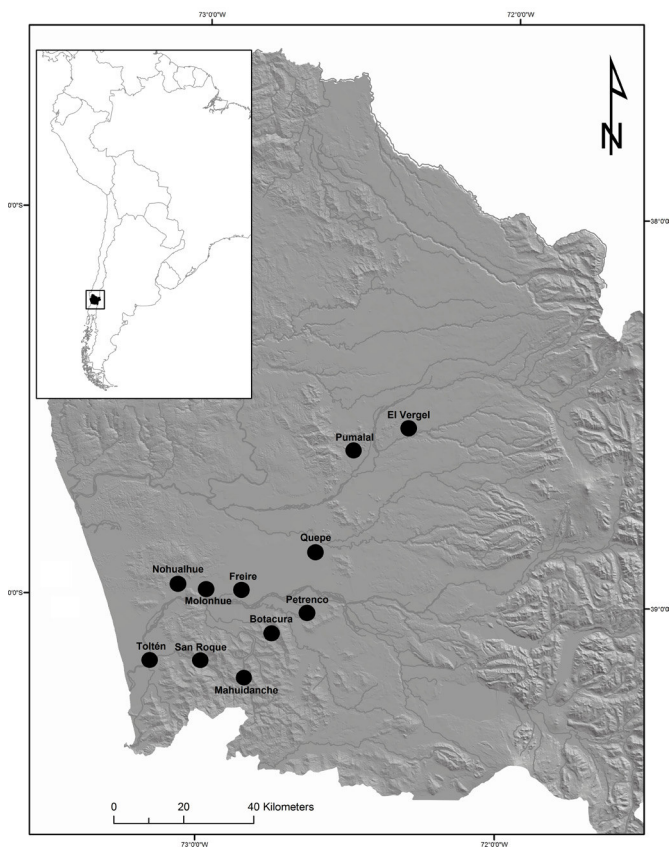


Fig. 1. Mapa de ubicación de los 11 fragmentos de bosque pantanoso considerados en este estudio en la región de La Araucanía, Chile.

definido como una banda perimetral que se inicia desde la orilla de cada fragmento hasta ca. 50 m al interior del mismo. Para efectos de este trabajo, la zona borde fue determinada en base a los estudios de Euskirchen *et al.* (2001), McDonald & Urban (2006) y Watkins *et al.* (2003), los cuales señalan que los efectos del borde en la composición de especies de plantas son mayormente evidentes en la franja de 5-30 m que va desde la orilla al interior del fragmento. La zona núcleo en tanto, fue definida como la porción central de cada fragmento, para cada uno de ellos la distancia mínima entre el borde y el núcleo fue de 500 m.

Al interior de cada zona de muestreo (borde y núcleo) se realizaron levantamientos florísticos, a través de un transecto de 500 m de largo por 2 m de ancho. En el caso de las zonas de borde, el transecto se orientó en manera longitudinal y dentro de los primeros 20 m de la orilla del fragmento. Para el

caso de las zonas de núcleo, el transecto se ubicó al centro del fragmento, lo cual aseguraba la mayor lejanía posible respecto del borde. En cada transecto de muestreo se identificaron todas las especies de plantas vasculares presentes, obteniendo de esta manera la riqueza específica por fragmento y por zona (i.e., borde y núcleo). Con la información registrada se elaboró un listado florístico, el cual incluye para cada especie su nombre científico, autor, familia botánica y origen geográfico. La nomenclatura y clasificación de las especies de plantas incluidas en el catálogo fue extraída de Zuloaga *et al.* (2008). El origen geográfico de las especies no-nativas se obtuvo de Matthei (1995) y Fuentes *et al.* (2014).

Análisis de datos

Con los datos de riqueza de plantas se construyó una matriz preliminar de presencia/ausencia

Tabla 1. Caracterización morfométrica de los fragmentos boscosos estudiados y uso de suelo de la matriz circundante. SF: superficie fragmento (ha), PF: perímetro fragmento (km), CU: cultivos agrícolas (ha), RN: renovación de bosque nativo (ha), PE: plantación forestal exótica (ha).

Fragmento	SF	PF	CU	RN	PE
Botacura	51.8	299.3	464.6	128.9	158.6
El Vergel	49.3	459.1	664.2	22	321.8
Freire	32	360.2	863.5	36.8	2.4
Mahuidanche	120.6	359.6	292.1	138.1	219.8
Nohualhue	65.1	479.4	779	68.8	34.7
Petrenco	136.1	739.7	757.1	78.6	96.3
Pumalal	41.5	218.4	445.8	58.6	120.8
Quepe	68.5	552.7	956.5	41.2	5
San Roque	121	529.8	534.6	100.5	68.7
Toltén	69	641.4	727.9	53.3	15
Molonhue	4.1	55.7	388.8	27.2	1.9

(representada con valores 1 y 0, respectivamente), a partir de la cual se calculó una matriz de semejanza utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis. Con esta información se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no-métrico (nMDS), que permitió visualizar gráficamente una potencial agrupación de los fragmentos estudiados según las zonas de borde y núcleo. Se realizó también un análisis de similitud florística (ANOSIM) de una vía, para determinar posibles diferencias estadísticas en la composición de especies utilizando las zonas borde y núcleo como factor predictor. Adicionalmente, se llevó a cabo una prueba de porcentaje de similitud (SIMPER), con la cual fue posible conocer las principales especies responsables en determinar diferencias en la composición florística entre las zonas de borde y núcleo de los fragmentos. Todos los análisis mencionados anteriormente se realizaron con el programa Primer v.6 (Clarke & Gorley, 2006).

Para determinar diferencias estadísticas en la riqueza media de especies nativas y no-nativas entre las zonas de borde y núcleo, se realizó un ANOVA de dos vías considerando como factores predictores la zona (i.e., borde y núcleo) y el origen geográfico de las especies (i.e., nativa y no-nativa). Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de

Tukey con $\alpha = 0,05$ para determinar diferencias significativas entre los grupos. Este análisis fue hecho usando la función *aov* en el programa estadístico R (R Core Team, 2016).

Por último, se construyó un modelo lineal generalizado (GLM) para predecir la respuesta de la riqueza de especies en función del origen geográfico de las mismas (variable predictora categórica) y la superficie de los fragmentos (variable predictora continua). Este análisis fue realizado en R usando la función *glm* (R Core Team, 2016). Tanto para las pruebas de ANOVA como para el GLM se realizaron pruebas previas de normalidad y homocedasticidad de varianza usando el test de Shapiro y Levene, respectivamente, ambos implementados en el programa R.

RESULTADOS

Se identificó un total de 123 especies de plantas vasculares en todos los fragmentos estudiados (Apéndice 1), las cuales se distribuyen en 104 géneros y 56 familias. Según su origen geográfico, 76 de ellas son nativas y 47 son no-nativas. Este último grupo se compone de dos especies procedentes de África, dos de Asia, dos de Oceanía, tres de Eurasia,

tres de Sudamérica, cinco de Norteamérica y 30 de Europa (Apéndice 1). Del espectro florístico total, se registraron especies en las zonas de borde, de las cuales 59 son exclusivas para esta condición. Para la zona núcleo en tanto, se identificaron 64 especies, siendo 23 de ellas exclusivas a esta condición. Del total de taxa registrados en el borde, 46 son no-nativos y 54 son nativos (46 y 54 % respectivamente). En el núcleo, 17 son no-nativos y 47 son nativos (26 y 74 % respectivamente). Cabe señalar además que hay 16 especies comunes a ambas zonas, todas las cuales son no-nativas. Las especies más frecuentes en el borde fueron *Cyperus eragrostis*, *Lotus pedunculatus* y *Rubus constrictus*, las cuales aparecieron en todos los fragmentos estudiados. En la zona núcleo en tanto, la especie más frecuente fue *Myrceugenia exsucca*, especie nativa de hábito arbóreo, la cual estuvo presente en los 11 fragmentos estudiados.

El fragmento con la mayor riqueza total fue Petreco con 47 especies, en tanto que la menor se obtuvo en Nohualhue con 31 especies. Los fragmentos de Pumalal y Toltén presentaron la mayor y menor riqueza de especies en el borde, con 36 y 22 especies, respectivamente. Los fragmentos de El Vergel y Petreco presentaron la mayor riqueza de especies en el núcleo, con 24 especies cada uno, situación distinta lo que ocurre en Quepe donde sólo se registraron nueve especies en el núcleo (Tabla 2).

El análisis de nMDS muestra una separación entre las zonas de borde y núcleo (Fig. 2), la cual dice relación con una diferencia significativa en la composición florística entre ambas zonas. Este resultado es confirmado por la prueba de ANOSIM (R global= 0,75; p = 0,001) y el análisis SIMPER, el cual indica una disimilitud florística del 77 % entre el borde y el núcleo de los fragmentos. Las principales especies responsables de esta diferencia son *Lotus pedunculatus*, *Ranunculus repens*, *Synammia feuillei*, *Juncus procerus* y *Holcus lanatus* (Tabla 3).

La riqueza de especies nativas y no-nativas difiere significativamente en las zonas de núcleo (p < 0,001), sin embargo no ocurre lo mismo para las zonas de borde (Fig. 3). Del mismo modo, la riqueza de especies no-nativas entre las zonas de borde y núcleo es estadísticamente distinta (p < 0,001), patrón que no se repite para la riqueza de especies nativas (Fig. 3).

Finalmente, el análisis GLM muestra que tanto la superficie de los fragmentos (p < 0,05), como el

origen geográfico de las plantas (p < 0,001), influyen en la riqueza florística. Además, la superficie de los fragmentos muestra una relación positiva con la riqueza de especies nativas, pero negativa para especies no-nativas (R^2 = 0,70; Fig. 4).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se muestra un claro efecto de la fragmentación sobre la comunidad de plantas en los bosques pantanosos del centro-sur de Chile, ya que se observó una mayor proporción de especies no-nativas en fragmentos más pequeños, y por el contrario una mayor proporción de especies nativas en fragmentos más grandes. Estos resultados confirman la hipótesis (i) planteada en nuestro trabajo. La relación entre la fragmentación del bosque y el aumento en la riqueza de especies exóticas es un patrón común y no exclusivo de plantas vasculares, ya que también ha sido documentado para insectos, aves y mamíferos (Becerra & Simonetti, 2013). Del mismo modo, la composición florística presenta cambios considerables en el arreglo de especies al comparar las zonas de borde y núcleo de los fragmentos. Ya que nuestros resultados indican que la riqueza de especies no-nativas es significativamente mayor en las zonas de borde, en tanto que la riqueza de especies nativas no difiere entre el borde y el núcleo. Estos resultados soportan parcialmente la hipótesis (ii) de esta investigación.

Los bosques pantanosos en la región de La Araucanía son ecosistemas de dosel cerrado (Ramírez *et al.*, 1995). En teoría, ambientes de este tipo parecen resistir de buena forma la llegada de especies no-nativas (Martin *et al.*, 2009), siendo éstas poco frecuentes o raras en su interior (Pauchard & Alaback, 2004). Teniendo esto en cuenta, resulta relevante destacar la presencia de especies no-nativas y con alto potencial invasor, tanto en las zonas de borde como las de núcleo. Ejemplo de lo antes mencionado son *Hypochaeris radicata*, *Rubus constrictus* y *Prunella vulgaris* (Fuentes *et al.*, 2014), lo que podría sugerir un proceso de anidamiento no aleatorio en el componente florístico de los bosques pantanosos (With, 2002). Entre estas especies no-nativas, especial atención merece *P. vulgaris*, cuya plasticidad fenotípica y adaptación fisiológica local le permite colonizar este tipo bosques

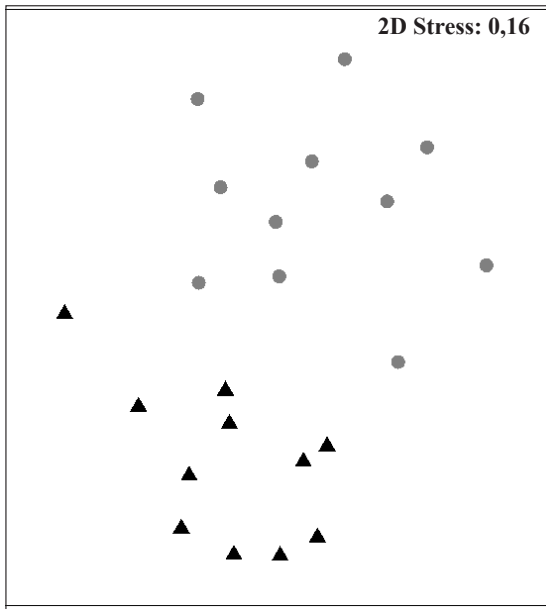


Fig. 2. Análisis de escalamiento multidimensional no-métrico (nMDS) basado en la matriz de presencia/ausencia de las especies registradas para zonas de borde (▲) y núcleo (●).

Tabla 2. Riqueza de plantas vasculares en cada uno de los fragmentos estudiados. RTOT: riqueza total especies, RNAT: riqueza especies nativas, RNON: riqueza especies no-nativas, RBOR: riqueza especies en borde, RNUC: riqueza especies en núcleo.

Fragmento	RTOT	RNAT	RNON	RBOR	RNUC
Botacura	38	21	17	24	21
El Vergel	39	23	16	26	24
Freire	36	19	17	27	19
Mahuidanche	41	27	14	31	16
Nohualhue	31	15	16	27	11
Petrenco	47	35	12	33	24
Pumalal	40	16	24	36	11
Quepe	34	18	16	28	9
San Roque	36	26	10	24	18
Toltén	36	20	16	22	14
Molonhue	37	20	17	25	15

(Godoy *et al.*, 2011), incluso al interior del núcleo de fragmentos grandes. En tal sentido, la teoría de ecología en invasiones señala que los bosques no perturbados y/o con dosel cerrado (como el caso de los bosques pantanosos aquí estudiados) son altamente resistentes a la llegada de plantas invasoras (Rejmánek, 1989; Von Holle *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 2004). Sin embargo, durante las últimas décadas la literatura ha venido mostrando evidencias claras de que tal situación no es estricta, ya que se han reportado más de 130 especies de plantas colonizando e invadiendo al interior de bosques sin perturbaciones aparentes (Martín *et al.*, 2009). El presente trabajo sintoniza con dichas evidencias, ya que las especies no-nativas son capaces de establecerse incluso al interior de grandes fragmentos en los bosques pantanosos del centro-sur de Chile (i.e., Mahuidanche con 120,6 ha).

Otro aspecto importante a destacar reflejado en el análisis GLM, es la relación que existe para la riqueza de especies nativas (positiva) y no-nativas (negativa) con el tamaño del fragmento. Estos resultados son congruentes con aquellos estudios que muestran un incremento en la

llegada de especies no-nativas desde la matriz circundante (usualmente de origen antrópico) hacia los fragmentos, las cuales se concentran principalmente en el borde (Hobbs, 2001; Rouget *et al.*, 2002; With, 2002). En tal sentido, y a la luz de nuestros resultados, en fragmentos pequeños (e.g., Freire con 32 ha) donde la zona núcleo se encuentra más cercana al borde, la presencia de especies no-nativas leñosas como *Salix caprea* y *S. viminalis*, puede constituir una amenaza para la conservación de los bosques pantanosos. Especies del género *Salix* son capaces de modificar las cadenas tróficas, reducen el suministro de agua y pueden provocar cambios en la estructura vertical de los bosques pantanosos (Cremer, 2003; Serra *et al.*, 2013; McInerney *et al.*, 2016). Es importante destacar que la composición vegetal predominante, así como las prácticas de manejo que se dan en la matriz circundante pueden influir en gran medida en los elementos florísticos que colonizan el borde y el núcleo de los fragmentos (Cadenasso & Pickett, 2001; Benítez-Malvido *et al.*, 2014). Adicionalmente, los pequeños fragmentos de bosque pantanoso rodeados por tierras de pastoreo son frecuentemente usados como refugio para

Tabla 3. Análisis de porcentaje de similitud (SIMPER) entre las zonas de borde y núcleo en los fragmentos estudiados. APN: Abundancia promedio núcleo, APB: abundancia promedio borde, Dis. Pro.: disimilitud promedio, DE: desviación estándar, Con.: contribución, Acu.: acumulado. Note que sólo se muestran las especies responsables del 30 % acumulado.

Dis.Pro.: 77 %	APN	APB	Dis.Pro.	Dis./DE	Con.(%)	Acu.(%)
<i>Lotus pedunculatus</i>	0.18	1	1.95	2.01	2.52	2.52
<i>Ranunculus repens</i>	0	0.82	1.91	2	2.47	4.99
<i>Synammia feuillei</i>	0.82	0	1.9	1.99	2.46	7.45
<i>Juncus procerus</i>	0.09	0.82	1.79	1.7	2.32	9.77
<i>Holcus lanatus</i>	0.09	0.73	1.59	1.43	2.05	11.81
<i>Carex acutata</i>	0	0.64	1.45	1.28	1.88	13.69
<i>Blepharocalyx cruckshanksii</i>	0.73	0.27	1.45	1.2	1.87	15.57
<i>Cyperus eragrostis</i>	0.36	1	1.44	1.28	1.86	17.43
<i>Prunella vulgaris</i>	0.27	0.64	1.31	1.1	1.69	19.12
<i>Eleocharis acicularis</i>	0.09	0.55	1.3	1.05	1.68	20.8
<i>Hydrocotyle ranunculoides</i>	0	0.55	1.3	1.07	1.67	22.48
<i>Myrceugenia exsucca</i>	1	0.45	1.29	1.07	1.67	24.14
<i>Rubus constrictus</i>	0.45	1	1.29	1.06	1.66	25.81
<i>Polygonum hydropiperoides</i>	0	0.55	1.27	1.06	1.65	27.45
<i>Rumex acetosella</i>	0	0.55	1.27	1.06	1.64	29.09
<i>Plantago lanceolata</i>	0.09	0.55	1.25	1.05	1.62	30.71

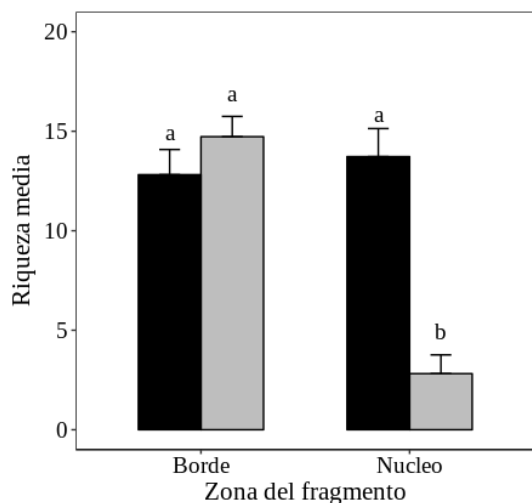


Fig. 3. Riqueza de especies (media \pm EE) en zonas de borde y núcleo para especies nativas (barras negras) y no-nativas (barras gris). Las distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas para la prueba de Tukey con $\alpha = 0,05$.

animales domésticos (i.e., vacunos, ovinos y equinos), lo cual puede generar importantes disturbios en la dinámica de los bosques a través del ramoneo (Echeverría *et al.*, 2007), pisoteo (Zamorano-Elgueta *et al.*, 2012) y traslado de propágulos de especies no-nativas (Pauchard & Alaback, 2004).

Respecto de las modificaciones en el microhábitat derivado del proceso de fragmentación, y que promueven el establecimiento de especies no-nativas (Thier & Wesenberg, 2016), se destaca el incremento en la disponibilidad de luz a lo largo de todo el borde de los fragmentos resultantes (Turner & Demkó, 2007). De este modo, las especies intolerantes a la sombra tienden a ser favorecidas (Ranney *et al.*, 1981), siendo sus tasas de crecimiento significativamente mayores a las que pudieran presentar al interior del bosque (Mc Donald & Urban, 2006). Un ejemplo claro de esto, es la presencia en todas las zonas de borde de dos especies no-nativas intolerantes a la

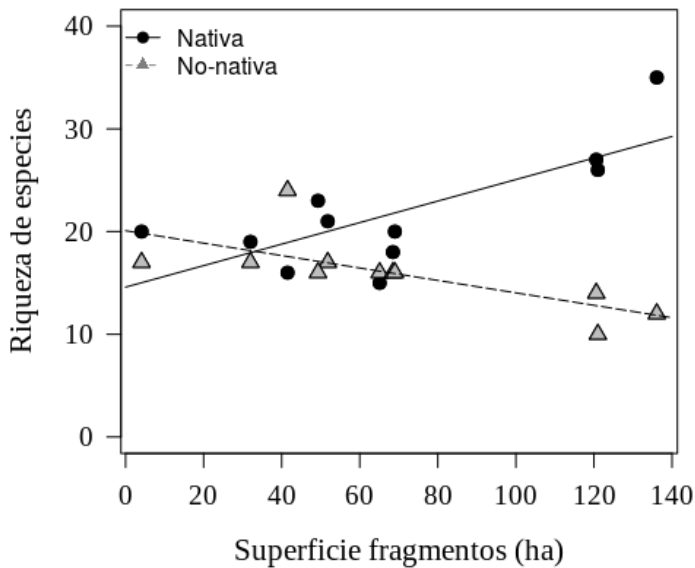


Fig. 4. Respuesta de la riqueza de especies en función del origen geográfico (nativas y no-nativas) y el tamaño de los fragmentos utilizando un modelo lineal generalizado (GLM). $R^2= 0,70$ y $p < 0,05$ para superficie de los fragmentos y $p < 0,001$ para origen geográfico.

sombra: *Lotus pedunculatus* y *Rubus constrictus*. La presencia continua de dichos taxa, sugiere que las zonas de borde de los fragmentos pudieran estar actuando como un reservorio de especies no-nativas, y que por lo tanto la llegada de éstas y otras especies al interior de los fragmentos, no sería un proceso aleatorio. En este sentido, las especies no-nativas a menudo producen mayor cantidad de semillas y crecen más rápido que sus contrapartes nativas (Rejmanék & Richardson, 1996), lo cual puede conducir a una exclusión competitiva de la vegetación local (Turner & Demkó, 2007). En última instancia, la colonización y propagación gradual de las especies no-nativas estaría contribuyendo al proceso de homogenización biótica, en el cual unas pocas especies (con gran potencial de adaptación a ambientes degradados) podrían ir reemplazando a un grupo importante de especies nativas (Olden *et al.*, 2004).

Por su parte, la única especie nativa que estuvo presente en todas las zonas núcleo de los fragmentos estudiados fue *Myrceugenia exsucca*. Esta especie es la más capacitada para soportar las condiciones extremas de anegamiento que caracterizan a estos bosques (Ramírez *et al.*, 1983). Su adaptación dice relación con el desarrollo de

raíces adventicias, juntamente con presentar hojas persistentes, las cuales no reducen su área foliar en condiciones de anegamiento, como si lo hacen en contraste otras especies no preparadas para tales condiciones (Lambers *et al.*, 2008; Zuñiga-Feest *et al.*, 2017). Por otro lado, la baja frecuencia de especies no-nativas al interior de los fragmentos podría ser consecuencia del ambiente de estrés que caracteriza a estos bosques, ya que pueden presentar inundaciones permanentes o estacionales (Correa-Araneda *et al.*, 2012). Adicionalmente, se sabe que muchas de las especies no-nativas del centro-sur de Chile presentan adaptaciones que les permiten establecerse en sitios perturbados (Fuentes *et al.*, 2014), o presentan alta capacidad de rebrote vegetativo frente ramoneo o incendios forestales, pero no están adaptadas para resistir procesos de anegamiento prolongado (Kozlowsky, 1997).

Los procesos de fragmentación que experimentaron (y siguen afectando) los bosques pantanosos del centro-sur de Chile tienen un impacto directo en su composición florística, estructura y funcionamiento (Hauenstein *et al.*, 2014; Hauenstein *et al.*, 2017; Urrutia & Hauenstein, 2017). En general, fragmentos grandes y bien conservados pueden resistir de mejor forma

los potenciales impactos que puedan suscitarse en el ambiente, toda vez que presenten en sus bordes características florísticas similares a la de las zonas de núcleo (Harper *et al.*, 2005). De nuestra investigación se desprende, además, la necesidad de manejar las actividades productivas en la matriz circundante a fin evitar futuros procesos de fragmentación, y con ello asegurar la permanencia de las especies que ocupan los fragmentos, sobre todo en los de menor tamaño. Finalmente, queremos destacar lo valioso de la información entregada en el presente trabajo, y esperamos que sea un aporte concreto para la toma de decisiones que involucren el manejo de los bosques pantanosos del centro-sur de Chile, los cuales han sido fuertemente intervenidos y escasamente estudiados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Núcleo de Investigación en Estudios Ambientales de la Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco, por sus aportes al presente estudio. AFR agradece al proyecto FONDECYT Iniciación N°11150487 y a la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de La Frontera. Agradecemos también los comentarios y correcciones hechas por dos revisores anónimos que contribuyeron a mejorar considerablemente el presente artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- ARMESTO, J.J., R. ROZZI, C. SMITH-RAMÍREZ & M.T.K. ARROYO. 1998. Conservation targets in South American temperate forests. *Science* 282: 1271-1272.
- BECERRA, P. & J. SIMONETTI. 2013. Patterns of exotic species richness of different taxonomic groups in a fragmented landscape of central Chile. *Bosque* 34: 45-51.
- BENFIELD, S., H. GUZMAN & J. MAIR. 2005. Temporal mangrove dynamics in relation to coastal development in Pacific Panama. *J. Environ. Manage.* 76: 263-276.
- BENÍTEZ-MALVIDO, J., J. GALLARDO-VÁSQUEZ, M. ÁLVAREZ-AÑORVE & L. AVILA-CABADILLA. 2014. Influence of matrix type on tree community assemblages along tropical dry forest edges. *Am. J. Bot.* 101: 820-829.
- BROTHERS, T.S. & A. SPINGARN. 1992. Forest fragmentation and alien plant invasion of central Indiana old-growth forests. *Conserv. Biol.* 6: 91-100.
- CADENASSO, M. & S. PICKETT. 2001. Effect of edge structure on the flux of species into forest interiors. *Conserv. Biol.* 15: 91-97.
- CLARKE, K. & R. GORLEY. 2006. *Plymouth routines in multivariate ecological research*. Primer-E. Plymouth Marine Laboratory, London.
- COCHRANE, M. 2001. Synergisms interactions between habitat fragmentation and fire evergreen tropical forest. *Conserv. Biol.* 15: 1515-1521.
- CORREA-ARANEDA, F., J. URRUTIA, Y. SOTOMORA, R. FIGUEROA & E. HAUENSTEIN. 2012. Effects of the hydroperiod on the vegetative and community structure of freshwater forested wetlands, Chile. *J. Freshw. Ecol.* 27: 459-470.
- CORREA-ARANEDA, F., J. URRUTIA & R. FIGUEROA. 2011. Estado de conocimiento y principales amenazas de los humedales boscosos de agua dulce de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 84: 325-340.
- CREMER, K. 2003. Introduced willows can become invasive pests in Australia. *Biodiversity* 4: 17-24.
- ECHEVERRÍA, C., A. NEWTON, A. LARA, J. REY-BENAYAS & D. COOMES. 2007. Impacts of forest fragmentation on species composition and forest structure in the temperate landscape of southern Chile. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 16: 426-439.
- EUSKIRCHEN, E.S., J. CHEN & R. BI. 2001. Effects of edges on plant communities in a managed landscape in Northern Wisconsin. *For. Ecol. Manage.* 148: 93-108.
- FISCHER, J. & D.B. LINDENMAYER. 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: A synthesis. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 16: 265-280.
- FUENTES, N., P. SÁNCHEZ, A. PAUCHARD, J. URRUTIA, L. CAVIERES & A. MARTICORENA. 2014. *Plantas invasoras del centro-sur de Chile: Una guía de campo*. Laboratorio de Invasiones Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción.
- FUENTES-RAMÍREZ, A., A. PAUCHARD, A. MARTICORENA & P. SÁNCHEZ. 2010. Relación entre la invasión de *Acacia dealbata* Link (Fabaceae: Mimosoideae) y la riqueza de especies vegetales en el centro-sur de Chile. *Gayana Bot.* 67: 188-197.
- GODOY, O., A. SALDAÑA, N. FUENTES, F. VALLADARES & E. GIANOLI. 2011. Forests are not immune to plant invasions: phenotypic plasticity and local adaptation allow *Prunella vulgaris* to colonize a temperate evergreen rainforest. *Biol. Invasions* 13: 1615-1625.
- HUENSTEIN, E., G. AGUIRRE, M. HERNÁNDEZ, P. SANCHEZ, J. URRUTIA & F. PEÑA-CORTÉS. 2017. Los bosques pantanosos de Mahuidanche,

- sitio prioritario para la conservación de biodiversidad, región de La Araucanía, Chile. *Gestión Ambiental* 33: 43-62.
- HAUENSTEIN, E., F. PEÑA-CORTÉS, C. BERTRÁN, J. TAPIA, L. VARGAS-CHACOFF & O. URRUTIA. 2014. Composición florística y evaluación de la degradación del bosque pantanoso costero de temu-pitra en la región de La Araucanía, Chile. *Gayana Bot.* 71: 43-57.
- HARPER, K., S.E. MACDONALD, P.J. BURTON, J. CHEN, K.D. BROSOKFKE, S.C. SAUNDERS, E.S. EUSKIRCHEN, D. ROBERTS, M.S. JAITEH & P-A. ESSEEN. 2005. Edge influence on forest structure and composition in fragmented landscapes. *Conserv. Biol.* 19: 768-782.
- HOBBS, R. 2001. Synergisms among habitat fragmentation, livestock grazing, and biotic invasions in Southwestern Australia. *Conserv. Biol.* 15: 1522-1528.
- IUCN. 2010. *Red list of Threatened Species*. Gland, Suiza. www.iucnredlist.org
- JAÑA, R., J.L. CELIS, A. GUTIÉRREZ, C. CORNELIUS & J.J. ARMESTO. 2007. Diversidad en bosques fragmentados de Chiloé: ¿Son todos los fragmentos iguales? En: GREZ, A., J. SIMONETTI & R.O. BUSTAMANTE (eds.), *Biodiversidad en ambientes fragmentados de Chile: Patrones y procesos a diferentes escalas*, pp. 159-190. Editorial Universitaria, Santiago.
- KOZLOWSKI, T.T. 1997. Response of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiol* 17: 1-29. Online Monograph.
- LAMBERS, H. 2008. *Plant physiological ecology*. Springer, New York.
- LEVINE, J.M., P.B. ALDER & S.G. YELENIK. 2004. A meta-analysis of biotic resistance to exotic plant invasions. *Ecol. Lett.* 77: 975-89.
- LINDENMAYER, D. & J. FISCHER. 2006. *Habitat fragmentation and landscape change*. Island Press, Washington D.C.
- MARTIN, P., C. CANHAM & P. MARKS. 2009. Why forests appear resistant to exotic plant invasions: intentional introductions, stand dynamics, and the role of shade tolerance. *Front. Ecol. Environ.* 7: 142-149.
- MATTHEI, O. 1995. *Manual de las malezas que crecen en Chile*. Alfabetra Impresores, Santiago.
- MC DONALD, R. & D. URBAN. 2006. Edge effects on species composition and exotic species abundance in the North Carolina Piedmont. *Biol. Invasions* 8: 1049-1060.
- MC INERNEY, P.J., G.N. REES, B. GAWNE, P. SUTER, G. WATSON & R.J. STOFFELS. 2016. Invasive willows drive instream community structure. *Freshw. Biol.* 61: 1379-1391.
- MELO, M.M., C.M. SILVA, C.S. BARBOSA, M.C. MORAIS, P.E.R. D'ANUNCIACÃO, V.X. SILVA & E. HASUI. 2016. Fragment edge and isolation affect the food web: effects on the strength of interactions among trophic guilds. *Biota Neotropica* 16(2): e20150088. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2015-0088>.
- MITSCH, W.J. & G. GOSSELINK. 2007. *Wetlands*. John Wiley & Sons, New York.
- MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G. DA FONSECA & J. KENT. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- OVERDORFER, E. 1960. Pflanzensoziologisches studien in Chile. Ein Vergleich mit Europa. *Flora et Vegetatio Mundi* 2: 1-208.
- OLDEN, J., N. LEROY, M. DOUGLAS, M. DOUGLAS & K. FAUSCH. 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends Ecol. Evol.* 19: 18-24.
- PAUCHARD, A. & P. ALABACK. 2004. Influence of elevation, land use, and landscape context on patterns of alien plant invasions along roadsides in protected areas of south-central Chile. *Conserv. Biol.* 18: 238-248.
- R CORE TEAM. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org>
- RAMÍREZ, C., A. FERRIERE & H. FIGUEROA. 1983. Estudio fitosociológico de los bosques pantanosos templados del sur de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 56: 11-26.
- RAMÍREZ, C., C. SAN MARTÍN & J. SAN MARTÍN. 1995. Estructura florística de los bosques pantanosos de Chile sur-central. En: ARMESTO, J., C. VILLAGRÁN & M. ARROYO (eds.), *Ecología de los bosques nativos de Chile*, pp. 215-234. Editorial Universitaria, Santiago.
- RANNEY, J.W., M.C. BRUNER & J.B. LEVENSON. 1981. The importance of edge in the structure and dynamics of forest islands. In: BURGESS, R.L. & D.M. SHARPE (eds.), *Forest island dynamics in managed landscapes*, pp. 67-92. Springer-Verlag, New York.
- REJMÁNEK, M. 1989. Invasibility of plant communities. In: DRAKE, J.A., H.A. MOONEY, F. DICASTRI, R.H. GROVES, F.J. KRUGER, M. REJMANÉK & M. WILLIAMSON (eds.), *Biological invasions: A global perspective*, pp. 369-388. Wiley and Sons, Chichester.
- REJMANÉK, M. & D.M. RICHARDSON. 1996. What attributes make some plants more invasive? *Ecology* 77: 1655-1661.
- ROJAS, I., P. BECERRA, N. GÁLVEZ, J. LAKER, C. BONACIC & A. HESTER. 2011. Relationship between fragmentation, degradation and native and exotic species richness in an Andean temperate forest of Chile. *Gayana Bot.* 68: 163-175.

- ROUGET, M., D. RICHARDSON, S. MILTON & D. POLAKOW. 2002. Predicting invasion dynamics of four alien *Pinus* species in a highly fragmented semi-arid shrubland in South Africa. *Plant Ecol.* 152: 79-92.
- SAKAI, A.K., F.W. ALLENDORF, J.S. HOLT, D.M. LODGE, J. MOLOFSKY, K.A. WITH, S. BAUGHMAN, R.J. CABIN, J.E. COHEN, N.C. ELLSTRAND, D.E. MC CAULEY, P. O'NEIL, I.M. PARKER, J.N. THOMPSON & S.G. WELLER. 2001. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32: 305-332.
- SAN MARTÍN, J., A. TRONCOSO & C. RAMÍREZ. 1988. Estudio fitosociológico de los bosques pantanosos nativos de la Cordillera de la Costa en Chile central. *Bosque* 9: 17-33.
- SAN MARTÍN, J., A. TRONCOSO, C. RAMÍREZ, C. SAN MARTÍN & A. DUARTE. 1990. Estudio florístico y vegetacional de los bosques pantanosos nativos de la cordillera costera entre los ríos Rapel y Mataquito, Chile central. *Revista Geográfica de Chile Terra Australis* 33: 103-128.
- SAX, D.F., J.J. STACHOWICZ & S.D. GAINES. 2005. *Species Invasions. Insights into ecology, evolution and biogeography*. Sinauer Associates Inc, Massachusetts.
- SCHMITT, C., M. DENICH, S. DEMISSEW, I. FRIIS & H.J. BOEHMER. 2010. Floristic diversity in fragmented Afrotropical rainforest: Altitudinal variation and conservation importance. *Appl. Veg. Sci.* 13: 291-304.
- SERRA, M.N., R. ALBARIÑO & V. DÍAZ. 2013. Invasive *Salix fragilis* alters benthic invertebrate communities and litter decomposition in northern Patagonian streams. *Hydrobiologia* 701: 173-188.
- TEO, D.H.L., H. TAN, R.T. CORLETT, C.M. WONG & K.Y. SHAWN. 2003. Continental rain forest fragments in Singapore resist invasion by exotic plants. *J. Biogeogr.* 30: 305-310.
- THIER, O. & J. WESENBERG. 2016. Floristic composition and edge-induced homogenization in tree communities in the fragmented Atlantic rainforest of Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Conserv. Sci.* 9: 852-876.
- TURNER, G. & M. DEMKÓ. 2007. Exotic plant distributions along disturbance corridors at the Grassy Hill Natural Area Preserve, Franklin County, Virginia. *Banisteria* 30: 19-26.
- URRUTIA, J. & E. HAUENSTEIN. 2017. Caracterización estructural del bosque pantanoso de mirtáceas de la región de La Araucanía, Chile. *Polibotánica* 43: 87-101.
- VILLA-MARTÍNEZ, R. & C. VILLAGRÁN. 1997. Historia de la vegetación de los bosques pantanosos de la costa de Chile central durante el Holoceno medio y tardío. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 70: 391-401.
- VISSER, V., B. LANGDON, A. PAUCHARD & D. RICHARDSON. 2014. Unlocking the potential of Google Earth as a tool in invasion science. *Biol. Invasions* 16: 513-534.
- VON HOLLE, B., H.R. DELACOURT & D. SIMBERLOFF. 2003. The importance of biological inertia in plant community resistance to invasion. *J. Veg. Sci.* 14: 425-32.
- WALTERS, B. 2005. Ecological effects of small-scale cutting of Philippine mangrove forests. *For. Ecol. Manage.* 206: 331-348.
- WATKINS, R.Z., J.C. CHEN, J.B. PICKENS & K.D. BROSOFSKE. 2003. Effects of forest roads on understory plants in a managed hardwood landscape. *Conserv. Biol.* 17: 411-419.
- WITH, K. 2002. The landscape ecology of invasive spread. *Conserv. Biol.* 16: 1192-1203.
- WITH, K. 2004. Assessing the risk of invasive spread in fragmented landscapes. *Risk Anal.* 24: 803-815.
- ZAMORANO-ELGUETA, C., L. CAYUELA, M. GONZALEZ-ESPINOSA, A. LARA & M.R. PARRA-VAZQUEZ. 2012. Impacts of cattle on the South American temperate forests: Challenges for the conservation of the endangered monkey puzzle tree (*Araucaria araucana*) in Chile. *Biol. Conserv.* 152: 110-118.
- ZULOAGA, F., O. MORRONE & M. BELGRANO. 2008. *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis.
- ZUÑIGA-FEEST, A., A. BUSTOS-SALAZAR, F. ALVES, V. MARTÍNEZ & C. SMITH-RAMIREZ. 2017. Physiological and morphological responses to permanent and intermittent waterlogging in seedlings of four evergreen trees of temperate swamp forests. *Tree Physiol.* 37: 779-789.

Recibido el 18 de agosto de 2017, aceptado el 4 de abril de 2018. Editor: Guillermo Funes.

Apéndice 1. Listado de todas las especies de plantas vasculares presentes en los fragmentos estudiados. OG: origen geográfico, N: nativo, AF: África, AS: Asia, EA: Eurasia, EU: Europa, NA: Norteamérica, SA: Sudamérica, OC: Oceanía. Ejemplares colectados en Chile, Región de La Araucanía, Provincia de Cautín. Testigos depositados en el Herbario de la Universidad Católica de Temuco (UCT).

Nombre científico	Familia	OG	Borde	Núcleo	Colector: Urrutia; Fecha y número de ejemplar
<i>Acacia melanoxylon</i> R. Br.	Fabaceae	OC	x		15-XII-2016, n° 2553
<i>Acaena argentea</i> Ruiz & Pav.	Rosaceae	N	x		18-XII-2016, n° 2554
<i>Achillea millefolium</i> L.	Asteraceae	EU	x		18-XII-2016, n° 2555
<i>Aextoxicon punctatum</i> Ruiz & Pav.	Aextoxicaceae	N	x		16-XII-2016, n° 2556
<i>Agrostis capillaris</i> L.	Poaceae	EU	x	x	15-XII-2016, n° 2557
<i>Alisma lanceolatum</i> With.	Alismataceae	EU	x		17-XII-2016, n° 2558
<i>Alisma plantago-aquatica</i> L.	Alismataceae	EU	x		15-XII-2016, n° 2559
<i>Alstroemeria ligtu</i> L.	Alstroemeriaceae	N	x		17-XII-2016, n° 2560
<i>Amomyrtus luma</i> (Molina) D. Legrand & Kausel	Myrtaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2561
<i>Aristotelia chilensis</i> (Molina) Stuntz	Elaeocarpaceae	N	x	x	16-XII-2016, n° 2562
<i>Asplenium dareoides</i> Desv.	Aspleniaceae	N		x	15-XII-2016, n° 2563
<i>Asplenium trilobum</i> Cav.	Aspleniaceae	N		x	18-XII-2016, n° 2564
<i>Azara lanceolata</i> Hook. f.	Flacourtiaceae	N	x	x	16-XII-2016, n° 2565
<i>Azara serrata</i> Ruiz & Pav.	Flacourtiaceae	N		x	16-XII-2016, n° 2566
<i>Azolla filiculoides</i> Lam.	Azollaceae	NA	x		16-XII-2016, n° 2567
<i>Baccharis sagittalis</i> (Less.) DC.	Asteraceae	N	x	x	18-XII-2016, n° 2568
<i>Baccharis sphaerocephala</i> Hook. & Arn.	Asteraceae	N	x		18-XII-2016, n° 2569
<i>Berberis trigona</i> Kunze ex Poepp. & Endl.	Berberidaceae	N	x	x	17-XII-2016, n° 2570
<i>Blechnum cordatum</i> (Desv.) Hieron.	Blechnaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2571
<i>Blechnum hastatum</i> Kaulf.	Blechnaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2572
<i>Blechnum penna-marina</i> (Poir.) Kuhn	Blechnaceae	N		x	17-XII-2016, n° 2573
<i>Blepharocalyx cruckshanksii</i> (Hook. & Arn.) Nied.	Myrtaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2574
<i>Boquila trifoliolata</i> (DC.) Decne.	Lardizabalaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2575
<i>Callitriche palustris</i> L.	Callitrichaceae	EU	x	x	17-XII-2016, n° 2576
<i>Calystegia sepium</i> (L.) R. Br.	Convolvulaceae	NA	x		16-XII-2016, n° 2577
<i>Cardamine geraniifolia</i> (Poir.) DC.	Brassicaceae	N	x		16-XII-2016, n° 2578
<i>Carex acutata</i> Boott	Cyperaceae	N	x		16-XII-2016, n° 2579
<i>Carex brongniartii</i> Kunth	Cyperaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2580
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Apiaceae	N	x	x	18-XII-2016, n° 2581
<i>Chusquea quila</i> Kunth	Poaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2582
<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Ten.	Asteraceae	EU	x		15-XII-2016, n° 2583
<i>Cissus striata</i> Ruiz & Pav.	Vitaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2584

Nombre científico	Familia	OG	Borde	Núcleo	Colector: Urrutia; Fecha y número de ejemplar
<i>Conium maculatum</i> L.	Apiaceae	EU	x		17-XII-2016, n° 2585
<i>Crepis capillaris</i> (L.) Wallr.	Asteraceae	EU	x		15-XII-2016, n° 2586
<i>Cyperus eragrostis</i> Lam.	Cyperaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2587
<i>Cyperus reflexus</i> Vahl	Cyperaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2588
<i>Dactylis glomerata</i> L.	Poaceae	EU	x		15-XII-2016, n° 2589
<i>Daucus carota</i> L.	Apiaceae	EU	x		16-XII-2016, n° 2590
<i>Digitalis purpurea</i> L.	Plantaginaceae	EU	x		16-XII-2016, n° 2591
<i>Discaria chacaye</i> (G. Don) Tortosa	Rhamnaceae	N		x	15-XII-2016, n° 2592
<i>Drimys winteri</i> J.R. Forst. & G. Forst.	Winteraceae	N	x	x	18-XII-2016, n° 2593
<i>Eleocharis acicularis</i> (L.) Roem. & Schult.	Cyperaceae	EU	x	x	15-XII-2016, n° 2594
<i>Eleocharis pachycarpa</i> E. Desv.	Cyperaceae	N	x		17-XII-2016, n° 2595
<i>Embothrium coccineum</i> J.R. Forst. & G. Forst.	Proteaceae	N	x		17-XII-2016, n° 2596
<i>Escallonia revoluta</i> (Ruiz & Pav.) Pers.	Escalloniaceae	N	x	x	16-XII-2016, n° 2597
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	OC	x		18-XII-2016, n° 2598
<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez	Bromeliaceae	N		x	18-XII-2016, n° 2599
<i>Gamochaeta americana</i> (Mill.) Wedd.	Asteraceae	N	x		15-XII-2016, n° 2600
<i>Genista monspessulana</i> (L.) L.A.S. Johnson	Fabaceae	EU	x		15-XII-2016, n° 2601
<i>Geranium core-core</i> Steud.	Geraniaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2602
<i>Gevuina avellana</i> Molina	Proteaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2603
<i>Gratiola peruviana</i> L.	Plantaginaceae	N	x		17-XII-2016, n° 2604
<i>Holcus lanatus</i> L.	Poaceae	EU	x	x	16-XII-2016, n° 2605
<i>Hydrocotyle ranunculoides</i> L. f.	Apiaceae	NA	x		16-XII-2016, n° 2606
<i>Hymenophyllum krauseanum</i> Phil.	Hymenophyllaceae	N		x	16-XII-2016, n° 2607
<i>Hypochaeris radicata</i> L.	Asteraceae	EU	x	x	17-XII-2016, n° 2608
<i>Juncus imbricatus</i> Laharpe	Juncaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2609
<i>Juncus pallescens</i> Lam.	Juncaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2610
<i>Juncus procerus</i> E. Mey.	Juncaceae	N	x	x	18-XII-2016, n° 2611
<i>Lactuca serriola</i> L.	Asteraceae	EU	x		15-XII-2016, n° 2612
<i>Lapageria rosea</i> Ruiz & Pav.	Philesiaceae	N		x	17-XII-2016, n° 2613
<i>Lardizabala biternata</i> Ruiz & Pav.	Lardizabalaceae	N		x	18-XII-2016, n° 2614
<i>Leontodon saxatilis</i> Lam.	Asteraceae	EU	x		17-XII-2016, n° 2615
<i>Lepidoceras chilense</i> (Molina) Kuijt	Eremolepidaceae	N		x	18-XII-2016, n° 2616
<i>Libertia chilensis</i> (Molina) Gunckel	Iridaceae	N		x	16-XII-2016, n° 2617
<i>Lolium perenne</i> L.	Poaceae	EU	x		15-XII-2016, n° 2618
<i>Lomatia hirsuta</i> (Lam.) Diels	Proteaceae	N	x		16-XII-2016, n° 2619
<i>Lotus pedunculatus</i> Cav.	Fabaceae	EU	x	x	15-XII-2016, n° 2620

J. Urrutia-Estrada *et al.* - Riqueza de plantas en fragmentos de bosque pantanoso

Nombre científico	Familia	OG	Borde	Núcleo	Colector: Urrutia; Fecha y número de ejemplar
<i>Ludwigia peploides</i> (Kunth) P.H. Raven	Onagraceae	SA	x		15-XII-2016, n° 2621
<i>Luma apiculata</i> (DC.) Burret	Myrtaceae	N	x	x	17-XII-2016, n° 2622
<i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray	Myrtaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2623
<i>Luzuriaga radicans</i> Ruiz & Pav.	Luzuriagaceae	N		x	18-XII-2016, n° 2624
<i>Maytenus boaria</i> Molina	Celastraceae	N	x	x	18-XII-2016, n° 2625
<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	EU	x	x	15-XII-2016, n° 2626
<i>Mimulus bridgesii</i> (Benth.) Clos	Phrymaceae	N		x	16-XII-2016, n° 2627
<i>Muehlenbeckia hastulata</i> (Sm.) I.M. Johnst.	Polygonaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2628
<i>Myoschilos oblongum</i> Ruiz & Pav.	Santalaceae	N		x	15-XII-2016, n° 2629
<i>Myosotis scorpioides</i> L.	Boraginaceae	EU	x	x	17-XII-2016, n° 2630
<i>Myrceugenia excrucata</i> (DC.) O. Berg	Myrtaceae	N	x	x	17-XII-2016, n° 2631
<i>Myrceugenia parvifolia</i> (DC.) Kausel	Myrtaceae	N		x	17-XII-2016, n° 2632
<i>Myriophyllum aquaticum</i> (Vell.) Verdc.	Haloragaceae	SA	x	x	15-XII-2016, n° 2633
<i>Nertera granadensis</i> (Mutis ex L. f.) Druce	Rubiaceae	N		x	16-XII-2016, n° 2634
<i>Nothofagus dombeyi</i> (Mirb.) Oerst.	Nothofagaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2635
<i>Nothofagus obliqua</i> (Mirb.) Oerst.	Nothofagaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2636
<i>Oxalis rosea</i> Jacq.	Oxalidaceae	N	x		16-XII-2016, n° 2637
<i>Paspalum dasylepulum</i> Kunze ex E. Desv.	Poaceae	N	x		16-XII-2016, n° 2638
<i>Pilea elliptica</i> Hook. f.	Urticaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2639
<i>Plantago lanceolata</i> L.	Plantaginaceae	EU	x	x	18-XII-2016, n° 2640
<i>Polygonum hydropiperoides</i> Michx.	Polygonaceae	NA	x		15-XII-2016, n° 2641
<i>Polypogon australis</i> Brongn.	Poaceae	N	x		17-XII-2016, n° 2642
<i>Populus nigra</i> L.	Salicaceae	EU	x		15-XII-2016, n° 2643
<i>Prunella vulgaris</i> L.	Lamiaceae	EU	x	x	15-XII-2016, n° 2644
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	Rosaceae	AS	x		15-XII-2016, n° 2645
<i>Ranunculus muricatus</i> L.	Ranunculaceae	AF	x	x	17-XII-2016, n° 2646
<i>Ranunculus repens</i> L.	Ranunculaceae	AF	x		17-XII-2016, n° 2647
<i>Rhamnus diffusus</i> Clos	Rhamnaceae	N		x	15-XII-2016, n° 2648
<i>Rhaphithamnus spinosus</i> (Juss.) Moldenke	Verbenaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2649
<i>Ribes magellanicum</i> Poir.	Grossulariaceae	N	x		16-XII-2016, n° 2650
<i>Ribes trilobum</i> Meyen	Grossulariaceae	N		x	15-XII-2016, n° 2651
<i>Rubus constrictus</i> P.J. Müll. & Lefèvre	Rosaceae	EU	x	x	15-XII-2016, n° 2652
<i>Rumex acetosella</i> L.	Polygonaceae	EA	x		15-XII-2016, n° 2653
<i>Rumex conglomeratus</i> Murray	Polygonaceae	EU	x	x	15-XII-2016, n° 2654
<i>Sagittaria montevidensis</i> Cham. & Schtdl.	Alismataceae	N	x		18-XII-2016, n° 2655
<i>Salix caprea</i> L.	Salicaceae	AS	x	x	18-XII-2016, n° 2656

Nombre científico	Familia	OG	Borde	Núcleo	Colector: Urrutia; Fecha y número de ejemplar
<i>Salix viminalis</i> L.	Salicaceae	EU	x	x	18-XII-2016, n° 2657
<i>Sarmienta scandens</i> (J.D. Brandis ex Molina) Pers.	Gesneriaceae	N		x	15-XII-2016, n° 2658
<i>Senecio fistulosus</i> Poepp. ex Less.	Asteraceae	N	x		17-XII-2016, n° 2659
<i>Sisyrinchium pearcei</i> Phil.	Iridaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2660
<i>Solanum valdiviense</i> Dunal	Solanaceae	N		x	15-XII-2016, n° 2661
<i>Sophora cassioides</i> (Phil.) Sparre	Fabaceae	N	x	x	16-XII-2016, n° 2662
<i>Stachys albicaulis</i> Lindl.	Lamiaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2663
<i>Symphotrichum vahlii</i> (Gaudich.) G.L. Nesom	Asteraceae	N	x		16-XII-2016, n° 2664
<i>Synammia feuillei</i> (Bertero) Copel.	Polypodiaceae	N		x	15-XII-2016, n° 2665
<i>Taraxacum officinale</i> G. Weber ex F.H. Wigg.	Asteraceae	EA	x		15-XII-2016, n° 2666
<i>Trifolium pratense</i> L.	Fabaceae	EU	x		17-XII-2016, n° 2667
<i>Trifolium repens</i> L.	Fabaceae	EU	x		18-XII-2016, n° 2668
<i>Tristerix corymbosus</i> (L.) Kuijt	Loranthaceae	N	x	x	15-XII-2016, n° 2669
<i>Ugni molinae</i> Turcz.	Myrtaceae	N	x		15-XII-2016, n° 2670
<i>Uncinia phleoides</i> (Cav.) Pers.	Cyperaceae	N		x	16-XII-2016, n° 2671
<i>Utricularia gibba</i> L.	Lentibulariaceae	NA	x		17-XII-2016, n° 2672
<i>Verbena bonariensis</i> L.	Verbenaceae	SA	x		15-XII-2016, n° 2673
<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.	Plantaginaceae	EA	x		15-XII-2016, n° 2674
<i>Vinca major</i> L.	Apocynaceae	EU		x	18-XII-2016, n° 2675

DELIMITACIÓN TAXONÓMICA DE *CEIBA CHODATII* Y *C. SPECIOSA* (MALVACEAE, BOMBACOIDEAE) EN DIFERENTES ESTADIOS FENOLÓGICOS

EVANGELINA C. LOZANO¹ y MARÍA A. ZAPATER¹

Summary: Taxonomic delimitation of *Ceiba chodatii* and *C. speciosa* (Malvaceae, Bombacoideae) in different phenological stages. Three species of *Ceiba* (Malvaceae, Bombacoideae) are cited for Argentina: *C. chodatii*, *C. speciosa* and *C. pubiflora*, differentiated by a few characters. The first two species are clearly distinguished in flowering stage, being difficult to identify them in other stages. The objective of this investigation is to check comparatively *C. chodatii* and *C. speciosa* in the search of greater characters that contribute to its delimitation. Native specimens of *C. chodatii* were studied in the Selva pedemontana and in Chaco serrano, also of *C. speciosa* cultivated in Salta and from herbaria. The vegetative and reproductive characters were studied with binocular loupe and MEB. A germination and seedling development test was carried out. The results show that the leaves from seedling to adult are differentiated in nerves and serrated of the margin. The differential characters in flower are: the size of the lobes in the staminodium column and the pubescence, the size of the anthers and collar, the total or partial union of the filaments, the shape, size and pubescence of the stigma and the type of basal pubescence of style. The fruits are differentiated by the thickness of the valves and the seeds by pubescence.

Key words: *Ceiba*, delimitation, taxonomy, phenological stages.

Resumen: Para Argentina se citan tres especies de *Ceiba* (Malvaceae, Bombacoideae): *C. chodatii*, *C. speciosa* y *C. pubiflora*, diferenciadas por pocos caracteres. Las dos primeras especies se distinguen claramente en etapa de floración, siendo complicada su identificación en otros estadios. El objetivo de esta investigación es revisar comparativamente a *C. chodatii* y *C. speciosa* en la búsqueda de mayores caracteres que aporten a su delimitación. Se estudiaron ejemplares nativos de *C. chodatii* en la Selva pedemontana y en Chaco serrano, también de *C. speciosa* cultivados en Salta y provenientes de herbarios. Se estudiaron todos los caracteres vegetativos y reproductivos, con lupa binocular y MEB. Se realizó un ensayo de germinación y desarrollo de plántulas. Los resultados muestran que las hojas desde plántula hasta adulto se diferencian en nerviación y aserrado del margen. Los caracteres diferenciales en flor son: el tamaño de los lóbulos en la columna de estaminodios y la pubescencia, el tamaño de las anteras y collar, la concrecencia total o parcial de los filamentos estaminales, la forma, tamaño y pubescencia del estigma y el tipo de pubescencia basal del estilo. Los frutos se diferencian por el espesor de las valvas y las semillas por pubescencia.

Palabras clave: *Ceiba*, delimitación, taxonomía, estadios fenológicos.

INTRODUCCIÓN

Recientes estudios filogenéticos basados en datos morfológicos, anatómicos, moleculares y biogeográficos muestran que las Bombacaceae como tradicionalmente se las circunscribía no constituyen un grupo monofilético. Las Bombacaceae no son reconocidas por el Angiosperm Phylogeny Group

(APG IV, 2016) con el rango de familia; se las trata como subfamilia Bombacoideae dentro de la familia Malvaceae (s.l.), clado que incluye miembros de cuatro familias previamente reconocidas Malvaceae (s.s.), Bombacaceae, Tiliaceae y Sterculiaceae. Las subfamilias Bombacoideae y Malvoideae forman el clado Malvatheca (Baum *et al.*, 1998) soportado por secuencias matK y ndhF (cpDNA) y las anteras altamente modificadas, bi - monotecas y poliesporangiadas. La subfamilia Bombacoideae comprende los taxa de hojas palmadas de Bombacáceas y la subfamilia Malvoideae incluye a las Malváceas (s.s.) (Baum *et al.*, 2004). Kunth

¹ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Avda. Bolivia 5150, (4400) Salta, Argentina. E-mail: evangelozano@gmail.com

(1822) describió al género *Chorisia*, con dos especies, *Ch. insignis* y *Ch. crispiflora*, caracterizado por la fusión completa de los filamentos estaminales funcionales para dar un tubo alrededor del estilo. *Ceiba* Mill. fue reestablecido por Schumann (1886, 1890) que reconoció tres secciones para *Ceiba* y consideró que los géneros *Ceiba* y *Chorisia* tenían caracteres para mantenerse unidos; lo mismo fue propuesto posteriormente por Gibbs *et al.* (1988). Por ello, *Ceiba insignis* (Kunth) P.E. Gibbs & Semir es sinónimo de *Chorisia insignis* Kunth. También el complejo *Chorisia* integrado por *Ch. crispiflora* Kunth, *Ch. speciosa* A. St.-Hil., *Ch. ventricosa* Nees & Mart., *Ch. integrifolia* Ulbr. y *Ch. incana* A. Robyns, fue transferido por Ravenna (1998) a *Ceiba*, aunque diferentes estudios tratan a estos taxa como sinónimos de *Ceiba insignis* y consideran que son un complejo polimórfico del que podrían derivar especies o subespecies como resultado de estudios detallados. Gibbs & Semir (2003) establecieron dos secciones. En la sección *Ceiba*, descrita en base al tipo *C. pubiflora* (A. St.-Hil.) K. Schum, caracterizada por poseer polen peritremo esférico y apéndices estaminales vascularizados cuando presentes, está el complejo *C. insignis* con los siguientes taxa: *C. pubiflora*, *C. chodatii* (Hassl.) Ravenna, *C. insignis*, *C. ventricosa*, *C. lupuna* P. G. Gibbs & Semir, *C. speciosa*, *C. crispiflora*, que presentan el tubo estaminal entero terminado en collar de anteras y solo una especie de este conjunto, *C. pubiflora*, tiene estambres libres. La distribución se corresponde con el Arco Pleistocénico de bosques estacionales definido por Prado & Gibbs (1993), a excepción de dos especies con amplia distribución *C. speciosa* y *C. lupuna* que pueden encontrarse en bosques húmedos ribereños. Según estos autores, todo el agregado es interfértil, *C. speciosa* × *C. chodatii* forman híbridos fértiles algunos de los cuales están comúnmente cultivados en arbolado en Argentina; también *C. pubiflora* × *C. speciosa* pueden cruzarse.

Ceiba comprende árboles grandes, a veces con tronco ventricoso, tronco y ramas generalmente con fuertes agujijones cónicos y hojas palmaticompuestas con 3-5 (-8) folíolos (Stevens *et al.*, 2001). Tres especies se encuentran en México y Centro América y 13 especies se distribuyen en América del Sur. Para Argentina se citan tres especies: *Ceiba chodatii*, *Ceiba speciosa* y *Ceiba pubiflora* var. *pubiflora* (Zuloaga *et al.*, 2008). *C. chodatii* habita

en Argentina en la Selva Pedemontana y Chaco serrano de Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca y la zona de ecotono con el Chaco occidental; también en Chaco, Formosa y Santiago del Estero (Digilio & Legname, 1966). *C. speciosa*, árbol nativo de las selvas tropicales y subtropicales de Sudamérica, habita en Argentina en Misiones, Corrientes, este de Chaco y Formosa y norte de Santa Fe (Selva Paranaense y Chaco oriental) (Erize, 1997). *C. pubiflora* var. *pubiflora* habita en Argentina en un área reducida (Misiones - Candelaria) (Anton & Zuloaga, 2017).

Ceiba chodatii y *C. speciosa* son las dos especies que ofrecen dificultad para su identificación en estado vegetativo o en fructificación fuera de su *hábitat natural* por encontrarse muy cultivadas y tener gran afinidad morfológica; las diferencias conocidas se basan solo en caracteres florales no cuantitativos. Según Novara (1993), *C. chodatii* es una especie imposible de confundir con ninguna otra indígena del valle de Lerma, pero muy difícil de distinguir de *C. speciosa*, “samohú” o “samuhú”, del noreste argentino, cuando faltan flores. Para este autor, posiblemente ambos taxones no sean más que variedades de una misma entidad. Por otra parte, Gibbs & Semir (2003), mencionan la existencia de hibridación natural, aunque no se encontraron registros que lo confirmen en Argentina.

El objetivo del trabajo es revisar comparativamente a *C. chodatii* y *C. speciosa* en todos los estadios del desarrollo en la búsqueda de otros caracteres, principalmente vegetativos, que aporten a su identificación.

MATERIAL Y MÉTODO

La metodología que se utilizó fue la tradicional para los estudios taxonómicos consistente en observaciones macroscópicas y con lupa binocular. Se consultaron los herbarios: LIL y MCNS. Se realizaron nuevas colecciones de *C. chodatii* en el área de distribución natural en Jujuy, Salta y Tucumán (Selva Pedemontana y Chaco Serrano), en diferentes estadios. También se coleccionaron ejemplares cultivados de esta especie y de *C. speciosa*. De esta última se seleccionaron ejemplares típicamente característicos por la coloración de los pétalos. Los ejemplares fueron descritos y comparados en forma completa con mediciones de

todos los órganos y sus partes. Se coleccionaron frutos y semillas y también se produjeron plántulas para analizar morfología, germinación y desarrollo.

Al MEB se analizaron algunos órganos como base del estilo, estigma y episperma. Para ello, las flores fueron fijadas en FAA para su posterior análisis más detallado en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB; JEOL JSM-6480 LV) y tratadas con las técnicas convencionales propias de este tipo de estudio.

Se consultaron en JSTOR Plant Science las imágenes digitales de los ejemplares tipo depositados en G, MO y P (Thiers, 2017). Se confeccionaron claves para la identificación de las especies.

RESULTADOS

Se analizaron características diferenciales detalladas en trabajos previos y se encontraron nuevas diferencias que se mencionan a continuación, con dos claves dicotómicas que se proponen.

Porte específico, forma del tronco

En ejemplares maduros de *C. chodatii* el tronco se ensancha abruptamente desde la base hasta el ápice alcanzando en la parte media una gran dilatación (hasta 2 m diám.), lo que permite diferenciarlo de *C. speciosa* con tronco más estilizado por un ensanchamiento gradual y con menor dilatación en la mitad de la longitud (hasta 1 m diám.). Fig. 1, A-B.

Aguijones

En *C. chodatii* los agujones del tronco son de forma conoidal con base muy ancha, dilatada y progresivamente aguzada al ápice en forma asimétrica, con el extremo curvado. Se distribuyen densa e irregularmente, presentan diferentes tamaños. En *C. speciosa*, los agujones son típicamente cónicos y simétricos, generalmente de ápice recto y muy agudo. Se disponen de forma semidensa a esparcida con regular distribución y tamaño. Fig. 1, C-D.

Nomófilos

El margen de los folíolos en los nomófilos juveniles y adultos es una de las diferencias más destacadas al estado vegetativo, que puede ser

irregularmente aserrado hasta entero (raro) en aproximadamente la mitad o tercio apical de la lámina en *C. chodatii*; en tanto que en *C. speciosa* es regular y casi completamente aserrado (excepto en 0,5-1,5 cm basal). Los dientes también son diferentes, generalmente curvos en *C. chodatii* y rectos en *C. speciosa*. La nerviación en *C. chodatii* es semicraspedódroma (Moreno, 1984), irregular, con 12-15 nervios secundarios completos, distanciados 4-10 mm. En *C. speciosa* es caspedódroma mixta (Moreno, 1984), regularmente paralela y con nervios completos más numerosos (18-20) distanciados 2-3 mm. Lo mismo se reproduce en los nomófilos de las plántulas. Fig. 1, E-F, G-H.

Flores

Corola. En *C. chodatii* la forma de la corola es infundibuliforme con pétalos erectos y el tercio apical reflexo y curvado; en *C. speciosa* la corola es rotácea o estrellada con pétalos abiertos y recurvados desde la base, exponiendo el extremo de la columna de estaminodios. En cuanto a color los pétalos en *C. chodatii* son blanco cremosos (Digilio & Legname, 1966) en la lámina y amarillos o marrones en la uña del haz (mitad basal), a menudo con algunas estrías longitudinales purpúreas irregularmente distribuidas. En *C. speciosa* el color de la lámina es magenta oscuro o rosado con uña blanca o amarilla y abundantes estrías oscuras en la mitad de la lámina. Respecto al margen de los pétalos, es liso en toda la lámina o ligeramente ondulado en el tercio apical en *C. chodatii*; en tanto que en *C. speciosa* es totalmente ondulado incluida la uña. La uña es más ancha en *C. chodatii*, de 1,5-1,6 cm en el extremo superior y de 0,9-1 cm en el extremo inferior; en *C. speciosa* es de 0,7-0,9 cm extremo superior y 0,5-0,7 cm en el inferior. La pubescencia en haz y envés en ambas especies es semejante. Fig. 1, I-L, M, Ñ.

Androceo. Columna de estaminodios de color amarillo homogéneo en toda su longitud en *C. chodatii* con 10 lóbulos apareados y divergentes, generalmente glabros, a veces con escasos pelos blancos o amarillos breves (hasta 3-4 células); lóbulos de 0,15-0,3 cm long. En *C. speciosa* la columna de estaminodios es blanquecina con 10 lóbulos simétricamente distribuidos, rosados a rojo oscuros, densamente cubiertos por tricomas pluricelulares largos y blancos; lóbulos de 0,3-

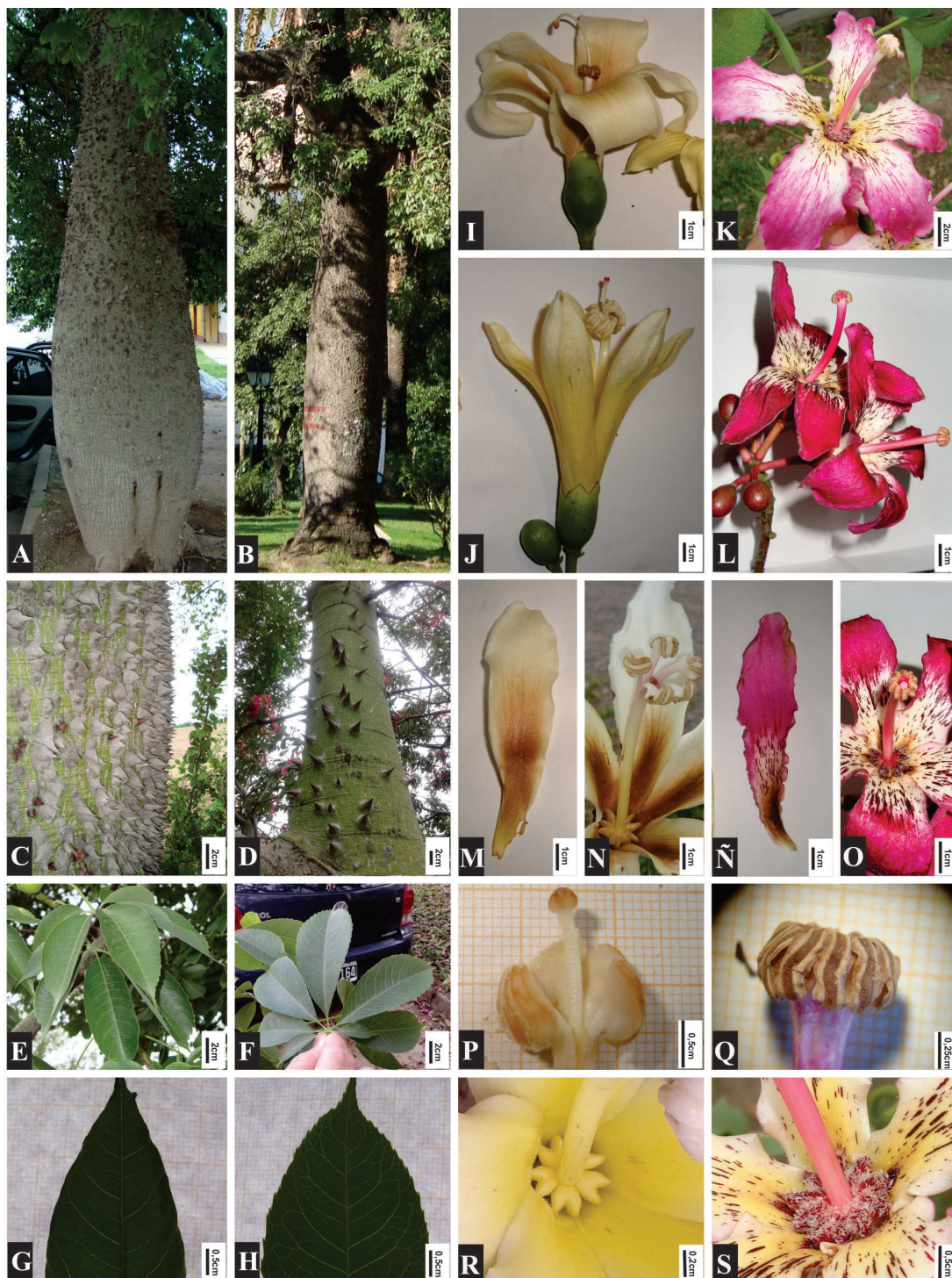


Fig. 1. *Ceiba chodatii*. A: tronco. C: agujones. E: hoja. G: folíolo. I-J: flor. M: pétalo. N: androceo. P: collar anteras. R: disco de estaminodios. *C. speciosa*. B: tronco. D: agujones. F: hoja. H: folíolo. K-L: flor. Ñ: pétalo. O: androceo. Q: collar anteras. S: disco de estaminodios.

0,7 cm long. Columna estaminal amarilla en *C. chodatii*; a menudo con los filamentos libres en el ápice unos 0,25-3,5 cm long.; cuando unidos, el collar de anteras de 0,8 × 1,3-1,5 cm; anteras de 0,5-0,8 × 0,2-0,4 cm. En *C. speciosa* la columna es rosado clara y los filamentos siempre se encuentran totalmente concrecentes hasta el ápice; también hay concrecencia en el collar de anteras, éste de 0,4-0,5 × 0,6-0,9 cm; anteras de 0,4-0,5 × 0,12-0,2 cm. Fig. 1, N, O-S.

Gineceo. Con forma de cono truncado en *C. chodatii*, con tricomas apicales cortos y gruesos; la base del estilo con tricomas estrellados con 2-8 ramas desiguales de 94-223 × 17 µm y extremos aguzados; también tricomas simples de hasta 168 × 35 µm (MEB); estigma de 2,30 × 1,82 mm (MEB), blanquecino, ovoide, con papilas largas, densas, irregulares, cónicas, de ápice largo delgado y curvado, de 155-260 × 43-49 µm (MEB). En *C. speciosa*, gineceo conoidal con extremo prolongado en el estilo, ápice glabro, base del estilo con tricomas simples, rectos, muy agudos, de 160 × 28 µm (MEB); estigma esférico a obovoide, de 1,66 × 1,92 mm (MEB), rosado claro, afelpado con papilas cortas cónicas con extremo redondeado y ligeramente curvado de 83 × 22 µm (MEB). Fig. 2, A-H.

Fruto. La cápsula con cinco valvas, adopta indistintamente tamaños y formas muy variables en ambas especies, desde cilíndricas largas, cortas, ovoides, elipsoides o piriformes con extremos redondeados y/o aguzados. La única diferencia interespecífica es el espesor de las valvas (epi y mesocarpo), notablemente más gruesas en *C. speciosa*, de 6,17-14 mm y de 2-6,11 mm en *C. chodatii*. Fig. 2, I-J, O, Q.

Semilla. En ambas especies son semejantes en tamaño y coloración; en general más largas que anchas. Los promedios de todas las dimensiones en 100 semillas muestran mínimas diferencias y los rangos (mínimo y máximo) son iguales. En *C. chodatii* las dimensiones promedio son: 7,78 × 6,21 × 4,65 mm; en *C. speciosa* de 7,79 × 6,11 × 4,59 mm. La testa es castaña a negruzca en *C. chodatii* y castaña en *C. speciosa*, regularmente mamelonada en ambas especies. En lupa binocular y al MEB se observa en *C. chodatii* que los mamelones

presentan depresiones circulares centrales, con emergencia de 1-2 tricomas blancos, simples, largos y cortos. En *C. speciosa* los mamelones se observan sin depresiones y sin tricomas. Fig. 2, K-L, M-N.

Desarrollo de plántulas. En una experiencia realizada en diciembre de 2016, se colocaron en macetas 80 semillas germinadas de *C. chodatii* y 80 de *C. speciosa*, colectadas en julio del mismo año, en cámara de germinación a 28°C y fotoperiodo 12/12 h. A las 48 h emergieron 24 plántulas de *chodatii* (24%) y 7 de *speciosa* (8,75%), posteriormente no hubo más emergencia. A los 5 días, el hipocótilo de 2-3 cm crecía curvado en *C. chodatii* con los cotiledones cubiertos por la testa, en tanto que en *speciosa* el hipocótilo de 2,5 cm crecía erguido y los cotiledones se encontraban plegados o cubiertos por la testa. A los 15 días, las plántulas se diferenciaron en tamaño de hipocótilo y de cotiledones, desarrollo de protófilo y epicótilo. A los 30 días, en *C. chodatii* el desarrollo del hipocótilo era notoriamente mayor entre 2-4 cm long. con respecto a *C. speciosa* y también los cotiledones la superaban en 1-2 cm en largo y ancho, el epicótilo en aproximadamente 1 cm y el protófilo en 0,2-0,3 cm.; además de un nomófilo bien desarrollado, que en *C. speciosa* iniciaba recién su desarrollo. Tabla 1, Fig. 2, Ñ, P.

TRATAMIENTO TAXONÓMICO

1. *Ceiba chodatii* (Hassl.) Ravenna, *Onira* 3(15): 44. 1998. *Chorisia chodatii* Hassl., *Bull. Herb. Boissier* ser. 2, 7: 174. 1907. Tipo: Paraguay, Chaco septentrional, en campo Santa Elisa, 1903, *Rojas* s. n. in herb. *Hassler 2849* (Lectotipo G!, designado por Gibbs & Semir, *Ann. J. Bot. Madrid* 60(2): 274. 2003).

Fenología. Florece desde febrero hasta mayo en Salta y Jujuy (obs. pers.); desde enero a julio en Tucumán (Digilio & Legname, 1966). Frutos bien desarrollados, no dehiscentes, desde fines de mayo hasta mediados de setiembre (obs. pers.) y con maduración posterior hasta diciembre (Erise, 1997). Se observó en el área de estudio que la floración no es regularmente anual en todas las poblaciones y también a menudo a pesar de una abundante floración no se producen frutos; por lo que puede considerarse una especie vecera.

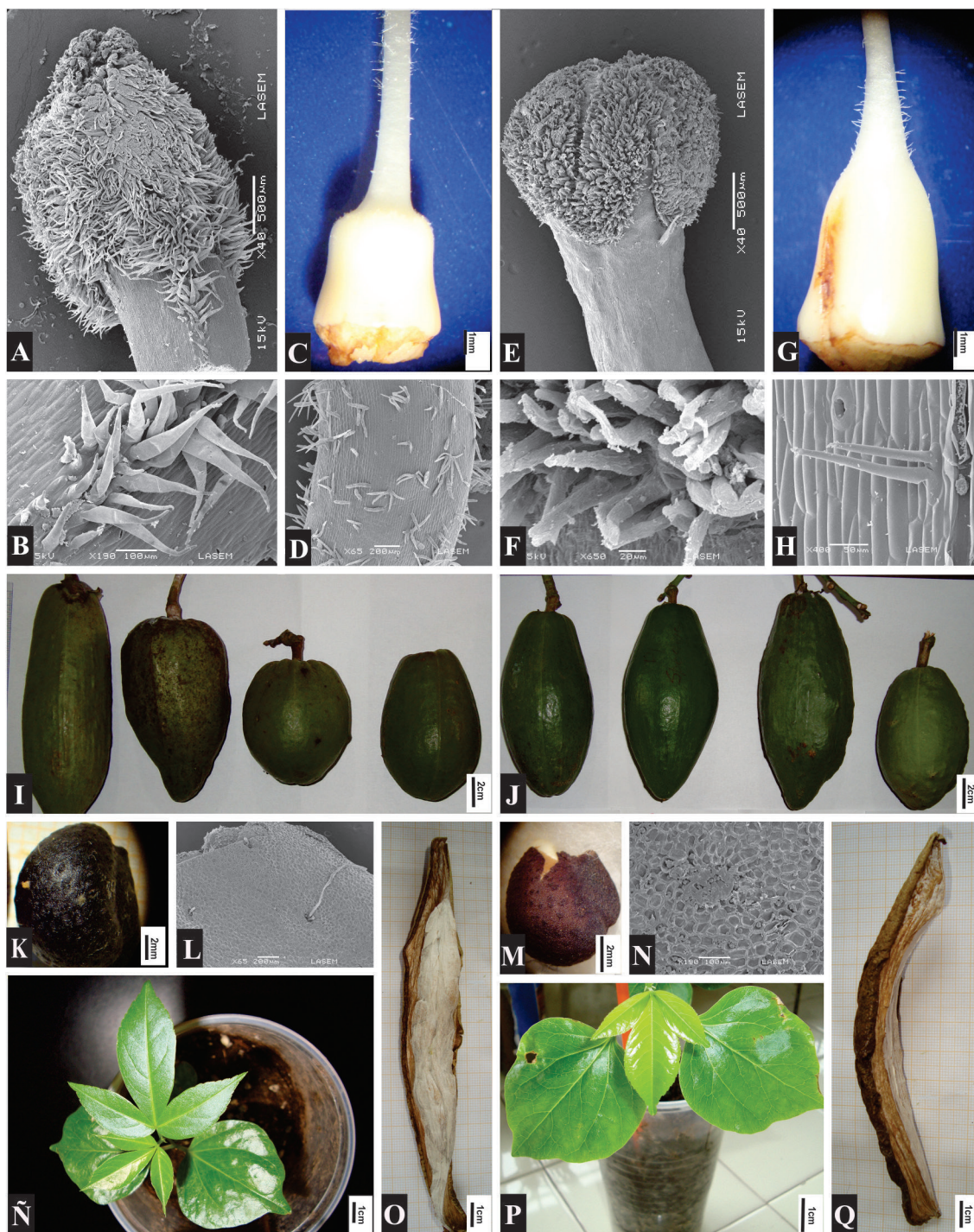


Fig. 2. *Ceiba chodatii*. **A-B:** estigma y tricomas del estigma. **C-D:** gineceo y tricomas del estilo. **I:** fruto. **O:** valva del fruto. **K-L:** semilla (lupa) y episperma (MEB). **N:** plántula de 20 días. *C. speciosa*. **E-F:** estigma y tricomas del estigma. **G-H:** gineceo y tricomas del estilo. **J:** fruto. **Q:** valva del fruto. **M-N:** semilla en proceso germinativo (lupa) y episperma (MEB). **P:** plántula de 20 días.

Tabla 1. *Ceiba chodatii* y *C. speciosa*. Desarrollo de plántulas durante 30 días.

Órgano	<i>C. chodatii</i>	<i>C. speciosa</i>
5 días		
Hipocótilo	2-3 cm curvado	2-2,5 cm erguido
Cotiledones	Plegados, generalmente cubiertos por la testa	Plegados o cubiertos por la testa
15 días		
Hipocótilo	9-10 cm long.	4-6 cm long.
Pecíolo del cotiledón	0,7-1,3 cm long.	0,3-0,4 cm long.
Cotiledones	5-6,5 × 4,8-5,4 cm	2,5-4 × 2,2-3,9 cm
Epicótilo	0,5 -1 cm	-
Pecíolo del protófilo	0,3-,0,5 cm long.	-
Protófilo (folíolo más largo)	1-3,2 × 0,3-1,8 cm	-
30 días		
Hipocótilo	12,3-14,3 cm long.	8,5-10 cm long.
Pecíolo del cotiledón	1,6-1,7 cm long.	1,1-1,8 cm long.
Cotiledones	7-7,2 × 6,4-6,5 cm	5,2-6 × 4,2-4,4 cm
Epicótilo	3-3,9 cm	1,6-3 cm
Pecíolo del protófilo	2,5-3,5cm long.	1,8-2,4 cm
Protófilo (folíolo más largo)	6-6,8 × 2,9-3,3 cm	5,7-6,5 × 2,7-3 cm
Pecíolo de eófilo	1-3,8 cm	-
Eófilo (folíolo más largo)	6,4-8 × 2,9-3,9 cm	-

Distribución geográfica y hábitat. Ravenna (1998) cita para la especie una distribución muy amplia en la región Chaqueña de Paraguay, norte y noreste de Argentina (Santa Fe, Chaco y Formosa); también en el noroeste (Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y La Rioja). Esta podría no ser la real distribución geográfica de las poblaciones naturales. Más adecuada sería la distribución aportada por Gibbs & Semir (2003), según la cual *C. chodatii* habita en los bosques estacionales secos de Paraguay, Bolivia y piedemonte del oeste de Argentina (Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca y La Rioja); también en algunas otras áreas chaqueñas de Santiago del Estero, Formosa y Chaco. Por otra parte, esta especie al encontrarse ampliamente cultivada también genera confusiones en su distribución.

En el marco de este estudio se comprobó con nuestro relevamiento y trabajo de colección la existencia de un área de distribución natural a lo largo del piedemonte de Yungas (Selva Pedemontana y Ecotono con Chaco Occidental) y en el Chaco serrano del noroeste de Argentina en las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán. En esta zona, la distribución se muestra discontinua con presencia de poblaciones concentradas en algunas áreas serranas, probablemente con hábitat asociado a sustratos con altos contenidos de calcio con base en el análisis de los suelos de la distribución (Nadir & Chafatinos, 1990), lo que debería ser comprobado mediante estudios específicos.

Material estudiado. ARGENTINA. Prov. Catamarca: Dpto. Capital, en "La Quebrada" en

el cerro, 15-II-1945, Krapovickas 17920 (LIL). Dpto. Santa Rosa, Alijilan, 26-I-1942, Pierotti 11549 (LIL). *Prov. Chaco*: Dpto. Río Bermejo, Las Palmas, 15-III-1947, Malvarez 1299 (LIL). *Prov. Jujuy*: Dpto. El Carmen: Ruta 34 pasando caminera Salta - Jujuy, sobre ruta vieja, 28-II-2014, Zapater & Lozano 4330 (MCNS). Dpto. Ledesma, Yuto en bosque de EECT - INTA, 21-II-2014, Zapater & Lozano 4320 (MCNS). *Prov. Salta*: Depto. Capital, Salta en camino al Santuario de la Virgen del Cerro, C° 20 de Febrero, 21-II-2015, Zapater & Lozano 4550 (MCNS). Dpto. Gral. Güemes, Autopista a Salta, 5 km de entrada a TermoAndes, 28-II-2014, Zapater & Lozano 4335 (MCNS); a 1 km de entrada a Cobos sobre Autopista Aunor, Ruta 9, 14-III-2014, Zapater & Lozano 4339 (MCNS). Dpto. Gral. San Martín, Ruta 81, 8 km al W de Dragones, 9-IV-1996, Krapovickas y Cristóbal 46718 (LIL); Campamento Tablillas, 3-7 km al W de Gral. Mosconi, 1-II-1997, Palma 196 (MCNS); Tartagal, sobre ruta nacional 34, 19-II-2000, Tolaba 2650 (MCNS). Dpto. La Viña: Coronel Moldes, Ruta 68 km 123, en lomada a 1km al W del camino, 1-III-1989, Novara et al. 8633 (MCNS). Dpto. Metán: Río Piedras, Ruta 34, 12-IX-2014, Zapater & Lozano 4501 (MCNS); Lumbreras, Ruta 34 a 100 m de la Planta Distribuidora de Gas, al costado de la Ruta, 29-II-2015, Zapater & Lozano 4552 (MCNS). Dpto. Orán, Arroyo Bananal, 28-III-1972, Meyer y Vaca 23558 (LIL). Dpto. Rosario de Lerma, Campo Quijano, a orilla de canal de riego, 3-III-2014, Zapater & Lozano 4336 (MCNS). *Prov. Santa Fe*: Dpto. Rosario, Costanera frente al Monumento La Bandera, 15-I-2015, Zapater & Lozano 4550 (MCNS). *Prov. Tucumán*: Dpto. Capital, Barranca colorada, 24-IV-1925, Venturi 167 (LIL). Dpto. Burruyacu, Macomita, 10-III-1944, Varela s.n. (LIL). Dpto. Trancas, Ruta 34, a 3 km de Vipos hacia San Miguel, en banquina, 24-II-2014, Zapater & Lozano 4325 (MCNS).

Observaciones. El estudio del lectotipo designado por Gibbs y Semir (2003) mediante JSTOR Plant Science, nos muestra discordancias en las dimensiones florales respecto a las que constan en la descripción de Ravenna (1998) para la nueva combinación de esta especie y con nuestros registros, entre otros la longitud de las anteras de 4,4 mm según Ravenna y de 5-8 mm long. en el material estudiado. También se aprecian diferencias

en algunos caracteres no cuantitativos como la pubescencia que Ravenna menciona para los estaminodios los que observamos a menudo glabros y solo a veces con tricomas cortos esparcidos; como también la eventual pigmentación rojiza del extremo de los estaminodios, que no se encuentra en el material estudiado. El lectotipo, aunque cuenta con 4 flores completas, no presenta el tubo estaminal dividido en ninguna de ellas y las anteras se encuentran separadas solo en un material suelto de sobre, a pesar de que generalmente la columna estaminal está apicalmente dividida y también el collar de anteras en los ejemplares nativos del área en estudio (solo raramente la columna se encuentra entera y el collar de anteras indiviso). Lo que si resulta completamente concordante entre el lectotipo y los ejemplares que estudiamos son el diámetro del collar de anteras y la longitud de las anteras. Respecto a las hojas del ejemplar, el aserramiento de la mitad superior de los márgenes es claramente coincidente con el material estudiado de *C. chodatii*, carácter de diferenciación con *C. speciosa*.

A campo, las flores se observaron a menudo atacadas por insectos de gran tamaño (coleópteros) que destruyen la base de la flor y afectan al gineceo.

2. *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) Ravenna, *Onira* 3: 46. 1998. *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. in A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess., *Pl. Usuel. Bras.*, tab. 63. 1827. Tipo: Brasil, Provincia de Minas Gerais, *Saint Hilaire* s.n., (Lectotipo P!, designado por Gibbs & Semir, *Ann. J. Bot. Madrid* 60(2): 271. 2003).

Fenología. Floración de enero a mayo. Frutos bien desarrollados, no dehiscentes, desde fines de mayo hasta mediados de setiembre, coincidente con *C. chodatii* en estado de cultivo en el área de estudio. Los frutos se encuentran maduros desde setiembre hasta diciembre.

Distribución geográfica y hábitat. Citado por Ravenna (1998) para Brasil desde el SE de Minas Gerais y a través de los estados de Río de Janeiro, San Pablo, Paraná y Santa Catarina, hasta E - SE de Paraguay y NE de Argentina, en los bosques lluviosos. Según Gibbs & Semir (2003) habita en el noreste, sudeste y oeste de Brasil, norte de Argentina, Paraguay, Bolivia, sur y centro de Perú. En Argentina vive en Misiones, Corrientes, Chaco

y Formosa (Selva Misionera y Parque Chaqueño Oriental) (Tortorelli, 2009). Mencionado como un árbol del dosel y emergente en los bosques semi-siempreverdes hasta deciduos, en suelos bien drenados y también en bosque húmedo de valles (Jardim *et al.*, 2003).

Material estudiado. ARGENTINA. *Prov. Corrientes:* Dpto. Santo Tomé, a 35 km al SW de Santo Tomé, A° Cuay Grande, 5-II-1979, Schinini *et al.* 16751 (LIL). *Prov. Formosa:* Dpto. Pilagá, Misión Tacahaglé, 11-XI-1949, Morel 8870 (LIL). *Prov. Jujuy:* Dpto. Palpalá, entrada a ciudad de Palpalá en autopista, cultivado, 28-II-2014, Zapater & Lozano 4326 (MCNS). *Prov. Misiones:* Dpto. Candelaria, Santa Ana, 20-I-1913, Lillo 12348 (LIL). Dpto. Eldorado, Eldorado, 29-III-1945, Bertoni 1087 (LIL). Dpto. Iguazú, Puerto Aguirre, 13-II-1945, Hayward s.n. (LIL); Col. Victoria, 3-IV-1945, Bertoni 107 (LIL). Dpto. Libertador Gral. San Martín, Puerto León, 26-VI-1909, Venturi 70 (LIL). Dpto. San Javier, Tres Bocas, 12-II-1947, Schwarz 4107 (LIL). *Prov. Salta:* Dpto. Capital, B° 20 de Febrero, Calle Alsina al costado de vías ferrocarril entre Alvear y Bolívar, 20-II-2014, Zapater & Lozano 4296 (MCNS); Plaza 9 de Julio, cultivado, 20-II-2014, Zapater & Lozano 4300 (MCNS); Monumento a Güemes, cultivado, 20-II-2014, Zapater & Lozano 4303 (MCNS); Tres Cerritos, Calle Los Saucos y Las Higueras, cultivado en vereda, 20-II-2014, Zapater & Lozano 4304 (MCNS); 2° Rotonda Tres Cerritos, cultivado, 20-II-2014, Zapater & Lozano 4305 (MCNS). Dpto. Güemes, ciudad de Güemes, en calle paralela a Ruta 34 al ingreso a la ciudad frente Estación de Servicio, 28-II-2014, Zapater & Lozano 4333 (MCNS). *Prov. Santa Fe:* Dpto. Rosario, Monumento a la Bandera, cultivado, 15-I-2015, Zapater & Lozano 4545 (MCNS).

Material adicional estudiado (ejemplares singulares o potenciales híbridos). *Prov. Santa Fe:* Dpto. Rosario, sobre Costanera, cerca Monumento a La Bandera (cultivado), 15-I-2015, Zapater & Lozano 4546 (MCNS); *ibid.*, Zapater & Lozano 4547 (MCNS); en Monumento a La Bandera, cultivado, corola rosado clara, 15-I-2015, Zapater & Lozano 4548 (MCNS); *ibid.*, corola rosado clara, Zapater & Lozano 4549 (MCNS).

Observaciones. El lectotipo de *C. speciosa* estudiado mediante JSTOR Plant Science, muestra un ejemplar con todos los folíolos elípticos con margen completamente aserrado y numerosos nervios paralelos aproximados, lo que concuerda con los caracteres de diferenciación en márgenes y nerviación con *C. chodatii*. Respecto a la forma de los folíolos, en los ejemplares estudiados es frecuentemente variable en la misma hoja, siendo en la mayoría elípticos los basales y obovados los laterales y centrales. En cuanto a la única flor del ejemplar, si bien la forma estrellada o rotácea de la corola no se encuentra expresada, hay coincidencia en el borde totalmente ondulado de los pétalos; también en las dimensiones del collar de anteras y la longitud de las anteras, por lo que podemos afirmar que los ejemplares cultivados y nativos que estudiamos corresponden a *C. speciosa*. En su monografía de *Ceiba*, Ravenna (1998), no describe a *C. speciosa* y solo marca diferencias con *C. insignis* que presenta posteriormente en una clave, por lo cual no se pueden corroborar características descriptivas de esta especie, pero al menos un carácter destacado por el autor como la longitud de las anteras, de 7-8 mm, no es coincidente con nuestros registros de 4-5 mm long.

Se observó una importante variación en la pigmentación de la corola desde rosado pálido hasta magenta (visto en ejemplares cultivados). Ejemplares coleccionados en Rosario (Santa Fe) en el Monumento a la Bandera y adyacencias sobre la Costanera, (Zapater & Lozano 4546, 4547, 4548 y 4549 MCNS), presentaron la columna de estaminodios con escasos tricomas cortos o largos, lóbulos de 0,2-0,3 cm long.; el tubo estaminal unido o dividido apicalmente 1,2-1,8 cm, erecto o resurpinado como en *C. pubiflora* y anteras de 0,7-0,75 × 0,25-0,3 cm unidas o separadas, caracteres coincidentes con *C. chodatii*. Sin embargo, también presentan caracteres vegetativos de *C. speciosa* como el tipo de margen y nerviación de los folíolos, sumado al color rosado de la flor. Estos ejemplares al presentar caracteres de ambas especies podrían validar un caso de hibridación como mencionan Gibbs & Semir (2003).

La especie florece abundantemente y fructifica todos los años en los ejemplares cultivados en el área de estudio, a diferencia de *C. chodatii*. Cabría confirmar si esto se sostiene en su distribución natural.

Clave para diferenciar *C. chodatii* de *C. speciosa* sobre la base de caracteres florales

1. Corola infundibuliforme con pétalos erectos y deflexos en la mitad superior, color crema, a veces con algunas estrías rojizas, margen liso o apenas ondulado en 1/3 apical. Columna de estaminodios amarilla, lóbulos de 0,15-0,3 cm long. apareados y divergentes, generalmente glabros. Columna estaminal a menudo con filamentos libres en el ápice; anteras de 0,5-0,8 × 0,2-0,4 cm. Gineceo en forma de cono truncado. *C. chodatii*
- 1'. Corola estrellada a rotácea, pétalos abiertos rosados o magenta con base amarilla y con abundantes estrías oscuras, margen completamente ondulado. Columna de estaminodios blanquecina, lóbulos rosados o rojo oscuros de 0,3-0,7 cm long., completamente simétricos, densamente cubiertos por largos tricomas. Columna estaminal con filamentos siempre concrecentes hasta el ápice; anteras concrecentes de 0,4-0,5 × 0,12-0,2 cm. Gineceo conoidal, extremo prolongado con el estilo. *C. speciosa*

Clave para diferenciar *C. chodatii* de *C. speciosa* sobre la base de caracteres vegetativos y de fruto

1. Tronco con agujones asimétricos de ápice curvado. Folíolos con margen irregularmente aserrado en 1/2 a 1/3 apical o entero, dientes curvos; nerviación semicaspedódroma; 12-15 nervios secundarios completos. Valvas del fruto de 2-6 mm de espesor. Semilla con mamelones con depresión apical y 1-2 tricomas simples. *C. chodatii*
- 1'. Tronco con agujones simétricos de ápice recto y muy agudo. Folíolos con margen regularmente aserrado casi hasta la base, dientes rectos; nerviación caspedódroma mixta; 18-20 nervios secundarios completos. Valvas del fruto de 6,2-14 mm de espesor. Semillas con mamelones sin depresiones ni tricomas. *C. speciosa*

DISCUSIÓN

Una de las diferencias marcadas por Gibbs & Semir (2003) entre las dos especies estudiadas se refiere a la pubescencia de los lóbulos de los apéndices estaminales, mencionados como glabros

en *C. chodatii* y usualmente pilosos en *C. speciosa*. Se ha observado en *C. chodatii* que estos apéndices pueden ser glabros o poseer tricomas cortos, esparcidos y amarillentos. Por otra parte en *C. speciosa* los lóbulos de los apéndices estaminales son siempre abundantemente pilosos con tricomas largos, flexuosos y blancos.

Si bien Gibbs & Semir (2003) mencionan que ocasionalmente ejemplares de *C. speciosa* y de *C. chodatii* pueden presentar el extremo superior del tubo estaminal dividido en 5 filamentos, este carácter es habitual en *C. chodatii* en ejemplares nativos y cultivados a la madurez de la flor. En *C. speciosa*, el tubo estaminal es completamente concrecente incluidas las anteras hasta la madurez de la flor, carácter observado en todos los ejemplares estudiados; solamente se encontró la columna dividida en los potenciales híbridos de Rosario, prov. de Santa Fe.

Dentro de la clave de las especies del género *Ceiba*, Gibbs & Semir (2003), realizan un agrupamiento de especies al que designan como "Ceiba insignis aggregate" sobre la base de los siguientes caracteres: flores con filamentos estaminales unidos que forman un tubo terminado en un collar de anteras, ocasionalmente con alguna fisión terminal del tubo. Dentro de este agrupamiento, *C. chodatii* y *Ch. insignis* tienen una problemática historia, según relatan Gibbs y Semir (2003); que Hicken en 1900, identificó los árboles de *C. chodatii* cultivados en La Recoleta en Buenos Aires como *Chorisia insignis* H.B.K. y como consecuencia este nombre fue ampliamente utilizado para denominar las especies colectadas en Argentina, Bolivia y Perú, como también los ejemplares cultivados, originándose una importante confusión taxonómica con *Chorisia insignis* Kunth, sinónimo de *C. insignis* (Kunth) Gibbs & Semir.

Analizando características citadas por Gibbs & Semir (2003) para *C. chodatii* y *C. insignis*, se encuentran las siguientes diferencias: 1) *C. chodatii* tiene pétalos blanquecinos a amarillos y *C. insignis* puede poseer pétalos rosado pálidos, no siempre blancos; 2) los estaminodios de *C. chodatii* son blanco amarillentos y los de *C. insignis* tienen colores variables desde blanco hasta rojo anaranjado; 3) el tubo estaminal en *C. chodatii* es blanco cremoso y en *C. insignis* es rosado; 4) los pétalos de *C. chodatii* son espatulados y en *C. insignis* angostamente oblongos; 5) la distribución de *C. insignis* es el sur de Ecuador y norte de Perú.

Dentro del agrupamiento *C. insignis*, se encuentran otras dos especies muy afines, *C. speciosa* y *C. crispiflora* (Kunth) Ravenna, caracterizadas por poseer en común la corola con pétalos magenta en la mitad superior, con estrías rojo oscuras y base amarillenta. Las diferencias entre ambos taxones son: 1) *C. speciosa* tiene columna de estaminodios glabra, en tanto que en *C. crispiflora* es sericea; 2) el ancho de los pétalos es mayor a 1,5 cm lat. en *C. speciosa*, en tanto que en *crispiflora* es de 0,6-1 cm lat. Estos caracteres delimitan ambas especies.

Tanto *C. chodatii* como *C. speciosa*, no se observaron con afectaciones por heladas en la zona de estudio, a pesar de que Tortorelli (2009) menciona que ambas son sensibles a heladas.

CONCLUSIONES

Se descarta para Argentina la presencia de *C. insignis* en estado natural por sus características diferenciales con *C. chodatii* y su distribución. También se descarta la presencia como nativa de *C. crispiflora* por lo analizado precedentemente y su distribución en Brasil, Minas Gerais y Rio de Janeiro.

Se mantiene por lo tanto la existencia de las tres especies conocidas de *Ceiba* para Argentina: *C. chodatii*, *C. speciosa*, y *C. pubiflora*, esta última no estudiada en este trabajo, por ser claramente identificable por sus filamentos estaminales libres y resurpinados, además de su particular y reducida área de distribución en Misiones sobre suelos calcáreos.

Para las dos especies objeto de estudio, se agregaron a los iniciales caracteres de diferenciación exclusivamente florales no cuantitativos, unos 20 nuevos caracteres florales, vegetativos, de fruto, semilla y plántula cuali- y cuantitativos, que permitirán una segura determinación de las dos especies.

BIBLIOGRAFÍA

BYNG, J. W., M. W. CHASE, M. J. M. CHRISTENHUSZ, M. F. FAY, W. S. JUDD, D. J. MABBERLEY, A. N. SENNIKOV, D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS & P. F. STEVENS. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.*, pp. 108.

ANTON, A. M. & F. O. ZULOAGA. 2017. Bombacaceae. In: ANTON, A. M. & F. O. Zuloaga (eds.), *Flora Argentina*. <http://www.floraargentina.edu.ar>

BAUM, D. A., W. S. ALVERSON & R. NYFFELER. 1998. A durian by any other name: taxonomy and nomenclature of the core Malvales. *Harv. Pap. Bot.* 3: 315–330.

BAUM, D. A., S. D. SMITH, A. YEN, W. S. ALVERSON, R. NYFFELER, B. A. WHITLOCK & R. L. OLDHAM. 2004. Phylogenetic relationships of Malvaceae (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid DNA sequences. *Am. J. Bot.* 91: 1863–1871.

DIGILIO, P. L. & P. R. LEGNAME 1966. Los árboles indígenas de la provincia de Tucumán. *Opera Lilloana* 15: 76.

ERIZE, R. 1997. *El Nuevo Libro del Árbol* 1-2. Ed. El Ateneo, Buenos Aires.

GIBBS, P. E., J. SEMIR & N. D. DA CRUZ 1988. A proposal to unite the genera *Chorisia* Kunth with *Ceiba* Miller (Bombacaceae). *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 45: 125-136.

GIBBS, P. & J. SEMIR. 2003. A taxonomic revision of the genus *Ceiba* Mill. (Bombacaceae). *Anales Jard. Bot. Madrid* 60: 259-300.

JARDIM, A., T. J. KILLEN & A. FUENTES. 2003. *Guía de los árboles y arbustos del Bosque Seco Chiquitano, Bolivia*, pp.324. Editorial FAN, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

KUNTH, C. 1822. *Chorisia*. In: F. Humbolt, A. Bonpland & C. Kunth (eds.), *Nova genera et species plantarum* 5: 285-298. Paris.

MORENO, N. P. 1984. *Glosario botánico ilustrado*, pp. 300. Compañía Editorial Continental S. A., México.

NADIR, A. & T. CHAFATINOS. 1990. *Los Suelos del N.O.A.* Tomo 1, 2, 3 (Salta y Jujuy). INTA Salta, Argentina.

NOVARA, J. L. 1993. Bombacaceae Kunth. In: NOVARA, J. L. (ed.), *Flora del Valle de Lerma* 1(20): 1-8. Edición digital 2012.

PRADO, D. E. & P. E. GIBBS 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 902-927.

RAVENNA, P. 1998. On the identity, validity, and actual placement in *Ceiba* of several *Chorisia* species (Bombacaceae), and description of two new South American species. *Onira* 3: 42-51

SCHUMANN, K. M. 1886. Bombacaceae. In: MARTIUS, C. F. (ed.), *Fl. Bras.* 12(3): 201-250. München, Wien, Leipzig.

SCHUMANN, K. M. 1890. Bombacaceae. In: ENGLER, A. & K. Prantl (eds), *Nat. Pflanzenfam.* 3(6): 53-68. Leipzig.

- STEVENS, W. D., ULLOA U., POOL A. & O. M. MONTIEL 2001. Flora de Nicaragua. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 85: 1–2666
- THIERS, B. [permanentemente actualizado, consulta 2017] *Index Herbariorum*: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium, <http://sweetgum.nybg.org/ih>.
- TORTORELLI, L. A. 2009. *Maderas y Bosques Argentinos* II, pp.1111. Orientación Gráfica Editora, 2º Edición, Buenos Aires.
- ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. J. BELGRANO. (eds.). 2008. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 107: 1-3348. <http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina>.

Recibido el 28 de noviembre de 2017, aceptado el 6 de abril de 2018. Editor: Massimiliano Dematteis.

SENECIO FARINIFER Y *S. MADARIAGAE* (ASTERACEAE, SENECIONEAE), NUEVOS REGISTROS PARA LA FLORA ARGENTINA

MARCELO P. HERNÁNDEZ^{1,2*}, SUSANA E. FREIRE³ y DANIEL A. GIULIANO¹

Resumen: En el presente trabajo se registra por primera vez para la flora argentina la presencia de *Senecio farinifer* Hook. & Arn. y *S. madariagae* Phil. (Asteraceae-Senecioneae). Se presenta una descripción de cada especie incluyendo microcaracteres vegetativos y reproductivos.

Palabras clave: *Senecio farinifer*, *S. madariagae*, Asteraceae, Salta, San Juan.

Summary: *Senecio farinifer* and *Senecio madariagae* (Asteraceae-Senecioneae), new records for Argentine flora. This paper records for the first time the presence in the Argentine flora of *Senecio farinifer* Hook. & Arn. and *S. madariagae* Phil. (Asteraceae-Senecioneae). A description, including vegetative and reproductive microcharacters, is provided.

Key words: *Senecio farinifer*, *S. madariagae*, Asteraceae, Salta, San Juan.

INTRODUCCIÓN

El género *Senecio* L. s.str. (Asteraceae), con aproximadamente 1000 especies prácticamente cosmopolitas (Pelser *et al.*, 2007), constituye una de las unidades sistemáticas más grandes dentro de las Angiospermas en general y de las Asteráceas en particular. La mayor concentración de especies del género se halla en las regiones montañosas de América, África y Asia, estando pobremente representado en las selvas ecuatoriales.

La subserie *Polyphylli* Giuliano, M. P. Hernández & S. E. Freire (Giuliano *et al.*, 2017) comprende 23 especies que crecen principalmente en la región andina de Argentina y Chile (Cabrera, 1949, 1985;

Cabrera *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2014). Dentro de esta subserie, *Senecio farinifer* Hook & Arn. y *S. madariagae* Phil. se distribuyen en el centro y norte de Chile respectivamente.

Recientes viajes del primer autor (M.P.H.) a la provincia de San Juan en febrero de 2016, como parte de su trabajo de tesis doctoral (Hernández, 2016), han permitido hallar ejemplares que se corresponden con la descripción de *Senecio farinifer*. Asimismo, la revisión del material de herbario facilitó la identificación de un ejemplar de *S. madariagae* procedente de la provincia de Salta.

El objetivo del presente trabajo es dar a conocer el primer registro de *Senecio farinifer* y *S. madariagae* para la Argentina. Se describen ambas especies incluyendo sinónimos, citas de iconografías y datos acerca de la distribución, hábitat y fenología; asimismo, se las diferencia de las restantes especies de la subserie que crecen en las respectivas provincias.

RESULTADOS

Senecio farinifer Hook. & Arn., *J. Bot.* [Hooker] 3: 331. 1841. TIPO. Chile. Near Viña de la Mar, *Bridges* 223 (K000527689!); Valparaíso, H. Cuming 583 (E00251538!).

¹ Área de Botánica, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Avda. 60 entre 116 y 118, 1900 La Plata, Argentina.

² LAMCE (Laboratorio de Morfología Comparada de Espermatófitas), Área de Botánica, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Avda. 60 entre 116 y 118, 1900 La Plata, Argentina.

³ Instituto de Botánica Darwinion, Casilla de Correo 22, Labardén 200, San Isidro (B1642HYD), Buenos Aires, Argentina.

* E-Mail: mphciencia@yahoo.com

Senecio belophyllus J. Rémy, in Gay, *Fl. Chil.* 4: 164. 1849. TIPO: Chile. Sin localidad consignada, 1839, C. Gay 120 (BR0000005528097!, P02296705!, P02296706!, P02296707!).

Senecio linariifolius Poepp. ex DC. var. *longifolia* Phil., *Anales Univ. Chile* 88: 245. 1894. TIPO: Chile. Quillota, Cerro de la Campanita, XII-1883, F. Philippi s.n. (SGO, SI043417!).

Senecio apricus Phil., *Anales Univ. Chile* 88: 261. 1894. TIPO: Chile. Estancia Mercedes, XI-1888, R. Philippi s.n. (SGO060635!).

Sufrútices lanuginosos, densamente ramosos desde la base, de 20-40 cm de altura. Tallos delgados, laxamente hojosos, muy divididos, con pelos glandulosos blancos. Hojas alternas, glabras, glabrescentes a pubescentes (levemente lanuginosas) y glandulosas en ambas caras, lineares, de 15-55 × 1-3 mm, levemente atenuadas en la base, agudas en el ápice, las superiores muy cortamente sagitadas, enteras, más o menos revolutas en el margen (muy rara vez con algún diente). Capitulos radiados, solitarios en el ápice de las ramas escapiformes, casi desnudas en su parte superior. Involucro anchamente acampanado, de 5,5-9 × 7-10 mm, caliculado, bractéolas del cálculo 3-5 (excepcionalmente 0-1), lineares, alcanzando menos de la mitad del largo del involucro. Filarios 16-20, linear-lanceolados, atenuados y penicilados en el ápice, con pelos glandulosos blancos y crespos en el dorso. Flores dimorfos; las marginales 12-20, pistiladas, con corolas amarillas liguladas, lígula oblonga, 2-3-dentada, de 7-9 × 2-3 mm, tubo ca. 3,5 mm de largo; las del centro numerosas, perfectas, con corolas amarillas tubulosas, de 5-7 mm de largo, 5-dentadas en el ápice, dientes triangulares de 0,5 mm de largo, con vena media o sin ésta; anteras con collares balusteriformes de menos de 1mm de largo, apéndices conectivales ovados; ramas del estilo truncadas en el ápice donde llevan una corona de pelos colectores. Aquenios cilindroides, de 1-2 mm de largo, 8-10-costados, densa y cortamente papiloso-pubescentes. Pappus blanco, de 6-9 mm de largo. (Figs. 1, 2).

Iconografía. Cabrera (1949, p. 185, fig. 59).

Distribución y hábitat. Especie hasta ahora mencionada para el centro de Chile, extendiéndose

en las montañas bajas, en las Regiones de Coquimbo, Valparaíso, Metropolitana de Santiago y Maule (Cabrera, 1949; Freire, 1999). La revisión del material de herbario llevada a cabo durante el desarrollo de la tesis doctoral ha permitido hallar ejemplares procedentes de las Regiones Libertador Bernardo O'Higgins y Araucanía, ampliando de esta manera su distribución en Chile. Asimismo, recientes colectas han permitido hallar ejemplares de esta especie en la provincia de San Juan, lo que constituye la primera cita de esta especie para la Flora Argentina. Vegeta en las provincias biogeográficas Altoandina (entre los 900-2200 m s.m.), Prepuneña (entre 1000 y 3400 m s.m.) y Chilena Central (Cabrera, 1976).

Fenología. Florece desde septiembre hasta marzo.

Observación. Hasta el momento, para la provincia de San Juan sólo se ha citado la presencia de una especie de *Senecio* perteneciente a la subserie *Polyphylli*, *S. segethii* Phil. (Tombesi & Freire, 2013; Freire *et al.*, 2014). *Senecio farinifer* se diferencia de *S. segethii* por su hábito sufruticoso de 20-40 cm de alto, hojas lineares y flores con corola ligulada amarilla (vs. hábito herbáceo de 7-10 cm de alto, hojas oblanceolado-espátuladas y flores con corola ligulada blanca).

Materiales adicionales examinados. ARGENTINA. *Prov. San Juan: Dpto. Calingasta,* Calingasta rumbo a Iglesia, a orillas de la ruta Nacional 149, 31° 14' 0,02" S - 69° 17' 0,56" W, 10-II-2016, Hernández 203 (LPAG). *Dpto. Iglesia:* Ruta Nacional 149, en la entrada a Iglesia, cerca del Santuario de Santa Gemma, a 50 m de la ruta, 30° 37' 57,49" S - 69° 5' 8,71" W, 11-II-2016, Hernández 204 (LPAG). *Dpto. Jáchal:* de Jáchal rumbo al Parque Nacional Talampaya, por Ruta Nacional 40, pasando el Río Jáchal, 29° 50' 33,57" S - 68° 25' 57,22" W, 12-II-2016, Hernández 205 (LPAG); Huaco rumbo al Parque Nacional Ischigualasto, ruta 150, sobre barranca del camino, 30° 13' 6,59" S - 68° 31' 47" W, 13-II-2016, Hernández 206 (LPAG).

Senecio madariagae Phil., *Anales Mus. Nac. Santiago de Chile* Secc. 2, Bot. 8: 45. 1891. TIPO: Chile. Tarapacá, inter Amincha et

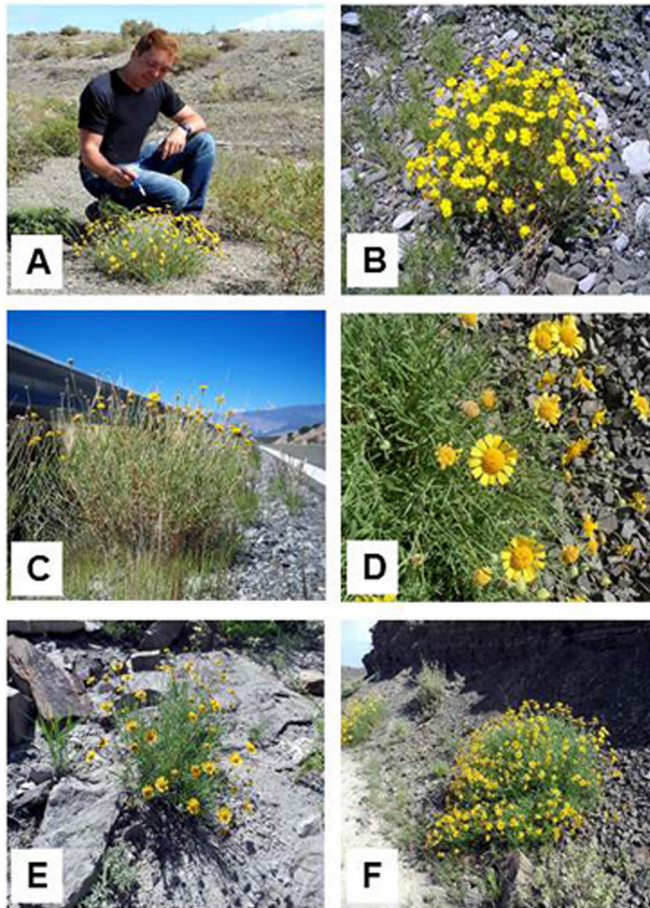


Fig. 1. *Senecio farinifer*. Individuos localizados en la provincia de San Juan: **A:** Dpto. Calingasta. **B y C:** Dpto. Iglesia. **D, E y F:** Dpto. Jáchal.

Paroma, 25-II-1885, F. Philippi s.n. (lectotipo, SGO44483!, designado por M. P. Hernández & D. A. Giuliano, *Bol. Soc. Argent. Bot.* 49(1): 78, 2014; isolectotipos, B, foto Field Museum n° 15639!, K000497901!, LP063405!, SGO60740!).

Arbustitos glabros o ligeramente lanosos en las partes jóvenes, densamente ramosos, de 30 cm de altura. Tallos algo ondulados, estriados, laxamente hojosos. Hojas alternas, sésiles, carnosas, las jóvenes lanuginosas, las adultas glabras a glabrescentes en la cara adaxial, glabras en la cara abaxial, oblongo-lineares, de 7-15 × 1-2 mm, ensanchadas y semiabrazadoras en la base, obtusas en el ápice, enteras o con 1-2 dientes a cada lado del margen, de 1-2 mm de largo. Capítulos radiados, solitarios o agrupados

de a 2-3, en el ápice de ramas, pedunculados, pedúnculos bracteados, de 1,5-4,5 cm de largo. Involucro anchamente acampanado, ecaliculado, de 8-10 × 12-14 mm, de igual largo que las flores del centro. Filarios 12-14, lanceolados, atenuados en la base y penicilados en el ápice, glabros en el dorso, de 8-10 × 1-3 mm. Flores dimorfas; las marginales 8-10, pistiladas, de corolas amarillas liguladas, lígula oblanceolada, de 5 × 2 mm, 2-3-dentada en el ápice, dientes triangulares de 0,4-0,5 mm de largo, tubo de 5-5,5 mm de largo; flores del centro numerosas, perfectas, corolas amarillas tubulosas, de 7-8,5 mm de largo, 5-dentadas en el ápice, dientes triangulares gruesos de 0,5-0,7 mm de largo, con nervadura central gruesa; anteras con collar balusteriforme, de menos de 1 mm de largo, apéndice conectival



Fig. 2. *Senecio farinifer*. Ejemplar colectado en la provincia de San Juan (Hernández 204, LPAG).

ovado; ramas del estilo truncadas en el ápice donde llevan una corona de pelos colectores. Aquenios cilindroides, de 3-4 mm de largo, 8-10-costados, seríceo-pubescentes. Papus blanco, de 6-10 mm de largo. (Fig. 3).

Iconografía. Cabrera (1949, p. 187, Fig. 60).

Distribución y hábitat. Especie hasta ahora citada como endémica del norte de Chile (Cabrera, 1949; Freire, 1999). Sin embargo, la revisión del material de



Fig. 3. *Senecio madariagae*. Ejemplar de herbario que constituye el nuevo registro de esta especie para la Flora Argentina, en la provincia de Salta (Cabrera 7914, GH).

herbario ha permitido hallar un ejemplar procedente de la provincia de Salta, el cual constituye la primera cita de esta especie para la Flora Argentina. Vegeta en la provincia biogeográfica Puneña entre 3400-3500 m s.m. (Cabrera, 1976).

Fenología. Ha sido colectada en flor desde enero hasta marzo, y en el mes de julio.

Observación. Hasta el momento, para la provincia de Salta sólo se ha citado la presencia de

una especie de *Senecio* perteneciente a la subserie *Polyphylli*, *S. punae* Cabrera (Freire *et al.*, 2014). *Senecio madariagae* se diferencia de *S. punae* por presentar hojas con margen entero o con 1-2 dientes a cada lado y capítulos ecaliculados (vs. hojas con margen con 2-3 lóbulos a cada lado y capítulos con numerosas brácteas del cálculo).

Material adicional examinado. ARGENTINA. Prov. Salta: Depto. Los Andes, San Antonio de los Cobres, en los cerros, 05-II-1943, Cabrera 7914 (GH).

AGRADECIMIENTOS

Al curador del herbario GH por el suministro del material correspondiente a *Senecio madariagae* y al Sr. Manuel Santos y la Sra. Nathalie Gelly, por su participación en el viaje de campaña a San Juan que nos permitió hallar los ejemplares de *Senecio farinifer* en esta provincia. Asimismo, a dos revisores anónimos por la lectura crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- CABRERA, A. L. 1949. El género *Senecio* en Chile. *Lilloa* 15: 27-501.
- CABRERA A. L. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. En: Kugler W. F. (ed.). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Tomo 2. 2da. ed., ACME S. A. C. I. Buenos Aires. Argentina. Fascículo 1: 1-85.
- CABRERA, A. L. 1985. El género *Senecio* (Compositae) en Bolivia. *Darwiniana* 26: 79-217.
- CABRERA, A. L., S. E. FREIRE & L. ARIZA ESPINAR. 1999. Género *Senecio*. En: *Flora Fanerogámica Argentina* Fascículo 62: 12-158. Proflora (Conicet).
- FREIRE, S. E. 1999. Tribu Senecioneae. En: Zuloaga, F. O. & O. Morrone (eds.), Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. *Monog. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden* 74: 1154-1565.
- FREIRE, S. E., L. ARIZA ESPINAR, L. SALOMÓN & M. P. HERNÁNDEZ. 2014. *Senecio*. En: ZULOAGA, F. O., BELGRANO, M. J. & ANTON, A. M. (eds.), *Flora Argentina* vol. 7(3): 27-220. Estudio Sigma S.R.L., Buenos Aires, Argentina.
- GIULIANO, D. A., M. P. HERNÁNDEZ & S. E. FREIRE. 2017. *Senecio* subser. *Polyphylli*, a new name for *Senecio* subsect. *Radiati* (Asteraceae, Senecioneae) from Southern South America. *Novon*, 25: 43.
- HERNÁNDEZ, M. P. 2016. Revisión taxonómica y análisis cladístico de la subserie *Radiati* (Cabrera) Cabrera & S.E. Freire del género *Senecio* (Asteraceae). Tesis Doctoral publicada on-line en SEDICI (Universidad Nacional de La Plata). 237 pp.
- PELSER, P. B., B. NORDENSTAM, J. W. KADEREIT & L. E. WATSON. 2007. An ITS phylogeny of tribe Senecioneae (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio* L. *Taxon* 56: 1077-1104.
- TOMBESI, T. S. & S. E. FREIRE. 2013. *Senecio*. En: KIESLING, R. (dir.), *Flora de San Juan*, vol. 3-b: 115-158. Zeta Editores, Mendoza, Argentina.

Recibido el 15 de diciembre de 2017, aceptado el 30 de mayo de 2018. Editor: Massimiliano Dematteis.

FIRST RECORD OF *ARAUJIA SERICIFERA* (APOCYNACEAE: ASCLEPIADOIDEAE) FOR CHILE, A NEW ALIEN CLIMBING SPECIES FROM SOUTH AMERICA

JAVIER SANTA CRUZ¹ and SEBASTIÁN CORDERO²

Summary: The presence of *Araujia sericifera* Brot. (Apocynaceae) in the vascular flora of central Chile is reported for the first time. A morphological description and an illustration is provided, as well as a background about its habitat, ecology and phenology.

Key words: Alien species, naturalization, Valparaíso vascular flora, weeds.

Resumen: Primer registro de *Araujia sericifera* (Apocynaceae: Asclepiadoideae) para Chile, una nueva especie exótica trepadora de América del Sur. La presencia de *Araujia sericifera* Brot. (Apocynaceae) en la flora vascular de Chile central es reportada por primera vez. Se entrega una descripción morfológica y una ilustración, así como también antecedentes acerca de su hábitat, ecología y fenología.

Palabras clave: Especies exóticas, flora vascular de Valparaíso, malezas, naturalización.

INTRODUCTION

Anthropogenic activities at the global scale have strongly altered the biotic and abiotic environments with increasing speed (Van Kleunen *et al.*, 2015), causing a weakening of the biogeographical barriers that have facilitated the dispersion of species in new regions where they can become naturalized (McNeely, 2005; Lambdon *et al.*, 2008). Sometimes, the introduction of plant species in new ranges derives in biological invasions, causing negative impacts on native biodiversity and ecosystems processes (Manchester & Bullock, 2000; Brooks *et al.*, 2004). In this sense, the documentation and characterization of alien species is critical to the management of plant invasions and

for the preservation of natural ecosystems (Fuentes *et al.*, 2013). For this reason, in this study we describe for the first time the presence of *Araujia sericifera* Brot. in the alien flora of Chile.

Araujia sericifera is an invasive vine belonging to the Apocynaceae family, native from northeastern Argentina, southern and southeastern Brazil, Paraguay, and Uruguay (Zuloaga *et al.*, 2008; BFG, 2015). Because of their multiple uses as a medicinal, edible, ornamental and textile plant, *A. sericifera* is usually cultivated worldwide (Kunkel, 1984; Gaig *et al.*, 2005; D'Errico *et al.*, 2014). Nevertheless, due to its ability to quickly spread, has become naturalized in Asia, Europe, North America, Oceania and South Africa (Kleinschmidt & Johnson, 1979; Joel & Liston, 1986; Hickman, 1993; Altinozlu & Donmez, 2003; Sanz *et al.*, 2004; Henderson, 2007; Champion *et al.*, 2010).

Araujia sericifera tends to grow in natural and disturbed habitats, where it is associated with forest and riparian vegetation (Csurhes & Edwards, 1998), as well as with species of economic interest, such as lemon and oranges trees (Sanz *et al.*, 2004; Vladimirov *et al.*, 2010). Its dense foliage smothers native shrubs and trees, and strangles

¹ Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agronómicas y de Los Alimentos, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Calle San Francisco S/N, Quillota, Chile.

² Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma, Avenida Universidad 330, Valparaíso, Chile. sebastian.cordero.r@mail.pucv.cl (corresponding author).

and causes breaks tree branches, interfering with its development and preventing their natural regeneration (Weber, 2003; Sanz *et al.*, 2004). For these reasons, it is considered as an invasive species in Australia, Israel, Italy, New Zealand, Spain, South Africa, and United States (Sanz *et al.*, 2004; D'Errico *et al.*, 2014). Also, it has been included in the risk list by European and Mediterranean Plant Protection Organization (D'Errico *et al.*, 2014).

Until now, no species of the genus *Araujia* has been described for Chile (Marticorena & Quezada, 1985; Zuloaga *et al.*, 2008), nevertheless, during 2016 and 2017, three populations of *A. sericifera* were first detected in central Chile. These populations inhabit urban settlements and crop fields, where they grow associated with other alien species. In order to increase the knowledge about alien plant species in Chile, the presence of *A. sericifera* in the country is reported for the first time, and a brief morphological description and an illustration of the species are also provided.

MATERIALS AND METHODS

During the Austral spring and summer of the years 2016 and 2017, several floristic surveys were conducted in agricultural crops from Valparaíso region of central Chile, in which were detected populations of an unknown species in three localities: Olmué, Petorca and Quillota. Then, specimens were collected, and identification keys were used.

In order to confirm that *A. sericifera* is reported for the first time for Chile, we look for other specimens of the species deposited in the SGO herbarium, as well as in checklists of the native and alien vascular Chilean flora (e.g. Marticorena & Quezada, 1985; Zuloaga *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2013).

RESULTS

Araujia sericifera Brot. *Trans. Linn. Soc. London* 12: 62, t. 4-5. 1818. Type: t. 4 in Brotero, *Trans. Linn. Soc. London* 12: 69, 1818 (Lectotype designated by Forster & Bruyns, *Taxon* 41: 746. 1992). Fig. 1.

= *Physianthus albens* Mart. *Nov. Gen. Sp. Pl.* 1: 54, t. 32. 1824.

= *Araujia albens* G. Don. *Gen. Hist.* 4: 149. 1837.

= *Araujia hortorum* E. Fourn. *Fl. Bras.* 6(4): 293, t. 84. 1885. ≡ *Araujia sericifera* Brot. var. *hortorum* (E. Fourn.) Malme. *Kongl. Vetensk. Acad. Handl. Ny Följd* 34: 74, t. 3, f. 7. 1900.

Sub-shrub climbing or vine, up to 5 m long, evergreen, lactiferous. Stem voluble, unbranched or branched, circular in cross section and densely pubescent at the apical region. Taproot, with a main axis and smaller secondary branches. Leaves simple, opposite, petiolate with petiole of 10-20 mm long, leaf blade ovate-oblong, ovate-lanceolate or subtriangular, 40-95 x 15-60 mm, apex acuminate, base truncate or lobate, margin entire, upper surface green and glabrous, and under surface canescent and densely pubescent. Inflorescences axillary of 2-5 flowers, sometimes solitary; bracts 4-10.1 x 0.9-1.9 mm; pedicels 10-16 mm long, pubescent. Calyx with 5 sepals, ovate or lanceolate, 8.5-13.3 x 5.7-8.1 mm. Corolla with tube of 11-16 x 21-28 mm, lobes 5 patent, oblong or ovate-acuminate, 7-9 x ca. 4 mm, apex obtuse, white or greenish dorsally and purple ventrally. Androecium with 5 stamens, pollinia gradually widening to the apex, forming a gynostegium inside the tube of the corolla. Follicle 85-125 x 35-55 mm, pruinous, pendulous greenish or brown. Seeds ca. 400 per fruit, 6.3-7.8 x 2.8-3.5 mm, compressed, oval-lanceolate, rough, with pappus sericeous, 25-40 mm long, white, deciduous.

Common names: “Cruel plant”, “doca”, “planta cruel”, “tasi”, “white bladderflower”.

Habitat, ecology and phenology

The presence of *A. sericifera* was recorded in three localities from Valparaíso region: Olmué, Petorca, and Quillota (Fig. 2). The populations from Olmué and Petorca grow in high density patches under the arboreal canopy of an avocado crop (*Persea americana* Mill.), and also climbing on lemon trees (*Citrus limon* (L.) Osbeck), orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), olive trees (*Olea europaea* L.), and grape vines (*Vitis vinifera* L.) in agricultural crops, in association with other alien herbaceous species, such as *Convolvulus arvensis* L., *Hirschfeldia incana* (L.) Lagr.-Foss., *Portulaca oleracea* L., and *Raphanus raphanistrum* L. On the other hand, the third population from Quillota grows into a peri-urban area, in association with other alien

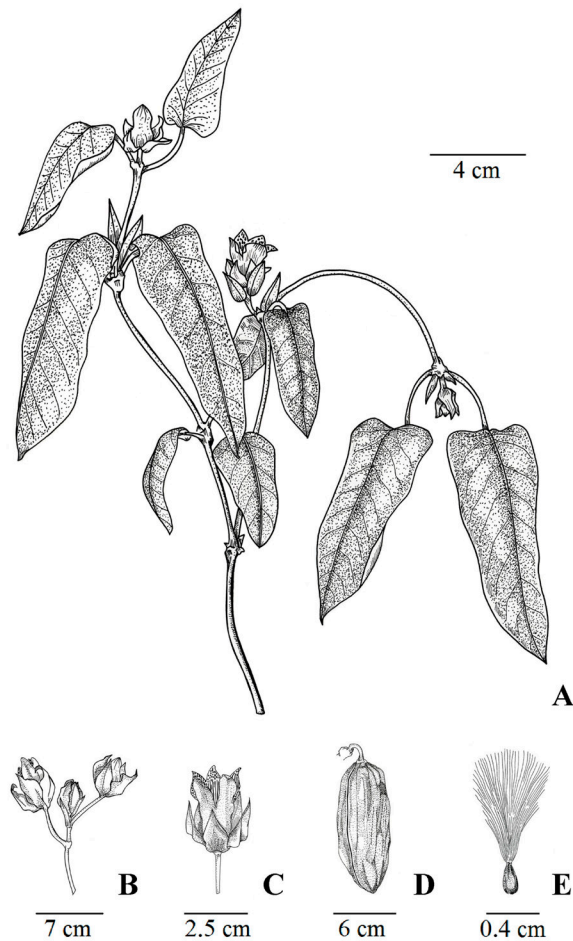


Fig. 1. *Araujia sericifera*. **A:** Floriferous branch. **B:** Inflorescence. **C:** Flower. **D:** Fruit. **E:** Seed. Santa Cruz s.n. (SGO 167373). Drawing by H. Tapia Berardi.

species, such as *C. arvensis*, *H. incana* and *Lactuca serriola* L., and climbing on *Acacia caven* (Molina) Molina and on fences of the nearby houses. In all the studied locations, *A. sericifera* exhibits vegetative growth throughout the year, occurring its flowering between the months of December and March.

Material examined. CHILE. *Reemplazar por Region of Valparaíso: Prov. Marga-Marga*, Olmué, 33°00'45''S 71°12'10'' W, 134 m, X-2016, Santa Cruz s.n. (SGO 167373); *Prov. Petorca*, Petorca, 32°16'45'' S 71°00'37'' W, 400 m, III-2017, Cordero s.n. (SGO 167343); *Prov. Quillota*, Quillota, 32°51'45'' S 71°14'09'' W, 144 m, XII-2016, Santa Cruz s.n. (SGO 167374).

DISCUSSION

Araujia sericifera is capable of sustain self-replacing populations without direct human intervention by recruitment from seeds and with independent growth, for this reason, the species is suitable to be categorized as a naturalized species, according to the classifications for alien species proposed by Pyšek *et al.* (2004). Other concepts for alien species, such as casual alien plants and transformers, are not applicable in this study for *A. sericifera* because its persistence is not due to repeated introductions and no changes in the character, condition, form or nature of ecosystems over a substantial area have been observed (Pyšek *et al.*,

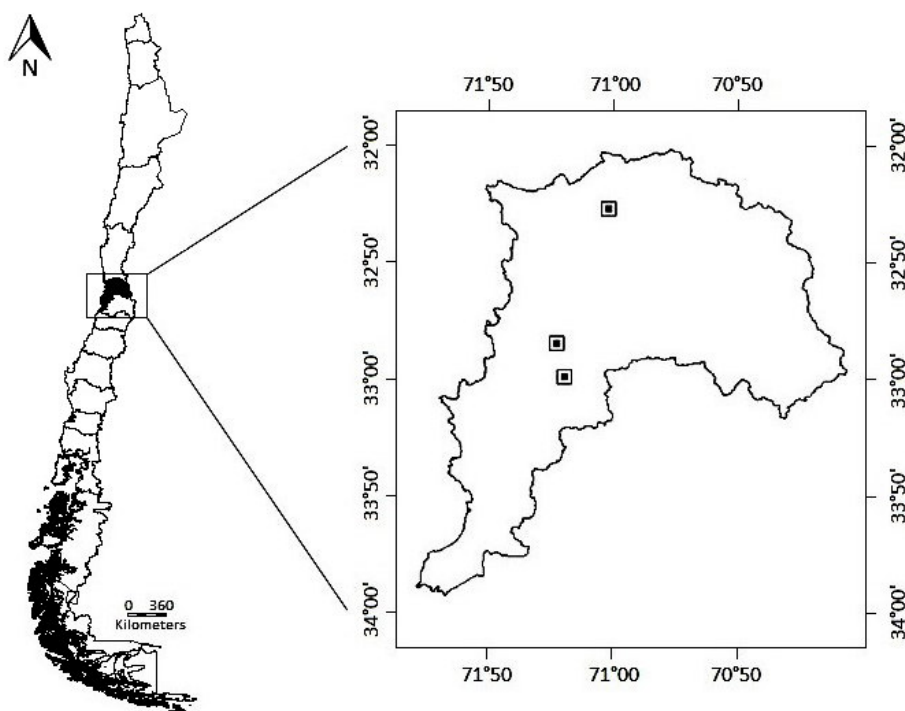


Fig. 2. Study area in Valparaíso region (central Chile), including new populations of *Araujia sericifera* (squares).

2004; Pyšek & Richardson, 2006). On the other hand, the lack of antecedents about the distance and time of spreading of the species since its arrival in central Chile and the fact that the studied populations do not expand in large geographical areas, make it impossible to categorize it as an invasive plant (Pyšek *et al.*, 2004).

Since *A. sericifera* is widely cultivated as an ornamental species in Valparaíso region, it is possible that the species has escaped from cultivation and naturalized in surrounding areas, and eventually establishing in agricultural crops. On the other hand, an alternative explanation based on the introduction of the species mediated by agricultural activities results less plausible because the presence of *A. sericifera* has been registered only in two fields of cultivation. Further, according to conversations with farmers and local people of Petorca, the presence of the species has been observed in the locality for at least 20 years, but only in recent years has it become more important as an agricultural weed.

In the agricultural plantations studied, the plants are controlled with herbicides and removed manually,

as they tend to suffocate and strangle tree branches, interfering with their development and consequently reducing their production. This behavior has also been observed in other parts of the world, not only in agricultural contexts, but also in natural environments (Weber, 2003; Sanz *et al.*, 2004). For these reasons, some preventive actions, such as avoiding the cultivation of the species for ornamental purposes in areas close to natural environments, and exhaustive inspections of agricultural fields to find new populations, could be key to control the range of expansion of the species in Chile.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Hugo Tapia Berardi for the illustration and Edson Peña for allowing us to access his property to study one of the populations and provide valuable background on the species. We also thank two anonymous reviewers for their comments and suggestions.

BIBLIOGRAPHY

- ALTINOZLU, H. & A. DONMEZ. 2003. *Araujia* Brot.: a new genus (Asclepiadaceae) record for Turkey. *Turk. J. Bot.* 27: 231-233.
- CHAMPION, P., T. JAMES & M. DAWSON. 2010. New names for New Zealand weeds. *N. Z. Plant Prot.* 63: 72-77.
- BFG-The Brazil Flora Group. 2015. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66: 1-29.
- BROOKS, M., C. D'ANTONIO, D. RICHARDSON, J. GRACE, J. KEELEY, J. DITOMASSO, R. HOBBS, M. PELLANT & D. PYKE. 2004. Effects of invasive alien plants on fire regimes. *BioScience* 54: 677-688.
- CSURHES, S. & R. EDWARDS. 1998. *Potential environmental weeds in Australia: Candidate species for preventative control*. Biodiversity Group, Environment Australia, Canberra.
- D'ERRICO, G., A. CRESCENZI & S. LANDI. 2014. First report of the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on the invasive weed *Araujia sericifera* in Italy. *Plant Dis.* 98: 1593-1593.
- FORSTER, P. I. & P. V. BRUYNS. 1992. Clarification of synonymy for the common moth-vine *Araujia sericifera* (Asclepiadaceae). *Taxon* 41: 746-749.
- FUENTES, N., A. PAUCHARD, P. SÁNCHEZ, J. ESQUIVEL & A. MARTICORENA. 2013. A new comprehensive database of alien plant species in Chile based on herbarium records. *Biol. Invasions* 15: 847-858.
- GAIG, P., V. GÁZQUEZ, M. LOMBARDERO, E. BOTEY & P. GARCÍA-ORTEGA. 2005. Moth plant (*Araujia sericifera*) allergy. *Allergy* 60: 1092-1093.
- HENDERSON, L. 2007. Invasive, naturalized and casual alien plants in southern Africa: a summary based on the Southern African Plant Invaders Atlas. *Bothalia* 37: 215-248.
- HICKMAN, J. C. 1993. *The Jepson manual: higher plants of California*. University of California Press, Berkeley.
- JOEL, D. & A. LISTON. 1986. New adventive weeds in Israel. *Israel J. Bot.* 35: 215-223.
- KLEINSCHMIDT, H. & R. JOHNSON. 1997. *Weeds of Queensland*. Government Printer, Brisbane.
- KUNKEL, G. 1984. *Plants for human consumption*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- LAMBON P., P. PYŠEK, C. BASNOU, M. HEJDA, M. ARIANOUTSOU, F. ESSL, V. JAROŠÍK, J. PERGL, M. WINTER, P. ANASTASIU, P. ANDRIOPOULOS, I. BAZOS, G. BRUNDU, L. CELESTI-GRAPOW, P. CHASSOT, P. DELIPETROU, M. JOSEFSSON, S. KARK, S. KLOTZ, Y. KOKKORIS, I. KÜHN, H. MARCHANTE, I. PERGLOVÁ, J. PINO, M. VILÁ, A. ZIKOS *et al.* 2008. Alien flora of Europe: species diversity, temporal trends, geographical patterns and research needs. *Preslia* 80: 101-149.
- MANCHESTER, S. & J. BULLOCK. 2000. The impact of non-native species on UK biodiversity and effectiveness of control. *J. Appl. Ecol.* 37: 845-864.
- MARTICORENA, C. & M. QUEZADA. 1985. Catálogo de la flora vascular de Chile. *Gayana Bot.* 42: 1-157.
- MCNEELY, J.A. 2005. Human dimensions of invasive alien species. In: MOONEY, H., R. MACK, J. MCNEELY, L. NEVILLE, P. SCHEI & J. WAAGE (eds.), *Invasive Alien Species*, pp. 285-309. Island Press, Washington.
- PYŠEK, P. & D. RICHARDSON. 2006. The biogeography of naturalization in alien plants. *J. Biogeogr.* 12: 2040-2050.
- PYŠEK, P., D. RICHARDSON, M. REJMÁNEK, G. WEBSTER, M. WILLIAMSON & J. KIRSCHNER. 2004. Alien plants in checklists and floras: towards better communication between taxonomists and ecologists. *Taxon* 53: 131-143.
- SANZ, M., E. DANA & E. SOBRINO. 2004. *Atlas de las plantas alóctonas invasoras en España*. Dirección General para la Biodiversidad, Madrid.
- VAN KLEUNEN, M., W. DAWSON, F. ESSL, J. PERGL, M. WINTER, E. WEBER, H. KREFT, P. WEIGELT, J. KARTESZ, M. NISHINO, L. A. ANTONOVA, J. F. BARCELONA, F. J. CABEZAS, D. CÁRDENAS, J. CÁRDENAS-TORO, N. CASTAÑO, E. CHACÓN, C. CHATELAIN, A. L. EBEL, E. FIGUEIREDO, N. FUENTES, Q. J. GROOM, L. HENDERSON, INDERJIT, A. KUPRIYANOV, S. MASCIADRI, J. MEERMAN, O. MOROZOVA, D. MOSER, D. L. NICKRENT, A. PATZELT, P. B. PELSNER, M. P. BAPTISTE, M. POOPATH, M. SCHULZE, H. SEEBENS, W.-S. SHU, J. THOMAS, M. VELAYOS, J. J. WIERINGA & P. PYŠEK. 2015. Global exchange and accumulation of non-native plants. *Nature* 25: 100-103.
- VLADIMIROV, V., F. DANE & K. TAN. 2010. New floristic records in the Balkans: 13. *Phytol. Balc.* 16: 143-165.
- WEBER, E. 2003. *Invasive Plant Species of the World: A Reference Guide to Environmental Weeds*. CABI Publishing, Wallingford.
- ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. J. BELGRANO (eds.). 2008. Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 107(2): 985-2286.

Recibido el 15 de enero de 2018, aceptado el 3 de abril de 2018. Editor: Diego G. Gutiérrez.

HONGOS ÚTILES Y TÓXICOS SEGÚN LOS YUYEROS DE LA PAZ Y LOMA BOLA (VALLE DE TRASLASIERRA, CÓRDOBA, ARGENTINA)

MARCO FLAMINI¹, MARÍA EUGENIA SUÁREZ^{2,3} y GERARDO ROBLEDO^{4,5}

Summary: Useful and toxic fungi according to the "yuyeros" of La Paz and Loma Bola (Valle de Traslasierra, Córdoba, Argentina). The importance of macrofungi –in both, practical and symbolic terms– among the different cultures can be appreciated in elements of their traditional art, mythology or material culture, and in the diversity of uses that they have; besides, they constitute an important source of monetary income and food for many families all over the world. In Argentina, and particularly in the province of Córdoba, published ethnomycological data are scarce and fragmentary. In order to contribute to reverse this situation, a qualitative ethnomycological research was carried out among Criollo peasants of the towns of La Paz and Loma Bola (Córdoba). Data were obtained through open interviews, the "walks-through-the-environment" technique, gathering of fungi and participant observation. Thirty one species were studied; 12 of them are used for one or more purposes, and 10 have some level of toxicity, according to the interviewees. A detailed description and analysis of the knowledge and uses of medicinal, ornamental, veterinary, dyeing and food species is presented. Vernacular knowledge allows people to discern among toxic and food species. The analysis of the results suggests that fungi are relevant for local peasants, and highlight the necessity and importance of the recovery and conservation of native forests of Córdoba.

Key words: Ethnobiology, mycology, ethnomycology, traditional knowledge, lichens, mushrooms, macrofungi.

Resumen: La relevancia práctica y simbólica que poseen los macrohongos en las distintas culturas se aprecia en elementos del arte tradicional, la mitología o la cultura material y en la diversidad de aplicaciones que poseen; constituyen además una importante fuente de ingresos y alimento para numerosas familias a nivel mundial. En Argentina, y particularmente en Córdoba, los datos etnomicológicos disponibles son escasos y fragmentarios. Para contribuir a revertir esta situación, se realizó una investigación etnomicológica con campesinos criollos de los poblados cordobeses de La Paz y Loma Bola. Se trabajó con un enfoque cualitativo; los datos se recopilaron mediante entrevistas abiertas, recorridos por el entorno con recolección de material de referencia y observación participante. Se estudiaron 32 especies fúngicas, de las cuales 12 poseen algún uso práctico y 11 algún grado de toxicidad, según los entrevistados. Se describen y analizan pormenores de conocimientos y usos de especies medicinales, ornamentales, tintóreas, alimenticias y veterinarias. Los saberes vernáculos permiten a la gente discernir entre especies tóxicas y alimenticias con certeza. El análisis de los resultados indica que los hongos son relevantes para los campesinos y resaltan la necesidad e importancia de la conservación y recuperación del bosque chaqueño serrano cordobés.

Palabras clave: Etnobiología, micología, etnomicología, conocimiento tradicional, líquenes, setas, macrohongos.

¹ Cátedra de Antropología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. flaminim@gmail.com

² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Grupo de Etnobiología. Buenos Aires, Argentina.

³ CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Micología y Botánica– CONICET (INMIBO). Buenos Aires, Argentina. eugesuarez78@gmail.com

⁴ Laboratorio de Micología, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal – CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

⁵ Fundación FungiCosmos, Córdoba, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La etnomicología es la rama de la etnobiología dedicada a investigar el papel de los hongos en las diversas culturas; en otras palabras, es un campo interdisciplinar que estudia las relaciones recíprocas entre uno o más grupos humanos y los hongos mediante la descripción, interpretación y análisis de los usos, creencias, percepciones, conocimientos y prácticas, tanto actuales como antiguos (Arora & Shepard, 2008; Yamin-Pasternak, 2011). Desde su establecimiento formal a mediados del siglo pasado, es indiscutible el fuerte y rápido desarrollo que vivió la materia hasta la actualidad, aunque la mayoría de los trabajos provienen del estudio en comunidades y pueblos mexicanos (Moreno Fuentes *et al.*, 2001; Ruán Soto, 2007).

Son ya numerosos los estudios que han demostrado la amplitud del conocimiento micológico tradicional y el destacado rol de los hongos, en especial los macrohongos (*i.e.* hongos con estructuras macroscópicas), en la vida cotidiana de muchas comunidades humanas alrededor del mundo: su relevancia práctica y simbólica se puede apreciar en el arte tradicional, en la mitología, en la cultura material y en la utilización para fines medicinales, alimenticios, enteogénicos, veterinarios, tintóreos, entre otros (Boa, 2004; Arora & Shepard, 2008; Malaisse, 2010; Yamin-Pasternak, 2011). Por ello, los hongos macroscópicos conforman uno de los grupos más importantes entre los productos forestales no madereros (PFNM) a nivel mundial, y constituyen real o potencialmente una significativa fuente de ingresos económicos y de alimento para numerosas familias que los recolectan (Boa, 2004; Kalac, 2009; Malaisse, 2010).

En Argentina, a excepción de unos pocos trabajos (Keller, 2008; Flamini *et al.*, 2015), la mayor cantidad de información etnomicológica se encuentra dispersa en investigaciones etnobotánicas realizadas desde distintos enfoques y en diferentes regiones del país, pero cuyo interés está centrado en las interrelaciones entre plantas y humanos y no en las existentes entre hongos y humanos (Filipov, 1997; Arenas, 2003; Domínguez Díaz, 2010; Hernández *et al.*, 2010; Keller, 2010; Martínez, 2007, 2010; Martínez & Cúneo, 2009; Ochoa *et al.*, 2010; Scarpa, 2012, 2013; Suárez & Arenas, 2012; Scarpa & Rosso, 2014; Suárez, 2014). También se pueden encontrar datos de interés

para la etnomicología en trabajos abordados desde la micología, la biología o la ecología (p. ej. Deschamps, 2002; Acosta, 2009; Niveiro *et al.*, 2009; Robledo & Urcelay, 2009; Fernández *et al.*, 2012). Con todo, salvo contadas obras (Keller, 2008; Flamini *et al.*, 2015; Suárez, 2014), la mayoría de los estudios citados se limitan a la mención y/o descripción de usos prácticos y algunos nombres vernáculos, dejando de lado el examen pormenorizado de las percepciones, clasificaciones y creencias locales, entre otros. Lo antedicho es particularmente válido para la provincia de Córdoba, ya que aparte de la información que brinda el trabajo etnomicológico de Flamini *et al.* (2015), sólo se cuenta con información parcial y general sobre usos y hongos útiles de contadas especies: *Calvatia cyathiformis* (Bosc) Morgan, *Phlebopus bruchii* (Speg.) Heinem. & Rammeloo, *Suillus granulatus* (L.) Roussel, *Suillus luteus* (L.) Roussel, *Usnea* spp. (Deschamps, 2002; Martínez & Planchuelo, 2003; Martínez, 2010; Arias Toledo, 2006; Trillo & Demaio, 2007; Furlan *et al.*, 2011). De este modo, la etnomicología en Córdoba y en el país resulta ser un campo prácticamente inexplorado.

El presente trabajo es la prosecución y complemento de uno anterior (Flamini *et al.*, 2015), y pretende contribuir al conocimiento de la etnomicología de la provincia, específicamente al de los habitantes de La Paz y Loma Bola. Para ello se plantearon como objetivos: a) Compendiar y describir en detalle los diferentes usos que asignan los yuyeros a los hongos y líquenes de su entorno e identificar las especies correspondientes; b) Analizar, desde una perspectiva etnomicológica, el empleo de cada hongo estudiado en función del contexto sociocultural de las personas involucradas, contrastando los datos con los resultados hallados por otros autores entre otros grupos humanos de la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Contexto ambiental y cultural

La investigación se desarrolló en el valle de Traslasierra de la Provincia de Córdoba, Argentina, en los poblados de La Paz (31°56'00"S 65°12'00"O) y Loma Bola (32°13'08"S 65°01'34"O) (Fig. 1), ubicados en el Departamento San Javier. La localidad

de La Paz está situada a 750 m.s.n.m. y cuenta con una población total de 1189 habitantes (INDEC, 2010). Loma Bola es un poblado que depende del municipio de La Paz, se encuentra a tan sólo 3 km de la plaza central de La Paz y cuenta con 418 habitantes (INDEC, 2010). Las principales actividades económicas de la zona son la producción de olivares y de plantas aromáticas; además hay una gran afluencia turística, principalmente durante el verano, por lo que muchas familias se dedican a la producción de artesanías y productos regionales para la venta al público (Buguña & Cometta, 2010). Desde el punto de vista fitogeográfico, el área de estudio se encuentra en el Distrito Chaqueño Serrano de la provincia Chaqueña, que se caracteriza por una vegetación dominada por bosques xerófilos de 'orco quebracho' [*Schinopsis lorentzii* (Griseb.) Engl., Anacardiaceae], 'molle' [*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl., Anacardiaceae] y 'coco' (*Zanthoxylum coco* Gillies ex Hook. f. & Arn., Rutaceae) (Cabrera, 1971; Luti *et al.*, 1979). Sin embargo, desde hace varias décadas los bosques de las zonas serranas de la provincia de Córdoba vienen sufriendo grandes transformaciones en su estructura, fisonomía y distribución, causadas principalmente por el avance de las urbanizaciones, la agricultura, la deforestación, los incendios, la invasión de especies exóticas y el sobrepastoreo (Aragón & Morales, 2003; Zak *et al.*, 2004). Por esos motivos, el paisaje actual está representado por un mosaico de manchones de bosque de especies nativas o de especies nativas y exóticas, junto con fachinales y pastizales de sustitución (Zak *et al.*, 2004). Además, en la zona existen extensas áreas forestadas con *Pinus* spp. (Pinaceae) que forman manchones de bosque monoespecíficos.

El contexto cultural de la zona de estudio está conformado por habitantes con distintos orígenes e historias de vida. En particular, la información disponible sobre aspectos socioculturales de las poblaciones de campesinos serranos de Traslasierra es realmente escasa, por lo cual se conformó un diagnóstico rural rápido de exploración (Coirini & Robledo, 1999) mediante la complementación de datos bibliográficos con otros obtenidos a campo. A partir del mismo se puede afirmar desde una perspectiva ética (Arenas & Martínez, 2012), que los colaboradores con quienes se trabajó son criollos (gente local no-indígena, en general de ascendencia mestiza) que viven o han pasado al menos parte de su vida en hogares dispersos en las laderas de las serranías, alejados del centro del pueblo e inmersos en

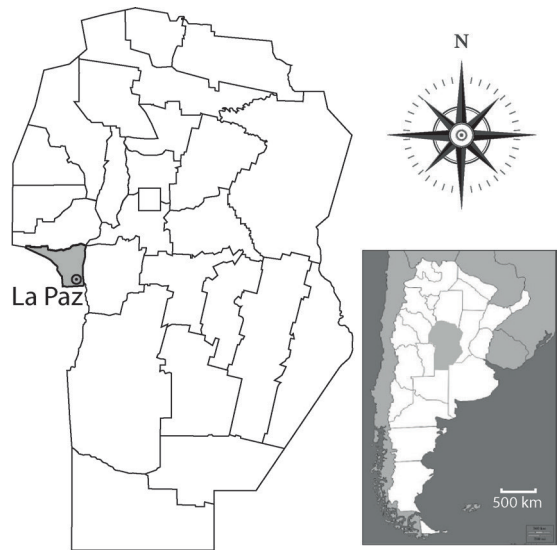


Fig. 1. Mapa del área de estudio, en la provincia de Córdoba, Argentina.

el monte. Todos hablan español como lengua materna. Actualmente, muchos viven en casas construidas a partir de barro, paja, rocas y troncos de árboles de la zona, con techo de paja y cañas, sin tendido eléctrico, gas natural ni agua corriente; otros están asentados en casas de material en los poblados de Loma Bola y La Paz. Habitualmente la vivienda está habitada por la familia extensa. Por las particularidades de su vida cotidiana, este grupo de personas mantiene un contacto íntimo con su entorno natural y cuenta con una larga tradición en la recolección, uso y comercialización de hierbas y hongos silvestres, motivo por el cual se autodenominan "yuyeros" (Fig. 2A). La economía familiar depende de actividades laborales informales, discontinuas y de marcada fluctuación estacional: venta de bienes y servicios vinculados al turismo (comercialización de hierbas aromáticas, hongos silvestres y productos regionales, guías de cabalgatas, etc.), changas y trabajos ocasionales como albañiles, trabajos en quintas y estancias con animales y cultivos, venta de leña, entre otros. Vale la pena destacar que el comercio de hierbas silvestres alcanza a involucrar hasta un 80% de los habitantes de la zona y es en gran medida la base de su subsistencia (Lagrotteria & Affolter, 1999). Particularmente las mujeres, además de realizar las tareas de mantenimiento del hogar, suelen trabajar como empleadas domésticas o cumplir distintas labores en hoteles y alojamientos



Fig. 2. Los yuyeros y sus hongos. **A:** Marcos cargando yuyos junto a su perro acompañante. **B:** Roberto picando “hongos de pino” (*Suillus granulatus*). **C:** Genaro recolectando “hongos de pino” (*S. granulatus*). **D:** Guillermina hilando lana de oveja teñida con “barba de piedra” (*Usnea* spp.). **E:** Maruca sosteniendo su hongo-velador donde se aprecia el píleo de *Ganoderma resinaceum*. Fotos: M. Flamini.

de la zona, y muchas veces desarrollan actividades vinculadas al arte textil (ya sea para venta o uso en el seno familiar) tales como hilados de lana de oveja, tinciones con anilinas, hongos y vegetales, y la confección de diversos tejidos. Los terrenos y casas donde vivieron sus antepasados hoy son en su mayoría propiedad de otras personas y se encuentran alambrados. En muchos casos las familias fueron coaccionadas para vender sus propiedades, y en otros fueron directamente despojadas de las tierras en las que históricamente habitaron; tan sólo tres son propietarios. El alcoholismo (especialmente entre los varones) y el Mal de Chagas son las principales problemáticas sanitarias que sufren.

Recopilación y análisis de los datos y materiales

La investigación se enmarca teórica y metodológicamente en la etnomicología, particularmente en su vertiente cualitativa (Mello Amorozo & Viertler, 2008; Arenas & Martínez,

2012). Se trabajó mediante la metodología ya clásica en etnobiología, que involucra tanto trabajo de campo como trabajo de gabinete y laboratorio (Martin, 1995; Yamin-Pasternak, 2011; Arenas & Martínez, 2012).

Se realizaron tres viajes de aproximadamente un mes de duración cada uno entre febrero de 2012 y marzo de 2013. Los trabajos de campo se concentraron en los meses de verano y principios del otoño, que son épocas de lluvia en la zona y por ende en las que resulta más probable encontrar estructuras fúngicas macroscópicas. Durante las campañas se entrevistó a un total de 14 personas (5 mujeres y 9 varones) de 46 a 99 años de edad, con quienes se tuvo un mínimo de 3 y un máximo de 7 encuentros de entre 1 y hasta 4 horas de duración cada uno.

Antes de comenzar el trabajo, se obtuvo el consentimiento informado de manera oral de cada una de las personas consultadas, siguiendo las recomendaciones del código de ética de la Sociedad Internacional de Etnobiología (ISE, 2006). Para la

selección de las personas entrevistadas se utilizó el método “bola de nieve” y se privilegió el trabajo con personas calificadas o informantes clave (Martin, 1995; Bernard, 2000).

Los datos se recopilaron a través de tres métodos: a) recorridos a pie por la zona en compañía de los entrevistados, b) entrevistas abiertas y semiestructuradas, con el apoyo de una guía temática confeccionada con antelación, y c) observación participante (Martin, 1995; Bernard, 2000; Guber, 2001; Arenas & Martínez, 2012). Durante las caminatas se recolectó material biológico de referencia. Para la recolección y conservación de las muestras fúngicas se siguieron los lineamientos descritos por Robledo & Urcelay (2009). Se recogieron también muestras de plantas que estaban vinculadas a los hongos, ya sea porque eran sustrato, porque según los campesinos guardaban algún otro tipo de asociación biológica, o porque se las nombraba en algún proceso o actividad que involucraba hongos. Los vegetales fueron recolectados y herborizados en el campo en pliegos de papel, y posteriormente trasladados al laboratorio para su identificación. Los nombres científicos de hongos y vegetales estudiados siguen las propuestas del “Index Fungorum” (<http://www.indexfungorum.org>) y de “The Plant List” (2013) respectivamente. Una vez identificados, los materiales se depositaron en el Herbario del Museo Botánico (CORD) de la Universidad Nacional de Córdoba.

La metodología de análisis de datos consistió en un estudio pormenorizado y de interpretación conjunta y holística del contenido de las entrevistas realizadas, de los datos provenientes de la observación participante y de la información encontrada en la bibliografía consultada, en función de los objetivos planteados (González Monteagudo, 2000; Guber, 2001; Arenas & Martínez, 2012; Wahyuni, 2012). Los análisis se realizaron considerando tanto la perspectiva del grupo humano bajo estudio (perspectiva émica) como el punto de vista de la ciencia académica (perspectiva ética) (Arenas & Martínez, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de la investigación se identificaron 32 especies de hongos conocidas por los colaboradores

(Flamini *et al.*, 2015); de ellas, 11 pueden ser tóxicas según los entrevistados y 12 tienen algún tipo de aplicación práctica. A continuación se detallan y analizan los resultados relativos a ambos casos.

Hongos tóxicos

Solamente dos especies han sido descritas por los yuyeros como hongos tóxicos para los humanos: *Chlorophyllum molybdites* (G. Mey.) Masee (Fig. 3A) y *Agaricus* sp. (Fig. 3B). Sin embargo, mencionan que *Phlebopus bruchii* y *Suillus granulatus* (Fig. 3C) -especies utilizadas con fines alimenticios-, tienen algún grado de toxicidad cuando están *negros* o *amojosados* (*i.e.* basidiomas atacados por moho) y, según algunos entrevistados, la gleba de los llamados “polvillo del diablo” (Fig. 3D, E) también puede tener efectos tóxicos al emplearla para fines medicinales (Tabla 1).

En cuanto a *Agaricus* sp. y *Chlorophyllum molybdites*, ningún entrevistado conoce a alguien que los haya consumido siquiera por error, ni tampoco saben con precisión la gravedad del problema que ocasionaría su ingestión o las formas de tratamiento; sólo apuntan que su consumo hace mal al estómago y que todos saben que no se debe comer. Afirman que el mero hecho de manipularlos no genera problemas, aunque algunos aclaran que lo mejor es lavarse las manos después de haber estado en contacto con ellos. Aseguran que el veneno no se concentra en ninguna parte del hongo en especial, sino que todo el basidioma es tóxico.

Dado el consenso generalizado entre los pobladores sobre la toxicidad de estos hongos, resulta de suma importancia para los yuyeros poder reconocerlos, lo cual realizan en base a características morfológicas discernibles a simple vista y que contrastan con aquellas que presentan los hongos alimenticios de la zona. Entre los principales caracteres se destacan:

1. La forma del basidioma y el himenóforo laminar: *es como una sombrillita* (basidioma), *y tiene como un librito por abajo, como unas hojitas larguitas* (laminillas del himenóforo).
2. El píleo y el estípite blancos, y las laminillas de color marrón oscuro o blanco: *es todo blanco por arriba y el palito, pero es negro, marrón oscuro o blanco por abajo*.
3. Presencia de restos de velo universal sobre el píleo: *tiene unas casquitas en la parte de arriba*.



Fig. 3. Algunos hongos y líquenes recolectados durante los recorridos por el bosque. **A:** “Hongo Veneno”, *Chlorophyllum molybdites*. **B:** “Hongo veneno”, *Agaricus* sp. **C:** “Hongo de pino”, *Suillus granulatus*. **D:** “Polvillo del diablo”, *Mycenastrum corium*. **E:** “Polvillo del diablo”, *Disciseda candida*. **F:** “Barba de piedra”, *Usnea* spp. Fotos: M. Flamini.

Por otra parte, los yuyeros sostienen que *Phlebopus bruchii* y *Suillus granulatus*, que son hongos alimenticios, no deben ser ingeridos cuando alguna parte del basidioma está negra o aguachenta, dado que en ese estado *hace mal a la panza* (afecta al aparato digestivo). Algunos comentan que en ese estado no deben siquiera recolectarse; otros opinan que se pueden juntar si el área afectada es pequeña y se la puede cortar. Todos coinciden en que desconocen casos de intoxicación en la zona o las formas de tratamiento, pero algunos consideran que un curandero podría solucionarlo.

De acuerdo a Domínguez & Hernández Caffot (2011), en la zona de estudio existen nueve especies de hongos tóxicos: *Agaricus* sp. (sección Xanthoderma), *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link, *Amanita muscaria* (L.) Lam., *Chlorophyllum molybdites*, *Coprinopsis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo, *Lepiota cristata* (Bolton) P. Kumm., *Leucocoprinus birnbaumii* (Corda) Singer, *Psilocybe coronilla* (Bull.) Noordel. y *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. Como puede verse,

las referencias a hongos tóxicos mencionadas por los entrevistados se condicen con la información académica disponible, al menos respecto a las especies *C. molybdites* y *Agaricus* sp. Aunque el material de referencia recolectado para *Agaricus* sp. no permite asegurar la identidad específica del mismo, los datos registrados en el momento de colecta no indican que los basidiomas tuvieran olor fuerte y desagradable, ni el píleo o contexto coloración amarillenta al rozarse o cortarse. Si bien esto sugiere que la especie referida por los entrevistados como tóxica no pertenece a la sección Xanthoderma y quizás entonces no sea tóxica, dada la alta similitud que existe entre distintas especies del género *Agaricus*, se justifica igualmente la actitud cautelosa que adoptan los entrevistados al considerar a los *Agaricus* spp. como tóxicos o potencialmente tóxicos. De manera similar, la distinción entre *Suillus granulatus* (comestible) y *Paxillus involutus* (tóxico), se basa en diferencias mínimas ya que poseen una gran similitud morfológica, se distribuyen en las

mismas zonas ecológicas y ambas se asocian a coníferas. En esta línea, cobra mucho sentido que el reconocimiento de especies de hongos tóxicos se base y haga hincapié en el contraste de características propias de dichos hongos y las de los alimenticios. Asimismo, existen referencias científicas sobre los peligros de intoxicación por consumo de *P. bruchii* y *S. granulatus* cuando los basidiomas se encuentran mojados, con moho o partidos (Domínguez & Hernández Caffot, 2011), lo cual refuerza la importancia de las medidas que adoptan los yuyeros al seleccionar basidiomas en buen estado.

La ausencia de intoxicaciones que mencionan los entrevistados podríamos atribuirla a los saberes especializados de quienes recolectan hongos y a los cuidados que ponen en la tarea, que son al parecer heredados de generaciones previas, y no conocimientos adquiridos por experiencias personales o de allegados. Ninguno de los campesinos ha sufrido intoxicaciones ni conocen casos que hayan ocurrido en la zona, lo cual es destacable, ya que no es inusual encontrar casos de intoxicación accidental en las comunidades alrededor del mundo que consumen y recolectan hongos habitualmente (Montoya *et al.*, 1998; Barron, 1999; García, 2004; Christensen *et al.*, 2008).

No existe consenso entre los yuyeros sobre la toxicidad de los “polvillo del diablo” (Tabla 1) para humanos u otros animales. Estos hongos son empleados en medicina humana y veterinaria vernáculas como cicatrizantes, para lo cual se aplica la gleba sobre las heridas (*vide infra*). Según algunos campesinos el problema estaría precisamente en el contacto de la gleba con la sangre. Sin embargo, al igual que lo referido para los demás hongos considerados tóxicos, no se conoce con exactitud cuáles son las dificultades que conllevaría, ni cómo tratarlas, y tampoco se conocen casos concretos de intoxicación. Otros entrevistados creen que se puede usar la gleba sin riesgo alguno si se tiene la precaución de mezclarla con aceite de ‘girasol’ (*Helianthus annuus* L., Asteraceae) o de aplicar primero el aceite y encima la gleba, para evitar así que *el polvillo se asiente en la sangre*. De todas formas, la recomendación general es usar poca cantidad de gleba. En definitiva, las opiniones referidas se pueden resumir en las siguientes cuatro posturas:

1. La utilización de la gleba con fines medicinales y veterinarios no acarrea efectos adversos.
2. La gleba se puede utilizar para fines veterinarios y medicinales pero teniendo cuidado en las dosis y considerando que los humanos son más sensibles que los animales (estos últimos poseen un *cuero más grueso*, cualidad que les conferiría mayor resistencia a potenciales efectos nocivos).
3. La gleba sólo puede ser utilizada en animales.
4. La gleba es tóxica y no se debe usar ni en animales ni en humanos.

A pesar de la diversidad de opiniones, un análisis integral y amplio de la información reunida permite concluir que la gleba puede ser utilizada tanto en animales como en humanos, aunque probablemente deba cuidarse la dosis administrada como sucede con cualquier medicina. Esta afirmación se basa, por un lado, en que muchos entrevistados han utilizado y utilizan de manera continuada la gleba de los “polvillo del diablo” en animales y en humanos, sin que se hayan registrado casos de intoxicación (según los testimonios recogidos); y por otro lado, en que existen numerosas referencias que documentan los usos de la gleba de Gasteromycetes para los mismos fines tanto entre criollos de la provincia de Córdoba (Martínez, 2010; Martínez & Luján, 2011) y de otras provincias (Scarpa, 2012), como entre indígenas del país (Filipov, 1997; Scarpa & Rosso, 2014; Suárez, 2014) y del mundo (Mapes *et al.*, 1981; Burk, 1983; Coetzee & van Wyk, 2009). Vale la pena aclarar que en algunas investigaciones se ha llegado a proponer al género *Calvatia*, y en particular a *C. cyathiformis* como un importante agente causante de alergias y otras reacciones adversas debido a la inhalación de grandes cantidades de esporas (Coetzee & van Wyk, 2009). Sin embargo, entre los problemas que causaría el uso medicinal de los “polvillo del diablo” nunca se mencionaron trastornos vinculados a la inhalación de esporas.

Hongos útiles

Los usos registrados para las 12 especies destacadas se organizaron *ad hoc* en cinco categorías: medicinales, veterinarios, tintóreos, alimenticios y ornamentales, que serán tratadas a continuación.

Medicinales, hongos que curan

Se registraron 9 especies con usos medicinales: *Usnea amblyoclada*, *Usnea angulata*, *Bovista*

Tabla 1. Especies fúngicas útiles y tóxicas estudiadas, sus nombres vernáculos, categoría, parte utilizada y modalidad de uso. Referencias: AL= alimenticio, MED= medicinal, OR= ornamental, TI= tintóreo, TÓ= tóxico, VET= veterinario.

FAMILIA/Nombre Científico/ Voucher (col. M. Flamini)	Nombre Vernáculo	Categoría	Parte Utilizada	Modo de Uso
AGARICACEAE				
<i>Agaricus</i> sp.; 23	Hongo veneno	TÓ		
<i>Bovista cunninghamii</i> Kreisel; 52	Polvillo del diablo	MED, VET	Gleba	Cicatrizante
<i>Calvatia cyathiformis</i> (Bosc) Morgan; 54	Polvillo del diablo	MED, VET	Gleba	Cicatrizante
<i>Calvatia fragilis</i> (Qué.) Morgan; 53	Polvillo del diablo	MED, VET	Gleba	Cicatrizante
<i>Chlorophyllum molybdites</i> (G. Mey.) Massee ex P. Syd.; 49	Hongo veneno	TÓ		
<i>Disciseda candida</i> (Schwein.) Lloyd; 1	Polvillo del diablo	MED, VET	Gleba	Cicatrizante
<i>Mycenastrum corium</i> (Guers.) Desv.; 2, 58	Polvillo del diablo	MED, VET	Gleba	Cicatrizante
BOLETINELLACEAE				
<i>Phlebopus bruchii</i> (Speg.) Heinem. & Rammeloo; 55, 57	Hongo de coco	AL	Talo entero	Alimentación, venta
GANODERMATAACEAE				
<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.; 44	Hongo de molle	OR	Talo entero	Hongo-velador, decoración de vivienda
GEASTRACEAE				
<i>Myriostoma coliforme</i> (Dicks.) Corda; 51	Polvillo del diablo	MED, VET	Gleba	Cicatrizante
PARMELIACEAE				
<i>Usnea amblyoclada</i> Müll. Arg.; 27, 59	Barba de piedra	MED, VET, TI	Talo entero	Desinfectante, tintura, diurético, digestivo
<i>Usnea angulata</i> Ach.; 63	Barba de piedra	MED, VET, TI	Talo entero	Desinfectante, tintura, diurético, digestivo
SCLERODERMATAACEAE				
<i>Scleroderma bovista</i> Fr.; 45	Polvillo del diablo	MED, VET	Gleba	Cicatrizante
SUILLACEAE				
<i>Suillus granulatus</i> (L.) Roussel; 26, 31, 32, 35, 46, 47, 50	Hongo de pino	AL	Talo entero	Alimentación, venta

cunninghamii, *Calvatia cyathiformis*, *Calvatia fragilis*, *Disciseda candida*, *Mycenastrum corium*, *Myriostoma coliforme* y *Scleroderma bovista*. Las primeras dos especies son líquenes denominados “barba de piedra”, mientras que las siete últimas son hongos gasteroides llamados “polvillo del diablo”. Cada una de las especies científicas que poseen un mismo nombre criollo se utiliza de la misma manera y para los mismos fines (Tabla 1).

Las “barba de piedra”

La recolección de “barba de piedra” (Fig. 3F) es una actividad que se puede realizar en cualquier momento del año ya sea para la venta o para el uso en el hogar. Estas especies son utilizadas para subsanar numerosos malestares y enfermedades (la

recetan incluso los/as curanderos/as de la zona), y prácticamente no ha sido sustituida por otras alternativas de la biomedicina. Por todo ello son muy valoradas y su empleo está ampliamente difundido. El uso medicinal de especies del género *Usnea* ha sido citado también en numerosas comunidades criollas e indígenas del país (Martínez & Planchuelo, 2003; Martínez, 2010; Arias Toledo, 2006; Scarpa, 2012, 2013; Trillo *et al.*, 2010; Furlan *et al.*, 2011; Suárez, 2014) y del mundo (Illana Esteban, 2012). Asimismo, en correlación con muchos de sus usos vernáculos, sendas pruebas de laboratorio sobre extractos de *Usnea* spp. han permitido verificar un efecto inhibitorio sobre la actividad bacteriana de ciertas cepas que afectan a humanos (Shukla *et al.*, 2010; Wendakoon *et al.*, 2012; Maharjan & Baral, 2013).

M. Flamini *et al.* - Hongos útiles y tóxicos según los yuyeros de La Paz y Loma Bola

Las “barba de piedra” se emplean para limpieza y desinfección de heridas, para aliviar dolores de garganta y muelas, para curar la disfonía y para otros trastornos del sistema respiratorio en general (flema, tos, anginas); dichos usos se sustentan en el efecto desinfectante que los campesinos le atribuyen porque, según explican, el líquen posee altas concentraciones de yodo [en la bibliografía consultada se constata la presencia de ácido úsnico en estas especies, el cual posee efectos antibióticos (Illana Esteban, 2012; Rodríguez & Estrabou, 2008)]. Salvo para tratar heridas, el modo de empleo más difundido consiste en hacer gárgaras al menos dos veces por día con una infusión aún tibia de 2-3 talos y sal, en una taza de té. Algunos entrevistados le adjudican además propiedades diuréticas que tendrían un efecto de *limpieza en los riñones* (i.e. desintoxicación de los riñones, asociado o no a síntomas como dolor de cabeza, dolor lumbar, fatiga, entre otros). En estos casos el brebaje se ingiere. Puede ser utilizada por cualquier persona sin restricciones de edad, género, gravidez, etc., pero sí suelen variar las concentraciones y algunos agregados (p. ej. para niños se emplean solo 1-2 talos para una taza).

Para limpiar y desinfectar heridas se realiza una decocción de 1-5 talos en 2-3 tazas de agua y sal, una vez templada la preparación, se lava la zona afectada repitiendo el proceso varias veces por día. Para contrarrestar dolores e infecciones de muelas, a diferencia de la otra modalidad, se agregan los talos cuando el agua llega al punto de hervor y se deja hirviendo entre tres y cinco minutos. Para limpiar y desinfectar heridas se vierte la preparación a temperatura ambiente directamente sobre la zona sentida y se limpia con una gasa o un trapo; se puede repetir la operación todas las veces que haga falta hasta que la herida quede impoluta. Se puede volver a colocar horas después pero siempre se debe limpiar y secar con una gasa y, en caso de ser posible, dejar la herida al descubierto *para que se airee*. Para aliviar dolores o infecciones en las muelas se realizan buches con el líquido aún tibio y luego se escupe. El proceso se debe repetir al menos dos veces y el tratamiento se debe prolongar hasta que desaparezca el malestar.

Aunque fueron citados solamente por un entrevistado, las “barba de piedra” tendrían dos usos medicinales más: uno para *aclarar la garganta* antes de cantar, y el otro para aliviar *dolores de riñones*

(efecto analgésico para dolores lumbares asociados a trastornos renales). Para esta última afección se emplea particularmente una mezcla de hierbas que incluye “barba de piedra”, ‘palo azul’ (*Cyclolepis genistoides* D. Don, Asteraceae), ‘cola de caballo’ (*Equisetum giganteum* L., Equisetaceae), ‘enebro’ (*Juniperus communis* L., Cupressaceae) y ‘uva ursi’ (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., Ericaceae). El entrevistado destaca que el ingrediente que verdaderamente tiene ese efecto de alivio en los riñones es el ‘palo azul’, y los restantes ingredientes –incluida la “barba de piedra”– pueden ser sustituidos por otros, manteniendo siempre la cantidad de ingredientes (cinco).

Otro registro interesante y novedoso es el empleo de las “barba de piedra” como parte de una preparación –“la mezcla de los 7 o 9 yuyos”– de efectos positivos para la salud: *hace bien tomarla / es muy buena digestiva / es buena para el estómago*, y que además tiene un sabor agradable. Esta mezcla es un remedio de tipo panacea: *con esa mezcla se puede curar casi cualquier cosa*. Lleva 7 o 9 ingredientes y se prepara como infusión (té o mezclas con mate). Es a base de ‘boldo’ (*Croton serratifolius* Baill o *Croton hirtus* L’Hér, Euphorbiaceae), y puede contener ‘cola de caballo’ (*Equisetum giganteum*), cáscara de ‘naranja’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, Rutaceae), ‘poleo’ (*Lippia* sp., Verbenaceae), ‘yerba del sapo’ (*Marrubium vulgare* L., Lamiaceae), ‘salvia lora’ (*Buddleja cordobensis* Griseb., Scrophulariaceae), ‘llantén’ (*Plantago* sp., Plantaginaceae) y “barba de piedra” (*Usnea* spp.), entre otros posibles ingredientes; es preciso aclarar que el repertorio de posibles ingredientes es finito y generalmente se repiten los mismos componentes.

Cualesquiera sean los ingredientes utilizados, y al igual que lo descrito más arriba para el dolor de riñones, se debe respetar por sobre todo el número de ingredientes, por tanto, el efecto curativo involucra no sólo los principios activos de las plantas sino también principios mágicos y simbólicos. Sobre este aspecto, Martínez & Planchuelo (2003), quienes también trabajaron con campesinos criollos de la provincia de Córdoba, hablan de “números potentes” que se configuran como una fuerza terapéutica más. Estos números son principalmente impares, usualmente el tres, el siete o el nueve. Por su parte, Arias Toledo (2006), trabajando también con criollos cordobeses, encontró resultados similares sobre un “té de los

siete yuyos”, en el que se destaca nuevamente el valor simbólico del número siete y su poder curativo. Lo mismo encontró Scarpa (2012) entre los criollos del oeste formoseño, para quienes 3 o 7 son los números de ingredientes apropiados en variadas recetas medicinales, asociándolo también a la potencia de estos números para la religión cristiana. En definitiva, aunque el uso de “barba de piedra” en esta preparación es opcional, es el primer registro de un hongo como parte integrante de esta medicina tan importante a nivel local y regional, cuyas connotaciones simbólicas resaltan aún más la trascendencia de las especies de líquenes registradas en el sistema medicinal de los serranos cordobeses.

La “barba de piedra” se encuentra distribuida, mayormente, en áreas alejadas de los poblados por lo que la recolección es realizada sobre todo por los habitantes de las zonas altas de la sierra. Bajan en caballos cargados con bolsas de nylon llenas con “barba de piedra” para venderlas en herboristerías y acopiadoras, y también para compartir con familiares y amigos. Los yuyeros de Loma Bola que viven más cercanos a los montes serranos también salen a recolectarlas pero con menor frecuencia, y en general sólo ante una necesidad puntual o un encargo de algún comerciante. Suelen salir a pie, temprano por la mañana, y se aprovecha el recorrido para recolectar otras hierbas; pocas veces se recolecta exclusivamente “barba de piedra”. Las hierbas se colocan por separado de las “barba de piedra”, ya que estas últimas se venden o utilizan directamente sin secar.

Los precios que se pagan varían mucho de acuerdo a las necesidades y habilidades comerciales de los yuyeros: en el año 2013 los entrevistados recibieron entre \$5 y \$20 (pesos argentinos) por cada kilo de “barba de piedra”. Para los criollos que no viven en las zonas altas serranas, la “barba de piedra” es uno de los recursos forestales no madereros que más se valora, ya que su recolección requiere mucho esfuerzo y sus usos son variados. Por esto, y debido a los bajos precios que se pagan, la mayoría prefiere recolectar y almacenar para el empleo en el hogar. Sin embargo, en los momentos del año en que hay escasez de alternativas laborales, ante un pedido concreto, salen a recolectar igualmente y reciben el dinero que se les ofrezca.

Los “polvillo del diablo”

En la práctica, el uso medicinal de los “polvillo del diablo” no se halla muy extendido, incluso entre quienes reafirman sus bondades son pocos

los que lo han usado alguna vez. A diferencia de las “barba de piedra”, están siendo reemplazados por medicamentos provenientes de la biomedicina. Sin embargo, el conocimiento sobre la utilización y los modos de aplicación sí están muy difundidos. La mayoría mencionó que a pesar de que están presentes en muchos y variados ambientes, se ha dado una merma sustancial en el uso debido a una disminución de estos hongos que podría estar asociada al avance de los procesos de deforestación y modificación del uso del suelo en la zona. A futuro, sería interesante indagar más a fondo sobre esto y si ocurre lo mismo con otras medicinas fúngicas o vegetales silvestres.

El principal empleo es como cicatrizante de heridas y quemaduras⁶ externas. Se utiliza la gleba de los basidiomas maduros: deben estar *marrones o negros por fuera, y secos y marrones por dentro*. Se aplica directamente la gleba sobre la zona afectada, previa desinfección de la herida. La cantidad es determinada a ojo y depende del tamaño de la herida, pero básicamente se debe cubrir espolvoreando con gleba toda el área lastimada, *como si se salara con el polvito*. Luego se deja la herida descubierta y se repite la aplicación hasta que cicatrice definitivamente. Explican que el efecto hemostático se debe a que la gleba es *secante, seca* la herida. Se puede utilizar también en forma de emplasto mezclando gleba con aceite de ‘girasol’, o colocando primero aceite y encima la gleba. Un dato sobresaliente surgido en las entrevistas es que ante una herida se puede combinar el uso de “barba de piedra” y “polvillo del diablo”. Primero se emplea la infusión de “barba de piedra” para limpiar y desinfectar la herida, y luego se aplica “polvillo del diablo” para favorecer la cicatrización; pasadas unas horas se repite el proceso. De esta manera, según explican, se puede prescindir completamente de utilizar medicamentos de origen farmacéutico.

El almacenamiento de “polvillo del diablo” no es habitual entre los yuyeros, pero si lo hacen, suelen acopiar al que consideran *el verdadero* “polvillo

⁶ En general la gente habla por un lado de *heridas* y por otro de *quemaduras*. Si bien las quemaduras podrían ser consideradas heridas desde la perspectiva ética, este último vocablo se emplea localmente para referirse a cortaduras, raspones y otras laceraciones, pero no a quemaduras.

del diablo”, *Calvatia cyathiformis*. Afirman que es el más eficiente y resulta el *más práctico de usar porque tira más polvo*. Se guarda seco, envuelto con papel dentro de una bolsa, y así se conserva durante meses. En el fundamento del uso de “polvillo del diablo” se puede apreciar claramente la influencia de la medicina humoral hipocrática [para consultar y ampliar sobre esta temática consultar a Foster (1994)], típica en las comunidades campesinas y criollas del país (Idoyaga Molina, 2001; Martínez & Planchuelo, 2003; Scarpa, 2012; Martínez, 2010). La gleba es considerada cicatrizante porque deseca heridas (que representan humedad), es decir responden a las nociones del equilibrio húmedo y seco: ante un problema húmedo se aplica un remedio seco. Asimismo, Scarpa (2012) encontró entre los criollos del oeste de Formosa que especies de *Usnea* son consideradas “cálidas” y se usan para curar trastornos “frescos”. A su vez, encontró que los problemas en las vías respiratorias corresponden a dolencias de índole “fresca”, por lo cual es muy probable que el uso de “barba de piedra” entre los yuyeros para ese tipo de problemas (es utilizada tibia o caliente), también responda a la teoría humoral hipocrática.

Veterinarios, medicinas para los animales

Las mismas especies que se emplean en medicina humana fueron también registradas por su utilidad en veterinaria. El uso veterinario de las “barba de piedra” y de los “polvillo del diablo” no es comúnmente practicado en la actualidad, aunque el conocimiento sobre las maneras de preparación y aplicación sí están muy difundidas. Esta disminución podría tener su razón en que ningún entrevistado posee actualmente ganado propio y la única posibilidad de aplicar estas medicinas es en sus trabajos cuidando ganado ajeno, pero en cuyo caso los dueños de los animales prefieren utilizar la biomedicina veterinaria.

Las “barba de piedra” se utilizan para la limpieza de heridas externas y los “polvillo del diablo” se usan como cicatrizantes, en ambos casos sobre todo a caballos y vacas. Los modos de uso son los mismos que los descriptos para humanos, sólo que se debe administrar mayor cantidad y en mayor concentración para que *penetre bien* y haga efecto, debido a que la piel de los animales, comentan, *es más gruesa*. Las proporciones son determinadas a ojo; estiman que para un caballo o una vaca son

necesarios uno o dos puñados de talos en un litro de agua, que deben hervir al menos durante cinco minutos. Se aplica mínimamente dos veces en el mismo día en que ocurrió la herida. También sirve para quemaduras.

No se han encontrado referencias sobre el empleo de *Usnea* spp. en la bibliografía consultada. Sin embargo, no sería extraño que esta práctica también sea llevada a cabo por criollos y/o indígenas de otras partes del país, ya que sí existe información sobre el uso de especies de *Usnea* como desinfectante aplicado a personas (Furlan *et al.*, 2011). Por el contrario, el uso de *Calvatia fragilis* y *Battarrea phalloides* (Dicks.) Pers. fue registrado entre los criollos del Noroeste argentino (Scarpa, 2012) y el de *Calvatia cyathiformis* entre criollos de las sierras de Córdoba (Martínez & Lujan, 2011), todas utilizadas como cicatrizantes de heridas externas en animales; de estas tres especies, las dos del género *Calvatia* también fueron consignadas en esta investigación para los mismos fines. Como aportes originales de uso veterinario de hongos en el país se encuentran las siguientes cinco especies: *Bovista cunninghamii*, *Disciseda candida*, *Mycenastrum corium*, *Myriostoma coliforme*, *Scleroderma bovista*.

En todas las modalidades de uso veterinario de “polvillo del diablo”, al igual que sucede en la medicina humana de los yuyeros, se puede apreciar nuevamente la influencia de la medicina humoral hipocrática en las prácticas de curación. En consonancia con esto, dada las notorias coincidencias en los modos de uso y preparación entre la medicina humana y animal, queda a la vista que separarlas no es del todo adecuado desde la perspectiva étnica, y tal como propone Scarpa (2012) para los criollos formoseños, la medicina tradicional veterinaria de los yuyeros forma parte de un sistema médico más amplio, que cuenta con un altísimo grado de coincidencias con los conocimientos y prácticas médicas aplicadas a personas en lo que a criterios terapéuticos, especies utilizadas y modos de preparación y aplicación respecta.

Hongos que tiñen

Entre los yuyeros, la tinción, el hilado y la confección de tejidos (de lana de oveja o de hilo de algodón industrial) son tareas casi íntegramente femeninas. Desde niñas, al tiempo que colaboran y acompañan a las mujeres adultas, se introducen

en el oficio. Los pormenores de la práctica de tinción de textiles entre criollos de Argentina han sido referidos por varios autores (Trillo & Demaio, 2007; Guerrero Maldonado, 2008; Keller, 2010; Palacio *et al.*, 2011; Suárez & Arenas, 2012). Se mencionarán aquí solamente detalles disímiles o importantes para nuestros objetivos.

Por lo general las materias primas utilizadas para teñir son especies vegetales de la zona, así como anilinas compradas en los poblados. Estas últimas son las preferidas porque son económicas, facilitan el trabajo y permiten una gran diversidad de colores. Todas las mujeres entrevistadas han teñido con tintes naturales y así continúan haciéndolo. En lo que respecta a los hongos, emplean líquenes para tal fin (*Usnea amblyoclada* y *U. angulata*). La búsqueda de hongos tintóreos siempre se realiza *aprovechando* las habituales salidas al campo para la recolección de hierbas silvestres medicinales. Sólo se recoge la cantidad de “barba de piedra” necesaria debido a la dificultad para encontrarlas y el esfuerzo extra que equivale.

El líquido de tinción se prepara en ollas de aluminio, de uso exclusivo para este fin. Se coloca la olla con agua al fuego usando *leñas fuertes* (‘chilca’, *Flourensia oolepis* S.F. Blake, Asteraceae; ‘molle’, *Lithraea molleoides*; ‘espinillo’, *Acacia caven* (Molina) Molina, Fabaceae). Luego que el agua hierve unos minutos, se agregan los talos y el mordiente (sal gruesa o alumbre), se deja hirviendo durante una hora y cada tanto se remueve con un palo, luego se retira del fuego y se deja reposar por 24hs aproximadamente. Posteriormente se calienta el líquido y se agrega el textil (hilado o sin hilar) y se deja alrededor de una hora o más, removiendo de vez en cuando. Por último, se retira la olla del fuego y se deja reposar toda la preparación por 24hs. Cuando se emplea lana hilada o hilos de algodón, antes de llevarlos a la olla se debe colar el líquido para que no se adhieran restos de material al hilo.

Las proporciones de hongos tintóreos y textil, así como el tiempo que debe permanecer la lana con las sustancias tintóreas, se determinan a ojo de acuerdo a los colores que se buscan, y dependen de la experiencia de cada persona. Sin embargo, una de las entrevistadas explicó que para la tinción de una olla de cinco litros de capacidad, llena de lana, se necesitan aproximadamente 100 gramos de “barba de piedra” seca y dos cucharadas soperas

de mordiente. Con esas medidas se obtiene lana de color marrón claro o amarillo. Una vez que la lana está teñida, se retira de la olla y se deja secar al sol. Si se usó lana sin hilar, luego que secó se realiza el tizado y finalmente el hilado con ayuda de un huso con tortero (Fig. 2D). De acuerdo a las entrevistadas es muy difícil obtener dos veces el mismo color debido a que cada talo individual cuenta con distintas cualidades tintóreas. Se puede mezclar la “barba de piedra” con otras plantas para obtener variaciones en los colores (diferentes tonalidades de amarillo y marrón).

La tinción de productos textiles con hongos ya ha sido registrada entre criollos e indígenas en nuestro país (Guerrero Maldonado, 2008; Keller, 2010), incluso también con especies del género *Usnea* (Trillo & Demaio, 2007; Palacio *et al.*, 2011; Suárez & Arenas, 2012). Por otro lado, llama la atención la amplia variedad de colores que se pueden obtener de las distintas especies de *Usnea*. Palacio *et al.* (2011), por ejemplo, encontraron que en algunas comunidades de Santiago del Estero se utilizaban ejemplares de *Usnea* spp. para obtener colores rojizos; según Suárez & Arenas (2012) la decocción de talos completos de *Usnea alata* Motyka produce tintes de color verde, marrón rojizo y tonos entre amarillo y anaranjado; Trillo & Demaio (2007) muestran que con *Usnea amblyoclada* se pueden obtener distintos colores, incluyendo distintas tonalidades de amarillo, anaranjado y marrón. Los resultados de los últimos dos artículos mencionados coinciden con lo que se registró en este trabajo con *U. amblyoclada* y *U. angulata*.

Los tejidos o las madejas de lana ovina hilada se venden por encargo y por lo general son trabajos esporádicos y aislados. Los tejidos que más se confeccionan y demandan son alfombras de pequeñas dimensiones, alforjas, aperos, fajas y cobijas. Los trabajos de tinciones con vegetales u hongos son mejor pagados que aquellos realizados con anilinas. A su vez, los entrevistados afirman que las tinciones con productos naturales son de mejor calidad: el color persiste más tiempo y se desgasta menos. En este sentido, aunque la tinción con anilinas es más rápida y permite obtener colores brillantes y variados, últimamente ha aumentado la demanda de productos artesanales teñidos con vegetales u hongos en la zona, lo cual a su vez ha incrementado e incentivado su elaboración.

Alimenticios, hongos que se comen

Se registraron dos especies de hongos silvestres alimenticios: *Phlebopus bruchii* y *Suillus granulatus*. Ambas son recolectadas y utilizadas tanto para la venta como para la alimentación de la propia familia. La cosecha de estos hongos no es una actividad prioritaria ya que la recolección de plantas medicinales es la principal tarea que desarrollan los yuyeros a lo largo de todo el año. Son pocos los que salen a juntar exclusivamente hongos, la mayoría aprovecha las salidas de recolección de plantas medicinales. Se realiza entre los meses de diciembre y abril, época en la que emergen los basidiomas, y por lo general uno, dos o hasta tres días después de una lluvia porque si no *se pasan y no sirven*. En ocasiones lo hacen a caballo, pero lo habitual es ir a pie. Las salidas para recolectar *P. bruchii* consisten en largas caminatas de dos o tres horas de duración por zonas boscosas y de pendiente marcada, y en ocasiones atravesando quebradas y terrenos muy escarpados. De esta forma, cada entrevistado visita diversos lugares del bosque serrano en búsqueda de *P. bruchii*; por lo general se buscan *molladas* (bosquecillos de *Lithraea molleoides*) o árboles de ‘coco’ (*Zanthoxylum coco*), debido a que consideran que existe un tipo de asociación particular, a veces directa a veces indirecta, en la distribución del hongo con esos árboles⁷. Cuando se llega a una zona de ‘cocos’ o a una *mollada*, se alejan del camino para buscar los hongos debido a que, por un lado, otras personas recorren esos mismos caminos y es muy probable que alguien ya haya recogido allí, y en segunda instancia porque consideran que crecen próximos entre sí, entonces, al hallar un basidioma, se examina cuidadosamente el terreno adyacente en busca de otros basidiomas: *donde hay uno siempre hay más*.

La búsqueda de *S. granulatus* se realiza en propiedades privadas forestadas con ‘pinos’ (*Pinus halepensis* Mill., Pinaceae) donde habitualmente vive alguna familia que cumple el rol de cuidadora (muchas veces son campesinos), que también salen a recolectar hongos, de modo que son ellos los que tienen prioridad en esas zonas (Fig. 2C).

⁷ Para más información sobre el tipo de vínculo y otros conocimientos de estos hongos con las especies arbóreas mencionadas, se recomienda consultar el trabajo de Flamini *et al.* (2015).

En estos casos, los recorridos son más cortos y las salidas más frecuentes. Según la opinión de los entrevistados los “hongos de pino” son *más fáciles de aparecer* y se encuentran en mayor cantidad que *P. bruchii*.

Por lo general los yuyeros saben de antemano qué lugares visitar: van a buscar hongos a zonas en los que ya han encontrado anteriormente, incluso cruzando alambrados. El aumento de campos alambrados fue citado por los entrevistados como la principal causa de la disminución en la recolección de hongos y plantas silvestres de los últimos años.

Las mujeres adultas salen acompañadas por sus hijos/as, en tanto que los varones generalmente lo hacen solos. Son entonces las madres quienes principalmente transmiten el conocimiento sobre la recolección de hongos. Otra forma de transmisión del conocimiento es observando trabajar a amigos o compañeros. Esta modalidad se cumple, principalmente, entre quienes nacieron y vivieron en las zonas más altas de las sierras ya que en esos lugares no crecen hongos comestibles, por lo que su primer contacto es cuando se mudan más abajo. En otras investigaciones realizadas en el país con grupos indígenas, y que incluyen datos sobre hongos alimenticios, se destaca la fuerte raigambre de la actividad en cada una de esas comunidades (Ladio & Lozada, 2000; Domínguez Díaz, 2010). El caso de los yuyeros es similar pero un poco más heterogéneo. Se registraron testimonios de personas nacidas durante la década de 1940, que alegan que ya sus padres recolectaban *Phlebopus bruchii* para su propia alimentación; incluso una entrevistada nacida en 1939 recordaba salir, durante su niñez, junto con sus abuelos a juntar “hongos de coco”. Sin embargo, todos estos registros corresponden a personas nacidas en las zonas de menor altitud. Entonces, para algunos la recolección de hongos comestibles cuenta con una muy rica historia, mientras que para otros (los originarios de las áreas alto serranas) es mucho más reciente pero no menos importante.

Por otra parte, la recolección de *S. granulatus* es bastante más reciente para todos los campesinos: estos hongos crecen asociados a *Pinus* spp. (todas son especies exóticas), por lo que, dado que las primeras plantaciones en la zona sucedieron durante la década de 1950 (Izurieta *et al.*, 1993), el vínculo no supera los cincuenta años. Esto podría ser uno de los fundamentos que justifique

el rechazo generalizado que tienen hacia el consumo de esta especie, a diferencia de *P. bruchii* que es más aceptada y mejor valorada en términos generales, ya que es una especie nativa que crece asociada a dos especies de árboles también nativos de la zona y que los yuyeros conocen muy bien.

Al ser consultados por la *aparición* de hongos silvestres alimenticios, los entrevistados comentaron que necesitan de la humedad que se puede acumular en la tierra o en las raíces de determinadas especies de árboles ('cocos', 'molles' o 'pinos'), es decir que *salen* con más facilidad en lugares sombríos y húmedos como los bosques y en las cercanías a ríos y arroyos, y allí van a buscarlos. En este sentido, dos entrevistados plantearon que la relación que mantienen los "hongos de comer" con los árboles bajo los que crecen, es similar a la de un fruto y el árbol que lo produce: *el hongo es como la fruta del palo*. La diferencia con los *verdaderos* frutos del árbol, explican, es que hongos y árboles son considerados dos tipos de organismos distintos donde uno, el árbol, hace posible el desarrollo del otro, el hongo.

Para el encuentro y reconocimiento de los hongos silvestres alimenticios es fundamental poseer una vista bien adiestrada para poder localizar hongos mimetizados con su entorno, entremezclados y escondidos entre la hojarasca y poder distinguirlos de otros hongos. Sin embargo, algunos entrevistados fueron capaces de reconocer hongos, que se encontraban secos y enteros o picados, por el olor más que por su aspecto. De esa forma, pudieron diferenciar ejemplares de hongos alimenticios de otros que no lo eran, y hasta distinguir entre pedazos secos de *P. bruchii* de otros de *S. granulatus*. En otras palabras, el olfato también es un sentido que se emplea y debe estar igualmente preparado. Los criterios para saber cuáles son las especies comestibles y la diferenciación entre ellas son variados, pero mayormente tienen que ver con particularidades morfológicas perceptibles a simple vista. Entre las principales destacan:

- Color de la superficie del píleo: marrón oscuro en *P. bruchii* y amarillo o marrón más claro para *S. granulatus*.
- El color de la superficie del himenóforo: es únicamente marrón o amarillo en los comestibles.
- Tipo de himenóforo de los hongos silvestres alimenticios: *es todo parejo con huequitos, como una esponja* (himenóforo poroide).

- Los "hongos de coco" son más oscuros y más grandes que los "hongos de pino".

Determinados ejemplares de las especies alimenticias no son recogidos cuando están negros o cuando tienen lo que los yuyeros llaman el *mojo* (moho). Incluso si son juntados por error y se ponen en contacto con otros hongos, estos también pueden *arruinarse o hacerse agua* (estado de pudrición o degradación avanzado). Tampoco son recogidos aquellos hongos que están dañados, o que hayan sido comidos por 'hormigas', o cuando al recogerlos se encuentran con 'bichitos bolita'⁸ debajo del píleo.

Las herramientas y elementos básicos que se llevan en cada salida son recipientes para acarreo, cuchillo y machete. Los recipientes que se usan son canastos de 'mimbre' (*Salix fragilis* L., Salicaceae) o de paja, bolsos, bolsas de nylon o bolsas de plástico tejido. De todos ellos, se recomienda usar los canastos porque así los hongos se airean y no se golpean o aplastan tanto.

El modo de recolección consiste en tomar directamente con la mano la parte basal del pie del hongo, procurando que el basidioma salga completo; algunos los sacan con ayuda de un cuchillo hundiéndolo en la tierra para sacar todo el cuerpo fructífero y otros cortan con un cuchillo el pie dejando parte del basidioma enterrado. Para *S. granulatus* se debe prestar especial atención ya que consideran que es frágil. Los colocan en el recipiente de acarreo acomodados con el pie hacia arriba, y procurando no amontonarlos ni apretarlos. Cuando además se sale a buscar plantas, éstas se colocan por separado de los hongos para no dañarlos. La cantidad que se recolecta en cada viaje depende de lo que haya disponible pero por lo general un máximo de unos 8 o 10 kilos por persona. Debido a las diferencias en los sustratos y las distribuciones de *P. bruchii* y *S. granulatus*, nunca se juntan en un mismo viaje, se colecta uno u otro.

Ya de regreso al hogar los hongos se sacan inmediatamente del recipiente y se colocan dispersos sobre alguna superficie limpia y seca. Este paso es muy importante porque de acuerdo a los testimonios recogidos si son dejados en el mismo recipiente todo el día se pueden echar a perder.

El proceso de secado resulta fundamental para lograr el almacenamiento a largo plazo. Se deben

⁸ Artrópodos del suborden *Oniscidea*.

cortar en rodajas longitudinales de un mínimo de 2 cm de espesor aproximadamente a *S. granulatus* (Fig. 2B), y un poco más pequeñas a *P. bruchii*. La diferencia, sostienen, se debe a que el primero tiene más agua y menos *cuerpo* o *sustancia*, entonces se seca más rápido y disminuye más su tamaño. Cuando se realiza el corte se debe procurar que el estípite no quede intacto porque de lo contrario el secado es más lento, de todas formas, el tamaño de corte es estipulado en base a las exigencias de los comerciantes que los compran. Si los hongos son para su propia alimentación no importa el tamaño. Deben ubicarse sin amontonar al sol, variando la duración según las condiciones climáticas. Las superficies utilizadas para el secado son: madera, zarzo de ‘cañas’ o de ‘mimbre’, cartón, cama elástica, lona, diario y chapa de zinc.

Durante el proceso de secado no se deben mojar porque se *hacen agua* o *amojosan* y se arruinan, de modo que si llueve se deben poner a cubierto. Por el mismo motivo, una recomendación adicional es entrarlos a la casa o tapparlos durante la noche para evitar el rocío y la humedad. Se calcula que por cada diez kilogramos de “hongos de pino” frescos se obtiene 1 kg de hongos secos, mientras que del “hongo de coco” se pueden obtener 2 kg. Una vez secos se almacenan en bolsas de nylon o de papel, siendo estas últimas las más recomendadas al menos durante los primeros días. Los hongos son conservados en la heladera o a temperatura ambiente dentro de la casa, hasta que se llega a acumular una cierta cantidad para entonces ser vendidos. Una recomendación habitual de los yuyeros para evitar que los hongos se *apolillen* (que sean comidos por ‘polillas’⁹ u otros insectos), es colocar en el recipiente donde se los conserva algunas hojas de ‘laurel’ (*Laurus nobilis* L., Lauraceae).

Sólo un entrevistado utiliza las dos especies de hongos alimenticios, mientras que los demás colaboradores que consumen hongos preparan comidas exclusivamente con *P. bruchii*. La mayoría considera que los “hongos de coco/molle” son mejor alimento que los “hongos de pino” porque *el árbol* (al que se asocian) *es mejor*, y *por eso* (los hongos) *tienen más sustancia*. Se recopilaron 6 recetas o formas de preparación: tuco de hongos secos para pastas, hongos secos fritos con huevo, estofados

con hongos secos, hongos secos en guiso de arroz o de fideos, milanesas de hongos frescos y hongos secos o frescos en escabeche. Para cualquiera de estas recetas, se pueden utilizar hongos frescos a los que, antes de poner a cocinar, se les retira la cutícula y/o la *barba* (estrato de tubos del himenóforo). La preparación más utilizada a partir de hongos secos es el tuco para pastas, mientras que los hongos frescos suelen prepararse sofreados con cebolla (*Allium cepa* L., Amaryllidaceae), ajo (*Allium sativum* L., Amaryllidaceae), carne bovina y huevo. Muchos consideraron que los hongos alimenticios son de un alto valor nutricional y los mencionaron como un sustituto de la carne, un entrevistado incluso comentó que *como es de la tierra es mejor alimento que la carne*.

La recolección de hongos alimenticios se realiza, principalmente, con la intención de obtener réditos económicos. Aunque no es la actividad económica primaria, ayuda mucho en las economías familiares, sobre todo entre mediados de febrero y abril, cuando se terminan los trabajos vinculados al turismo. La mayoría de los entrevistados reconoció que cada vez se sale con menor frecuencia a juntar hongos porque se encuentra cada vez menor cantidad. En este sentido, destacan que en los últimos 10 años se ha registrado una merma muy significativa de lluvias, lo que resulta condicionante para la aparición de los cuerpos fructíferos, lo cual, sumado a la deforestación de los bosques serranos y al alambrado y privatización de los campos, afecta considerablemente la actividad de recolección no sólo de hongos sino también de plantas, trabajos que son el sostén económico de numerosas familias.

Son los yuyeros quienes van a ofertar los hongos a los comercios, aunque en algunas ocasiones también les realizan encargos particulares. A excepción del Hotel Loma Bola, que también compra hongos frescos, todos los comerciantes compran exclusivamente hongos deshidratados. Los lugares de compra principales son herboristerías y almacenes de Loma Bola y La Paz, y dos hoteles de Loma Bola. Uno de los entrevistados tiene la posibilidad de trasladarse hasta la localidad de Merlo (provincia de San Luis), donde puede vender los mismos productos a mejores precios.

Los precios varían año a año y de acuerdo a la disponibilidad, es decir, el precio aumenta después de abril debido a la finalización de la temporada de hongos. Asimismo, aunque existe cierta uniformidad

⁹ Orden *Lepidoptera*, especie no identificada.

en los precios, los comerciantes son quienes los establecen, por lo que también se paga de acuerdo a las habilidades individuales y urgencias económicas de cada yuyero. Prueba de ello es la variación del precio registrado durante abril de 2013: en algunos establecimientos se pagaba \$10 por el kilo de “hongo de pino” o “de coco” fresco y \$40 por el kilo de hongo seco, mientras que en otros se pagaba entre \$120 y \$150 el kilo de “hongo de coco” seco; en Merlo algunos negocios pagaban hasta \$300 el kilo de “hongo de coco” seco (fraccionado en paquetes de 100 gramos), con un piso mínimo de \$200 el kilo.

Comparativamente, el precio que se paga por el kilo de hongos es en promedio varias veces superior al que se paga por el kilo de ‘peperina’ [*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, Lamiaceae], que es la hierba silvestre de mayor precio entre todas las que juntan los yuyeros (en marzo de 2013 se pagaba entre 30 y 50 pesos por kilo seco y picado). Las cantidades de hongos recolectados en cada año varían según una multiplicidad de factores (*vide supra*). De todas maneras, podemos tener una primera idea de los montos anuales que se pueden conseguir tomando como ejemplo el caso de un informante, que reveló que entre los meses de diciembre de 2012 y febrero de 2013 pudo recolectar aproximadamente 3 kg de *Phlebopus bruchii* (peso ya deshidratado), y considerando que consigue venderlos en Merlo a un precio de entre doscientos y trescientos pesos argentinos por kilo, la extrapolación daría una suma de entre seiscientos y novecientos pesos en ese lapso, sólo por *P. bruchii*. Vale la pena destacar, que de acuerdo a éste y a otros entrevistados el verano de 2012/2013 fue muy seco, por lo que la recolección no fue buena. Teniendo esto en cuenta, y que en ese momento la temporada aún no terminaba (se puede prolongar hasta abril inclusive), se podría considerar que esos valores son un piso mínimo del aporte económico de la temporada de tan sólo una de las especies que se recolectan para la venta. En conclusión, económicamente, la ventaja de la venta de hongos radica en el hecho que, si bien es un recurso que depende de múltiples factores ambientales que lo convierten en un recurso inestable aún durante la temporada, se obtiene una gran cantidad de dinero en poco tiempo y que en el caso de secarlos, se pueden almacenar y vender en momentos del año que el trabajo escasee.

Hoy en día la recolección de hongos está más enfocada a la venta, pero antiguamente sólo se usaban para consumo en el hogar. De acuerdo a algunos entrevistados la venta de hongos comenzó hace aproximadamente unos sesenta años (cuando el turismo cobró mayor trascendencia en la zona), y tomó más énfasis con el auge del comercio de hierbas silvestres medicinales. En la actualidad, por el precio y la escasez se han convertido en un artículo de lujo para los campesinos, y aún cuando reconocen su alto valor nutricional y en algunos casos aprecian su sabor, hoy prefieren venderlos. Esto último contrasta con lo registrado en distintas culturas del mundo, como en comunidades mestizas mexicanas (Ruán Soto *et al.*, 2009), en comunidades indígenas de Camerún (van Dijk *et al.*, 2003) y Nigeria (Okigbo & Nwatu, 2015) o entre los sherpas nepaleses (Giri & Rana, 2008), que consideran a los hongos como un sustituto más económico de la carne.

Ornamental, hongo decorativo

Fueron descritas tres modalidades de uso ornamental para *Ganoderma resinaceum*: un velador de madera al que se le adhirió un basidioma seco, el uso como elemento decorativo en el patio y para decoración en el interior de la vivienda.

El hongo-velador observado está conformado por una base de madera de ‘espinillo’ (*Acacia caven*) con forma piramidal, fijada a una columna también de la misma madera, engrosada en el centro. Termina en una pantalla que cubre el foco. En la columna de la lámpara está adherido el píleo de un ejemplar de *G. resinaceum* que tiene un diámetro de 20 cm aproximadamente (Fig. 2E). En el interior de una vivienda se observó un ejemplar de *G. resinaceum* seco colocado sobre una repisa a modo de decoración. En el patio de otra vivienda, sobre un árbol adulto de ‘molle’ (*Lithraea molleoides*), han surgido sucesivos basidiomas de *G. resinaceum*. En el seno de la familia consideran que, por su combinación de colores, tamaño y aspecto brillante como si estuviera barnizado (por la laca del píleo), el hongo posee una particular belleza y hace que el árbol esté más lindo. Tal es el valor que le asignan a esta especie que, para que sigan apareciendo, riegan la base del tronco donde ya se han desarrollado basidiomas, y le quitan las malezas y basura a su alrededor para que quede mejor expuesto.

Recapitulación y comentarios finales

Los resultados de este trabajo muestran que los hongos lejos de ser ignorados o desconocidos por los pobladores locales, ocupan un lugar destacado en sus vidas y que muchas de las aplicaciones registradas son importantes en distintos ámbitos de su cultura (medicina, veterinaria, alimentación, textil, decoración y podría agregarse comercio). De las 32 especies estudiadas, el 37,5% tiene alguna utilidad práctica en la vida cotidiana de la gente local, y en general la mayoría de las especies útiles sirven para más de una finalidad. Las categorías de uso medicinales y veterinarios son las que más especies involucran (9 cada una) (Fig. 4), pero aunque las formas de tratamiento y dosis difieren, se trata de las mismas 9 especies que además sirven para fines o propósitos similares. Por otro lado, a juzgar por los resultados obtenidos, podríamos afirmar que los hongos alimenticios a pesar de ser solamente dos especies, ocupan un rol fundamental para la economía de muchas familias y quizás por ello son de los más relevantes para su vida cotidiana.

El análisis de los resultados obtenidos en conjunto con aquellos presentados en nuestra contribución anterior (Flamini *et al.*, 2015) indica que la importancia local de los hongos no sólo

radica en los distintos usos prácticos que estos poseen; su relevancia excede el nivel utilitario, ya que muchos de los hongos conocidos por los entrevistados no son empleados (20 de 32 estudiados), pero sí son nombrados, observados en detalle y clasificados. De todas formas, teniendo presente los pormenores descriptos para los hongos útiles en contraposición a lo registrado para los demás, pareciera que los yuyeros conocen en mayor detalle y profundidad aquellos hongos que revisten alguna utilidad práctica.

Para terminar, debe destacarse que el conocimiento y entendimiento de los vínculos entre los pobladores locales y los hongos de su entorno resultan clave para contribuir en la elaboración de proyectos de desarrollo local que sean factibles, sustentables y de interés para las comunidades. A ello pretende contribuir este artículo. De igual manera, se espera que los resultados del presente trabajo sean un puntapié para fomentar futuros estudios etnomicológicos en el país en esta y otras sociedades, los cuales resultan urgentes en un contexto en el que la diversidad biocultural, así como saberes y prácticas tradicionales de los pobladores criollos e indígenas de Argentina se encuentran seriamente amenazados.

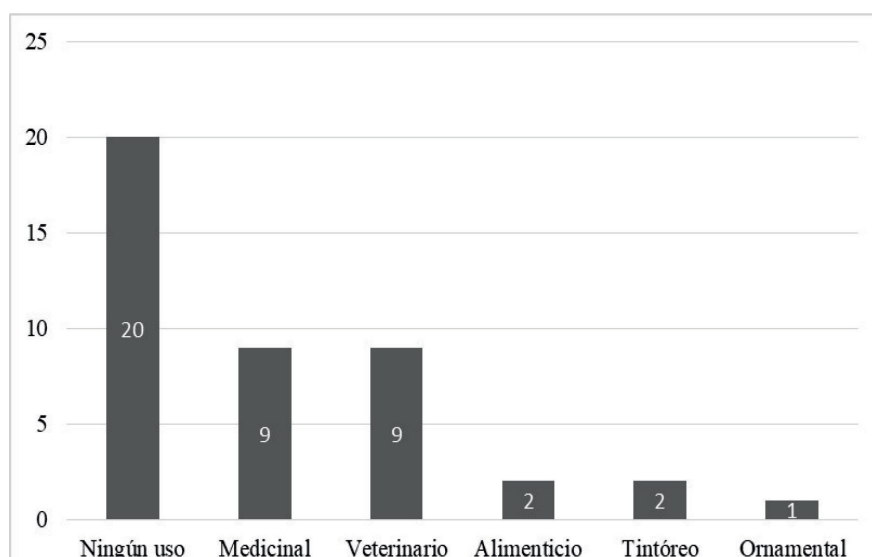


Fig. 4. Número de especies empleadas según categoría de uso.

AGRADECIMIENTOS

A todos los entrevistados que tan gentilmente nos abrieron las puertas de sus casas y compartieron los relatos y conocimientos que hicieron posible este trabajo. A la familia Rintisch por todo el apoyo durante los viajes. A Juan Manuel Rodríguez y Bernardo Lechner por la colaboración desinteresada con la identificación de líquenes y Agaricales respectivamente. Al CONICET y a la ANPCyT, que financiaron parcialmente esta investigación, y a la Universidad Nacional de Córdoba que proveyó espacio, equipamiento y materiales para el mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, C. A. 2009. *Varietades de vegetales y de hongos existentes en la República Argentina y poseedoras de principios Psicoactivos*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- ARAGÓN, R. & J. M. MORALES. 2003. Species composition and invasion in NW Argentinian secondary forests: Effects of land use history, environment and landscape. *J. Veg. Sci.* 14: 195-204.
- ARENAS, P. 2003. *Etnografía y alimentación entre los Toba-Nachilamolettek y Wichí-Lhuku'tas del Chaco Central (Argentina)*. Editor Pastor Arenas, Buenos Aires.
- ARENAS, P. & G. J. MARTÍNEZ. 2012. Estudio etnobotánico en regiones áridas y semiáridas de Argentina y zonas limítrofes. Experiencias y reflexiones metodológicas de un grupo de investigación. En: ARENAS, P. (ed.), *Etnobotánica en zonas áridas y semiáridas del Cono Sur de Sudamérica*, pp. 11-43. CEFYBO-CONICET, Buenos Aires.
- ARIAS TOLEDO, B. 2006. Aspectos cuantitativos, cualitativos y simbólicos de la medicina tradicional de los pobladores criollos de Cerro Colorado (Córdoba, Argentina). *PINACO-Investig. Antropol. Cog.* 6: 105-115.
- ARORA, D. & G. H. SHEPARD. 2008. Mushrooms and Economic Botany. *Econ. Bot.* 62: 207-212.
- BARRON, G. 1999. *Mushrooms of northeast North America: Midwest to New England*. Long Pine, Edmonton.
- BERNARD, H. R. 2000. *Social Research Methods: Qualitative and Quantitative Approaches*. SAGE Publications, California.
- BOA, E. 2004. *Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people*. Non-Wood Forest Products 17. FAO, Roma.
- BUGUÑA, P. & C. I. COMETTA (coords.). 2010. Diagnóstico preliminar y formulación de proyectos. Municipalidad de La Paz, Valle de Traslasierra. Provincia de Córdoba, Argentina. Instituto del Ambiente Liliana Rainis. FAUDI-UNC. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/45058814/Diagnostico-La-Paz> [Acceso:14-08-2017].
- BURK, W. R. 1983. Puffball usages among North American Indians. *J. Ethnobiol.* 3: 55-62.
- CABRERA, A. L. 1971. Regiones fitogeográficas de la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 14: 1-42.
- CHRISTENSEN, M., S. BHATTARAI, S. DEVKOTA, & H. O. LARSEN. 2008. Collection and use of wild edible fungi in Nepal. *Econ. Bot.* 62: 12-23.
- COETZEE, J. C. & A. E. VAN WYK. 2009. The genus *Calvatia* ('Gasteromycetes', Lycoperdaceae): A review of its ethnomycology and biotechnological potential. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 6007-6015.
- COIRINI, R. & C. W. ROBLEDO. 1999. Elementos de Diagnóstico Rural Rápido. En: CASERMERIO, J. & E. SPAHN (eds.), *Sistemas agroforestales para pequeños productores de zonas húmedas*, pp. 158-163. Universidad Nacional de Entre Ríos, Entre Ríos.
- DESCHAMPS, J. R. 2002. *Hongos silvestres comestibles del Mercosur con valor gastronómico*. Documento de Trabajo N° 86, Universidad de Belgrano. Disponible en: <http://repositorio.ub.edu.ar/handle/123456789/433> [Acceso: 12-09-2017].
- DOMÍNGUEZ, L. S. & M. L. HERNÁNDEZ CAFFOT. 2011. *Hongos venenosos de Córdoba*. Infografía publicada por el Ministerio de ciencia y tecnología del gobierno de la Provincia de Córdoba. Disponible en: <http://www.efn.uncor.edu/departamentos/divbioeco/divveg1/lab%20micologia/archivos%20fotos/afiche-hongos%20venenosos%20toxicos.pdf> [Acceso: 14-08-2017].
- DOMÍNGUEZ DÍAZ, E. 2010. Flora de interés etnobotánico usada por los pueblos originarios: Aónikenk, Selk'nam, Kawésqar, Yagan y Haush en la Patagonia Austral. *Dominguezia* 26: 19-29.
- FERNÁNDEZ, M. V., C. BARROETAVERÑA, V. BASSANI & F. RÍOS. 2012. Rentabilidad del aprovechamiento del hongo comestible *Suillus luteus* para productores forestales y para familias rurales de la zona cordillerana de la provincia del Chubut, Argentina. *Bosque* 33: 43-52.
- FILIPOV, A. 1997. La farmacopea natural en los sistemas terapéuticos de los indígenas Pilagá. *Parodiana* 10: 35-74.
- FLAMINI, M., G. L. ROBLEDO & M. E. SUÁREZ. 2015. Nombres y clasificaciones de los hongos según los campesinos de La Paz (Valle de Traslasierra, Córdoba, Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 50: 265-289.

M. Flamini *et al.* - Hongos útiles y tóxicos según los yuyeros de La Paz y Loma Bola

- FOSTER, G. 1994. *Hippocrates' Latin American legacy: humoral medicine in the New World*. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- FURLAN, V., C. TORRES & L. GALETTO. 2011. Conocimiento y utilización de plantas medicinales por pobladores rurales del bosque chaqueño serrano de Córdoba (Argentina). *Bonplandia* 20: 179-201.
- GARCÍA, R. M. 2004. *Guía fácil de las mejores setas*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.
- GIRI, A. & P. RANA. 2008. Ethnomycological knowledge and nutritional analysis of some wild edible mushrooms of Sagarmatha National Park (SNP). *Nepal. J. Nat. Hist. Mus.* 23: 65-77.
- GONZÁLEZ MONTEAGUDO, J. 2000. El paradigma interpretativo en la investigación social y educativa: nuevas respuestas para viejos interrogantes. *Cuestiones pedagógicas* 15: 227-246.
- GUBER, R. 2001. *La Etnografía: método, campo y reflexividad*. Norma, Bogotá.
- GUERRERO MALDONADO, N. 2008. *Uso y valoración de plantas medicinales y tintóreas presentes en Santiago del Estero, Argentina*. Proyecto de fin de carrera. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- HERNÁNDEZ, M. P., S. M. CIVITELLA & V. G. ROSATO. 2010. Uso medicinal popular de plantas y líquenes de la Isla Paulino, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *BLACPM* 9: 258-268.
- IDOYAGA MOLINA, A. 2001. Etiologías, síntomas y eficacia terapéutica. El proceso diagnóstico de la enfermedad en el noroeste argentino y Cuyo. *Mitológicas* 16: 9-43.
- ILLANA ESTEBAN, C. 2012. Líquenes usados en medicina tradicional. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 36: 163-174.
- INDEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2010. República Argentina. Censo 2010.
- ISE (International Society of Ethnobiology), 2006. International Society of Ethnobiology Code of Ethics (with 2008 additions). Disponible en: <http://ethnobiology.net/code-of-ethics/> [Acceso: 24-08-17].
- IZURIETA, G., D. ABUD & J. IZAURRALDE. 1993. Plantaciones de pinos en la provincia de Córdoba. En: *Actas de Congreso Forestal Argentino-Latinoamericano*, pp. 354-364. A.Fo.A, Paraná.
- KALAC, P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chem.* 113: 9-16.
- KELLER, H. A. 2008. Relación entre las dimensiones del cuerpo fructífero y el pseudoesclerocio de *Lentinus velutinus* (Lentinaceae-Poriales), validación de una hipótesis sugerida por los guaraníes de Misiones, Argentina. *Bonplandia* 17: 29-34.
- KELLER, H. A. 2010. Plantas colorantes utilizadas por los guaraníes de Misiones, Argentina. *Bonplandia* 19: 11-25.
- LADIO, A. H. & M. LOZADA. 2000. Edible wild plant use in a Mapuche community of northwestern Patagonia. *Hum. Ecol.* 28: 53-71.
- LAGROTTERIA, M. & M. AFFOLTER. 1999. Sustainable production and harvest of medicinal and aromatic herbs in the Sierras de Córdoba Region. Argentina. En: NAZAREA, V. D. (ed.), *Ethnoecology: Situated Knowledge/Located lives*, pp. 175-189. The University of Arizona Press, Tucson.
- LUTI, R., M. A. BERTRAND DE SOLIS, F. M. GALERA, N. MÜLLER, M. BERZAL, M. NORES, M. A. HERRERA & J. C. BARRERA. 1979. Vegetación. En: VÁZQUEZ, J. B., R. MIATELLO & M. E. ROQUÉ (eds.), *Geografía Física de la Provincia de Córdoba*, pp. 297-368. Boldt, Córdoba.
- MAHARJAN, B. L. & B. BARAL. 2013. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Some Nepalese Medicinal Plants. *Amer. J. Pl. Sci.* 4: 1660-1665.
- MALAISSÉ, F. 2010. *How to live and survive in Zambebian open forest (Miombo ecoregion)*. Presses agronomiques de Gembloux, Gembloux.
- MAPES, C., G. GUZMÁN & J. CABALLERO. 1981. *Etnomicología purépecha. El conocimiento y uso de los hongos en la cuenca del lago de Pátzcuaro, Michoacán*. Dirección General de Culturas Populares, Secretaría de Educación Pública/Instituto de Biología, UNAM/Sociedad Mexicana de Micología, México D.F.
- MARTIN, G. J. 1995. *Ethnobotany: a methods manual*. Chapman & Hall, London.
- MARTÍNEZ, G. J. 2007. La farmacopea natural en la salud materno-infantil de los Tobas del Río Bermejito. *Kurtziana* 33: 39-63.
- MARTÍNEZ, G. J. 2010. *Las plantas en la medicina tradicional de las sierras de Córdoba. Un recorrido por la cultura campesina de Paravachasca y Calamuchita*. Ediciones del Copista, Córdoba.
- MARTÍNEZ, G. J. & P. CÚNEO. 2009. Las denominaciones vernáculas y el conocimiento toba del entorno vegetal. *Revista de Dialectología y Tradiciones Populares* 64: 149-168.
- MARTÍNEZ, G. J. & M. C. LUJÁN. 2011. Medicinal plants used for traditional veterinary in the Sierras de Córdoba (Argentina): An ethnobotanical comparison with human medicinal uses. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 7: 23.
- MARTÍNEZ, G. J. & A. M. PLANCHUELO. 2003. La medicina tradicional de los criollos campesinos de Paravachasca y Calamuchita, Córdoba (Argentina). *Scripta Ethnologica* 25: 83-116.
- MELLO AMOROZO, M. C. & R. B. VIERTLER. 2008. A abordagem qualitativa na coleta e análise de dados etnobotânicos. En: ALBUQUERQUE, U. P., R. F. P. LUCENA & L. V. F. C. CUNHA (eds.), *Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica*, 2ª ed., pp. 73-91. Comunigraf Editora, Recife.

- MONTOYA, A., S. CARMONA & A. KONG. 1998. *Intoxicaciones causadas por hongos*. Fundación Produce Tlaxcala-O.P.D. Salud de Tlaxcala-Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.
- MORENO FUENTES, A., R. GARIBAY ORIJEL, J. TOVAR VELASCO & J. CIFUENTES. 2001. Situación actual de la Etnomicología en México y el mundo. *Etnobiología* 1: 75-84.
- NIVEIRO, N., O. F. POPOFF & E. O. ALBERTÓ. 2009. Hongos comestibles silvestres: especies exóticas de *Suillus* (Boletales, Basidiomycota) y *Lactarius* (Russulales, Basidiomycota) asociadas a cultivos de *Pinus elliottii* del Nordeste argentino. *Bonplandia* 18: 65-71.
- OCHOA, J. J., A. H. LADIO & M. LOZADA. 2010. Uso de recursos herbolarios entre mapuches y criollos de la comunidad campesina de Arroyo Las Minas (Río Negro, Patagonia Argentina). *BLACPM* 9: 269-276.
- OKIGBO, R. N. & C. M. NWATU. 2015. Ethnobotany and Usage of Edible and Medicinal Mushrooms in Some Parts of Anambra State, Nigeria. *Natural Resources* 6:79-89.
- PALACIO, M. O., E. CARRIZO, M. F. EPSTEIN VITTAR & H. J. MÜLLER. 2011. El bosque como proveedor de materia prima para la elaboración de tintes naturales en Santiago del Estero, R. Argentina. Memoria V Congreso Forestal Latinoamericano. Lima, Perú. Disponible en: http://www.cnf.org.pe/secretaria_conflat/memorias/DOCUMENTO%20MESAS/MESA%204/Manuel%20%20D3scar%20Palacio.pdf [Acceso: 24-08-17].
- ROBLEDO, G. & C. URCELAY. 2009. *Hongos de la madera en árboles nativos del centro de Argentina*. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- RODRÍGUEZ, J. M. & C. ESTRABOU. 2008. *Usnea amblyoclada* «Barba de piedra» (Ascomycetes liquenizados) en Argentina. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 43 (3-4): 221-225.
- RUÁN-SOTO, F. 2007. 50 años de etnomicología en México. *Lacandonia* 1: 97-108.
- RUÁN-SOTO, F., J. CIFUENTES, R. MARIACA, F. LIMÓN, L. PÉREZ-RAMÍREZ & S. SIERRA. 2009. Uso y manejo de hongos silvestres en dos comunidades de la Selva Lacandona, Chiapas, México. *Rev. Mex. Mic.* 29: 61-72.
- SCARPA, G. F. 2012. *Las plantas en la vida de los criollos del oeste formoseño. Medicina, ganadería, alimentación y viviendas tradicionales*. Asociación Civil Rumbo Sur, Buenos Aires.
- SCARPA, G. F. 2013. *Medicina indígena Chorote. Continuidad y transformaciones históricas y culturales*. Editorial Académica Española, Saarbrücken.
- SCARPA, G. F., & C. N. ROSSO. 2014. La etnobotánica moqoit inédita de Raúl Martínez Crovetto I: Descripción, actualización y análisis de la nomenclatura indígena. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 49: 623-647.
- SHUKLA, V., G. P. JOSHI & M. S. RAWAT. 2010. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochem. Rev.* 9: 303-314.
- SUÁREZ, M. E. 2014. *Etnobotánica wichí del bosque xerófito en el Chaco Semiárido salteño*. Autores de Argentina, Don Torcuato.
- SUÁREZ, M. E. & P. ARENAS. 2012. Plantas y hongos tintóreos de los wichís del Gran Chaco. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 47: 275-283.
- THE PLANT LIST. 2013. Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/> [Acceso: 24-08-17].
- TRILLO, C. & P. DEMAIO. 2007. *Tintes naturales. Guía para el reconocimiento y uso de plantas tintóreas del Centro de Argentina*. Editorial Sezo, Córdoba.
- TRILLO, C., B. ARIAS TOLEDO, L. GALETTO & S. COLANTONIO. 2010. Persistence of the Use of Medicinal Plants in Rural Communities of the Western Arid Chaco (Córdoba, Argentina). *Open Complement. Med. J.* 2: 80-89.
- VAN DIJK, H., N. A. ONGUENE & T. W. KUYPER. 2003. Knowledge and utilization of edible mushrooms by local population of the rain forest of south Cameroon. *Ambio* 32:19-23.
- WAHYUNI, D. 2012. The Research Design Maze: Understanding Paradigms, Cases, Methods and Methodologies. *JAMAR* 10: 69-80.
- WENDAKOON, C., P. CALDERON & D. GAGNON. 2012. Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens. *Journal of Medicinally Active Plants* 1: 60-68.
- YAMIN-PASTERNAK, S. 2011. Ethnomycology: Fungi and Mushrooms in Cultural Entanglements. En: ANDERSON, E. N., D. M. PEARSALL, E. S. HUNN & N. J. TURNER (eds.), *Ethnobiology*, pp. 213-230. Wiley-Blackwell, Hoboken.
- ZAK, M. R., M. CABIDO & J. G. HODGSON. 2004. Do subtropical seasonal forests in the Gran Chaco, Argentina, have a future? *Biol. Conservation* 120: 589-598.

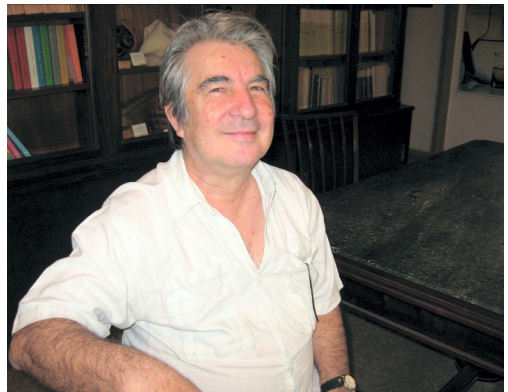
Recibido el 20 de septiembre de 2017, aceptado el 28 de diciembre de 2018. Editor: Leopoldo Iannone.

OBITUARIO

AURELIO SCHININI CACACE

1943 - 2018

Aurelio Schinini Cacace nació en Asunción (Paraguay) un 4 de febrero de 1943. Sus padres de descendencia italiana, encontraron allí una opción de paz y tranquilidad para desarrollar una familia y la época demandaba nuevas mentes y profesiones para hacerlo. Su padre, Cartógrafo de profesión, rápidamente aplicó sus conocimientos para confeccionar los nuevos mapas con gran precisión del norte de Paraguay limítrofes con Brasil y Bolivia. De él, heredaría el GPS natural que tenía Aurelito (como lo llamábamos entre los amigos) y que supo utilizarlo cuando se transformó en un eximio colector de plantas y luego en botánico consumado. De su madre heredaría ese amor incondicional a la comida italiana. Cenar o almorzar con Aurelio –previa confirmación de día, hora y menú– fue unos de los grandes placeres que pudimos apreciar los mortales que nos sentábamos a su mesa:



era un estupendo cocinero, exquisito comensal y anfitrión del Olimpo culinario. Las mesas de Aurelito eran un derroche de color y fantasías: manteles bordados, lozas y vajillas multicolores y platos servidos cual obra de arte confeccionado con precisión gourmet. Su gastronomía experta seguía una transecta que iba de Paraguay a Argentina, Brasil, Italia, España y de allí, a exquisiteces del norte de África hasta medio oriente con comidas judías y sirio libanesas. Sus licores, elixires de la naturaleza, eran ofrecidos cual bálsamos de opíparas degustaciones.

Sus estudios formales los realiza, junto con otros dos hermanos que conformaban su familia, como alumno pupilo en un colegio jesuítico en San Miguel (provincia de Buenos Aires, Argentina) para luego regresar al Colegio Nacional de Asunción. Paralelamente incursiona en el mundo de las artes visuales y musicales realizando estudios de dibujo, pintura y música. Su espíritu fue marcado a fuego con estas actividades y lo acompañó toda su vida atesorando pinturas, esculturas y arte religioso que hoy lo podemos seguir disfrutando en los museos que han recibido este legado, fruto de la donación que se hiciera post mortem, siguiendo sus deseos en vida.

La vida familiar en una típica casa italiana de esa época, transcurría entre estudios y quehaceres mundanos. Su madre, con buenos dones para la jardinería, participaba en concursos de jardinería y fue allí que Aurelio también encontró un ámbito para desarrollar su espíritu inquieto y el amor por la naturaleza que marcó su futuro como botánico indómito. Entusiasta aficionado de la Botánica, colocaba nombres a cuanta planta llegaba a su patio, bajo la protesta de su madre italiana que no entendía que las plantas, aparte del nombre común en guaraní/castellano, también tenían nombres y apellidos botánicos. Las orquídeas, bromelias, plantas medicinales y las utilizadas en la cocina de esa época siempre fueron sus preferidas y ocupaban un lugar preponderante en su casa materna a las que les dedicó, años más tarde, estudios botánicos profundos. Esta nueva pasión vegetal lo llevó a cursar desde 1966 a 1969 la Tecnicatura Nivel Medio en Agronomía en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de San Lorenzo, Paraguay, y le permitió

conocer a la botánica Eugenia Bordas, aprendiendo de su maestra a realizar herbarios y cuadernos de viaje que serían hoy, un patrimonio escrito de gran valor botánico para entender el ambiente en que realizaban sus viajes de colección. Su suerte y anhelo ya estaban predestinado a transformarlo en un excelente botánico y quiso la vida que, en su camino, se cruce con el Ing. Agr. Arturo Burkart (Instituto Darwinion) y el matrimonio Boelcke quienes se sorprendieron de Aurelio Schinini que, siendo tan joven, manejara con fluidez y profundidad la taxonomía de las plantas de Paraguay y Argentina. El nombre del joven botánico Schinini, llegó a oídos del Ing. Agr. Antonio Krapovickas y de la Dra. Carmen Cristóbal y rápidamente lo convencieron de integrar el novel plantel de ingenieros agrónomos, biólogos y botánicos que el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) estaba buscando en su sede de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste en Corrientes. La avidez y amor por la botánica rápidamente lo ayudó a formarse con estos grandes maestros. Sus viajes de campaña con el Ing. Agr. Martínez Crovetto, la Dra. Cristóbal y el Ing. Agr. Krapovickas eran anecdóticos y llenos de historias, controversias e innumerables plantas colectadas.

A partir de allí, la actividad botánica de Aurelio fue increíblemente prolífica. El conocimiento profundo de la flora del Paraguay y del NEA y su generosidad para mostrarla le valió numerosos viajes con expertos extranjeros que venían a Corrientes a trabajar con el joven prodigio del IBONE. Hacer un viaje de colección con Aurelio, era éxito asegurado, algo que muchos entendimos años después. Aurelio también realizó incontables viajes al extranjero y a numerosos herbarios de primer nivel y siempre lo recibieron con especial deferencia en retribución a la generosidad que él les prodigó. Verlo preparar un viaje de colección, montando prensas, calentadores a kerosene, papeles de diarios, cartones, cartulinas, tijeras, palas, serruchos, botellones con solución FAA para pequeñas flores, alcohol, carpas y lonas, comestibles de toda índole, yerba mate y yuyos para el infaltable tereré, era pensar que se iría a algún lugar desconocido del que quizás no tenga retorno. Sin embargo, 15 días después lo veía volver con cientos de ejemplares colectados, prensas llenas de plantas y su cara de felicidad que había logrado el propósito para todo el grupo: encontrar sus plantas y las de los demás. Muchas orquídeas que atesoró en el vivero, escaparon misteriosamente de las prensas de secado, so pretexto de que las tenía que seguir estudiando. Luego había que secarlas, etiquetarlas, montarlas en cartulinas e incorporarlas al herbario del IBONE con nombre y apellido, una tarea descomunal que muchos no tienen la capacidad de dimensionarla si no conocen la tarea de un taxónomo. Aurelio Schinini recolectó 37.000 ejemplares originales con números propios y más de 85.000 duplicados que hoy recorren el mundo de la Botánica o integran ejemplares de estudios en diversos institutos internacionales. Su último ejemplar colectado lleva el número 37.062 y corresponde a *Acacia aroma*, comúnmente llamada “aromito”, una especie que siempre adornaba sus extraños jarrones con ramas profusamente florecidas en diciembre.

A Aurelio lo conocí al poco tiempo de entrar como Ayudante Alumno de Fisiología Vegetal en 1986. Las tertulias a la hora del mate (10 hs) eran un increíble espacio de aprendizaje de todas las ramas de la Botánica y Aurelio era un libro abierto en un tema desconocido que me marcó de por vida: las orquídeas. Me llevó a las afueras de Corrientes y me mostró las plantas de orquídeas creciendo, sus árboles hospedantes, sus polinizadores, sus ambientes, los nombres botánicos y desde allí fue un amigo sincero y generoso. Duda que tenía, Aurelio me llevaba al herbario y me mostraba el ejemplar colectado. Lo que más me sorprendía de él, era su GPS mental de sus plantas coleccionadas. Hace 15 años atrás volviendo de la Fiesta Nacional de la Orquídea en la que siempre participábamos me dijo: qué pocas habenarias conocen los orquideófilos y qué hermosas son... pensar que hace 20 años atrás supe colectarlas muy cerca de aquí cuando todo esto era selvas y campos. Decidí adentrarme en un camino de tierra colorada en muy mal estado con destino a San Carlos (Corrientes). Cada 5 km nos deteníamos, se paraba en la camioneta y miraba 360 grados y me decía: acá no es. Así anduvimos 15 ó 20 km. De repente me dice: volvamos que nos pasamos. Caminamos por la orilla de un minúsculo arroyito que serpenteaba sobre piedra basáltica y vegetación en galería hasta que me dice: acá deben estar las habenarias enterradas así que cavemos para encontrarlas, y allí estaban. Aún las conservo y florecen profusamente. Su aporte a los estudios orquideológicos de Argentina y Paraguay han sido tan vastos e importantes que el año 2009 inscribí una orquídea con su nombre en la International Registration Authority For Orchid Hybrids, Royal Horticultural Society (Inglaterra). La *Gomonia* Don

Aurelio Schinini FCA (*Miltonia moreliana* x *Gomesa bifolia*), cuyo registro fue confirmado el 4 de febrero de 2009 e, increíblemente, coincide con su cumpleaños. Su pasión por las orquídeas y bromelias le valieron su participación en numerosos concursos de jurados en estas plantas y era un permanente consultor para las asociaciones aficionadas a su cultivo.

Su afición por las estampillas y en especial las colecciones filatélicas de temas botánicos, lo llevaron a lo largo de sus años y viajes a coleccionar innumerables sellos postales que mostraba a interesados con gran pasión. De su alma generosa surgió la idea de mostrarla y armó una extraordinaria exposición de estampillas de orquídeas para la Exposición Nacional de Orquídeas de Corrientes (2013) y que luego fue expuesta en la Fiesta Nacional de la Orquídea de Montecarlo, Misiones.

Su formación artística siempre lo mantuvo muy activo y cercano a instituciones del arte. Su vida social y cultural la compartió participando en instituciones benéficas ligadas al arte, la música y la danza como el Teatro Juan de Vera y Museo de Bellas Artes de Corrientes. Esta última institución, lo tuvo como mecenas a tiempo completo cuando participó en el armado de 3 exposiciones que tuvieron éxito asegurado y concurrencia multitudinaria. El Museo de Ciencias Naturales de Corrientes Amado Bonpland, la Sociedad Italiana Dante Alighieri, la Orquesta Sinfónica de Corrientes, el carnaval de Corrientes, diarios difundiendo diversos temas y radios de Corrientes donde difundía música sacra, extrañarán sus aportes y las genialidades que llevaba a cabo. La Federación Orquideófila de la República Argentina y la Sociedad Correntina de Orquideófilos lo honró otorgándole la distinción de Socio Honorario por sus trabajos en el área de la orquideología.

Un comentario aparte merece su total entrega a tareas sociales. Su gran sensibilidad ante personas en situación de vulnerabilidad y desprotección social, en especial niños y ancianos, lo llevaron a cocinar con gran alegría en un comedor comunitario en el barrio San Gerónimo, donde impartía clases de cocina y era muy apreciado por la comunidad. Por sus trabajos sociales, la Municipalidad de Corrientes lo nombró Ciudadano Ilustre otorgándole la Orden de Mérito correspondiente.

Ser amigo de Aurelio Schinini era una gran honra. Hacía de la amistad un culto y del humor inteligente e incisivo, una materia de estudio. Siempre estaba con proyectos innovadores en carpeta y su espíritu inquieto e indómito franqueaba cualquier escollo. Al enfermarse y ver a sus amigos cómo lo cuidaban, vio el fruto de su trabajo y dedicación. Falleció en Corrientes, el día 4 de marzo de 2018. Lo vi sonriendo, tranquilo, sereno, llevando un pequeño ramo de orquídeas entre sus manos. Nunca había florecido en marzo la *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA, siempre lo hace en septiembre. Este año, sin embargo, adelantó su floración.

Cada vez que entre al vivero de orquídeas un picaflor, sabré que sos vos querido amigo así que tendrás asegurado un poco de dulce néctar en retribución a los exquisitos licores de Yatay que supe disfrutar contigo. Buen descanso y no dejes de visitarnos para recordarte.

Eduardo Flachsland
Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)

TRAYECTORIA

Un especial agradecimiento a la Dra. María Mercedes Arbo y al Ing. Agr. Sergio Cáceres por permitirme usar la siguiente trayectoria del obituario de Aurelio Schinini publicado en *Bonplandia*.

PREMIOS Y DISTINCIONES

- 1988. Orquídea Dorada. Premio Mérito Actividad Conservacionista. 1º Fiesta Internacional de la flor en Corrientes, Argentina.
- 1989-2017. Presidencia honorario de la Sociedad Correntina de Orquideófilos.
- 2001. Diploma de Honor del año 2000. Asociación Cultural El Paraíso. Corrientes. Argentina.
- 2005. Distinción Especial en reconocimiento por el trascendente aporte en beneficio de la comunidad. Rotary Club Río Paraná, Corrientes, Argentina.

2011. Distinción Honorífica: Mérito al Ciudadano. Honorable Consejo Deliberante de la Municipalidad de la Ciudad de Corrientes.
2012. Pergamino en reconocimiento a sus aportes científicos a la taxonomía de las orquídeas y bromelias del Cono Sur. 3° Congreso de Orquideología y Conservación - 2° Jornadas de Bromeliáceas. Montecarlo, Misiones, Argentina.
2013. Socio Honorario de la Federación Orquideófila de la República Argentina (FORA), por su trayectoria y compromiso en estudio y difusión de las orquídeas en Argentina.
2017. Certificado de Reconocimiento, por su valioso trabajo de investigación científica sobre las Orquídeas Nativas del Paraguay. Asociación Paraguaya de Orquideófilos. Asunción, Paraguay.
2017. Placa en reconocimiento a su trayectoria. 40° aniversario del Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.

ESPECIES DEDICADAS

- Arachis schinini* Krapov., Valls & C. E. Simpson (Fabaceae) - *Bonplandia* 14: 54-56. 2005.
- Aspicarpa schinini* W. R. Anderson (Malpighiaceae) - *Contr. Univ. Michigan Herb.* 16: 59. 1987.
- Cnidocolus aurelii* Fern. Casas (Euphorbiaceae) - *Fontqueria* 55: 215-224. 2004.
- Eupatorium schinini* Cabrera (Asteraceae) - *Darwiniana* 20: 411-413. 1976.
- Galianthe aurelii* E. L. Cabral (Rubiaceae) - *Bonplandia* 7: 1-4. 1993.
- Mimosa aureliana* Barneby & Fortunato (Mimosaceae) - *Brittonia* 39: 165-167. 1987.
- Pavonia aurelii* Fryxell (Malvaceae) - *Fl. Neotrop. Monogr.* 76: 137-140. 1999[2000].
- Pavonia schinini* Krapov. & Cristóbal (Malvaceae) - *Bonplandia* 7: 45. 1993.
- Sida schinini* Krapov. (Malvaceae) - *Bonplandia* 15: 30-32. 2006.
- Turnera aurelii* Arbo (Turneraceae) - *Candollea* 40: 181. 1985.

EXPOSICIONES PRESENTADAS

1988. Cestería guaraní. Día del Indio americano, Centro Cultural Marechal, Resistencia, Chaco.
1995. Frutos subtropicales. Museo de Ciencias Naturales Augusto G. Schulz. Resistencia, Chaco.
1998. Exposición filatélica con el tema Orquídeas. Asociación Paraguaya de orquideófilos. Asunción, Paraguay.
1999. Filatelia con el tema Orquídeas. Exposición de la Sociedad Correntina de orquideófilos. Museo A. Bonpland, Corrientes.
2008. Bonpland Naturalista. Schinini A. & A. Arbelo de Mazzaro Museo de Ciencias Naturales, Corrientes. Exposición itinerante, presentada en Ituzaingó, San Carlos, Santo Tomé, Virasoro, Paso de los Libres, Yapeyú, La Cruz, Bonpland y Curuzú Cuatiá (Corrientes). También fue presentada en Asunción y Santa María de la Fe (Paraguay) a través de la Fundación La Piedad y la Academia Paraguaya de la Historia, auspiciada por la Embajada de Francia en Paraguay.
- 2009-2010. La Yerba Mate en Corrientes. Schinini, A., A. Arbelo de Mazzaro & H. Soler. Museo de Ciencias Naturales, Corrientes.
2010. Platería de Corrientes. Museo de Bellas Artes Dr. J. R. Vidal, Corrientes.
2011. Arte sacro en Corrientes. Museo de Bellas Artes Dr. J. R. Vidal, Corrientes.

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

- SCHININI, A. 1975. Notas sobre Burmanniáceas argentinas. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 16: 349-353.
- SCHININI, A. 1981. Contribución a la Flora del Paraguay. *Bonplandia* 5: 101-108.
- SCHININI, A. 1981. Lista de plantas colectadas en el Chaco. *Informes Ci. Inst. Cs. Básicas, Univ. Nac. Asunción, Paraguay* 3: 1-13.
- SCHININI, A. 1981. Lista de vegetales de la zona de P. Lagerenza y otras del Chaco Paraguayo. *Informes Ci. Inst. Cs. Básicas, Univ. Nac. Asunción, Paraguay* 3: 13-30.
- FERNÁNDEZ CASAS, F. J. & A. SCHININI. 1983. *Calliandra pyrophila*, nueva especie del Paraguay. *Fontqueria* 4: 29-32.
- FERNÁNDEZ CASAS, F. J., R. GARILLETI & A. SCHININI. 1988. En FERNÁNDEZ CASAS, F. J. (ed.), *Paraguariae florum atlas*, II. *Fontqueria* 19: 1-79.
- SCHININI, A. 1989. Cuando las mujeres se quedaron definitivamente en la tierra. El origen de la humanidad según la mitología toba. *Fontqueria* 22: 1-3.

8. SCHININI, A. 1989. Raúl Martínez Crovetto. Obituario. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 26: 139-140.
9. FERNÁNDEZ CASAS, F. J., R. GARILLETI ALVAREZ & A. SCHININI. 1990. En FERNÁNDEZ CASAS, F. J. (ed.), *Paraquariae florae atlas*, III. *Fontqueria* 28: 63-64.
10. PIRE, S. M. & A. SCHININI. 1992. Estudio palinológico de las Bromeliaceae del Nordeste Argentino. *Asoc. Paleontol. Argent. Publicación Especial* 2: 89-90.
11. SCHININI, A. & M. G. LÓPEZ. 1997. Novedades para la Flora Argentina encontradas en el Parque Nacional Iguazú (Misiones). *Bonplandia* 9: 231-236.
12. SCHININI, A. & M. G. LÓPEZ. 1999. *Solanum comptum* C.V. Morton (Solanaceae), su distribución en Argentina y Paraguay. *Candollea* 54: 110-112.
13. SCHININI, A. & M. G. LÓPEZ. 2000. Novedad en el género *Manihot* para Paraguay secc. Graciles (Euphorbiaceae). *Rojasiana* 5: 137-140.
14. SCHININI, A. & M. G. LÓPEZ. 2001. *Solanum paniculatum* (Solanaceae) en Argentina y Paraguay. *Kurtziana* 29: 99-103.
15. SCHININI, A., E. CIOTTI, C. E. TOMEI, M. E. CASTELÁN & C. M. HACK. 2004. Especies nativas de campos bajos de potencial uso forrajero. *Agrotecnia* 12: 17-21.
16. CIOTTI, E. M. & A. SCHININI. 2005. Evaluación agronómica y distribución geográfica de *Desmodium barbatum* en Corrientes, Argentina. *Revista Cient. Agropecu.* 9: 187-190.
17. SCHININI, A. 2005. Teodoro Rojas, Biografía, viajes y especies dedicadas. *Rojasiana* 7: 101-149.
18. FLACHSLAND, E., A. SCHININI, G. TERADA, G. FURST & L. A. MROGINSKI. 2005. Regeneración de plantas de *Rhabdadenia ragonesei* (Apocynaceae) por cultivo *in vitro* de explantes foliares. *Bonplandia* 14: 91-96.
19. SCHININI, A. 2006. Adenda a las Araceae de la Flora del Paraguay. *Rojasiana* 7: 51-62.
20. SCHININI, A. 2008. Nueva cita para Paraguay *Tillandsia mereliana* Schinini, nov. spec. *Rojasiana* 8: 73-76.
21. FLACHSLAND, E., A. SCHININI & N. CÁNEVA. 2009. Andrés Eduardo Johnson (1956-2009). *Bonplandia* 18: 81-82.
22. SCHININI, A. 2010. Orquídeas nativas del Paraguay. *Rojasiana* 9: 11-315.

CAPÍTULOS DE LIBROS

1. ARBO, M. M., M. G. LÓPEZ, A. SCHININI & G. PIESZKO. 2002. Las plantas hidrófilas. En ARBO, M. M. & S. G. TRESSENS (eds.) *Flora del Iberá*. EUDENE. Corrientes. Pp. 9-110.
2. FONTANA, J. L., A. KRAPOVICKAS, M. M. ARBO, A. SCHININI, M. G. LÓPEZ, R. VANNI, F. ZULOAGA, M. BELGRANO, J. C. CHEBEZ, D. R. CIVEYBEL, S. D. CIVEYBEL, V. DÍAZ & A. BODRATI. 2004. Campos del Teyú Cuaré. En BILENGA, D. & F. MIÑARRO (eds.) *Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil (AVPs)*. AVP 59: 196-197.
3. SCHININI, A. & E. M. CIOTTI. 2008. Los palmares del Nordeste Argentino. En BASTERRA, N. I., J. J. NEIFF & S. L. CASCO. *Manual de Biodiversidad de Chaco, Corrientes, Formosa*. Pp. 261-271. EUDENE. Corrientes.
4. SCHININI, A., M. G. L. WANDERLEY, T. STREHL, Z. MARTINS & B. MOREIRA. 2008. Bromeliaceae. En ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. BELGRANO (eds.) *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur*. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 107(1): 245-291.
5. SCHININI, A., J. WAECHTER, P. IZAGUIRRE & C. LEHNEBACH. 2008. Orchidaceae. En ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. BELGRANO (eds.) *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur*. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 107(1): 472-609.
6. SCHININI, A. 2010. Bonpland aux pays de la Plata (traducción G. Martinière). En MARTINIÈRE, G. & T. LALANDE (dir.), *Aimé Bonpland un naturaliste rochelais aux Amériques (1773-1858) - De l'orchidée à la yerba mate*. Pp. 195-214.

SOCIEDAD ARGENTINA DE BOTÁNICA

Comisión Directiva

Presidente: Gabriel Bernardello
Vicepresidente: Gloria E. Barboza
Secretaria: M. Laura Las Peñas
Tesorero: Gustavo Delucchi
Protesorero: Claudio A. Sosa
Secretaria de Actas: Natalia Evelin Delbón

Vocales Titulares:

Marcelo Arana, Lucas Carbone, Rocío Deanna, Rita Morero, Raquel Scrivanti,
y Cecilia Trillo

Vocales suplentes:

Elena Noemi Gari, Melisa Giorgis, Federico O. Robbiati y Melina Scandaliaris

Revisores de cuentas:

Pablo Horacio Demaio y Ana Sofia Machado

Para asociarse, puede contactarse con la sede central de la sociedad, o bien consultar en su página “web”, las direcciones de los 34 representantes locales distribuidos en todo el país.

Categorías de asociados:

Protectores: aquellos que abonan una cuota anual doble a la de un socio activo.

Benefactores: los que donan una suma equivalente o mayor a cien cuotas anuales de socio activo, o bien que pagan una cuota anual equivalente a diez veces la de socio activo.

Vitalicios: los que pagan de una sola vez el equivalente a 30 cuotas de socio activo.

Activos: los que pagan la cuota societaria que se establece cada año.

Institucionales: personas jurídicas que pagan una cuota anual no menor a la de socio activo.

Adherentes: estudiantes de nivel terciario que pagan una cuota societaria equivalente al 50% de la cuota anual de socio activo.

Secretarias de edición:

ADRIANA N. PÉREZ (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Córdoba)

La diagramación de la tapa corresponde a Diana Abal Solís.

El diseño del isotipo de la S.A.B. pertenece a Nidia Flury.

La composición y el armado del presente volumen fueron hechos por María Cecilia Puigbo (IBONE).

La Sociedad Argentina de Botánica es una asociación civil sin fines de lucro, cuyos propósitos son:

- a) agrupar a los profesionales y aficionados a la Botánica
- b) fomentar el progreso de todas las ramas de esta ciencia
- c) editar trabajos de investigación botánica
- d) propender al mejoramiento de la enseñanza de la Botánica, en todos los niveles
- e) estimular la protección de la vegetación natural
- f) organizar y auspiciar reuniones científicas
- g) llevar a cabo excursiones botánicas
- h) contribuir a una mayor precisión de la terminología botánica.



Sede Central

SOCIEDAD ARGENTINA DE BOTÁNICA

Museo Botánico
Av. Velez Sarsfield 299
Casilla de Correo 495
5000 Córdoba, Argentina
Tel./Fax 54 351 4332104
e-mail: sabotanica@gmail.com
Domicilio legal: Av. Angel Gallardo 470
CP (C1405DJR)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina

Página WEB: <http://www.botanicaargentina.com.ar/>

En venta en la Argentina y en el exterior:
LIBRERÍA L.G.C
Pasaje Gallego 3570
CP (C1240ACD)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Teléfono: (011) 49241140.