

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE GENÉTICA Y QUÍMICA CELULAR

**CARACTERIZACIÓN MORFO-ANATÓMICA DE LA
MICORRIZA ERICOIDE EN *Vaccinium meridionale* Swartz y
Vaccinium floribundum Kunth DEL PARQUE NACIONAL SIERRA DE
LA CULATA**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

presentado por:

Br. MARÍA ALEJANDRA MOLINA PÉREZ

Como requisito parcial para optar al título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Tutor: Dr. Samuel Segnini

Co-tutora: Licda. Sonia Morales

Mérida-Venezuela, Diciembre del 2022

Dedicatoria

A Mirian María Pérez Mercado

mi madre, quién nunca ha cesado de creer en mí.

www.bdigital.ula.ve

Agradecimientos

Primeramente a Dios por concederme la sabiduría para culminar esta investigación.

A mis padres, en especial a mi madre, cuyo amor no conoce límites y a mis sobrinos, quiénes son fuente de inspiración para mí.

Al profesor Samuel Segnini por su tutela, su paciencia, sus conocimientos y su apoyo sin los cuales no podría haber culminado.

A la profesora María Marcano quién me abrió las puertas del laboratorio de Genética y Química Celular (GeQuimCel) donde se realizó esta investigación.

A Sonia Morales, investigadora del GeQuimCel y co-tutora de este trabajo quién me ha acompañado religiosamente durante cada etapa de esta investigación.

A la profesora Francisca Ely Bali, quién me facilitó las instalaciones y equipo del laboratorio de Anatomía Vegetal del Instituto Jardín Botánico y a la profesora Luz Thais Castro, quienes además de ser jurados de esta investigación, contribuyeron grandemente en mi formación y enriquecieron mi experiencia con las plantas.

A Jhon Parra, experto en ericáceas quién tuvo la bondad de instruirme en la identificación de las especies en estudio.

A mi hermano Wilson Daniel Molina, al profesor Gustavo Fermín y al Ing. Diocelis Angel, quienes fueron los proveedores de los portaobjetos y cubreobjetos usados en esta investigación.

Al Ing. Pedro Segovia, Jhonny Alejandro Albarrán y Diego García, por haberme acompañado en las salidas de campo, sin ellos no hubiese sido posible llegar al sitio de muestreo.

Al profesor Guillermo Bianchi por sus observaciones pertinentes que han contribuido a la mejora de esta investigación.

A mi querida amiga María Teresa Moreno quién me ha dado su amor incondicional, su apoyo y ayuda en cada tropiezo que he tenido.

A María Carolina Rosales, investigadora de GeQuimCel quién me ha animado y apoyado.

A mis profesores de la carrera en especial al profesor Benito Briceño, Mariana Muñoz, Antonio de Ascencao, Luis Daniel Llambí, Gustavo Fermín, Marleny Chacón, Leida Valero, Wilfredo Quiñones, y Masyelys Rojas, quienes contribuyeron en mi formación y cuyas huellas son imborrables.

A todas las personas que hacen vida laboral en el laboratorio de Ecología de insectos quienes me recibieron con calor de hogar.

A mis compañeros de estudio que ahora son colegas y entrañables amigos: Greysa Barrios, Edwin Parada, Ricardo Carrasco, Mariana Fernández y Camilo Barabás.

A la Universidad de Los Andes y a la Facultad de Ciencias que ha sido mi segunda casa durante todos estos años.

Y finalmente a mí, por nunca rendirme.

¡Muchas Gracias!

www.bdigital.ula.ve

Resumen

Vaccinium es un género cosmopolita perteneciente a Ericaceae, familia de plantas conocida por su asociación con hongos del suelo formando la micorriza ericoide. Las especies *Vaccinium meridionale* y *Vaccinium floribundum* son las parientes silvestres del género en el neotrópico, las cuales se distribuyen en ambientes de páramo y bosque paramero con suelos ácidos caracterizados por la acumulación de materia orgánica. Dado que la micorriza ericoide se considera una asociación obligatoria y exclusiva en esta familia, el objetivo de este estudio fue caracterizar la simbiosis en *V. floribundum* y *V. meridionale* desde el punto de vista morfoanatómico. Para ello, se fotodocumentaron los tipos de colonización observados en 3 individuos de cada especie mediante el microscopio óptico. Asimismo, se aislaron y cultivaron los potenciales hongos endófitos. Se observaron tres tipos de colonización correspondientes a micorrizas ericoides con algunas variaciones entre hospederos. Adicionalmente, se observó la presencia de otras asociaciones simbióticas como los endófitos septados oscuros y las micorrizas arbusculares, evidencia de que estas especies de *Vaccinium* albergan por lo menos a tres grupos fúngicos con funciones fisiológicas distintas. Se requiere mayor número de observaciones combinadas con aislamiento del hongo, identificación y estudios de inoculación en otras especies para determinar todas las características estructurales de las micorrizas ericoides.

Palabras clave: *Vaccinium floribundum*, *Vaccinium meridionale*, caracterización morfoanatómica, micorrizas ericoides, micorrizas arbusculares, hongos endófitos septados oscuros, arándanos silvestres.

Abstract

Vaccinium is a genus belonging to Ericaceae; a plant family known for its association with soil fungi forming ericoid mycorrhiza. The neotropic representatives of the genus, *Vaccinium floribundum* and *Vaccinium meridionale*, occur in environments like paramo and rainforests, characterized by acidic soils with high contents of organic matter. Since the ericoid mycorrhiza is considered to be exclusive of this family, our objective was to characterize the symbiosis by the morphoanatomical approach. In order to do that, light microscopy was used to characterize the colonization patterns observed. Likewise, isolation and culture of the potential endophytes was carried. Three colonization patterns corresponding to ericoid mycorrhiza that varied among hosts were described. Additionally, the co-occurrence of dark-septate endophytes and arbuscular mycorrhiza were observed. These findings suggest that at least three different fungal endosymbionts with diverse ecophysiological functions colonize the roots of the species. Further research with observations of a bigger number of samples, fungi isolation, identification and reinoculation experiments with another plant host is required to determine the full range of structural details of the ericoid mycorrhizal symbiosis.

Keywords: *Vaccinium floribundum*, *Vaccinium meridionale*, morphoanatomical characterization, ericoid mycorrhizae, arbuscular mycorrhizae, dark septate endophytes, wild blueberry.

Índice General

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice General	vi
Índice de Figuras	ix
1. Introducción y Planteamiento del Problema	1
1.1. Introducción	1
1.1.1 El arándano andino	1
1.1.2 Descripción morfológica de las especies en estudio	1
1.1.3 Importancia de los arándanos	3
1.1.3.1 Comercialización a nivel mundial	3
1.1.3.2 Valor nutricional y medicinal del arándano	4
1.1.4 Asociaciones simbióticas hongo-planta en las ericáceas.	5
1.1.4.1 Micorrizas ericoides	6
1.1.4.1.1 La raíz de Ericaceae y su relación con la micorriza ericoide	6
1.1.4.1.2 Definición de micorriza ericoide	6
1.1.4.1.3 La micorriza ericoide típica y la micorriza ericoide con manto	8
1.1.4.1.4 Identidad del micobionte	8
1.1.4.2 Asociación endófitos septados oscuros	9
1.1.4.2.1 Reconocimiento entre el endófito y el hospedero	10
1.1.4.2.2 Efectos de los endófitos septados en el hospedero	10
1.1.4.2.3 ¿Quiénes son los endófitos septados oscuros?	11
1.1.4.3 Micorrizas arbusculares	11
1.1.4.3.1 Proceso de colonización	12

1.1.4.3.2 Beneficios de la micorriza arbuscular	12
1.1.4.3.3 Los hongos arbusculares	13
1.1.5 <i>Vaccinium floribundum</i> y <i>Vaccinium meridionale</i> en Venezuela	13
1.2 Justificación	14
1.3 Hipótesis	14
1.4 Objetivos	14
1.4.1 Objetivo General	14
1.4.2 Objetivos Específicos	15
2. Metodología	16
2.1. Área de Estudio	16
2.1.1 Clima	16
2.1.2 Suelos	17
2.1.3 Vegetación	17
2.2 Colecta del material vegetal	17
2.3 Procesamiento de las micrografías obtenidas	19
2.4 Comprobación de la presencia de micorrizas ericoides por microscopio óptico	19
2.5 Aislamiento y cultivo de hongos endófitos	20
2.6 Caracterización morfo-anatómica de la simbiosis micorrícica ericoide en ambas especies	21
3. Resultados	22
3.1 Comprobación de la presencia de hongos formadores de micorrizas ericoides por microscopio óptico	22
3.2 Comprobación de la presencia de hongos endófitos por aislamiento y cultivo	23
3.3 Caracterización morfo-anatómica de las micorrizas ericoides observadas en cada especie	26
3.3.1 Micorriza ericoide típica	26
3.3.2 Micorriza ericoide con manto	29
3.3.3 Micorriza ericoide en células corticales	31
3.3.4 Micorriza ericoide en raíces maduras	31

3.3.5 Características anatómicas del tejido colonizado	33
3.4 Otros hallazgos observados con microscopio óptico	35
4. Discusión	43
4.1. Presencia y caracterización morfoanatómica de la micorriza ericoide en <i>Vaccinium floribundum</i> y <i>Vaccinium meridionale</i> por microscopio óptico	43
4.1.1 Morfología de los tipos de colonización observados	43
4.1.1.1 Micorriza ericoide típica	43
4.1.1.2 Micorriza ericoide con manto	46
4.1.1.3 Micorriza ericoide en tejido cortical	47
4.1.1.4 Micorriza ericoide en raíces maduras	48
4.1.2 Anatomía de los tejidos colonizados	49
4.2 Comprobación de hongos endófitos por aislamiento y cultivo	50
4.3 Otros hallazgos observados en <i>Vaccinium floribundum</i> y <i>Vaccinium meridionale</i>	51
4.3.1 Presencia de Endófitos Septados Oscuros	51
4.3.2 Presencia de Micorrizas Arbusculares	52
4.3.3 Co-colonización de las micorrizas ericoides, endófitos septados oscuros y las micorrizas arbusculares	52
4.4 Otras consideraciones	54
4.4.1 Micorrizas ericoides: ¿es la evidencia morfológica concluyente?	54
4.4.2 Posibles implicaciones fisiológicas de las asociaciones simbióticas observadas	55
5. Conclusiones y Recomendaciones	58
6. Referencias Bibliográficas	60

Índice de Figuras

Figura 1. Parte vegetativa y reproductiva de <i>Vaccinium floribundum</i> y <i>Vaccinium meridionale</i> .	3
Figura 2. Lista de países con mayor producción de arándano.	4
Figura 3. Raíz micorrícica ericoide de <i>Epacris impressa</i> .	7
Figura 4. Diagrama esquemático de un sistema radicular que ilustra el método de clasificación a partir del desarrollo de la raíz.	18
Figura 5. Distribución del inóculo sobre medio de cultivo agar-papa-dextrosa.	20
Figura 6. Estructuras fúngicas observadas en las células epidérmicas de <i>Vaccinium floribundum</i> y <i>Vaccinium meridionale</i> que constatan la presencia de colonización por micorrizas ericoides.	22
Figura 7. Cultivo de hongos endófitos a los 4 días de haber sido inoculado.	23
Figura 8. Características macroscópicas de colonias de endófitos aislados a partir de las raíces de <i>Vaccinium</i> spp. después de 4 semanas en medio APD a 24°C.	25
Figura 9. Estrategias de colonización de las células epidérmicas exhibidas por los hongos ericoides en <i>Vaccinium floribundum</i> y <i>Vaccinium meridionale</i> .	26
Figura 10. Primera etapa del proceso de colonización de micorrizas ericoides típicas en <i>Vaccinium</i> spp.	27
Figura 11. Etapas de la colonización de la micorriza ericoide típica en <i>Vaccinium</i> spp.	28
Figura 12. Primera etapa de la colonización observada de la micorriza ericoide con manto en las raíces de <i>Vaccinium</i> spp.	29
Figura 13. Etapas de la colonización de micorrizas ericoides con manto en las raíces de <i>Vaccinium</i> spp.	30
Figura 14. Micorriza ericoide en células corticales de <i>Vaccinium floribundum</i> .	31
Figura 15. Evidencia de colonización de micorrizas ericoides en el tejido maduro de <i>Vaccinium</i> spp.	32
Figura 16. Tipos de micelio extraradicular característicos de los endófitos septados oscuros presentes en <i>Vaccinium meridionale</i> .	35
Figura 17. Estructuras típicas de endófitos septados oscuros en <i>Vaccinium</i> spp.	36
Figura 18. Estructuras típicas de micorrizas arbusculares en <i>Vaccinium</i> spp.	37
Figura 19. Vesículas del morfotipo arum en <i>Vaccinium</i> spp.	38

- Figura 20.** Estructuras fúngicas características del morfotipo París de micorrizas arbusculares en *Vaccinium* spp. 39
- Figura 21.** Estructuras características de micorrizas arbusculares en el tejido maduro de *Vaccinium* spp. 40
- Figura 22.** Co-colonización de las micorrizas arbusculares y los hongos endófitos septados oscuros en el tejido maduro de *Vaccinium* spp. 41
- Figura 23.** Clamidosporas características de hongos ericoides pertenecientes al género *Serendipita* en las células epidérmicas de *Vaccinium meridionale*. 41
- Figura 24.** Representación esquemática de las estrategias de colonización de los simbiontes micorrícicos observados en *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale*. 42

www.bdigital.ula.ve

1. Introducción y Planteamiento del Problema

1.1. Introducción

1.1.1 El arándano andino

Vaccinium es un género cosmopolita de arbustos de la familia Ericaceae que incluye a todas las especies llamadas arándanos. Las especies *Vaccinium meridionale* y *Vaccinium floribundum* son las parientes silvestres del género en el neotrópico y se distribuyen en los páramos andinos de Sudamérica, desde Perú hasta los límites de Venezuela (Chamorro & Nates-Parra, 2015). Algunos de los nombres comunes usados para estas especies son mortiño, agraz y con menor frecuencia chivacú, uva de los andes, manzanilla de cerro, raspadura quemada, macha macha, pushgay y uva de monte. (Coba *et al.*, 2012).

Son especies heliófitas que se desarrollan en ambientes de páramo y bosque paramero, con temperaturas que oscilan entre 8 a 16°C y suelos ácidos con un pH entre 4 y 5, arenosos, con turba o materia orgánica (Chamorro & Nates-Parra, 2015). En la Cordillera de Mérida, su rango de distribución altitudinal va desde 2000 m hasta los 3500 m de elevación (Briceño & Morillo, 2002). Por lo general, *V. floribundum* es de menor tamaño que *V. meridionale*, con tallos más ramificados y produce frutos más pequeños. Las plantas de *Vaccinium* se propagan tanto sexualmente como vegetativamente (Wilbur & Luteyn, 2008), siendo el crecimiento vegetativo que conlleva a la clonación su principal estrategia de propagación en hábitats naturales (McDonald *et al.*, 2003).

1.1.2 Descripción morfológica de las especies en estudio

V. floribundum tiene un crecimiento arbustivo ramificado y alcanza de 2 a 3 m de altura. Sus **hojas** son simples y alternas, pinnatinervias, de contorno elíptico a ovado, base cuneada, margen crenado, ápice agudo, ligeramente apiculado y consistencia coriácea (Fig. 1A)(Arjona, 2001). Por su parte, *V. meridionale*, es un arbusto que varía entre 1 y 4 m de altura. Sus **hojas** son simples y alternas, pinnatinervias, de contorno elíptico, base obtusa, margen serrado, ápice acuminado y consistencia coriácea. (Fig. 1B)(Ávila *et al.*, 2007).

Ambas especies tienen **flores** tetrámeras, ocasionalmente pentámeras que se encuentran en racimos axilares o terminales. Presentan un cáliz sinsépalo, con lóbulos apiculados, ciliados en el margen hacia el ápice y una **corola** urceolada (*V. floribundum*) (Fig. 1C) (*V. meridionale*) (Fig. 1D), blanca o manchada de rosado o rojo, con ocho o diez estambres, del mismo largo que el tubo de la corola. Los

estambres son de filamentos aplanados, libres, de anteras con tecas cortas y dehiscencia apical poricida. Son flores de **ovario** ínfero, sincárpico, adherido al cáliz, (5-locular en el caso de *V. floribundum* y 4-locular en *V. meridionale*); estilo terminal, simple, glabro, casi igual de largo que la corola; estigma filiforme. El **fruto** es una baya globosa esférica de color verde en estado inmaduro y morado oscuro, casi negro, en su madurez. (Fig. 1E y F) (Pérez & Valdivieso, 2007; Ávila *et al.*, 2007; Echeverry & Toro, 2009). La clasificación taxonómica de *V. floribundum* Kunth y *V. meridionale* Swartz se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Vaccinium floribundum* Kunth y *V. meridionale* Swartz

Jerarquía	Descripción
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Asteranae
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	<i>Vaccinium</i>
Especie	<i>Vaccinium floribundum</i> , <i>Vaccinium meridionale</i>

Fuente: Trópicos (2019)



Figura 1. Parte vegetativa y reproductiva de *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale*. **A, C y E.** Hojas, flores y frutos de *V. floribundum*. **B, D y F.** Hojas, flores y frutos de *V. meridionale*. **Fuente:** Pérez & Valdivieso (2007), Calderón & Socha (2009).

1.1.3 Importancia de los arándanos

1.1.3.1 Comercialización a nivel mundial

A principios de los años 1900, se empezó a desarrollar un cultivo comercial de arándanos en Estados Unidos a partir de las especies conocidas comúnmente como arándano de arbusto alto (*V. corymbosum*), arándano de arbusto pequeño (*V. angustifolium*) y ojo de conejo (*V. ashei*). Desde entonces, el cultivo se ha expandido prácticamente a todos los continentes excluyendo la Antártida. La producción global del fruto de estas tres especies se ha más que duplicado entre los años 2010 y 2019, incrementándose desde 439.000 toneladas métricas a casi 1.000.000 de toneladas métricas. Actualmente, el mayor consumidor es Estados Unidos y el mayor exportador es Perú siendo el cuarto

país con mayor producción del fruto después de Estados Unidos, Canadá, Chile y seguido por España. (Protzman, 2021).

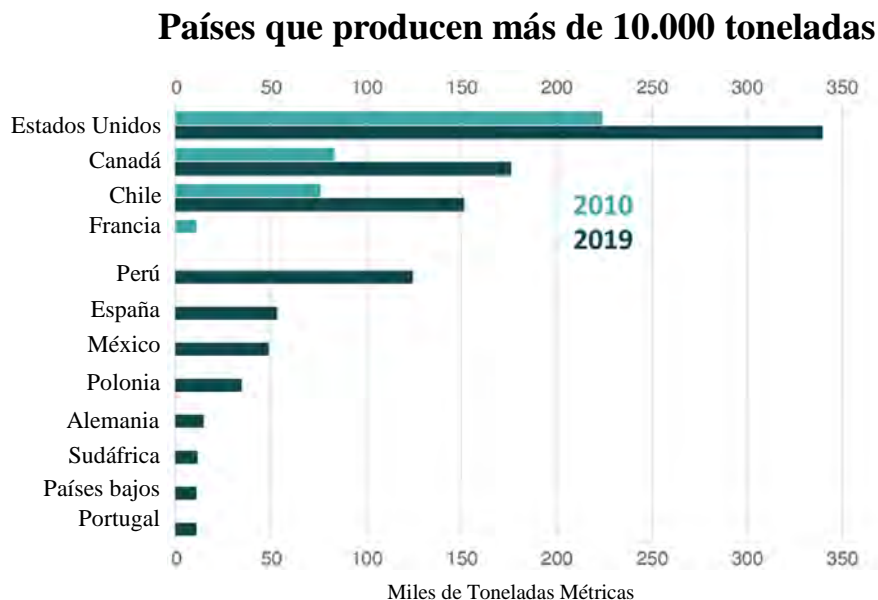


Figura 2. Lista de países con mayor producción de arándano. **Fuente:** Prontzman (2019).

1.1.3.2 Valor nutricional y medicinal del arándano

Una de las principales razones por las que la producción de arándanos incrementa cada año es debido a su condición de alimento nutraceutico, es decir que además de ser nutritivo, proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades, por lo que se ha vuelto indispensable en la dieta de numerosas familias en todo el mundo. El género *Vaccinium* tiene más de 70 usos médicos tradicionales y alimenticios, principalmente relacionados a los sistemas genitourinario, digestivo y endocrino/metabólico, siendo el fruto una de las partes más utilizadas de la planta (Abreu *et al.*, 2014). Algunos de estos beneficios se han demostrado farmacológicamente *in vitro* e *in vivo* como son: los efectos antidiabéticos (Allen, 1972; Kit *et al.*, 1972, Zozulya, Museva & Kuzmina, 1975); capacidad antimicrobiana (Brantner & Grain, 1994; Hamilton-Miller, 1994; Lee *et al.*, 2000) y propiedades antioxidantes (Calderón & Socha, 2009).

Los frutos de *V. floribundum* y *V. meridionale* comparten algunas propiedades nutricionales con el resto de las plantas de su género así como altos contenidos de moléculas antioxidantes por lo que se han hecho algunas investigaciones probando la capacidad antiinflamatoria de estos frutos (García, 2007), su efecto en la inhibición *in vitro* de las enzimas α glucosidasa y α amilasa como posible antihiper glucemiante (Schreckinger *et al.*, 2012) y se ha evaluado los cambios físico-químicos, antioxidantes y probióticos del yogurt de mortiño (*V. meridionale*) comprobando que es un alimento muy nutritivo (Zapata *et al.*, 2015).

1.1.4 Asociaciones simbióticas hongo-planta en las ericáceas.

Los hongos son parte de la vasta flora microbiana del suelo y desempeñan un papel en muchos procesos microbiológicos y ecológicos: actúan en los procesos de descomposición, ciclaje de nutrientes y materia orgánica, así como tienen un efecto directo o indirecto en la salud, desarrollo y nutrición de las plantas. Una de las formas en que estos organismos interactúan con los sistemas vegetales es mediante la formación de micorriza; la cual se define como una simbiosis que se caracteriza por un intercambio de moléculas entre hongo-planta (carbohidratos para el hongo y fósforo de fácil movilización para la planta) que tiene lugar en las raíces de la planta hospedera (Mukerji *et al.*, 2002).

Las plantas de la familia Ericaceae se asocian a diversos tipos de hongos y consecuentemente, establecen distintos tipos de categorías micorrícicas y relaciones endófitas, las cuáles están siendo influenciadas por la taxonomía del hongo, la especie de planta que están colonizando y las condiciones nutricionales del sustrato en el que se encuentran. Todas estas asociaciones simbióticas se distinguen fácilmente unas de otras a partir de las estructuras morfológicas que los hongos responsables generan en las raicillas de estas especies vegetales (Smith & Read, 2008).

La micorriza ericoide es la categoría micorrícica más predominante en la familia (Bizabani, 2015). Sin embargo, también se ha obtenido evidencia microscópica de asociaciones como la ectendomycorriza, la micorriza cavendishioide, la micorriza arbuscular y los hongos endófitos septados (Setaro *et al.*, 2006; Chaurasia *et al.*, 2005; Koske, 1990). Por otro lado, en esta familia también se ha reportado la presencia de interacciones raíz-hongo que no generan estructuras morfológicas bien definidas (Vohník & Albrechtová, 2011).

1.1.4.1 Micorrizas ericoides

1.1.4.1.1 La raíz de Ericaceae y su relación con la micorriza ericoide

El sistema radicular de las ericáceas se caracteriza por la formación de numerosas raicillas en la capa más superficial del suelo donde cada raicilla contiene un cilindro vascular reducido, dos o tres capas de tejido cortical incluyendo la endodermis y células epidérmicas agrandadas en lo que sería una zona pilífera en la raíz de una planta convencional (Read, 1996). Aunque la familia Ericaceae es morfológicamente diversa, las raíces de estas plantas conservan uniformidad en su organización estructural lo que desemboca en la posesión de la micorriza ericoide (Read, 1983), llamada así por su ubicuidad en las plantas de esta familia.

Esta uniformidad de la estructura de la raíz es consecuente con la uniformidad de las condiciones ecológicas en donde las ericáceas son dominantes. Con algunas excepciones, se restringen a suelos de pH ácido, alto contenido de materia orgánica y baja disponibilidad de nutrientes. Este paralelismo sugiere que la asociación micorrícica que se establece ha sido producto de la evolución para dar respuesta al tipo de estrés específico que causan los ambientes con el tipo de suelo descrito. (Read, 1996).

1.1.4.1.2 Definición de micorriza ericoide

La micorriza ericoide está delimitada exclusivamente a la epidermis de raíces primarias. Las hifas penetran la pared celular vegetal de estas células y se ramifica para formar enrollados hifales que se asemejan a un ovillo de lana, los cuales ocupan la totalidad del espacio intracelular (Fig. 3). Similarmente a otras endosimbiosis, el simbiote fúngico intracelular está separado del citoplasma por una membrana derivada de la célula vegetal que se invagina para delimitar el crecimiento del hongo y la formación de los enrollados (membrana perifungal) (Perotto *et al.*, 1995).

Generalmente, el hongo se encuentra como saprótrofo de vida libre en el suelo, en ausencia de un hospedero adecuado. La colonización comienza cuando el hongo puede reconocer a su contraparte vegetal, gracias a que el ápice de la raíz secreta un mucílago rico en ácidos orgánicos y polisacáridos. A su vez, la hifa secreta una lámina que contiene residuos de sucrosa y manosa que permite que una red laxa de micelio pueda sujetarse a la zona de las raicillas donde se han diferenciado células epidérmicas (Duddridge & Read, 1982).

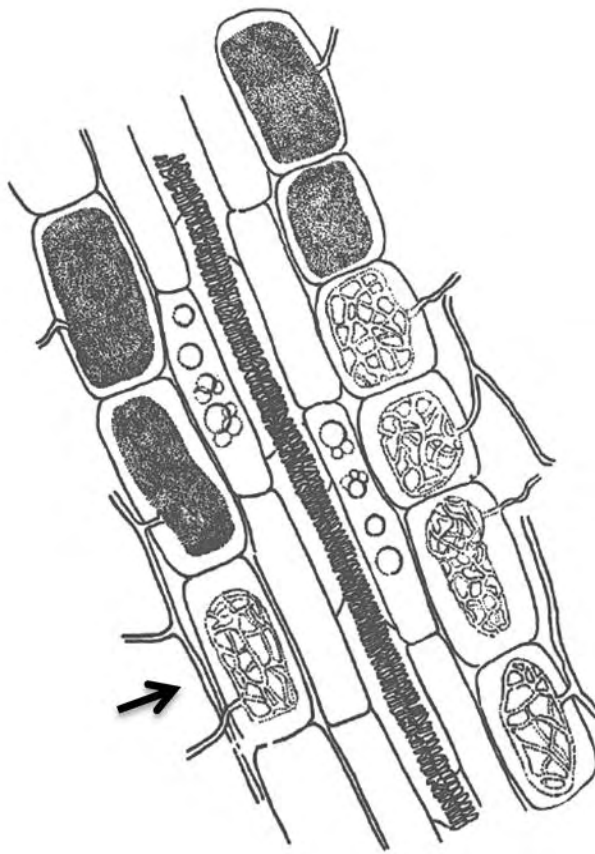


Figura 3. Raíz micorrícica ericoide de *Epacris impressa*. La flecha indica células epidérmicas altamente colonizadas por enrollados hifales. **Fuente:** Read (1996).

A medida que el ápice de la raíz se extiende, nuevas células epidérmicas se diferencian y las hifas en el borde que lideran la red avanzan para colonizar esas células (Read *et al.*, 2004). Este proceso también va acompañado de la liberación de enzimas de degradación de elementos de la pared vegetal, como pectinasas y celulasas que permiten el paso del hongo hacia el interior de la célula (Smith & Read, 2002). El tiempo de vida funcional de la micorriza ericoide comprende entre ocho a once semanas; el intercambio de nutrientes ocurre dentro de este período, donde ambas partes mantienen su integridad estructural (Smith & Read, 2008).

La micorriza ericoide tiene un rol activo en la nutrición de estas plantas, especialmente en la incorporación de minerales que proceden de la descomposición de polímeros orgánicos o sales insolubles, a causa de las acciones de la población saprófaga de vida libre (Read, 1996). Por otro lado, los hongos formadores de este tipo de micorriza tienen la capacidad de movilizar nutrientes de la materia orgánica liberando enzimas extracelulares hidrolíticas y oxidativas como proteasas, quitinasas y fosfatasa, las cuales ayudan al hospedero a adquirir nitrógeno proveniente de proteínas y fósforo de ácidos nucleicos (Sadovsky *et al.*, 2012).

Una vez incorporadas las moléculas de interés, el intercambio entre planta-hongo ocurre en una matriz interfacial que se genera entre la pared celular del hongo y la membrana plasmática de la célula vegetal (Peterson *et al.*, 2004). Además, la colonización por los hongos ericoides parece conferir al hospedero una resistencia significativa a metales, impidiendo el importe de metales pesados como cadmio y aluminio. De hecho, la capacidad de colonización de suelos contaminados demostrada por las ericáceas está asociada a su resistencia a estos metales pesados (Cairney & Meharg, 2003).

1.1.4.1.3 La micorriza ericoide típica y la micorriza ericoide con manto

Una subcategoría de la micorriza ericoide, se denomina micorriza ericoide con manto, nombre proveniente del inglés “sheathed ericoid mycorrhiza”. Las características más prominentes de esta asociación incluyen la conglomeración de micelio extraradicular formando un manto denso, e hifas septadas con pinzas fúngicas (engrosamientos de la hifa alrededor del septo); morfología que se mantiene establecida la simbiosis. Estos rasgos morfológicos son indicativos de hongos basidiomicetos (Vohník *et al.*, 2012); en cambio, cuando la micorriza ericoide está siendo establecida por hongos ascomicetos, se considera típica y se caracteriza por hifas aseptadas con ausencia de rasgos morfológicos distintivos (Read & Smith, 2002).

1.1.4.1.4 Identidad del micobionte

Se reconoce ampliamente que los hongos micorrícicos ericoides pertenecen al filo Ascomycota (Bruzzone *et al.*, 2015; Vralstad *et al.*, 2000; Read, 1996; Dalpé *et al.*, 1989). Sin embargo, siempre ha habido controversia desde sus primeros intentos de aislamiento y cultivo. El hongo más estudiado hasta la fecha fue previamente clasificado como *Pezoloma ericae*, *Hymenoscyphus ericae*, *Pezizella ericae* y *Rhizoscyphus ericae*. Posteriormente, se determinó que segrega conjuntamente con otros hongos estériles que producen enrollados hifales formando el complejo *Rhizoscyphus ericae* o por sus siglas en inglés REA (*Rhizoscyphus ericae* aggregate) (Vralstad *et al.*, 2000; Bruzzone *et al.*, 2015).

No obstante, la revisión filogenética más reciente de estos hongos ubica al simbionte dominante en el género *Hyaloscypha*. La primera especie de hongo experimentalmente confirmada como hongo micorrícico ericoide se reconoce actualmente como *Hyaloscypha hepaticicola*. Muchos de los hongos que fueron ubicados por métodos moleculares en el complejo REA también son congénéricos con *Hyaloscypha*, incluyendo el descrito recientemente *H. gryndleri* por lo que actualmente se denomina el

agregado *Hyaloscypha hepaticicola*. Asimismo, los hongos micorrícicos ericoides confirmados en el género *Meliniomyces*, ahora están clasificados como *Hyaloscypha variabilis* y *Hyaloscypha bicolor*. Además del género *Hyaloscypha*, también se ha comprobado que especies del género *Oidiodendron*, otros ascomicetos de los helotiales como *Leohumicola*, *Acremonium strictum* y *Geomyces pannorum* forman micorrizas ericoides. (Daghino *et al.*, 2022).

Por otro lado, algunas investigaciones recientes han proporcionado evidencia de que los basidiomicetos pueden formar micorrizas ericoides (Vohník *et al.*, 2016; Vohník *et al.*, 2012; Selosse *et al.*, 2007). Especialmente, especies del género *Serendipita* (Sebacinales, Agaricomycetes) y un miembro del complejo *Kurtia argillacea* (Agaricomycetes), especie que fue identificada como la principal responsable de la categoría micorrícica “micorriza ericoide con manto” (Kolařík & Vohník, 2018; Vohník *et al.*, 2012).

1.1.4.2 Asociación endófitos septados oscuros

En líneas generales, se consideran endófitos a todos los organismos que viven en los tejidos internos de las plantas. Esta definición tan amplia contemplaría a cualquier categoría micorrícica como endófito. Sin embargo, las micorrizas pertenecen a un gremio funcional completamente distinto, porque en adición a la colonización de los tejidos internos de la raíz, también crecen extensivamente fuera de la rizósfera, hacia el suelo. Además, generan estructuras específicas para el intercambio bidireccional de nutrientes, mientras que los hongos endófitos se caracterizan por invadir el tejido vegetal en alguna de las etapas de su ciclo de vida, sin causar aparente daño al hospedero (Daghino *et al.*, 2022).

Los endófitos de clase IV denominados comúnmente como endófitos septados oscuros (ESO) o *dark septate endophytes* (DSE), colonizan extensivamente los tejidos corticales de las raíces de numerosas plantas vasculares. Exhiben distintas características morfológicas en función del hongo y el hospedero involucrado. (Smith & Read, 2008). En algunos casos, se presentan como un micelio inter o intracelular, con hifas engrosadas, septadas y melanizadas. En otros casos, la hifa penetra el tejido cortical y forma microesclerocia: una estructura a la que se le ha atribuido funciones de descanso, dispersión e incluso de almacenamiento de sustancias como el glicógeno, proteínas y polifosfatos que incrementan la viabilidad del hongo bajo condiciones extremas (Malicka *et al.*, 2022).

Adicionalmente, forman una estructura que recibe el nombre de micelio laberíntico, la cual consiste en una red miceliar de hifas melanizadas que están sobre la superficie de la raíz o en el tejido radicular. Esta estructura tiene una apariencia similar a la red de Hartig y podría o no mimetizar sus funciones (Jumpponen & Trappe, 1998).

1.1.4.2.1 Reconocimiento entre el endófito y el hospedero

La pared vegetal está íntimamente relacionada con el diálogo molecular entre microorganismo y hospedero e incluso media la mayoría de interacciones planta-microorganismo existentes. Cuando el hongo entra en contacto con la pared vegetal del posible hospedero, esta se modifica y se flexibiliza para permitir el paso del endófito, y para que la membrana plasmática vegetal forme un compartimiento funcional, llamado la interfaz simbiótica, que delimita el crecimiento del hongo. A su vez, el hongo secreta enzimas de degradación como celulasas, lacasas, pectinasas y xilanasas que permiten su infiltración, colonización y su proliferación en el tejido vegetal. Puesto que la mayoría de estos endófitos no pueden degradar carbohidratos ni lignina, las respuestas observadas en los hospederos son no-patogénicas y asintomáticas, aunque tienen mayor capacidad infecciosa que muchos patógenos (Lu *et al.*, 2021).

1.1.4.2.2 Efectos de los endófitos septados en el hospedero

Los endófitos septados pueden degradar distintas sustancias orgánicas como celulosa, almidón, y xilano gracias a la secreción de lipasas, lacasas, amilasas y polifenol oxidasas, lo que puede ampliar la fuente de nutrientes del hospedero. Además, confieren protección contra patógenos, herbívoros e incluso aminoran el efecto de condiciones ambientales estresantes como el calor. Estos beneficios pueden estar conectados con la capacidad que tienen de sintetizar compuestos antimicrobianos y antibacterianos, metabolitos secundarios tóxicos y con el alto contenido de melanina en sus hifas (Kariman *et al.*, 2018). No obstante, la interacción entre endófitos septados y hospederos se expresa a lo largo del continuo mutualismo-parasitismo puesto que hay evidencia de efectos beneficiosos y neutrales como patogénicos en distintos hospederos (Newsham, 2011).

En el caso particular de los miembros de la familia Ericaceae, no se ha registrado que los endófitos septados tengan tendencias parásitas, pero sí se ha observado efectos neutrales en *Rhododendron* (Vohník *et al.*, 2003) y el incremento en la toma de nitrógeno en *Calluna vulgaris* gracias a la presencia de *Phialocephala fortinii* (Zijlstra *et al.*, 2005). Sin embargo, no hay consenso sobre el estado micorrícico de estas asociaciones dado que no se ha demostrado que estos organismos generen estructuras de interfaz específicas para el intercambio de nutrientes (Bizabani, 2015).

1.1.4.2.3 Identidad de los endófitos septados oscuros

Los endófitos septados representan un ensamblaje artificial que los agrupa en base a características morfológicas y funcionales; por esta razón, ubicarlos en una unidad taxonómica definida es prácticamente imposible. La mayoría de estos hongos pertenecen al orden Helotiales y Pleosporales (Ascomycota). Otras especies se encuentran en órdenes como: Chaetothyriales, Capnodiales, Calosphaeriales, Chaetosphaeriales, Eurotiales, Hypocreales, Magnaporthales, Microascales, Sordariales y Xylariales. Los más estudiados hasta la fecha pertenecen al complejo *Phialocephala fortinii-Acephala applanata* (CAP) y al complejo de especies *Gaeumannomyces-Phialophora/Harpophora* (CGP) (Malicka *et al.*, 2022).

El complejo *Phialocephala fortinii-Acephala applanata* incluye numerosas especies crípticas que anteriormente se consideraban una sola especie: *Phialocephala fortinii* (Helotiales). Este grupo de hongos ha sido detectado numerosas veces en las raíces de coníferas, ericáceas y orquidáceas del hemisferio norte (Malicka *et al.*, 2022; Sadowsky *et al.*, 2012; Massicotte *et al.*, 2005). Sin embargo, la poca información obtenida de algunas investigaciones enfocadas en la ocurrencia de este grupo, sugiere que puedan estar presentes en las regiones tropicales y subtropicales, implicando su distribución cosmopolita (Lukešová *et al.*, 2015; Bizabani, 2015; Queloz *et al.*, 2011). En cualquier caso, los estudios que se han realizado en la última década han demostrado la inmensa diversidad de estos hongos (Shadmani *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2017).

1.1.4.3 Micorrizas arbusculares

Las micorrizas arbusculares son asociaciones simbióticas de carácter mutualista que ocurren en el 80% de las plantas terrestres. A pesar de que en esta categoría existen algunas variaciones estructurales, la mayoría de micorrizas arbusculares se caracterizan por la presencia de hifas intraradiculares (ya sea inter o intracelulares), arbusculos (hifas finamente ramificadas involucradas en el intercambio de nutrientes), micelio extraradicular (hifas que conectan la raíz con el suelo) y esporas que se forman en el micelio extraradicular. Algunas especies de hongos forman estructuras intraradiculares llamadas vesículas (porciones alargadas de la hifa que acumulan cuerpos lipídicos) (Peterson *et al.*, 2004).

Se reconocen dos morfotipos: el tipo arum, el cual se distingue por enrollados hifales extraradiculares, hifas intercelulares extensivas, arbusculos y vesículas intraradiculares y el morfotipo parís, que se caracteriza por la producción numerosa de vesículas, la ausencia de hifas intercelulares e hifas intracelulares que se enrollan y ramifican para formar arbusculos (Bizabani, 2015). Ambos

morfortipos se han observado en las raíces de ericáceas (Obase *et al.*, 2013; Fukuchi *et al.*, 2011; Urcelay, 2002); pueden co-ocurrir con micorrizas ericoides o existir por sí solos en hospederos de esta familia (Massicotte *et al.*, 2005; Koske, 1990).

1.1.4.3.1 Proceso de colonización

Para que el desarrollo intracelular de estructuras características tome lugar, primero debe haber contacto entre la superficie de la raíz y el hongo micorrícico. Previo a la penetración hifal, el hongo forma estructuras de anclaje especializadas llamadas apresorios. Las células epidérmicas ubicadas directamente debajo de esta estructura, sufren reprogramación intensiva como la remodelación de filamentos de actina y microtúbulos para formar un aparato de pre-penetración. El desarrollo de este aparato involucra la expresión diferencial de genes, los cuales están involucrados en la modificación de la pared vegetal (como el gen que codifica para la celulosa sintasa) (Peterson *et al.*, 2004).

Después de la penetración celular, se forman las estructuras descritas en la sección anterior en función del hospedero, la cepa del hongo y las condiciones del sustrato (Kariman *et al.*, 2018). Interesantemente, bajas concentraciones de fósforo inorgánico (Pi) en conjunto con las rutas de señalización de la micorriza arbuscular, parecen ser los prerequisites para el establecimiento de esta simbiosis. No obstante, los mecanismos regulatorios que puedan estar controlando este fenómeno siguen sin dilucidarse (Mohanta & Bae, 2015).

1.1.4.3.2 Beneficios de la micorriza arbuscular

Los efectos que los hongos arbusculares ejercen sobre el crecimiento y la toma de macronutrientes como P y N de las plantas hospederas han sido estudiados extensivamente, especialmente en cultivos económicamente importantes como *Cucurbita maxima*, *Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor* y *Solanum lycopersicum*. La estimulación del crecimiento está ligada al hecho de que este tipo de micorriza extiende la red de absorción mucho más allá de la zona de agotamiento de nutrientes de la rizósfera, lo que permite el acceso a una porción mucho más grande de suelo (Diagne *et al.*, 2021).

Por otro lado, los hongos arbusculares promueven el crecimiento de la planta, la absorción de agua y en general, la fisiología de la misma bajo condiciones de estrés abiótico como la salinidad, la sequía y la presencia de metales pesados; siendo más relevante la protección contra la sequía puesto que es uno de los factores que reduce la productividad de la planta considerablemente (Balestrini & Lumini, 2018).

1.1.4.3.3 Los hongos arbusculares

Los hongos involucrados en esta simbiosis pertenecen a cuatro órdenes: Archaeosporales, Paraglomerales, Diversisporales y Glomerales (Glomeromycota, Glomeromycetes). Se reconocen ocho géneros en base a características morfológicas de las esporas de estos hongos que son: *Glomus*, *Paraglomus*, *Sclerocystis*, *Scutellospora*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Archaeospora* y *Entrophospora*, los cuales engloban 150 especies aproximadamente (Peterson *et al.*, 2004). El filo Glomeromycota presenta morfologías asexuales simples lo que hace difícil la discriminación basada únicamente en estos caracteres, incluso entre taxones que han sido identificados como distintos con las herramientas moleculares. Además, la evidencia molecular obtenida a partir de muestras en campo, sugiere que muchas especies no han sido descritas todavía (Lewis, 2016).

1.1.5 *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale* en Venezuela

Entre los estudios que se han realizado en Venezuela, se pueden mencionar a Barrios & Rondón (2014), quienes realizaron la descripción xilemática de las especies *Gaultheria myrsinoides*, *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale*, por su posible aprovechamiento como especies madereras así como a Cáceres (2008) quien estudió los mecanismos de resistencia a las bajas temperaturas y el intercambio de gases en *Vaccinium meridionale*, en un gradiente altitudinal del Páramo La Aguada, perteneciente al Parque Nacional Sierra Nevada. Estos estudios forman parte del gran número de investigaciones que se han enfocado en las interacciones existentes entre las plantas, el ambiente y otros organismos en partes visibles y de fácil acceso.

No obstante, interacciones complejas y que están presentes en todo el planeta con numerosas familias de plantas y organismos involucrados ocurren bajo suelo. De estas interacciones, las micorrizas prevalecen tanto en sistemas naturales como en sistemas controlados por el hombre y es por eso que su estudio es de gran relevancia. Confirmar la presencia de micorrizas ericoides en *V. floribundum* y *V. meridionale* así como aportar datos de su morfología y comportamiento es el primer paso hacia el entendimiento del proceso de colonización y sus propiedades micorrícicas.

1.2 Justificación

Las asociaciones micorrícicas se hallan en todos los ecosistemas; en importantes bosques y especies de cultivo. Los hongos involucrados en estas asociaciones desempeñan roles fundamentales como biofertilizadores por lo que se pueden utilizar para promover el establecimiento de plantas económicamente importantes en suelos deficientes en nutrientes así como incrementar sus tasas de crecimiento, desarrollo y producción. Por lo tanto, es importante realizar estudios estructurales que aporten información básica de la morfología de la simbiosis.

Por otro lado, las especies de arándano en estudio son recursos fitogenéticos endémicos aún no bien conocidos con alto potencial de aprovechamiento como alimento nutraceutico, que además tiene un alto valor ecológico puesto que contribuyen al soporte de la diversidad biológica de mamíferos y aves presentes en los hábitats de su ocurrencia. Asimismo, una mejor comprensión de los procesos de micorrización natural puede contribuir a mejorar las estrategias de propagación de los arándanos andinos, lo cual aumentaría su producción horticultural, estimulando su explotación por pequeños agricultores. Igualmente, este conocimiento es vital para favorecer su conservación en el páramo, su hábitat natural, que debido a los efectos del cambio climático está siendo modificado de forma acelerada.

1.3 Hipótesis

Si los hongos formadores de micorrizas ericoides son simbiontes obligatorios de la mayoría de las especies del género *Vaccinium*, se esperaría que en las especies *Vaccinium floribundum* Kunth y *Vaccinium meridionale* Swartz del Parque Nacional Sierra de la Culata estén presentes estos organismos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Determinar morfo-anatómicamente si están presentes hongos micorrícicos ericoides en individuos de las especies de *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale* del Parque Nacional Sierra de la Culata.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Verificar ópticamente la presencia de los hongos en raíces de individuos de las especies de *Vaccinium*.
2. Comprobar la presencia de hongos ericoides en el tejido radicular de individuos de las especies de *Vaccinium* mediante aislamiento y cultivo.
3. Describir los tipos de colonización de los hongos micorrícicos ericoides y sus características morfo-anatómicas en cada una de las especies bajo estudio.

www.bdigital.ula.ve

2. Metodología

2.1. Área de Estudio

El sitio de estudio se encuentra dentro del Parque Nacional Sierra de la Culata, ubicado en la cordillera norte de la Sierra de la Culata de los andes venezolanos, en la estribación occidental del páramo de Piedras blancas, próximo a la laguna Tapada la cual se encuentra a 3420 m de altitud cercana a una de las afluentes que forman las cabeceras del río Mucujún.

Previo a la selección del área de estudio, se efectuó una revisión detallada de los especímenes de herbario del género *Vaccinium* depositados en el herbario “Luis Ruiz Terán” (MERF) de la Universidad de los Andes para identificar las especies en estudio y conocer su distribución geográfica en el estado Mérida. Finalmente, se escogieron dos localidades en las que crecían especímenes del género *Vaccinium* cuya georeferenciación y elevación se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Ubicación geográfica y descripción de los sitios de muestreo

Especie	Sitio	Longitud y Latitud	Altitud (m.s.n.m)	Tipo de Sitio	Especie Dominante
<i>V. floribundum</i>	Sendero hacia la laguna Tapada	8°46'0"N 71°02'52.1"W	3412	Parche de bosque	<i>Diplostephium</i> sp.
<i>V. meridionale</i>		8°46'0"N 71°02'52.1"W	3203	Individuos aislados	<i>Calamagrostis</i> sp.

2.1.1 Clima

En la zona de estudio el patrón de precipitación predominante es bimodal, con dos máximas en abril y octubre y dos mínimas en febrero y julio, con una amplitud térmica diaria promedio de régimen medio anual isotermal (Aldana & Bosque, 2008). En la transición entre el bosque altiandino y el subpáramo, las temperaturas medias multianuales son inferiores a los 8 o 9 °C, mientras que en páramo andino los valores son inferiores a los 6 ° y en páramo altiandino, valores inferiores a los 3° (Llambí, 2003).

2.1.2 Suelos

El tipo y las propiedades del suelo son determinados por el clima y la existencia de una capa homogénea de cenizas de erupciones volcánicas del cuaternario. En el caso de la Cordillera de Mérida, los suelos se formaron sobre rocas sedimentarias y metamórficas y sin cenizas. Por debajo de los 3.800 m.s.n.m, los suelos son inceptisoles y entisoles (Llambí, 2003).

En general, los suelos en el piso andino, desarrollados sobre sedimentos recientes de origen glaciar y fluvioglaciar, son húmicos, ácidos y bajos en nutrientes, de textura media, con bajo porcentaje de saturación de bases, alta capacidad de intercambio catiónico, baja capacidad de retención de agua y una relación C/N (Carbono/Nitrógeno) alta (Azócar & Fariñas, 2003).

2.1.3 Vegetación

Las especies bajo estudio se recolectaron dentro de los límites altitudinales para la zona de transición entre bosque paramero y páramo andino. El estrato superior de esta franja altitudinal (3000 - 3500 m.s.n.m) está dominado por arbustos enanos y árboles no mayores a 10 metros pero también muestra vegetación de páramo abierto como plantas del tipo pajonales y rosetales. Las familias Ericaceae, Asteraceae, Bromeliaceae, Melastomataceae, Rubiaceae y Poaceae destacan como componentes ecológicos y florísticos importantes del Páramo de la Culata (Monasterios, 1980).

Vaccinium meridionale y *Vaccinium floribundum* se encuentran creciendo en conjunto con otras especies como parches de bosques aislados o como individuos solitarios. Algunas de las especies más relevantes que se observan son: *Baccharis prunifolia*, *Calamagrostis* sp., *Diplostephium* sp., *Gaultheria* sp., *Pernettya* sp., *Valeriana parviflora*, *Hesperomeles pernettyoides*, *Espeletia* spp, entre otras. (Llambí, 2015).

2.2 Colecta del material vegetal

Las muestras de las dos especies de *Vaccinium* fueron recolectadas una vez por mes durante el período de abril-agosto del año 2018, en parches de arbustales parameros donde se encontraban creciendo conjuntamente con otras especies arbustivas o de forma dispersa como individuos aislados. Se recolectaron aleatoriamente tres individuos por especie, aparentemente saludables y con el tronco lignificado, fueron seleccionados al azar en cada sitio de muestreo sin tomar en cuenta el tamaño o la

edad de las plantas. Puesto que las raíces de *Vaccinium* sp. son superficiales, se colectaron en un radio de 10-15 cm del centro de la planta a una profundidad de 10-15 cm junto con suelo y se almacenaron en tubos tipo “falcon”, se transportaron al laboratorio de Genética y Química Celular (GeQuimCel) de la Universidad de Los Andes, donde se refrigeraron hasta el momento de su procesamiento, el cual se realizó en un período menor a cuatro días desde su colecta.

Para la selección de las raíces, se tomó en cuenta el modelo de desarrollo de los sistemas radiculares (Hackett, 1969) el cual propone que las raíces producidas directamente desde el vástago son ejes, las que se derivan de estos ejes son raíces laterales primarias, las que se derivan de estas raíces primarias son laterales secundarias y así sucesivamente (Fig. 4). Se colectaron aproximadamente 2 gr del sustrato asociado a raíces laterales cuaternarias, terciarias, secundarias y primarias por cada individuo muestreado. Una parte fue destinada para la observación microscópica y otra parte para el cultivo de hongos endófitos.

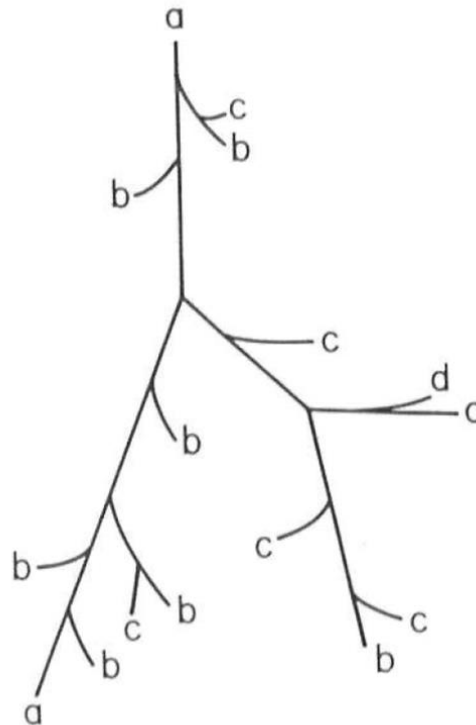


Figura 4. Diagrama esquemático de un sistema radicular que ilustra el método de clasificación a partir del desarrollo de la raíz. **a:** eje, **b:** laterales primarios, **c:** laterales secundarios, **d:** laterales terciarios. **Fuente:** Hackett (1969).

2.3 Procesamiento de las micrografías obtenidas

Gran parte de los resultados experimentales de esta investigación se obtuvieron a partir de la descripción y análisis de imágenes obtenidas con un microscopio óptico LEICA CME equipado con una cámara digital Pulpicam Ven- α -vision del Laboratorio de Anatomía Vegetal del Instituto Jardín Botánico de Mérida y el programa de procesamiento de imágenes ImageJ en su versión Fiji. Con este programa se puede editar, analizar, procesar, guardar e imprimir imágenes 8-bit, 16-bit y 32-bit en cualquiera de los formatos de imágenes más utilizados como TIFF, GIF y JPEG. Es un programa de dominio público desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH) (Campa, 2017). Por otro lado, se utilizó el programa de diseño Adobe Photoshop Lightroom en su versión para teléfono móvil para corregir parámetros de luz como contraste y exposición. Se utilizó la misma edición para todas las micrografías obtenidas.

2.4 Comprobación de la presencia de micorrizas ericoides por microscopio óptico

Las raíces fueron sometidas a un procedimiento de decoloración y tinción. Para la decoloración de las raíces, se siguió el protocolo descrito por Phillips & Hayman (1970) con algunas modificaciones. Las raíces intactas se lavaron con agua corriente para eliminar cualquier residuo orgánico o de sustrato y posteriormente, se lavaron diez veces con agua destilada. Fueron depositadas en tubos de vidrio de cinco mililitros con malla en el fondo y sumergidas en una solución de KOH al 10% contenida en vasos de precipitado. Seguidamente, las raíces primarias, secundarias y terciarias se calentaron durante una hora a una temperatura de 86°C, mientras que las raíces cuaternarias se calentaron durante dos horas a 86°C. El material radicular se sometió a otro lavado con agua destilada para minimizar la cantidad de residuos de KOH.

Para la tinción de las raíces, se sumergieron en solución de HCl al 1% durante 30 minutos y luego en una solución a partes iguales de azul de tripán y lactoglicerol al 0,05% durante 12 horas en una cápsula de Petri. El exceso de colorante se removió con lactoglicerol al 0,05%. Las raíces teñidas se seccionaron en segmentos de 0,5 cm de longitud y se distribuyeron entre 20-30 segmentos de raíz por portaobjeto para cada individuo de cada especie para los diferentes muestreos. Finalmente, se fijaron en lactoglicerol al 0,05%. Las raíces teñidas se observaron bajo el microscopio Leica CM con un objetivo de 40X. Se identificaron como hongos micorrícicos ericoides aquellos que cumplieron con las características morfo-anatómicas descritas por Read *et al.* (2004) (enrollados hifales aseptados

ocupando células epidérmicas) y por Vohník *et al.* (2012) (enrollados hifales con septos y pinzas ocupando células epidérmicas) para cada especie y cada mes de muestreo.

2.5 Aislamiento y cultivo de hongos endófitos

Aproximadamente un gramo de las raíces colectadas de ambas especies se lavó ocho veces con agua destilada. Estas muestras se seccionaron en segmentos de 2 cm. Se sumergieron en una solución de NaClO al 1% durante 5 minutos y se secaron con papel absorbente esterilizado. Nuevamente, se lavaron las raíces con agua destilada en ocho ocasiones para eliminar residuos de la solución de NaClO. Estos segmentos se colocaron en placas de Petri con medio APD (agar-papa-dextrosa) (Fig. 5) (Tian *et al.*, 2011), que posteriormente se sellaron con parafilm y se incubaron en oscuridad a 20 °C. Al cabo de cinco días, se registraron observaciones del desarrollo del micelio. Se agruparon en morfotipos basados en características macroscópicas observadas en las colonias de hongos obtenidas.



Figura 5. Distribución del inóculo sobre medio de cultivo agar-papa-dextrosa.

2.6 Caracterización morfo-anatómica de la simbiosis micorrícica ericoide en ambas especies

Para la caracterización de la organización estructural de la simbiosis, se utilizaron las mismas muestras con las que se comprobó la presencia de los hongos formadores de micorrizas ericoides en ambas especies. La descripción de las estructuras observadas se basó en las descripciones publicadas por otros autores (Baba *et al.*, 2016; Vohník *et al.*, 2012; Sadowsky *et al.*, 2012; Vohník & Albrechtová, 2011; Massicotte *et al.*, 2005; Read, 1996). Se aplicó el estadístico no paramétrico Mann-Whitney para evaluar la significancia de la única variable métrica que se realizó en este estudio: diámetro hifal.

www.bdigital.ula.ve

3. Resultados

3.1 Comprobación de la presencia de hongos formadores de micorrizas ericoides por microscopio óptico

Las raíces de ambas especies se consideraron colonizadas por hongos micorrícicos ericoides (HME) cuando se observaron ovillos laxos o compactos de hifas aseptadas, correspondientes a la micorriza ericoide típica (Fig. 6A y B). También cuando se observaron estructuras fúngicas caracterizadas por hifas hialinas septadas con protrusiones en los septos denominadas “pinzas” (del inglés “*clamp*”)(Fig. 6C y D), presentes en los ovillos intracelulares, indicativos de las micorrizas ericoides con manto. Ambos tipos de colonización se restringen al tejido epidérmico y solo se observaron en raíces jóvenes, las cuales tienen una coloración pálida ligeramente amarilla.

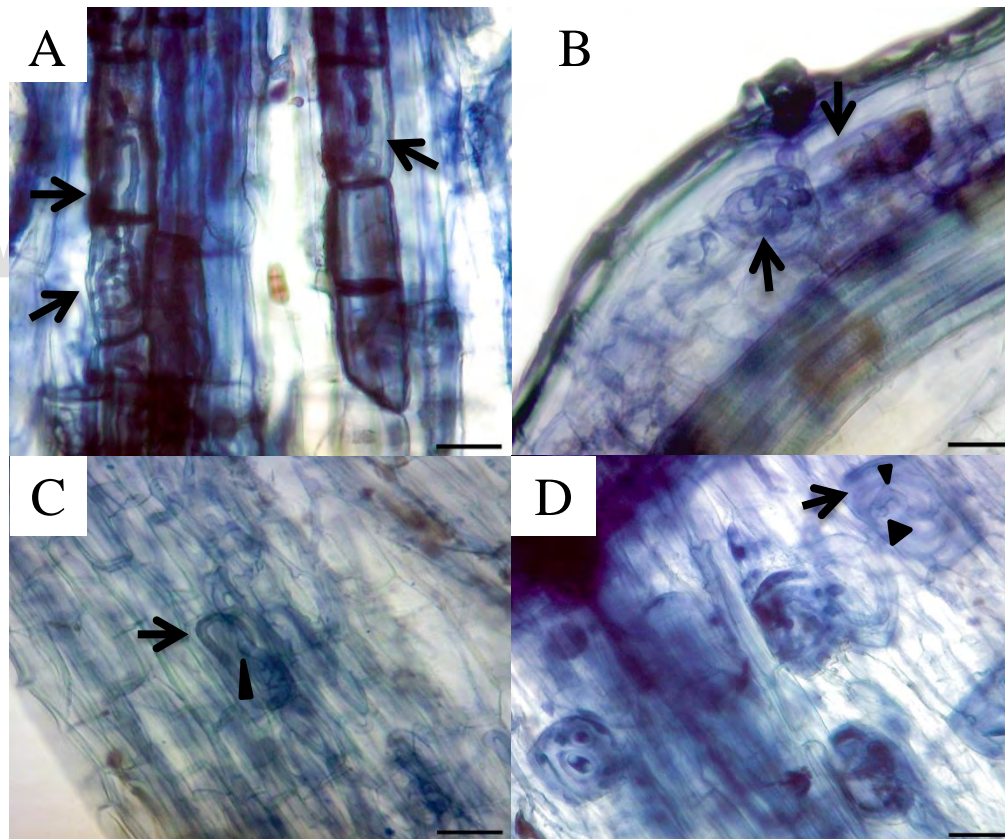


Figura 6. Estructuras fúngicas observadas en las células epidérmicas de *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale* que constatan la presencia de colonización por micorrizas ericoides. Barra de escala = 50 μm . **A.** Ovillo hifal característico de micorrizas ericoides típicas en la raíz de *Vaccinium floribundum* (flechas). **B.** ovillo hifal característico de micorrizas ericoides con vaina en la raíz de *V. floribundum* (flecha) con septos y pinzas (triángulo). **C.** ovillo hifal característico de micorrizas ericoides con vaina en la raíz de *V. meridionale* (flecha) con septos y pinzas (triángulos).

3.2 Comprobación de la presencia de hongos endófitos por aislamiento y cultivo

Mediante la utilización como inóculos de los segmentos de raíz de las especies en estudio, se obtuvieron tres morfotipos de hongos potencialmente micorrícicos, un morfotipo de hongos potencialmente endófitos y un morfotipo desconocido (Tabla 3). Una de las características más resaltantes observada en estos cultivos fue la lentitud de la aparición de las colonias. En el primer registro de observación, cuatro días después de la inoculación, solo se observaron colonias bacterianas (Fig. 7). No se observaron características morfológicas que permitieran la identificación taxonómica de estos endófitos puesto que son colonias estériles, de crecimiento lento, generalmente radial.

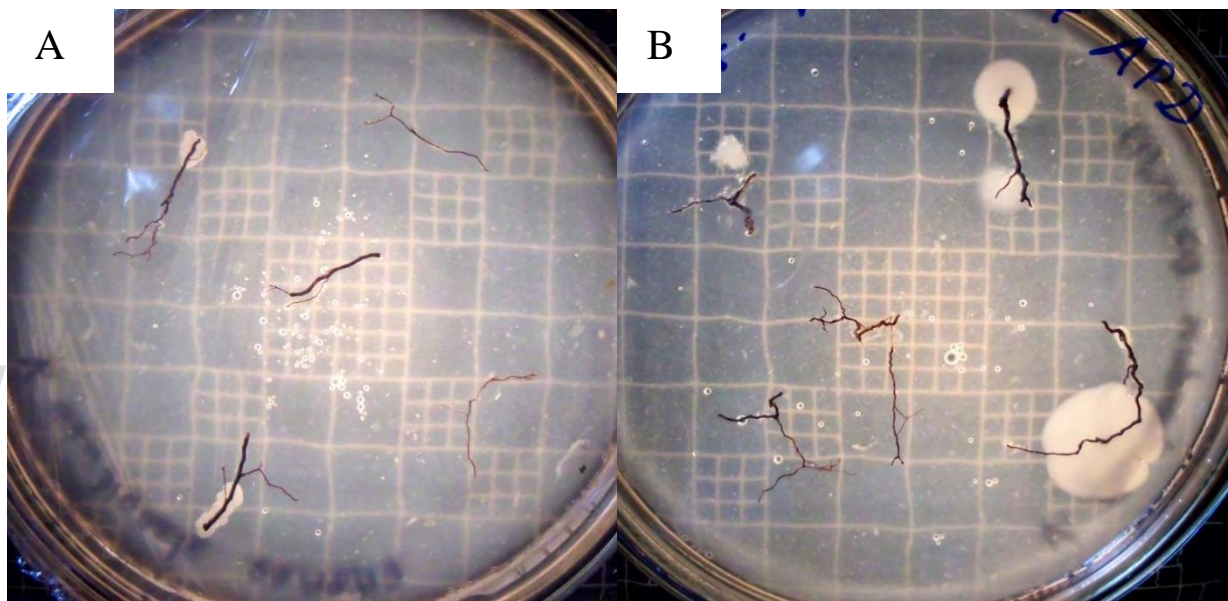


Figura 7. Cultivo de hongos endófitos a los 4 días de haber sido inoculado. **A.** Raíces de *V. floribundum*. **B.** Raíces de *V. meridionale*.

El morfotipo 1 (Fig. 8A y B) se observó a partir de la tercera semana de cultivo; la cara abaxial tiene una apariencia lustrosa (Fig. 8B y C) de tonalidades pardas mientras que la cara adaxial es de color blanco grisáceo y con una textura algodonosa; características macroscópicas similares a las reportadas para los endófitos septados oscuros. El morfotipo 2 corresponde a colonias completamente blancas en el centro y ligeras coloraciones grises hacia los bordes (Fig. 8A), tiende a ocupar toda la caja de Petri formando un micelio con una apariencia pulverulenta. Este tipo de morfología no solo ha sido reportada para hongos micorrícicos ericoides sino también para hongos formadores de micorrizas arbusculares.

Tabla N° 3. Características macroscópicas observadas en las colonias de hongos endófitos

Morfotipo	Características Morfológicas	Potenciales Hongos Endófitos	Especie vegetal de la que fue aislado
1	Micelio con tonalidades pardas en la cara abaxial, blanco-grisáceo en la cara adaxial.	endófitos septados	<i>Vaccinium floribundum</i> , <i>Vaccinium meridionale</i> .
2	Micelio blanco en el centro y gris hacia los bordes.	hongos ericoides/ arbusculares	<i>V. floribundum</i>
3	Micelio verde oliváceo-negro.	hongos ericoides del complejo <i>Hyaloscypha</i> <i>hepaticicola</i>	<i>V. floribundum</i> , <i>V. meridionale</i>
4	Micelio púrpura en el centro y blanco hacia los bordes.	desconocido	<i>V. meridionale</i>
5	Micelio gris plomo con tonalidades pardo oscuro en el centro.	forma anamorfa de <i>Hyaloscypha hepaticicola</i>	<i>V. floribundum</i>

El morfotipo 3 se caracterizó por colonias de color verde oliváceo-negro, textura aterciopelada y de bordes irregulares; morfología que coincide con lo descrito para los hongos pertenecientes al complejo *Hyaloscypha hepaticicola*: *Oidiodendron maius* y *O. griseum* (Fig. 8C y D). El morfotipo 4, en cambio, desarrolla un micelio de apariencia algodonosa, de color blanco en la zona más joven, tornándose de color rosa-púrpura con la edad (Fig. 8E). No se han reportado características morfológicas semejantes en ninguna de las investigaciones sobre la resíntesis de los hongos micorrícicos ericoides. Finalmente, el morfotipo 5 corresponde a colonias de color gris plomo que pueden tomar tonalidades café con la edad y en algunos casos, en el micelio aéreo (Fig. 8D). Los morfotipos 1 y 3 fueron aislados tanto de *Vaccinium floribundum* como de *Vaccinium meridionale* por lo que se presume la presencia de hongos micorrícicos ericoides y de hongos endófitos septados oscuros (ESO) en las raíces de ambas especies.

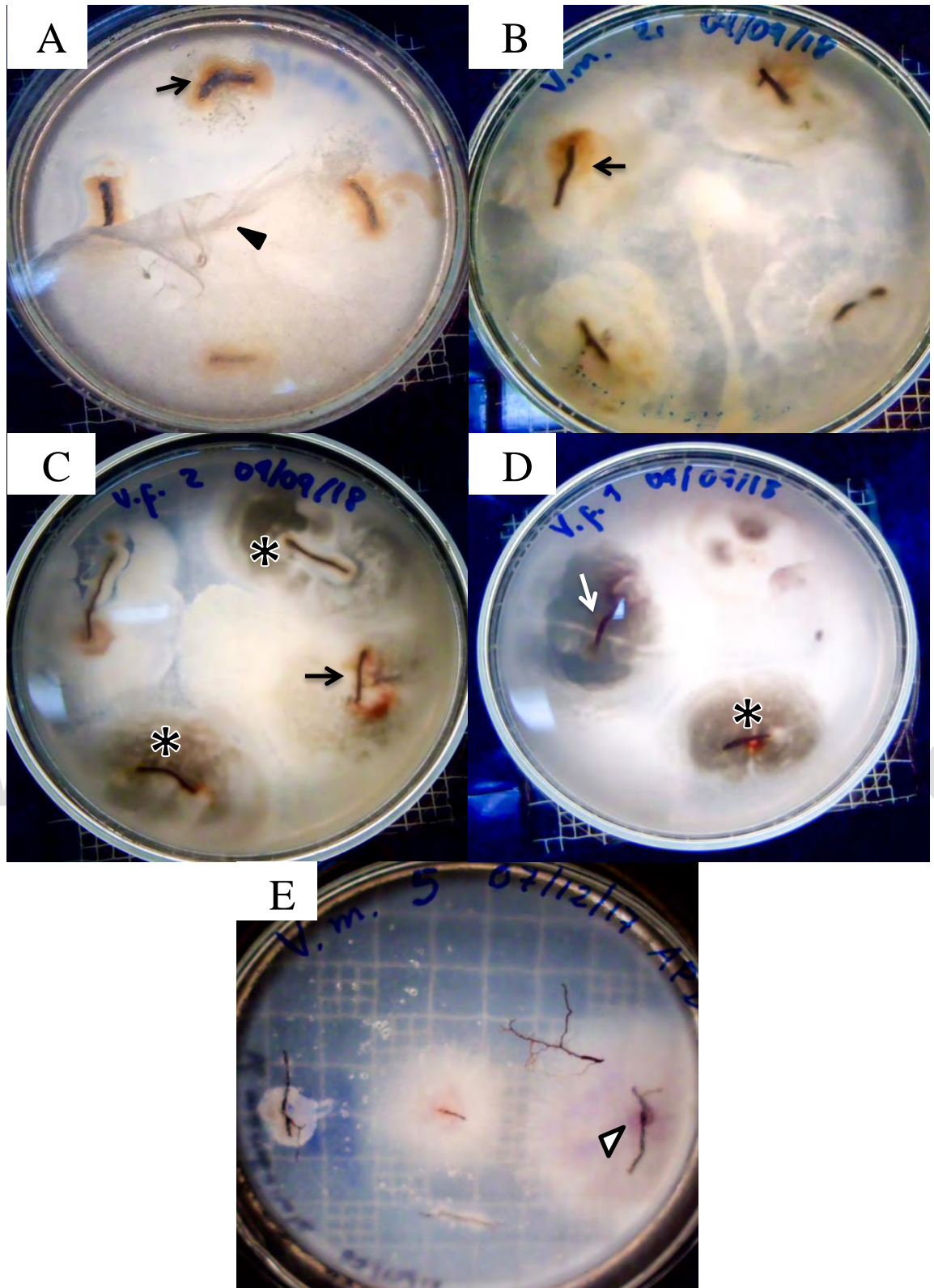


Figura 8. Características macroscópicas de colonias de endófitos aislados a partir de las raíces de *Vaccinium* spp. después de 4 semanas en medio APD a 24°C. **A, C y D.** Colonias de endófitos encontrados en *V. floribundum*. **B y E:** colonias de endófitos encontrados en *V. meridionale*. **Flechas negras:** morfotipo 1. **Triángulos negros:** morfotipo 2. **Asterisco:** morfotipo 3. **Triángulo blanco:** morfotipo 4. **Flecha blanca:** morfotipo 5.

3.3 Caracterización morfo-anatómica de las micorrizas ericoides observadas en cada especie

Se observaron dos tipos de colonización correspondientes a micorrizas ericoides en las raíces de *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale*: micorrizas ericoides típicas (enrollados hifales aseptados) y micorrizas ericoides con vaina (enrollados hifales septados con pinzas fúngicas). Ambos tipos de colonización mostraron preferencia por las células epidérmicas de los tejidos inmaduros y parecen ser mutuamente excluyentes. Las características morfológicas observadas van a detallarse a continuación.

3.3.1 Micorriza ericoide típica

Una de las características más notables observadas en este estudio es que existen dos posibles estrategias o modos de colonizar las células epidérmicas: por células individuales o por colonización horizontal (penetración de células vecinas). En el caso de *Vaccinium floribundum*, se observaron los dos modos mientras (Fig. 9A) que en *V. meridionale* solo se observó la colonización independiente (Fig. 9B). Asimismo, se obtuvo evidencia de todas las etapas de la colonización: iniciación (Fig. 10), establecimiento y degradación (Fig. 11); teniendo en cuenta que en *V. floribundum* fue posible observar los tres estadios mientras que en *V. meridionale* solo se observaron dos: iniciación y establecimiento.

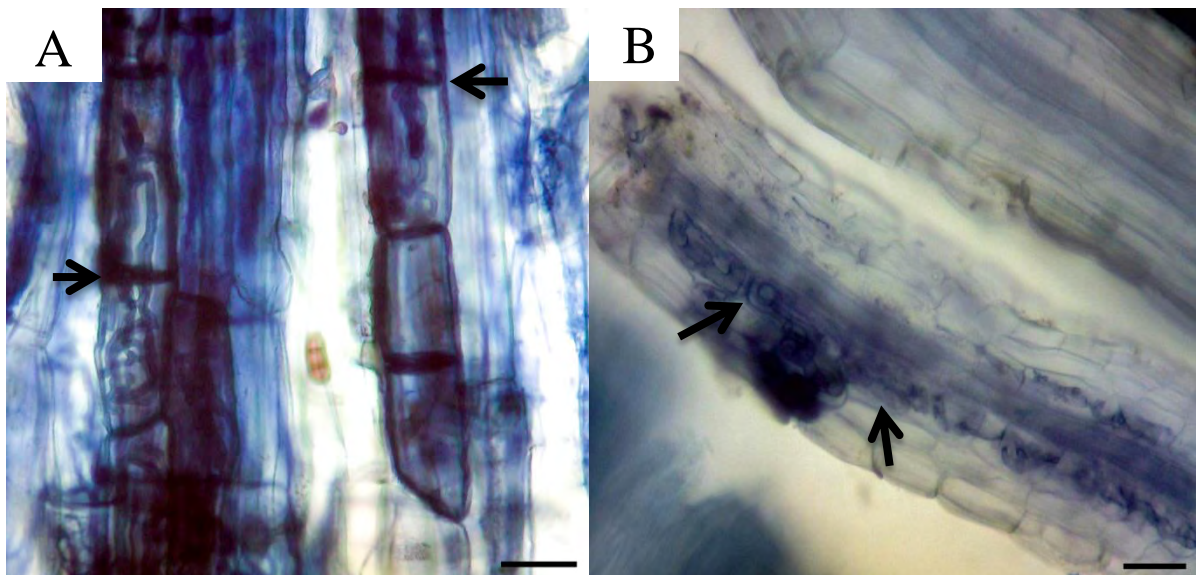


Figura 9. Estrategias de colonización de las células epidérmicas exhibidas por los hongos ericoides en *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale*. Barra de escala = 50 μ m. **A.** Colonización horizontal en *Vaccinium floribundum*. **B.** Colonización independiente en *Vaccinium meridionale*.

El estadio de iniciación hace referencia a la formación de micelio laxo sobre la superficie de la raíz, un rasgo diagnóstico para este tipo de simbiosis. Dicho micelio se caracteriza por hifas finas, translúcidas, regulares y con extensión limitada (Fig. 10). El segundo estadio corresponde al establecimiento de la simbiosis propiamente dicha. Se identificó como tal a los ovillos laxos a compactos (Fig. 11A-D), ocupando los espacios intracelulares de las células epidérmicas. Cabe mencionar que cuando se observó micelio extraradicular, no hubo colonización intracelular y cuando se observó colonización intracelular, no se observó micelio extraradicular.

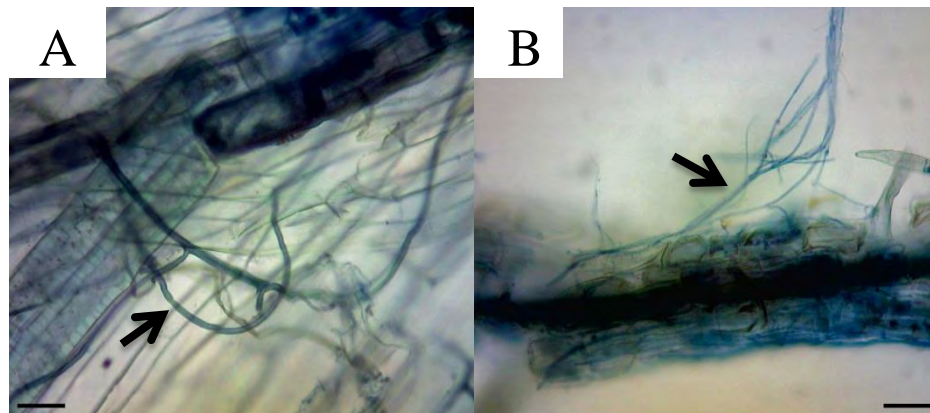


Figura 10. Primera etapa del proceso de colonización de micorrizas ericoides típicas en *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 μ m. **A.** Micelio extraradicular en la raíz de *V. floribundum*. **B.** Micelio extraradicular en la raíz de *V. meridionale*.

Asimismo, resulta particular que el diámetro de la hifa parece incrementar cuando la simbiosis tiene lugar. En otras palabras, el diámetro hifal es menor en estado saprótrofo y mayor cuando se forma el ovillo, en estado biótrofo (Tabla 4), por lo que pudiera tratarse de una característica morfológica relevante de esta categoría micorrícica en ambas especies. Finalmente, se observó el estadio final que corresponde a la muerte celular de la célula epidérmica y pérdida de la integridad del ovillo que alberga (Fig. 11E).

Tabla N° 4. Promedio y desviación estándar del diámetro de las hifas en la micorriza ericoide típica observada en raíces juveniles de *Vaccinium* spp.

Especie	Micelio extraradicular (μ m)	Ovillos hifales (μ m)
<i>Vaccinium floribundum</i>	3,1240 ^a \pm 1,0618	9,4461 ^b \pm 2,2405
<i>Vaccinium meridionale</i>	3,0727 ^a \pm 1,3298	11,6993 ^b \pm 1,5633

Promedios con exponentes desiguales indican diferencias significativas entre categoría “micelio extraradicular” y categoría “ovillo hifal” para cada especie (Mann-Whitney; $P < 0,05$). $n = 12$.

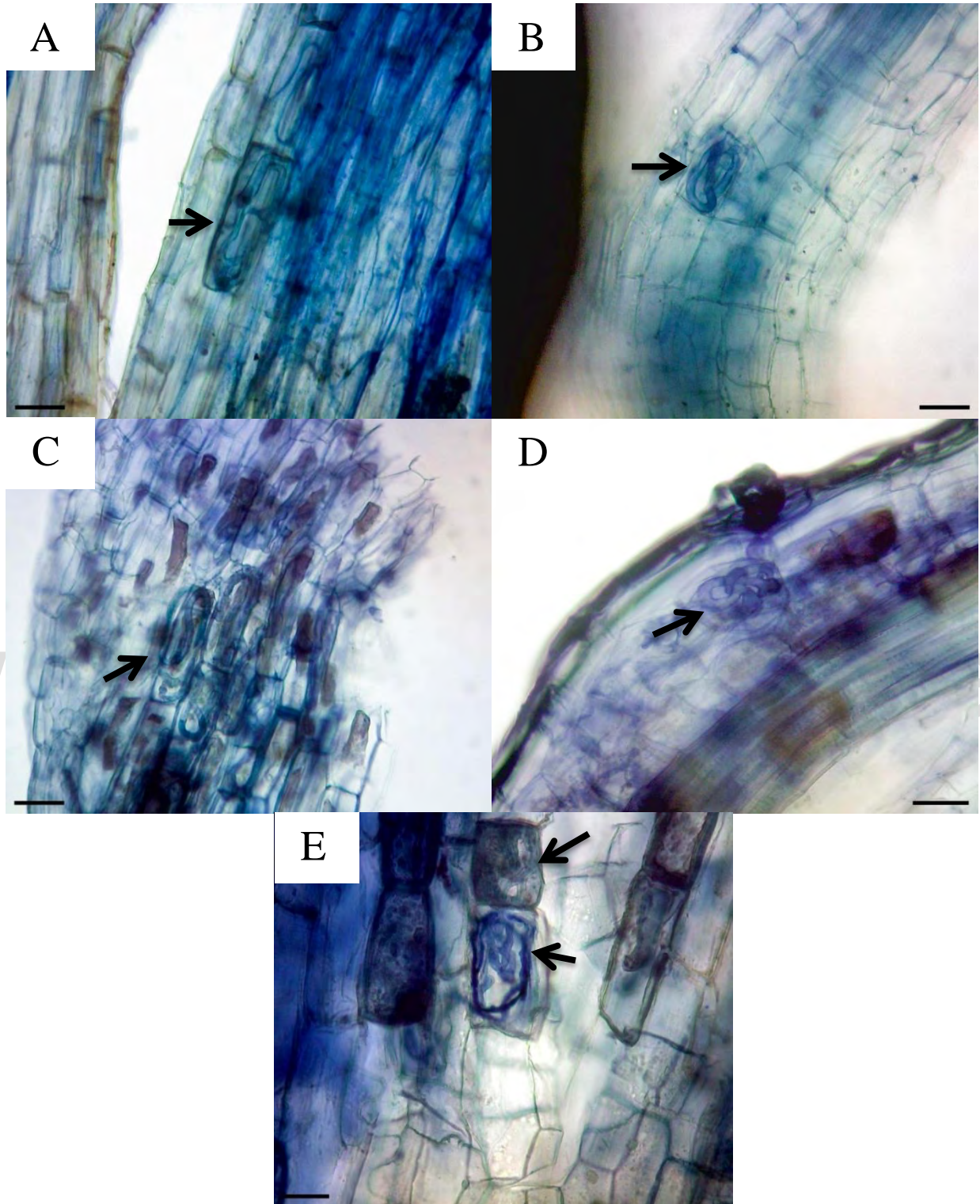


Figura 11. Etapas de la colonización de la micorriza ericoide típica en *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 μ m. **A.** Ovillo laxo en células epidérmicas de *Vaccinium floribundum*. **B.** Ovillo laxo en células epidérmicas de *V. meridionale*. **C.** Ovillos medianamente compactos en *V. floribundum*. **D.** Ovillo medianamente compacto en *V. meridionale*. **E.** Degradación del ovillo hifal en *V. floribundum*.

3.3.2 Micorriza ericoide con manto

A diferencia de la micorriza ericoide típica, en la micorriza ericoide con manto no se observó colonización horizontal en ninguna de las muestras radiculares obtenidas de las especies bajo estudio. Asimismo, similarmente a la micorriza ericoide típica, el proceso de colonización también consta de tres etapas: iniciación, establecimiento y pérdida de la integridad del ovillo hifal. No obstante, pese a que en ambas especies se observó el estadio de iniciación, hubo una diferencia en cuanto al tejido que se asoció el hongo. En el caso de *Vaccinium floribundum*, el micelio está en contacto con raíces juveniles (Fig. 12A), mientras que en *V. meridionale* se observó el micelio característico alrededor de raíces maduras (Fig. 12B). En ambos casos, el micelio extraradicular está conformado por hifas engrosadas, con septos y protrusiones denominadas “pinzas fúngicas” formando una red densa, características morfológicas que distinguen esta subcategoría micorrícica de la micorriza ericoide típica.

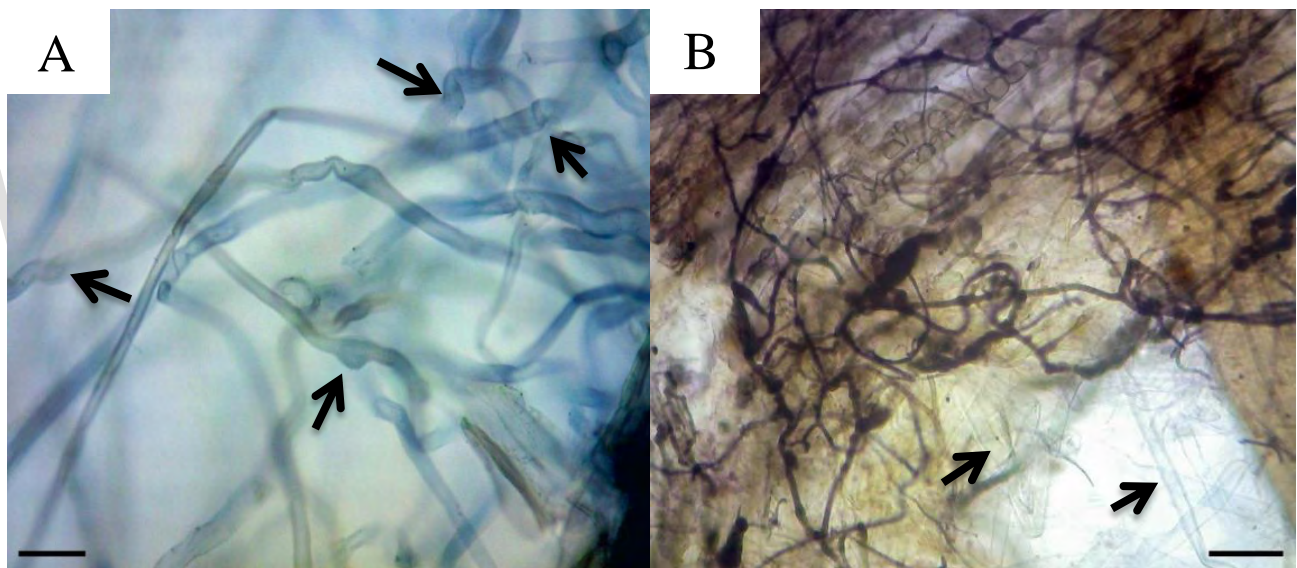


Figura 12. Primera etapa de la colonización observada de la micorriza ericoide con manto en las raíces de *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 μm . **A.** Raíz de *Vaccinium floribundum* **B.** Raíz de *Vaccinium meridionale*. **Flechas:** micelio con septos y pinzas fúngicas.

Ya establecida la simbiosis, se observaron ovillos hifales con distintos grados de compactación y con las características morfológicas hifales descritas en el micelio extraradicular (Fig. 13A y B). Es importante señalar que en este caso, en lugar de observarse un incremento en el diámetro de la hifa intracelular, se observa una disminución o conservación del mismo, dependiendo de la especie vegetal involucrada (Tabla 6). Por otro lado, hay rastros de la etapa final de la colonización aunque solo se

observó en *V. meridionale* (Fig. 13C), así como también se observó que tanto ovillos hifales funcionales como ovillos degradados están en la misma porción de raíz.

Tabla N° 5. Promedio y desviación estándar del diámetro de las hifas en la micorriza ericoide con manto observada en raíces juveniles de *Vaccinium spp.*

	Micelio extraradicular (μm)	Ovillos hifales (μm)
<i>Vaccinium floribundum</i>	$11,6503 \pm 2,8312$	$11,0043 \pm 3,0465$
<i>Vaccinium meridionale</i>	$22^a \pm 5$	$9,1977^b \pm 1,1584$

Promedios con exponentes desiguales indican diferencias significativas entre categoría “micelio extraradicular” y categoría “ovillo hifal” para cada especie (Mann-Whitney; $P < 0,05$). $n=12$.

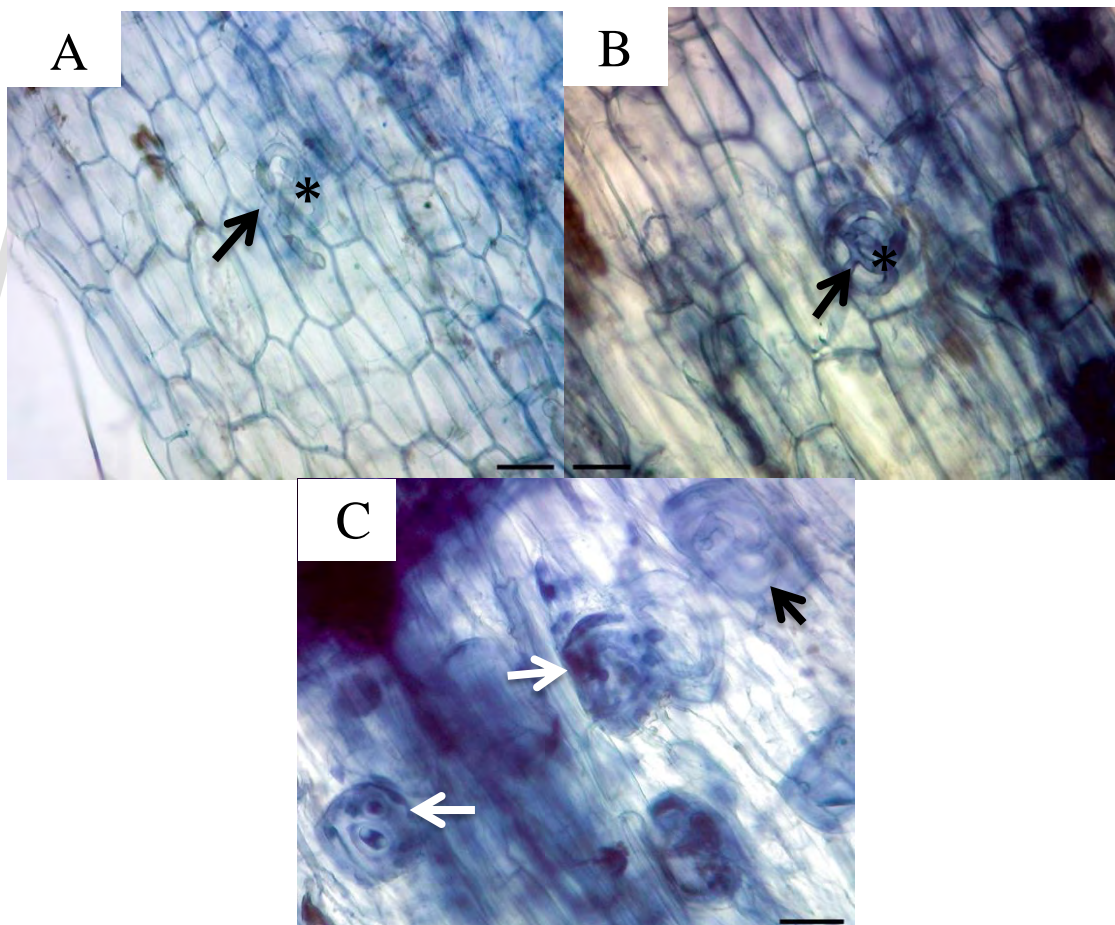


Figura 13. Etapas de la colonización de micorrizas ericoides con manto en las raíces de *Vaccinium spp.* Barra de escala = 50 μm . **A:** Ovillo hifal en células epidérmicas de *Vaccinium floribundum*. **B.** Ovillo hifal en células epidérmicas de *Vaccinium meridionale*. **C.** Estadio final de la colonización en la raíz de *Vaccinium meridionale*. **Flechas negras:** ovillos hifales funcionales. **Asteriscos:** septos con pinzas fúngicas. **Flechas blancas:** ovillos hifales degradados.

3.3.3 Micorriza ericoide en células corticales

En el caso de *Vaccinium floribundum*, se observó un tercer tipo de colonización en raíces juveniles, cuyas características morfológicas y cuyo arreglo de la colonización en el tejido vegetal, no corresponden con lo típicamente identificado como “micorriza ericoide”. Este modo de colonización se caracterizó por la presencia de una red laberíntica en los espacios intercelulares de la epidermis (indicativa de la presencia de hongos endófitos septados), y el enrollamiento de la hifa conectada a esta red, en los espacios intracelulares de la corteza (Fig. 14). No obstante, este patrón de colonización se observó con baja frecuencia en el tejido radicular de *V. floribundum* por lo que sería interesante determinar si es un fenómeno recurrente en la especie estudiada.

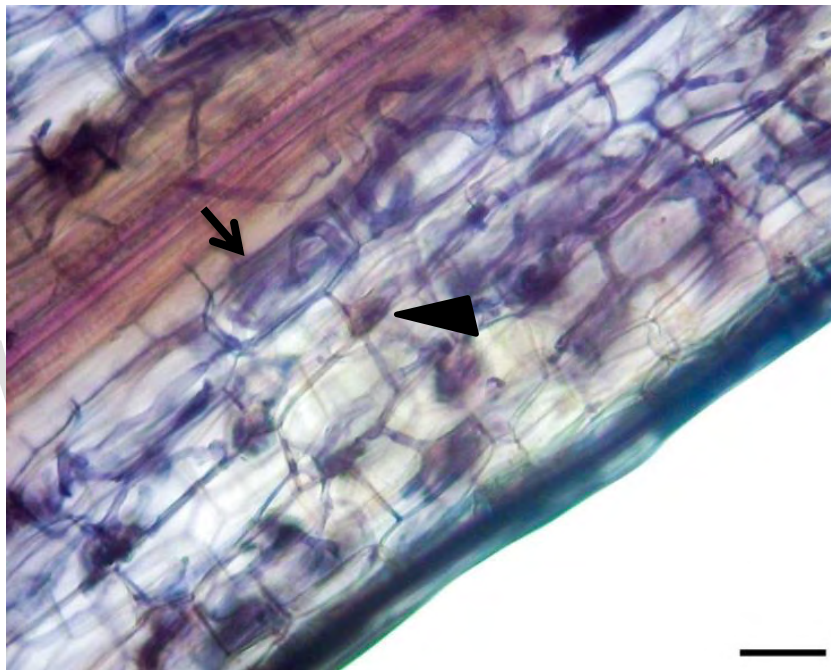


Figura 14. Micorriza ericoide en células corticales de *Vaccinium floribundum*. Barra de escala = 50 μ m. **Triángulo:** red laberíntica de los endófitos septados oscuros. **Flecha:** enrollado hifal similar a un ovillo típico de micorriza ericoide.

3.3.4 Micorriza ericoide en raíces maduras

Por último, se observaron rastros de colonización de micorrizas ericoides en raíces maduras en ambas especies (terciarias en adelante); probablemente típicas, aunque no es posible discriminar debido a la alta pigmentación del tejido (Fig. 15). Nótese el aumento del número de capas celulares, el mayor engrosamiento de las paredes celulares y la reducción del tamaño de las células epidérmicas (caracteres indicativos del crecimiento secundario) en *Vaccinium floribundum* (Fig.15A-E).

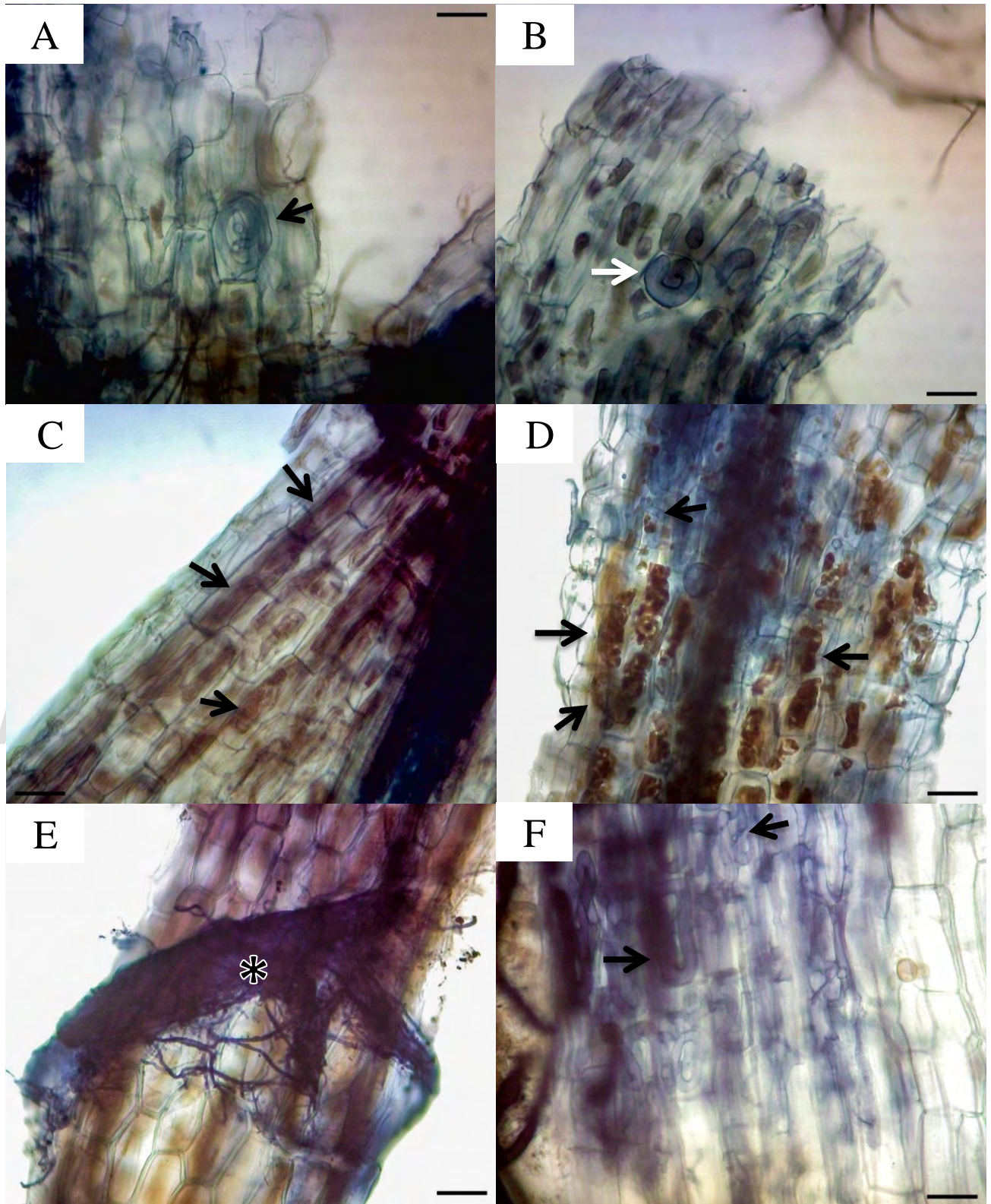


Figura 15. Evidencia de colonización de micorrizas ericoides en el tejido maduro de *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 μm . **A-B.** Raíces terciarias de *Vaccinium floribundum*. **C-E.** Raíces cuaternarias de *Vaccinium floribundum*. **F.** Raíz cuaternaria de *Vaccinium meridionale*. **Flechas negras:** ovillos hifales. **Flecha blanca:** ovillo hifal atrofiado. **Asterisco:** conglomeración de micelio extraradiclar aparentemente ericoide.

Por otro lado, en la raíces terciarias de *V. floribundum* se observó un engrosamiento desproporcionado de la hifa, lo que conllevó al desarrollo atrofiado del ovilleo hifal (Fig. AB). Igualmente, se apreció un cúmulo de micelio extraradicular con apariencia similar a hifas de hongos ericoides anclado sobre la superficie de la raíz y sin colonización intracelular aparente (Fig. 15E).

En contraste, las paredes celulares de *Vaccinium meridionale* no sufren engrosamientos como los observados (Fig. 15F) en *V. floribundum*, aunque también fue posible detallar el incremento en el número de estratos celulares. Tampoco se observaron engrosamientos desproporcionados de la hifa ni micelio extraradicular de micorrizas ericoides. Finalmente, es importante mencionar que los ovillos hifales observados en el tejido maduro de ambas especies, aparentan ser funcionales ya que no se observan signos de degradación.

3.3.5 Características anatómicas del tejido colonizado

A pesar de que con el método empleado en esta investigación, no se pudo observar detalladamente las características anatómicas de los tejidos que están siendo colonizados por las micorrizas ericoides, sí se observó que las células epidérmicas de *Vaccinium floribundum* muestran una morfología variable: en algunos casos, son células isodiamétricas cuyas paredes periclinales adoptan formas redondeadas y rectangulares; en otros casos, son células alargadas (Fig. 13A).

Por su parte, *Vaccinium meridionale* parece tener una morfología conservada: células alargadas dispuestas paralelamente (Fig. 13B). No obstante, en el tejido epidérmico de ambas especies se observaron ciertos rasgos comunes: células grandes, engrosamiento de las paredes periclinales y espacios intercelulares reducidos. Por otro lado, las raíces juveniles de ambas especies se caracterizaron por tener de 3-4 estratos celulares incluyendo el tejido vascular. Finalmente, en la tabla 6 se especifican todas las características morfológicas y anatómicas de ambos sistemas vivos involucrados (raíz de la planta y micelio del hongo), en los distintos tipos de simbiosis micorrícica ericoide observados.

Tabla N° 6. Características morfo-anatómicas de las micorrizas ericoides observadas en *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale*.

	Micorrizas ericoides típicas	Micorrizas ericoides con manto	Anatomía del tejido radicular juvenil	Anatomía del tejido radicular maduro
<i>Vaccinium floribundum</i>	<p>Presentes en células epidérmicas de raíces juveniles y maduras.</p> <p>Engrosamiento de la hifa en simbiosis.</p> <p>Engrosamiento anormal de la hifa en ovillos atrofiados.</p> <p>Colonización por unidades independientes y de célula a célula.</p> <p>Hifas aseptadas.</p> <p>Micelio extraradicular laxo.</p>	<p>Presentes en células epidérmicas juveniles.</p> <p>Uniformidad en el diámetro de la hifa en simbiosis o no.</p> <p>Colonización por unidades independientes.</p> <p>Hifas con engrosamientos en los septos: “pinza fúngica”.</p> <p>Micelio extraradicular denso.</p>	<p>Células epidérmicas agrandadas, con paredes periclinales de morfología variable (redondeada, elíptica, rectangular).</p> <p>Espacios intercelulares reducidos.</p> <p>Paredes tangenciales engrosadas.</p> <p>De 3 a 4 estratos celulares incluyendo el tejido vascular.</p>	<p>Reducción del tamaño de las células epidérmicas.</p> <p>Células isodiamétricas con morfología de las paredes periclinales variables (redondeadas, rectangulares, cuadrangulares).</p> <p>Espacios intercelulares reducidos.</p> <p>Paredes tangenciales engrosadas.</p> <p>Corteza pluriestratificada (>5 estratos celulares)</p>
<i>Vaccinium meridionale</i>	<p>Presente en células epidérmicas de raíces juveniles y maduras.</p> <p>Engrosamiento de la hifa en simbiosis.</p> <p>Colonización por unidades independientes.</p> <p>Hifas aseptadas.</p> <p>Micelio extraradicular laxo.</p>	<p>Presente en células epidérmicas de raíces juveniles.</p> <p>Reducción de la hifa en simbiosis.</p> <p>Colonización por unidades independientes.</p> <p>Hifas con engrosamientos en los septos: “pinzas fúngicas”.</p> <p>Micelio extraradicular denso.</p>	<p>Células epidérmicas agrandadas, alargadas, dispuestas unas con otras de forma paralela.</p> <p>Espacios intercelulares reducidos.</p> <p>Paredes tangenciales delgadas.</p> <p>De 3 a 4 capas celulares incluyendo el tejido vascular.</p>	<p>Reducción del tamaño de las células epidérmicas.</p> <p>Células isodiamétricas y uniformes.</p> <p>Espacios intercelulares reducidos.</p> <p>Paredes tangenciales delgadas.</p> <p>Corteza pluriestratificada (>5 estratos celulares)</p>

3.4 Otros hallazgos observados con microscopio óptico

Adicionalmente, en ambas especies se observó una co-colonización por parte de una variedad de simbiontes, puesto que se detectaron estructuras típicas de dos tipos de asociaciones: los endófitos septados oscuros y las micorrizas arbusculares, cuyas características morfológicas así como el tipo de tejido que colonizan se detallan a continuación.

Las hifas densas, septadas, melanizadas y en algunos casos hialinas, son características de los hongos endófitos septados oscuros (ESO) (Fig. 16). En efecto, se observaron tres estructuras bien definidas: micelio extraradicular con las características hifales mencionadas (Fig. 17A), microesclerocia y una red hifal que se denomina red laberíntica. Se observaron dos tipos de microesclerocia: segmentos globosos hialinos (Fig. 17B) y segmentos en forma de barril melanizados (17C).

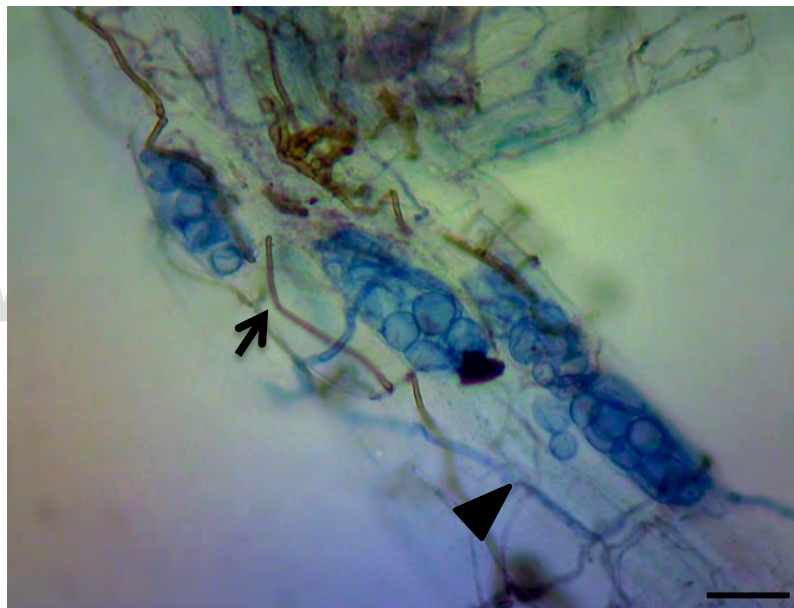


Figura 16. Tipos de micelio extraradicular característicos de los endófitos septados oscuros presentes en *Vaccinium meridionale*. Barra de escala = 50 μ m. **Flecha:** hifas septadas y melanizadas. **Triángulo:** hifas septadas y hialinas.

La microesclerocia se encontraba ocupando todo el espacio intracelular de las células epidérmicas, de las células corticales y de las células indiferenciadas del meristema apical (Fig. 17D). Se observó que la red laberíntica, por su parte, también puede ser de dos tipos: hifas finas y regulares (Fig. 17C y E) tanto como hifas lobuladas con bordes irregulares (Fig. 17F). Esta estructura se halla en los espacios intercelulares del tejido epidérmico y cortical (Fig. 17C) así como también sobre la superficie de la raíz (Fig. 17D y E). La presencia de los hongos endófitos septados oscuros fue conspicua en todas las muestras observadas en ambas especies, especialmente en raíces maduras (Fig. 17A, C y E).

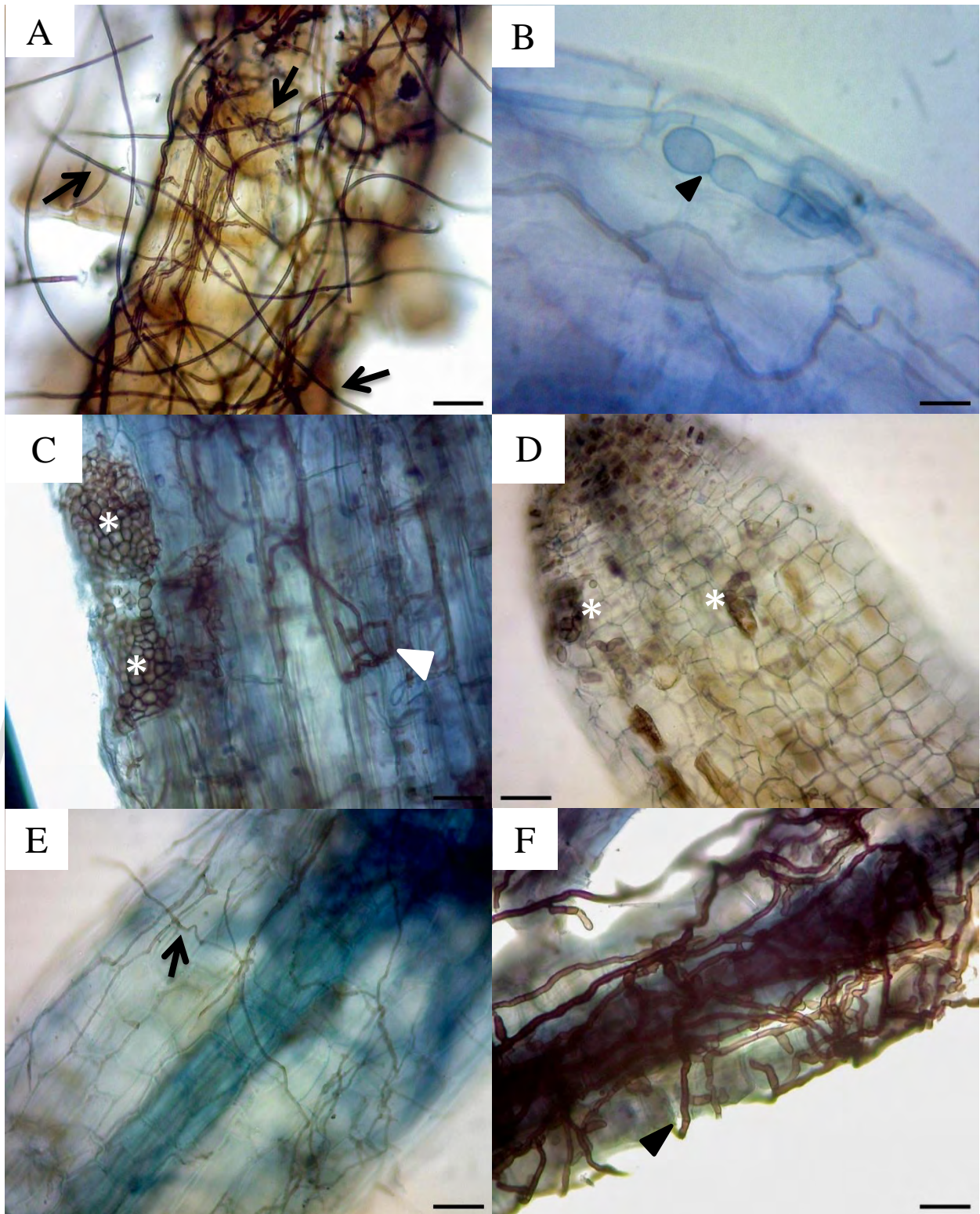


Figura 17. Estructuras típicas de endófitos septados oscuros en *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 μ m. **A.** Micelio extraradicular en *Vaccinium floribundum* (flechas). **B.** Microesclerocia de segmentos globosos en *Vaccinium meridionale* (triángulo negro). **C.** Microesclerocia de segmentos en forma de barril (asteriscos) y red laberíntica de hifas finas (triángulo blanco) en *V. floribundum*. **D.** Microesclerocia en células del meristema apical de *V. meridionale* (asteriscos). **E.** Red laberíntica de hifas finas (flecha) sobre la superficie de *V. meridionale*. **F.** Red laberíntica de hifas lobuladas sobre la superficie de *V. floribundum* (triángulo negro).

Por otra parte, se observaron estructuras morfológicamente similares a las reportadas para las micorrizas arbusculares: micelio extraradicular irregular y extenso (Fig. 18A), en algunas ocasiones enrollado; micelio intracelular, vesículas intracelulares e intercelulares y arbuscúlos. Se reconocieron dos tipos de micorrizas arbusculares: el tipo arum y el tipo parís. El primero se caracterizó por enrollados extracelulares de micelio (Fig. 18B y C), arbuscúlos bien desarrollados y por vesículas intracelulares que ocupaban todo el espacio de la célula (Fig. 19).

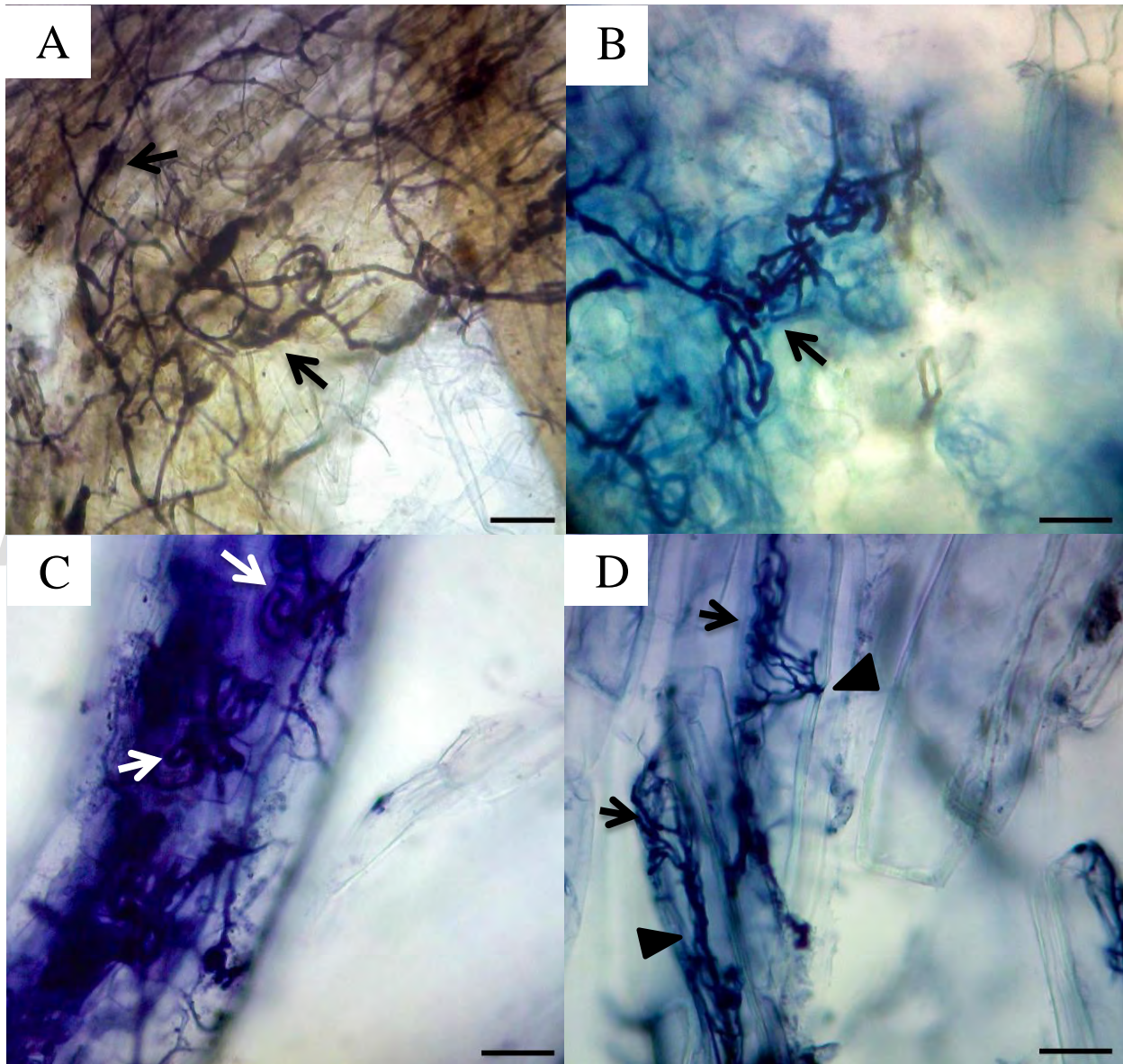


Figura 18. Estructuras típicas de micorrizas arbusculares en *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 μ m. **A.** Micelio extraradicular característico de micorrizas arbusculares (flechas). **B.** Micelio enrollado extraradicular de micorrizas arbusculares tipo arum en *Vaccinium floribundum* (flecha negra). **C.** Micelio enrollado extraradicular de micorrizas arbusculares tipo arum en *Vaccinium meridionale* (flechas blancas). **D.** Arbuscúlos de micorrizas arbusculares tipo arum en *V. meridionale* (flechas negras). **Triángulos negros:** puntos de penetración de las células.

Tanto los arbuscúlos como las vesículas colonizaron las células corticales, las últimas prefiriendo las adyacencias del tejido vascular (Fig. 19 C y D). Cabe mencionar que rara vez se observó este morfotipo en tejido juvenil y cuando estuvo presente, no se observaron micorrizas ericoides en las células epidérmicas (Fig. 19C). La micorriza arbuscular tipo arum colonizó los tejidos radiculares de ambas especies.

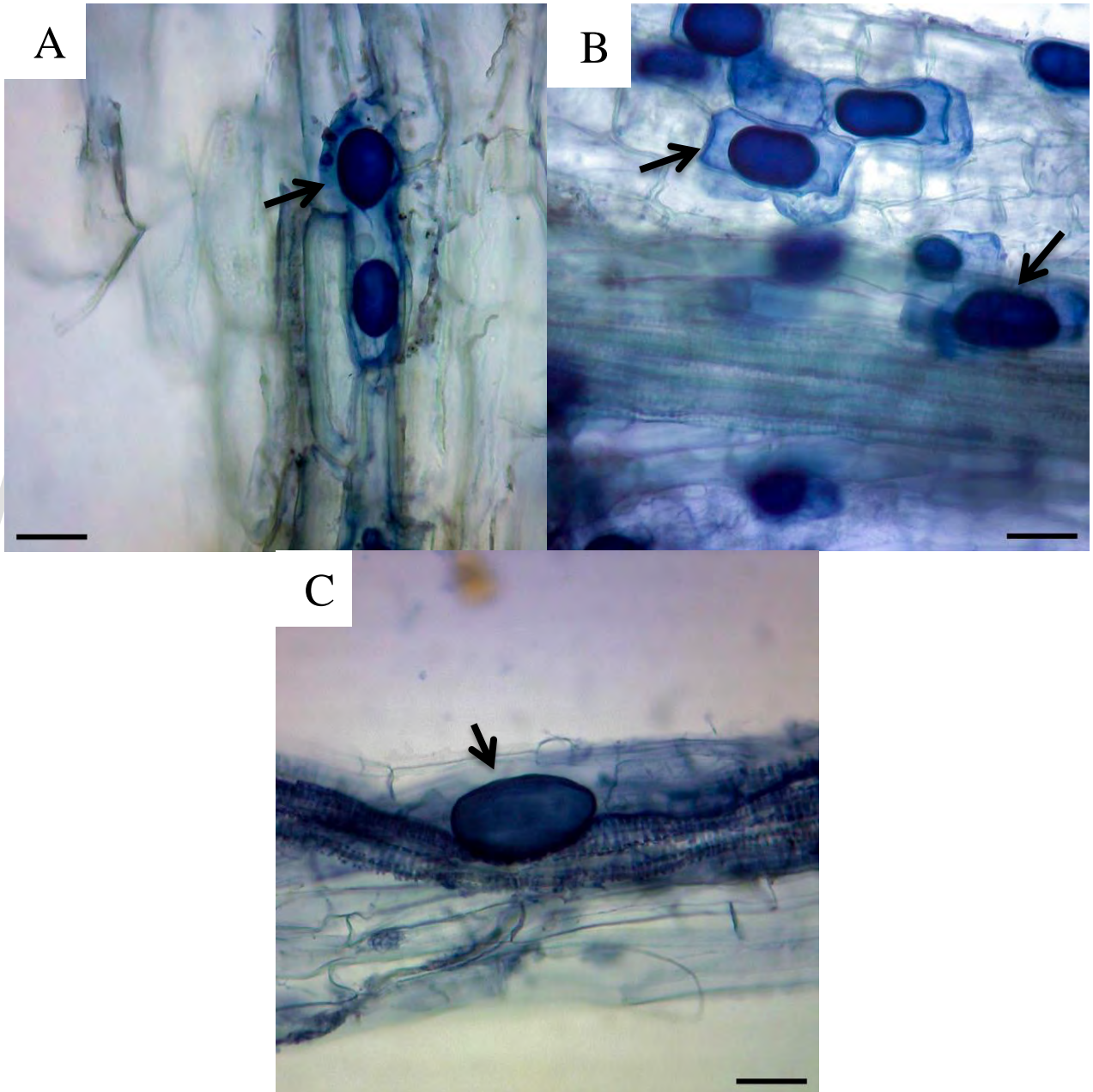


Figura 19. Vesículas del morfotipo arum en *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 μ m. **A.** Vesículas intracelulares en *Vaccinium floribundum* (flecha). **B.** Vesículas intracelulares en *Vaccinium meridionale* (flechas). **C.** Vesícula intercelular en *V. meridionale* (flecha).

En cuanto al tipo parís, se observó micelio extraradicular conectado a numerosas vesículas intercelulares (Fig. 20A), así como también se registró la presencia de enrollados intracelulares conectados a arbusculos sumamente ramificados (Fig. 20B). Por otro lado, este morfotipo se caracterizó por la excesiva cantidad de vesículas que se forman (Fig. 20C) e incluso fue posible notar puntos con coloración más tenue, indicativos de cuerpos fosfolipídicos.

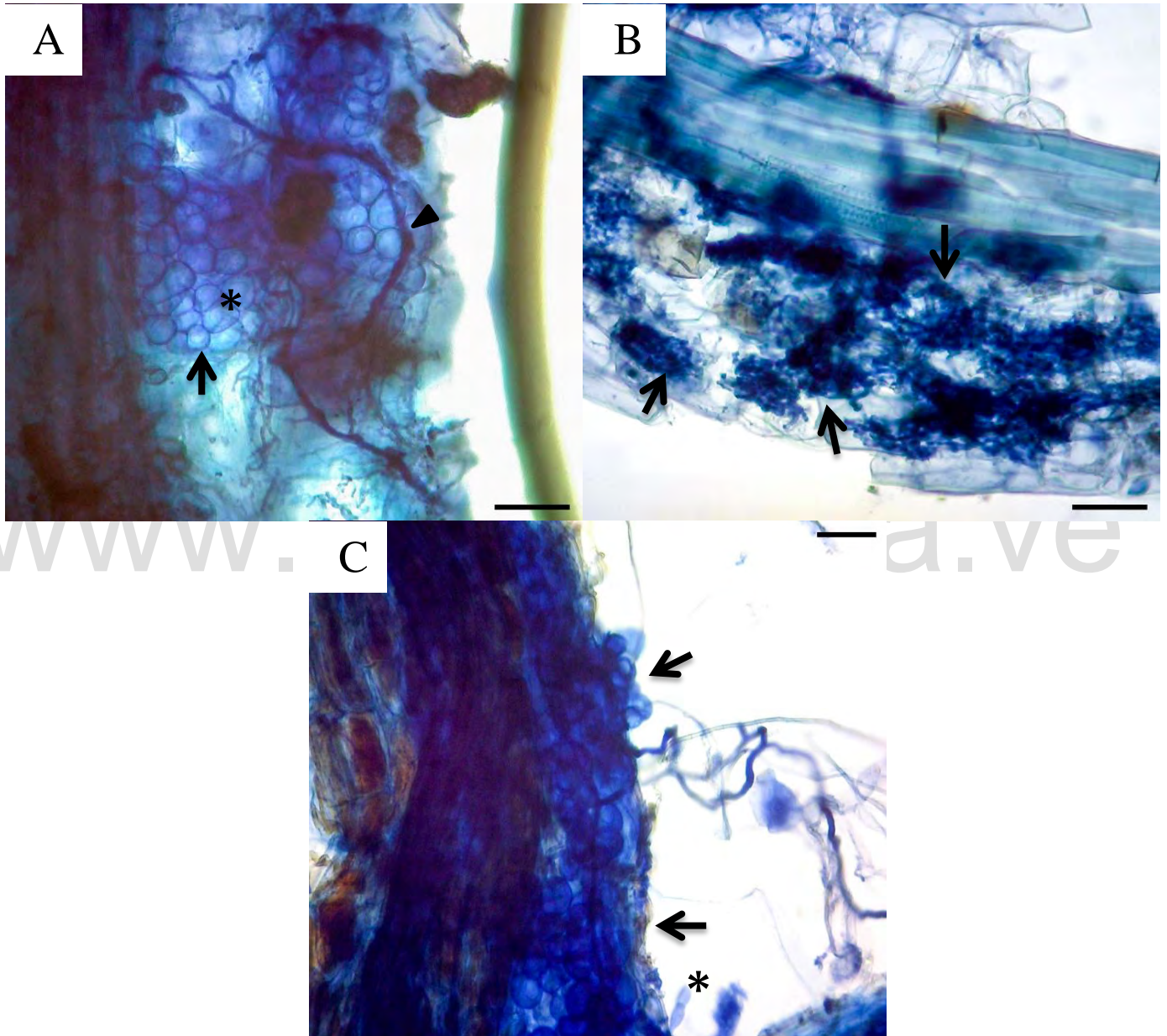


Figura 20. Estructuras fúngicas características del morfotipo parís de micorrizas arbusculares en *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 μ m. **A.** Micelio extraradicular (triángulo) conectado a vesículas intercelulares conteniendo fosfolípidos (asterisco) en *Vaccinium floribundum*. **B.** Enrollados intracelulares formando arbusculos sumamente ramificados (flechas) en *Vaccinium meridionale*. **C.** Hifa segmentándose (asterisco) para formar vesículas intercelulares típicas del morfotipo parís en *V. floribundum* (flechas).

Al igual que el morfotipo arum, el morfotipo parís coloniza células corticales, específicamente las que se encuentran adyacentes al cilindro vascular. Asimismo, las micorrizas arbusculares observadas en estas especies mostraron una clara preferencia por las raíces maduras (Fig. 21).

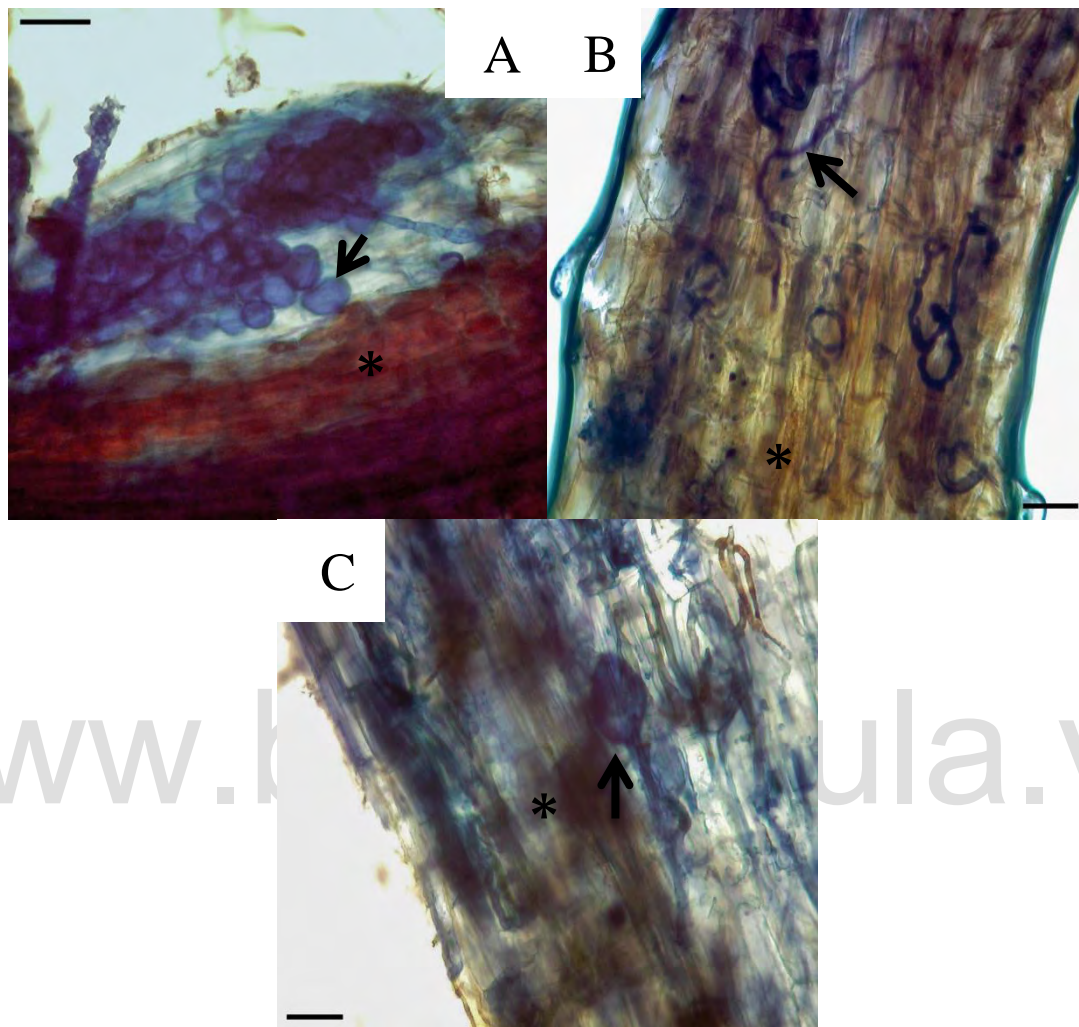


Figura 21. Estructuras características de micorrizas arbusculares en el tejido maduro de *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 μm . **A.** Vesículas del morfotipo parís (flechas) en *Vaccinium floribundum*. **B.** Micelio enrollado extraradical del morfotipo arum en *Vaccinium meridionale*. **C.** Vesículas del morfotipo arum en *V. meridionale*. Nótese las células pigmentadas indicativas del crecimiento secundario de la raíz (asteriscos).

Es importante destacar que no se observó la co-colonización simultánea de los tres tipos de asociaciones fúngicas descritos anteriormente. Sin embargo, sí se observó que tanto los endófitos septados como las micorrizas arbusculares coexisten en una misma porción de raíz. En algunos casos, se observa diferenciación espacial y por lo tanto, diferencia en el modo de colonización. Los endófitos septados están restringidos a los espacios intercelulares mientras que las micorrizas arbusculares están colonizando las células adyacentes al tejido vascular (Fig. 22).

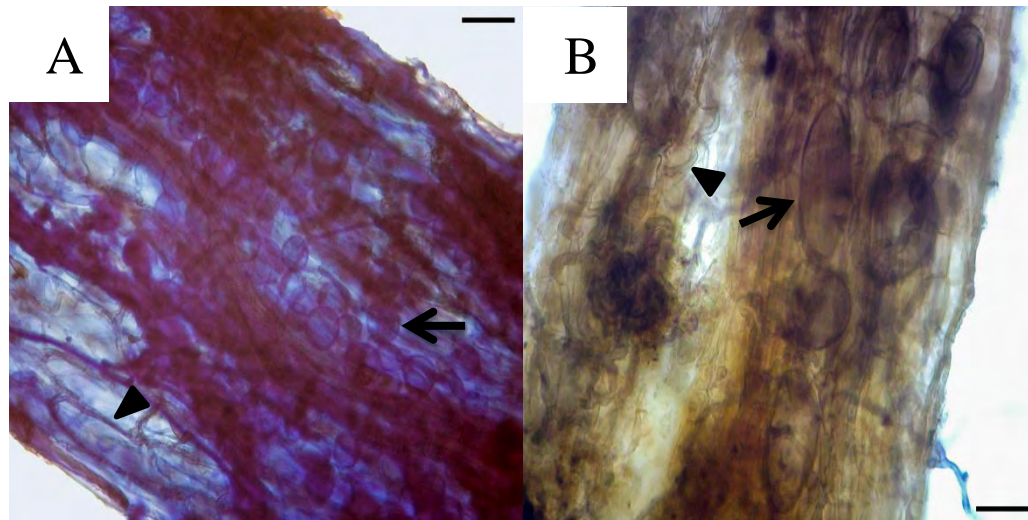


Figura 22. Co-colonización de las micorrizas arbusculares y los hongos endófitos septados oscuros en el tejido maduro de *Vaccinium* spp. Barra de escala = 50 µm. **A.** Raíz de *Vaccinium floribundum*. **B.** Raíz de *Vaccinium meridionale*. **Flechas:** vesículas de micorrizas arbusculares. **Triángulos:** red laberíntica de los hongos septados oscuros.

Por otro lado, se observaron estructuras globosas (Fig. 23) en la raíz juvenil de *Vaccinium meridionale*, cuya morfología es similar a las clamidosporas que producen los hongos micorrícicos ericoides del género *Serendipita*. No obstante, se clasificó como un hallazgo extra, puesto que no hay rastros de ovillos hifales ericoides en las células epidérmicas de esta raíz.

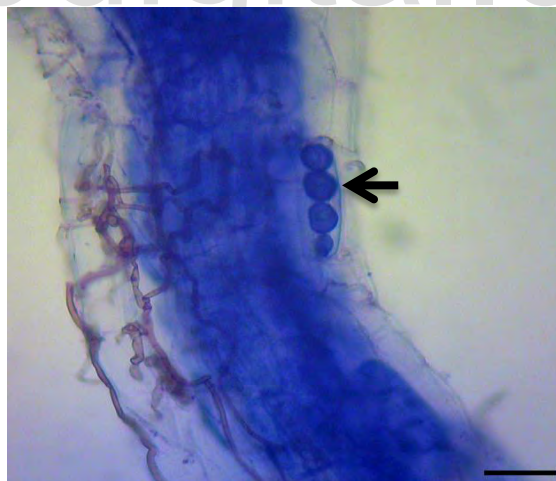


Figura 23. Clamidosporas características de hongos ericoides pertenecientes al género *Serendipita* en las células epidérmicas de *Vaccinium meridionale* (flecha). Barra de escala = 50 µm.

Finalmente, en la Figura 24 se detallan todos los modos de colonización observados en ambas especies, tanto en raíces juveniles como en raíces maduras, donde se muestra no solo las características morfológicas intrínsecas de cada tipo de simbiosis, sino también las estructuras de interfaz que generan y los tejidos que colonizan.

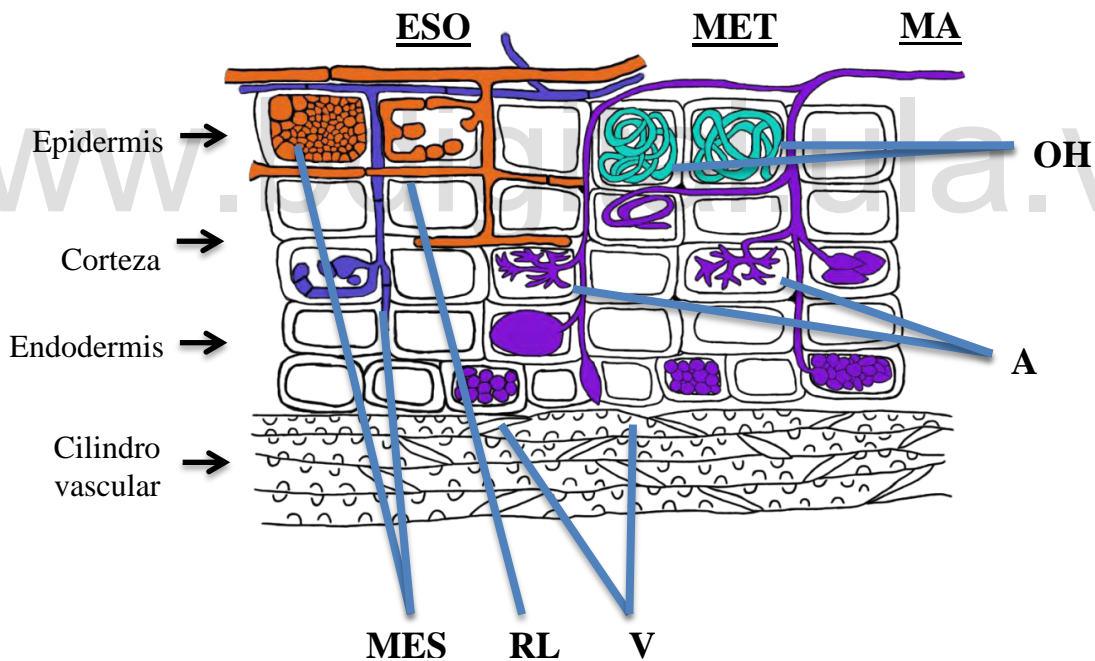
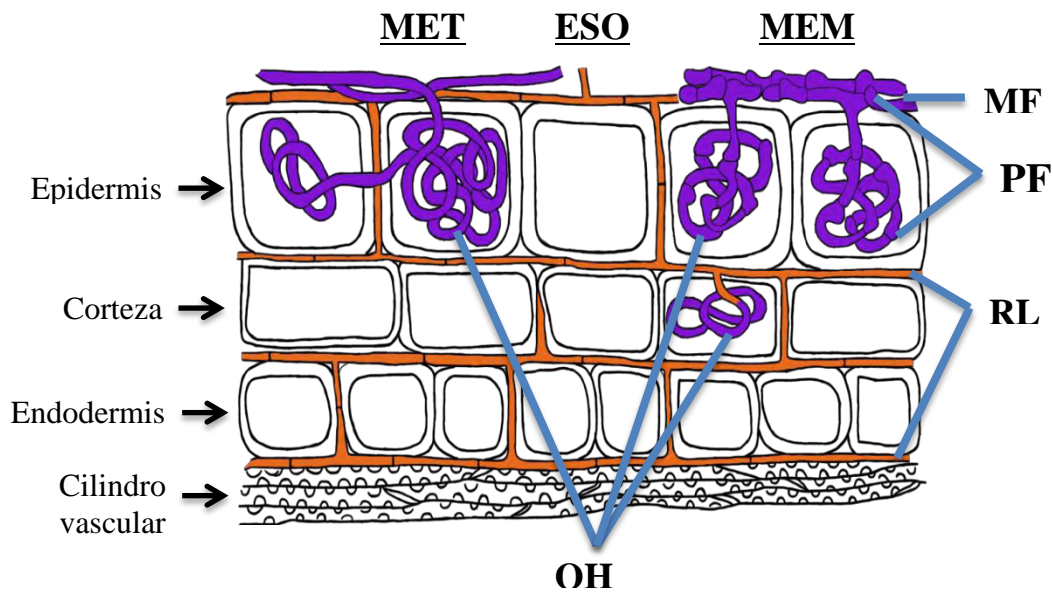


Figura 24. Representación esquemática de las estrategias de colonización de los simbiontes micorrícicos observados en *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale*. El diagrama muestra las estructuras de interfaz, las características de las hifas que penetran las células radiculares y los tejidos que colonizan tanto en la raíz joven como en la raíz madura. **A.** Dibujo esquemático de una raíz joven. **B.** Dibujo esquemático de una raíz madura. **MET:** micorriza ericoide típica, **ESO:** endófitos septados oscuros, **MEM:** micorrizas ericoides con manto, **MA:** micorrizas arbusculares, **OH:** ovillos hifales, **PF:** pinza fúngica, **RL:** red laberíntica, **MES:** microesclerocia, **V:** vesículas, **AR:** arbusculos. **MF:** manto fúngico.

4. Discusión

4.1. Presencia y caracterización morfoanatómica de la micorriza ericoide en *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale* por microscopio óptico

La micorriza ericoide es un tipo de simbiosis que estructural y morfológicamente está bien definida, fácilmente distinguible de otros tipos de micorrizas: enrollados hifales finamente compactos como un ovillo que se forman en los espacios intracelulares de las células epidérmicas (Read, 1996). En efecto, nuestros resultados muestran dos tipos de colonización que encajan con esa descripción y que coinciden con los hallazgos de otros investigadores: 1. ovillos hifales sin septos en células epidérmicas (Bizabani, 2015; Baba *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011; Valenzuela-Estrada *et al.*, 2008; Setaro *et al.*, 2006; Massicotte *et al.*, 2005 y Peterson *et al.*, 2003.) y 2. ovillos hifales con septos y pinzas en células epidérmicas (Vohník *et al.*, 2016; Bizabani, 2015; Bruzone *et al.*, 2015 y Vohník *et al.*, 2012). Por otro lado, se registró un tercer tipo de colonización, que en este estudio identificamos como micorriza ericoide por la similitud en ciertas características morfológicas: red laberíntica intercelular conectada a enrollados hifales parecidos a ovillos en células corticales (Lukešová *et al.*, 2015 y Vohník & Albrechtová, 2012), los cuales se detallarán a continuación.

4.1.1 Morfología de los tipos de colonización observados

4.1.1.1 Micorriza ericoide típica

El primer patrón de colonización descrito en esta investigación corresponde a una micorrización ericoide típica, considerada así porque posiblemente el hongo u hongos responsables sean ascomicetos que pertenecen al complejo *Hyaloscypha hepaticicola*. Es el patrón más común donde se observa una colonización inicial de la periferia de las células epidérmicas, probablemente en proximidad de la pared celular, seguida por la penetración y el enrollamiento hifal intracelular, para formar una estructura organizada laxa a compacta. Para ambas especies en estudio, se observó que las células epidérmicas son colonizadas como unidades independientes desde el suelo (Perotto *et al.*, 2002).

En el caso de *Vaccinium floribundum*, también se observó colonización de célula a célula. Sin embargo, es posible que en *V. meridionale* también ocurra y que no se haya podido observar porque son hifas sumamente delgadas, cuyos puntos de infección pueden pasar inadvertidos cuando se usa microscopio óptico convencional. En cualquier caso, la colonización horizontal ha sido reportada en

numerosas ericáceas incluyendo varias especies del género *Vaccinium* (Setaro *et al.*, 2006; Massicotte *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 2003).

Al respecto, Massicotte *et al.* (2005) conjeturaron que las conexiones intercelulares podrían ser estructuras fúngicas específicas de un hongo o grupo de hongos en particular y que no necesariamente es una característica común de todos los sistemas ericoides del planeta. Aunado a esto, estos autores plantean que este rasgo lo exhiben únicamente hongos micorrícicos ericoides “verdaderos”. Sin embargo, estos hallazgos tienen que ser puestos a prueba con aislamiento de los hongos en estado natural, experimentos de resíntesis y determinaciones taxonómicas, acompañados con microscopía de luz y microscopía de transmisión electrónica, para determinar de manera concisa si esta morfología hifal es un fenómeno común o no en las micorrizas ericoides.

Por otra parte, se observaron los distintos estadios de la colonización: micelio extraradicular en contacto con la raíz, ovillos hifales de laxos a compactos y ovillos degradados. La presencia de micelio extraradicular corresponde a la fase de iniciación de la micorriza ericoide; en ambas especies se observó que se forma una red laxa sobre la superficie de la raíz cuya extensión es limitada. Probablemente porque a diferencia de otros tipos de micorrizas, las mismas raicillas son las que ejecutan la función de exploración y explotación del suelo. (Peterson *et al.*, 2003).

La falta de micelio extraradicular conocido como “manto” es otra de las características diagnósticas de la micorriza ericoide. No obstante, en raíces maduras de *V. floribundum* se observó una conglomeración de micelio fúngico. Massicotte *et al.* (2005), observaron micelio extraradicular parecido a un manto en raíces primarias de *Kalmia angustifolia* con la particularidad de que parecía asociarse a porciones de la raíz donde ocurrió un crecimiento anómalo de la pared celular vegetal. Estos autores, también observaron que las hifas del manto eran capaces de penetrar los espacios apoplásticos de la pared vegetal de células senescentes y degradar sus componentes para su nutrición aunque este fenómeno también tuvo lugar en células completamente funcionales.

Sin embargo, es imposible ver cuál es el comportamiento de este “manto” en las raíces de *V. floribundum* con microscopio óptico convencional. Puesto que son raíces maduras que pudieran estar senescentes, es posible que sean hifas de hongos saprótrofos que están haciendo vida libre en la rizósfera o sean hifas de un hongo ectomicorrícico de plantas vecinas como también pudiera ser un basidiomiceto ericoide tal como *Sebacina vermifera* que tiene capacidades saprofíticas excepcionales (Berch *et al.*, 2002).

Por otro lado, la presencia de ovillos hifales con distintos grados de compactación constató la segunda fase del proceso de colonización, la cual es el establecimiento de la micorriza. El hecho de que en una misma porción de raíz se observan complejos hifales laxos a medianamente compactos, es evidencia de que ciertamente las células son tratadas como unidades independientes por el o los

simbiontes. No obstante, en este estudio no se llegaron a observar los ovillos hifales altamente compactados como ha sido descrito numerosas veces en los tipos de colonización donde el ascomiceto *Hyaloscypha hepaticicola* es el hongo dominante (Baba *et al.*, 2011; Peterson *et al.*, 2003; Read, 1996).

Al respecto, hay que tener en cuenta que el trabajo investigativo con fotodocumentación aporta datos del momento de recolección. Es posible que unas horas, días, o semanas después se pudiera observar en estas especies ovillos hifales que ocupen la totalidad del espacio intracelular. En contraste, Massicotte *et al.* (2005) argumentaron que es posible que la compactación del ovillo sea un indicador de que se está en presencia de un hongo distinto a *Hyaloscypha hepaticicola*, que no necesariamente corresponde o no a un hongo micorrícico ericoide *per sé*.

Asimismo, se observó un incremento del diámetro de la hifa una vez que se ha establecido la simbiosis y se ha formado el ovillo hifal. Esta es una característica morfológica que resultó bastante particular y que hasta ahora solo se ha reportado en la micorriza cavendishioide (Setaro *et al.*, 2006). Aunque no hay evidencia experimental que confirme que este rasgo sea relevante para la simbiosis, es posible que tenga una implicación positiva en el intercambio bidireccional de nutrientes: mayor diámetro pudiera significar mayor superficie de contacto. Por otro lado, pudiera ser un rasgo distintivo de un grupo fúngico.

Curiosamente, la micorriza cavendishioide es generada tanto por ascomicetos como sebacinales, los principales responsables de la micorriza ericoide. Además, cabe mencionar que la colonización conjunta de unidades celulares por ambos grupos de hongos parece ser un fenómeno común, no solo en la micorriza cavendishioide donde este carácter morfológico fue reportado, sino también en la micorriza ericoide e incluso en ectomicorrizas (Selosse *et al.*, 2007; Setaro *et al.*, 2006; Brand, 1991; Bonfante-Fasolo, 1980).

Así pues, a pesar de que la observación del incremento del diámetro de la hifa una vez formado el ovillo hifal en *V. floribundum* y *V. meridionale* del páramo andino merideño, pudiera sugerir que se trata de un rasgo compartido de las simbiosis donde ascomicetos y basidiomicetos intervienen, es importante resaltar que para conjeturar conclusiones sólidas, se requiere hacer un estudio más amplio que incluya ericáceas con diversas categorías micorrícicas así como plantas no ericáceas que se asocian con estos organismos, para poder dilucidar hasta qué punto es una característica determinante y común de los simbiontes y hasta qué punto es independiente de la categoría micorrícica.

Finalmente, se detectó la presencia de ovillos hifales degradados, indicativos de la última fase de la colonización. Dado que las raicillas de Ericaceae son estructuras efímeras, delicadas y son reemplazadas rápidamente, algunas partes del sistema radicular siempre están en proceso de degeneración y descomposición. Además, el tiempo de vida de una célula epidérmica activa no es mayor a cinco o seis semanas y eventualmente, el micobionte pierde su integridad y la célula

experimenta muerte celular (Vohník *et al.*, 2020). Por eso, lo que observamos en las raíces como el estadio final de la colonización, seguramente era una célula muerta conteniendo residuos fúngicos de la colonización que tuvo lugar previamente.

4.1.1.2 Micorriza ericoide con manto

Ahora bien, el segundo patrón de colonización encontrado en estas especies corresponde a una simbiosis micorrícica ericoide con manto, cuya característica más prominente es la formación de un micelio extraradicular denso de hifas con protrusiones ensanchadas en los septos. Todas las características morfológicas observadas concuerdan con las descritas por Vohník *et al.* (2012) en *Vaccinium myrtillus* y *Vaccinium vitis-idaea* a excepción del diámetro hifal. Los investigadores observaron diámetros variables mientras que en este estudio, hubo una clara tendencia hacia la reducción del diámetro una vez establecida la simbiosis.

Cabe destacar que en la micorriza ericoide típica se observó el caso contrario. Pudiera tratarse de una característica morfológica relevante que puede ser específica de la identidad del micobionte como también pudiera estar asociada tanto al micobionte y al hospedero, por lo que habría que determinar si todos los hongos basidiomicetos que producen pinzas fúngicas, que son micorrícicos ericoides exhiben este rasgo sin importar el hospedero o si es un rasgo co-específico y dependiente del hospedero.

Similarmente, la presencia de micorrizas ericoides envainadas se limitó a tejido epidérmico de raíces jóvenes (no-pigmentadas y no-suberizadas), lo cual pudiera significar que esta asociación tiene lugar en las partes de la raíz fisiológicamente más activas. Por otro lado, los ovillos hifales se aglomeraban por parches a lo largo de la raíz. Esta distribución pudiera implicar que el basidiomiceto muestra una preferencia por algún tipo de sustrato.

En cuanto a la identidad del micobionte, Vohník *et al.* (2012), quienes fueron los primeros en describir este tipo de colonización, no lograron enlazar el basidiomiceto que forma micorrizas ericoides envainadas con ninguna especie o género de hongo secuenciado hasta esa fecha. Kolarik & Vohník (2018), realizaron un análisis filogenético a los aislados previamente obtenidos por Vohník *et al.* (2012) e identificaron el micobionte ericoide envainado como *Kurtia argillacea* (Basidiomycota) perteneciente al orden Hymenochaetales que viene a ser el único hongo himenoquetoide conocido y experimentalmente confirmado que forma micorrizas ericoides. Este hongo se distribuye en bosques templados y boreales de Europa, Asia y Norteamérica por lo que es posible que en Sudamérica sea otro basidiomiceto el que esté exhibiendo estos rasgos micorrícicos.

En contraste, algunos investigadores confirmaron el potencial micorrícico de los hongos serendipitoides y demostraron la capacidad que tienen de formar micorrizas ericoides envainadas (Vohník *et al.*, 2016). De hecho, uno de los tipos de colonización registrados para *Serendipita indica* que es morfológicamente similar al que forma *Melinyomices variabilis* (ascomiceto), también genera cuerpos globosos intracelulares además de los ovillos hifales, los cuales fueron interpretados como clamidosporas. Interesantemente, en las raíces de *V. meridionale* también se observaron cuerpos globosos muy similares a los de *S. indica*, y aunque no se observaron ovillos hifales, esta evidencia sugiere por lo menos que los hongos serendipitoides están haciendo vida en la rizósfera en la que *V. floribundum* y *V. meridionale* habitan y posiblemente, sean el grupo de hongos responsables de las micorrizas ericoides con manto observadas en estas especies.

Resulta interesante mencionar que la micorriza ericoide con manto solo ha sido observada y descrita en especies del género *Vaccinium*. Vohník *et al.* (2016), hallaron que regiones de ADN ribosomal que codifican para la subunidad larga (nuLSU rDNA), que se obtuvieron de aislados provenientes de plantas de *Vaccinium* con gran capacidad de formar micorrizas ericoides, segregaron con secuencias que eran derivadas exclusivamente de hospederos de micorrizas ericoides del planeta entero. Dentro de esas secuencias, las más similares (99.8% de identidad) provenían de especies de *Vaccinium*. Dado que el rango de variación intraespecífica es desconocido para esta secuencia dentro del orden Sebaciales, no pudieron discernir si esta similitud es indicativa de una co-especificidad.

Además, cabe mencionar que Daghino *et al.* (2022) estudiaron los ensamblajes fúngicos tanto en partes aéreas como en las raíces de *Vaccinium myrtillus* y encontraron que los diferentes órganos moldean estos ensamblajes, sugiriendo una diferenciación de nichos. Curiosamente, obtuvieron que el género *Hyaloscypha* y *Serendipita* son biomarcadores del compartimiento raíz. A la luz de estos datos, cabe preguntarse si es coincidencia o especificidad que se haya observado micorrizas ericoides con manto en las especies estudiadas, por lo que en definitiva, se requieren realizar estudios exhaustivos de filogenia, de resíntesis e intercambio de nutrientes para dilucidar estas y muchas otras preguntas acerca de la relación existente entre estos organismos.

4.1.1.3 Micorriza ericoide en tejido cortical

Finalmente, se observó un tercer tipo de colonización, únicamente en raíces de *Vaccinium floribundum*: red laberíntica en los espacios intercelulares de la epidermis y ovillos hifales colonizando células corticales. La red laberíntica es una estructura típica de los endófitos septados oscuros (ESO) y los ovillos hifales, una característica diagnóstica de la micorriza ericoide. Tanto los endófitos septados

como las micorrizas ericoides son dos tipos de simbiosis hongo-raíz, considerados como dos categorías simbióticas completamente distintas (Peterson *et al.*, 2004).

A pesar de que la habilidad que tienen los endófitos septados de colonizar los tejidos de las plantas es similar al comportamiento de los hongos micorrícicos, otras características metabólicas, genéticas, funcionales y morfológicas los excluyen de ese grupo de simbioses vegetales (Malicka *et al.*, 2022). Por tanto, los hongos ericoides y los endófitos septados pertenecen a grupos de hongos funcionalmente distintos (Smith & Read, 2008). No obstante, un endófito septado oscuro formó estructuras similares a la micorriza ericoide. Bajo las dos premisas anteriores, estos hallazgos fueron inesperados y podrían considerarse “extraordinarios”, porque no encajan con lo descrito hasta la fecha para estos organismos.

Sin embargo, estudios previos demostraron comportamientos similarmente “extraordinarios” en otras especies y latitudes, que sugieren un continuo morfológico entre endófitos septados oscuros y las micorrizas ericoides. Por ejemplo, Haselwandter & Read (1980) observaron que un hongo ESO no identificado formaba enrollados hifales en células radiculares de ericáceas, Usuki & Narisawa (2005) demostraron que el endófito septado *Heteroconium chaetospira*, es capaz de formar estructuras parecidas a micorrizas ericoides en raíces de *Rhododendron obtusum* y Chambers *et al.* (2008) mencionaron que algunos aislados fúngicos formaban ovillos hifales en ericáceas y hongos endófitos septados en otras plantas.

En este estudio, se observó que el micelio que formaba la red laberíntica, simultáneamente formaba el ovillo hifal en la siguiente capa celular en una única raíz. Puesto que los hongos endófitos no generan estructuras especializadas para el intercambio de nutrientes, es posible que los ovillos hifales sean estructuras de interfaz para tal función. No obstante, habrá que evaluar a futuro si se forma o no la membrana perifungal y si hay intercambio bidireccional de nutrientes para determinar si se trata de una asociación micorrícica o no.

Dado que los endófitos septados son altamente funcionales y sumamente diversos, no es fácil dilucidar la naturaleza de la relación existente entre estos hongos y los distintos sistemas vegetales, por lo que habría que evaluar si este tipo de colonización es frecuente en las especies de este género e incluso, en otras ericáceas del trópico.

4.1.1.4 Micorriza ericoide en raíces maduras

Todo lo descrito anteriormente corresponde a lo observado en raíces jóvenes. No obstante, en raíces maduras se observaron estructuras granuladas que rellenaban todo el espacio intracelular, indicativas de enrollados hifales aunque no fue posible determinar si estaban operativos o no, lo cual también fue

observado por Bizabani (2015) y Baba *et al.* (2011). En la mayoría de investigaciones, las raíces de primer orden son el único objeto de estudio por lo que no hay muchos datos disponibles sobre las implicaciones que tendría la micorriza ericoide en raíces maduras. Generalmente, se considera que las raíces altamente pigmentadas muestran declive en el metabolismo, senescencia de las estructuras micorrícicas y comienzo de dormancia o mortalidad (Vohník *et al.*, 2012).

En el caso de las raíces de *Vaccinium*, muchas de las características anatómicas observadas están relacionadas con la presencia o ausencia de xilema secundario. De hecho, esta es una característica clave para definir la función de la raíz. Algunos estudios han determinado que las raíces de primer y segundo orden tienen funciones exclusivas de absorción de nutrientes y conducción de agua, que las raíces de tercer y cuarto orden donde hay un claro declive de la colonización micorrícica son transicionales, con funciones de absorción a conducción y que las raíces de quinto orden en adelante con crecimiento secundario cumplen funciones de conducción y anclaje (Valenzuela-Estrada *et al.*, 2008). En este sentido, es posible que lo que se clasificó como raíz cuaternaria en adelante en realidad corresponda a una raíz de orden menor, ya que los autores determinaron el orden de las raíces mediante el método morfométrico y no por el método del desarrollo.

Por otro lado, las células corticales sumamente suberizadas reemplazan a las células epidérmicas en las raíces que presentan crecimiento secundario del xilema, característica que es indicativa de una raíz madura y que implica la ausencia total de micorrizas ericoides en las mismas (Yang *et al.*, 2018). Dado que en todas las raíces evaluadas, se observaron células epidérmicas consistentemente, probablemente lo que aquí se denota como una raíz madura, sea en realidad una raíz transicional como las descritas por Valenzuela-Estrada *et al.* (2008).

4.1.2 Anatomía de los tejidos colonizados

Ambas especies exhiben rasgos anatómicos conservados en congruencia con lo reportado en la bibliografía (Peterson *et al.*, 2003). En raíces juveniles, se observaron de 3 a 4 capas celulares incluyendo el tejido vascular, coloración pálida ligeramente amarilla, paredes tangenciales engrosadas mientras que en raíces maduras, se observaron más de 5 estratos celulares, altamente pigmentados, suberizados y con engrosamientos de las paredes tangenciales. Setaro *et al.* (2006), realizaron la caracterización anatómica de varias ericáceas del Ecuador incluyendo *V. floribundum*, sus resultados son consistentes con los hallados en esta investigación.

En contraste, Valenzuela-Estrada *et al.* (2008), observaron que en las raíces de primer grado de *V. myrtillus*, varias células epidérmicas estaban colapsadas, aplastadas o ausentes por completo. Este

fenómeno no se observó en las especies bajo estudio por lo que podría ser un evento único de esa especie. En cuanto a la morfología celular observada, se ha encontrado que las células epidérmicas son isodiamétricas con paredes periclinales redondeadas en *Vaccinium corymbosum* (Valenzuela-Estrada *et al.*, 2008), mientras que en *Vaccinium oliginosum*, se observó morfología variable dentro de un mismo sistema radicular (Yang *et al.*, 2018) y tanto en la misma raíz como entre hospederos en *Vaccinium oxycoccos*, *Ledum groenlandicum*, *Vaccinium myrtilloides*, *Kalmia angustifolia*, *Gaultheria procumbens* (Massicotte *et al.*, 2005). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en este estudio.

4.2 Comprobación de hongos endófitos por aislamiento y cultivo

Las características morfológicas observadas en los aislados obtenidos se compararon con las reportadas para hongos micorrícicos ericoides reconocidos (Wu *et al.*, 2020; Bizabani *et al.*, 2015; Hambleton & Currah; 1997; Bain, 1931); tales características coinciden con las descritas para *Hyaloscypha hepaticicola* y otros miembros del complejo, como *Odiendron maius* y *Meliniomyces variabilis*, así como también para hongos endófitos septados oscuros. Sin embargo, sin la aplicación de herramientas moleculares, esta evidencia no contrasta ni respalda lo observado con microscopio óptico. Por ejemplo, Hambleton & Currah (1997), identificaron algunos aislados obtenidos como *Scytalidium vaccinii* (la forma anamorfa de *Hyaloscypha hepaticicola*) porque el grado de pigmentación, textura y tasa de crecimiento de la colonia era prácticamente igual a lo reportado para esta especie. No obstante, la data molecular demostró que esos aislados pertenecían a otra taxa.

Dado que en un principio se pensaba que las micorrizas ericoides eran el único tipo de asociación a observar en las raíces de *V. floribundum* y *V. meridionale* y además, que las mismas eran generadas por una única taxa de hongos, se esperaba obtener aislados con un único tipo de morfología. Sin embargo, la realidad de estos sistemas vivos es otra. Por consiguiente, la metodología aplicada aquí no contempló la posibilidad de obtener hongos no micorrícicos. En concreto, Vohník (2020) mencionó que en un segmento de raíz de un cm se pueden observar de 200 a 2000 puntos de entradas fúngicas y que por lo tanto, inóculos de más de dos mm incrementa el chance de obtener endófitos de rápido crecimiento o saprótrofos casuales que estarían a expensas de los hongos ericoides, quienes exhiben un crecimiento lento.

Sin embargo, en este estudio se utilizaron segmentos de raíz de 2 cm de longitud como inóculo, lo que pone aún más en duda que se haya aislado hongos micorrícicos ericoides con éxito. En síntesis, no todos los aislados obtenidos a partir de un segmento de raíz de las ericáceas, representan un hongo micorrícico ericoide.

4.3 Otros hallazgos observados en *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale*

4.3.1 Presencia de Endófitos Septados Oscuros

Aunque la familia Ericaceae forma micorrizas ericoides primariamente y un considerable número de investigaciones han descrito la micorriza ericoide como el único tipo de simbiosis que tiene lugar en las plantas de esta familia (Finlay, 2008; Read & Pérez-Moreno, 2004; Cairney & Meharg, 2003; Smith & Read, 2002), se ha detectado la presencia de estos endófitos en numerosas ericáceas tanto con observaciones microscópicas como con herramientas moleculares (Lukésova *et al.*, 2015; Bizabani, 2015; Bruzone *et al.*, 2015; Gorzelak *et al.*, 2012; Baba *et al.*, 2011; Selosse *et al.* 2007; Bougoure & Cairney, 2005; Massicotte *et al.*, 2005).

En este estudio, se observaron estructuras morfológicamente características de hongos endófitos septados oscuros (DSE) en ambas especies, específicamente del tipo *Rhizoctonia* y del complejo *Phialocephala fortinii* - *Acephala applanata* (PAC): micelio dematiáceo con hifas septadas, diferentes tipos de microesclerocia y red laberíntica intercelular. El morfotipo *Rhizoctonia* se reconoció como tal por la presencia de hifas lobuladas y ramificadas que producen segmentos cortos en forma de barril que tienden a agruparse en células corticales y el morfotipo PAC por la colonización intracelular de cuerpos globosos melanizados. En raíces de *Erica* y *Rhododendron* también se ha observado la presencia conjunta de estos morfotipos (Bizabani *et al.*, 2015; Massicotte *et al.*, 2005). Similarmente a lo que ocurre en la micorriza ericoide, estas observaciones sugieren que las estructuras intraradiculares formadas están determinadas por el hongo responsable y por la morfología de la raíz.

Los hongos endófitos se consideran así porque no producen interfaces específicas para el transporte de nutrientes cuando colonizan los tejidos vegetales. En estudios preliminares se ha mencionado que la microesclerocia de los DSE es una estructura que está relacionada con funciones de dispersión y almacenamiento y que la red laberíntica podría mimetizar las funciones de una red de Hartig, e incluso se ha demostrado que existe un flujo bidireccional de nutrientes entre planta hospedera y endófitos septados (Vohník & Albrechtová, 2011; Usuki & Narisawa, 2007), por lo que no es descabellado pensar que las estructuras de las asociaciones endofíticas observadas tengan un papel activo en la nutrición de las plantas estudiadas.

4.3.2 Presencia de Micorrizas Arbusculares

En las raíces de las plantas bajo estudio, vesículas y micelio típicos de micorrizas arbusculares estuvieron presentes en ambas especies pero arbusculos (tanto del tipo París como el tipo arum) y enrollados hifales sólo se observaron en *Vaccinium meridionale*, lo que confirma sin lugar a dudas que estas especies están beneficiándose mutuamente de este tipo de asociación, puesto que es aceptado ampliamente que la presencia de arbusculos, vesículas y micelio intra e intercelular en un hospedero cuyos tejidos se ven sanos, es evidencia suficiente para concluir que ambos organismos se encuentran en simbiosis (Vohník *et al.*, 2020).

La micorriza arbuscular es abundante en los páramos andinos (Montilla *et al.*, 2018). De hecho, en una parcela del rosetal-arbustal del páramo desértico El Banco de la Sierra de la Culata, se reportaron los valores más altos de colonización micorrícica arbuscular (Barnola & Montilla, 1997). Evidentemente, estas estructuras se están observando en estas especies porque estos hongos se encuentran en el sustrato circundante. Sin embargo, como se dijo en el párrafo anterior, la presencia de arbusculos indica la capacidad de estas plantas de establecer este tipo de micorriza. En tal sentido, cabe mencionar que la micorriza arbuscular fue el primer tipo de micorriza en surgir en el orden Ericales. De hecho, la subfamilia Enkianthoideae aún se asocia con hongos micorrícicos arbusculares glomeromicetes (Selosse *et al.*, 2007).

Pese a que las subfamilias Ericoideae, Styphelioideae, Harrimanelloideae, Cassiopoideae y Vaccinioideae muestran asociaciones más evolucionadas como la micorriza ericoide y cavendishioide, han habido numerosos reportes de la presencia de micorrizas arbusculares en estas plantas (Bruzzone *et al.* 2017; Bruzzone *et al.*, 2015; Bizabani, 2015, Baba *et al.*, 2011; Fukuchi *et al.*, 2011; Urcelay, 2002; McLean & Lawrie, 1996; Koske *et al.*, 1990), por lo que parecen haber retenido la condición ancestral de formar micorrizas arbusculares.

4.3.3 Co-colonización de las micorrizas ericoides, endófitos septados oscuros y las micorrizas arbusculares

Se observaron estructuras típicas de micorrizas ericoides, endófitos septados oscuros y micorrizas arbusculares, consistentemente en las raíces de *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale* del Páramo de la Culata, Mérida, Venezuela. Tales resultados parecen implicar la coexistencia de tres grupos fúngicos completamente distintos. Hasta la fecha, existen varios reportes que constatan la coexistencia de las micorrizas ericoides con los endófitos septados en los sistemas radiculares de

ericáceas de distintas latitudes (Yang *et al.*, 2018; Mandyam & Jumpponen, 2005; Haselwandter & Read, 1980), así como la coexistencia de micorrizas ericoides con micorrizas arbusculares en plantas del género *Vaccinium* (Koske, 1990). Sin embargo, Urcelay (2002) hizo el primer registro formal de la presencia de los tres tipos de simbiosis en *Gaultheria poeppigii* de las montañas de Córdoba, Argentina, y Bizabani (2015) en especies del género *Erica* del Reino Florístico de Cabo, Sudáfrica.

En este estudio, no se realizaron estimaciones de intensidad y porcentaje de colonización para determinar qué tipo de asociación es más abundante. Sin embargo, la evidencia morfoanatómica obtenida indica que posiblemente estos organismos están colonizando nichos diferentes, aún estando en la misma porción de raíz. Los hongos micorrícicos ericoides se limitaron a células epidérmicas de raíces juveniles, en tanto que los endófitos septados, aunque capaces de colonizar las células epidérmicas de raíces jóvenes, parecen proliferar en las porciones de raíz con tejidos maduros.

Generalmente, donde se observó micorriza ericoide, también se observó una red laberíntica intercelular o formación de microesclerocia en la corteza en lugar de la epidermis. Posiblemente, esto sea resultado de la actividad enzimática de los hongos ericoides como la liberación de quitinasas, lo cual podría ser desfavorable para la coexistencia de hongos endófitos y micorrizas ericoides en células adyacentes. Por otro lado, se observó microesclerocia en tejidos cercanos al meristema apical; regiones que el hongo micorrícico ericoide no puede colonizar debido a que las células epidérmicas no se han diferenciado.

Las micorrizas arbusculares, por su parte, mostraron clara preferencia por las raíces adultas. Este resultado es consistente con lo descrito por Koske *et al.* (1990) donde las raíces mayores a 1,5 mm de diámetro mostraron altos niveles de colonización por micorrizas arbusculares, mientras que las raíces de primer orden estaban siendo colonizadas por micorrizas ericoides. Nuevamente, se observa una diferenciación espacial. No obstante, los endófitos septados oscuros también se encuentran colonizando los tejidos maduros del sistema radicular.

De hecho, en numerosas muestras se observó la colonización conjunta por ambos gremios fúngicos. Es posible que estos organismos estén compitiendo por la adquisición de nutrientes puesto que se ha demostrado que los exudados de los endófitos septados afectan el desarrollo de los hongos arbusculares (Yang *et al.*, 2018). Asimismo, se ha descubierto que la colonización por micorrizas arbusculares y los endófitos septados oscuros se relacionan negativamente con la altitud, sugiriendo que los endófitos septados son más prevalentes a altas elevaciones que los hongos arbusculares (Read & Haselwandter, 1981).

Urcelay (2002), observó un comportamiento similar al descrito anteriormente: la micorriza ericoide se restringió a las partes terminales de las raíces más delgadas cuyo diámetro variaba entre 60 a 120

μm , los endófitos septados colonizaron raíces de diámetro mayor a 70 μm mientras que las micorrizas arbusculares colonizaron raíces de diámetros entre 80 a 250 μm .

Desafortunadamente, no hay datos disponibles que sirvan de base para dilucidar cuál es la relación existente entre estos organismos y cuáles son los factores que están controlando la dinámica en la interacción de los mismos. Si se desconoce el rol de los endófitos septados en las ericáceas que por años ha sido reportado como un fenómeno común, mucho menos se sabe cuál es el posible rol de las micorrizas arbusculares en estas especies. En todo caso, es un hecho que las raíces de Ericaceae tienen la capacidad de hospedar hongos taxonómicamente y fisiológicamente distintos.

4.4 Otras consideraciones

4.4.1 Micorrizas ericoides: ¿es la evidencia morfológica concluyente?

Las plantas del orden Ericales desarrollaron capacidades para hospedar endófitos en células individuales y promover la formación de ovillos hifales (Tedersoo *et al.*, 2009). En principio, cada célula puede ser colonizada por un hongo diferente, por una especie diferente o por un individuo de la misma especie genéticamente diferente (Vohník *et al.*, 2020). Dado que las estructuras generadas por las micorrizas ericoides son morfológicamente simples, pueden confundirse con haustorio intracelular de hongos parásitos y/o con enrollados hifales intracelulares producidos por hongos ericoides putativos. De hecho, existen numerosos reportes de hongos no ericoides que tienen estilos de vida endofíticos, saprotróficos y ectomicorrícicos capaces de formar estructuras similares a la micorriza ericoide en las raíces de ericáceas, tanto *in vitro* como en la naturaleza (Grunewaldt-Stöcker & von Alten, 2016; Vohník *et al.*, 2016; Lukešová *et al.*, 2015; Vohník *et al.*, 2012; Vohník *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

Por muchos años, se consideró que la habilidad que exhibe un hongo de formar enrollados hifales altamente compactos en las células epidérmicas de las ericáceas, es rasgo suficiente para clasificarlo como micorrícico ericoide. Sin embargo, es claro que la presencia dada de un hongo no es necesariamente sinónimo de su estado micorrícico, aunque ampliamente se interprete de esa manera. Leake & Read (1991), dijeron: “La observación en estado natural de un hongo, el aislamiento, el cultivo y la demostración de que forma “estructuras típicas” es solamente la primera etapa en la determinación de la naturaleza de la relación existente entre heterótrofo y autótrofo”.

Puesto que muchos hongos son capaces de invadir los tejidos radiculares, para poder describir legítimamente una asociación como micorrícica, se requiere obtener evidencia de que la relación

existente entre hospedero y hongo es mutualista, bajo condiciones similares a aquellas que prevalecen en la naturaleza. Igualmente, estos investigadores insisten en que debe existir evidencia experimental de que la infección por el hongo conduce a un incremento de la toma de nutrientes en el hospedero y evidencia experimental que determine hasta qué punto el heterótrofo depende del autótrofo para la obtención de carbono.

Todo lo anteriormente expuesto conduce a pensar que la evidencia morfológica no es determinante para concluir que las especies en estudio están en una simbiosis con hongos micorrícicos ericoides. Sin embargo, si la interacción micorrícica es definida como un proceso morfogénético que unifica la raíz de la planta hospedera con los hongos del suelo (una definición que la autora de este trabajo promueve a usar), entonces las especies en estudio se encuentran en una simbiosis micorrícica ericoide. Ahora bien, si la definición de micorriza adicionalmente implica una relación mutualista, entonces para responder a la pregunta se requiere más investigación. En definitiva, la confirmación morfológica de la presencia de estos hongos y la descripción de sus modos de colonización es apenas el primer paso hacia el entendimiento de la relación existente entre estos dos sistemas; es el atisbo de la punta del iceberg, mientras que la mayoría del cuerpo sigue oculto esperando a ser descubierto.

4.4.2 Posibles implicaciones fisiológicas de las asociaciones simbióticas observadas

Las raíces de las especies en estudio resultaron ser un mosaico complejo donde distintas poblaciones de hongos micorrícicos coexisten, cada uno representado por un número variable de genets y con posibles repercusiones fisiológicas y ecológicas distintas. La asociación simultánea con distintos hongos puede ser una estrategia significativa en el éxito ecológico de las ericáceas; siempre y cuando la diversidad fúngica implique también una diversidad funcional. Es decir, si y sólo si diferentes especies de hongos micorrícicos realizan diferentes funciones fisiológicas. Al respecto, se ha demostrado que el arsenal enzimático de los hongos micorrícicos ericoides varía entre individuos de la misma especie. Algunos aislados pertenecientes a *Hyaloscypha hepaticicola* desplegaron distintas habilidades para utilizar nitrógeno a partir de fuentes orgánicas e inorgánicas mientras que algunas cepas de *Oidiodendron maius* exhiben distintos rangos de tolerancia a metales pesados, aún cuando provenían del mismo sitio (Lacourt *et al.*, 2000; Cairney *et al.*, 2000).

Por otro lado, los ascomicetos responsables de la micorriza ericoide típica usualmente no atacan los polímeros de carbono más recalcitrantes aunque tienen el potencial de movilizar N y P teniendo como fuente residuos de hongos y plantas. Asimismo, sus habilidades para utilizar la celulosa como su fuente primaria de carbono son limitadas. Curiosamente, las ericáceas colonizan ambientes con acumulación

elevada de compuestos lignocelulósicos, compuestos que pueden ser degradados por basidiomicetos. Al respecto, dos basidiomicetos co-específicos formadores de micorrizas ericoides con manto, degradaron un compuesto modelo de lignina que permaneció inalterado en presencia de ascomicetos micorrícicos ericoides (Casieri *et al.*, 2010).

Estos hallazgos demuestran el potencial ligninolítico del basidiomiceto (o basidiomicetos) responsable de la micorriza ericoide con manto, cuyo comportamiento es similar a muchos de los basidiomicetos especialistas en la descomposición, incluyendo el hongo blanco de pudrición, generalmente considerado como el agente principal en la degradación de lignina en los ecosistemas de bosque (Vohník *et al.*, 2012). Para la planta, esto podría significar una ventaja evolutiva especialmente si la lignina se presenta como una restricción bioquímica que impide la adquisición de nutrientes. La capacidad de degradación de polímeros aromáticos complejos que exhibe la micorriza ericoide con manto pudiera permitir la proliferación en suelos con elevados desechos lignificados, mientras que la condición micorrícica provee un conducto directo para la transferencia de nutrientes entre planta y hongo.

En cuanto a las micorrizas arbusculares, el hongo (Glomeromycota) depende completamente del autótrofo para la obtención de carbono. De hecho, no se puede crecer en cultivo en ausencia de la raíz (Peterson *et al.*, 2003). Los hongos micorrícicos ericoides tienen mayor acceso a N orgánico que los hongos arbusculares dado que poseen proteasas y enzimas especializadas en la degradación del N como las lacasas, ascorbato oxidasas y peroxidasas (Wurzburger *et al.*, 2011). En este sentido, es claro que beneficios obtiene el hongo al asociarse con una ericácea. Por otra parte, las micorrizas arbusculares forman redes comunes de micelio (CMN), lo que significa que una vasta diversidad de plantas pudieran estar enlazadas accediendo al banco nutritivo que representa la micorriza ericoide (Kjøller, *et al.*, 2010). Desde este punto de vista, asociarse a ericáceas pudiera representar una ventaja evolutiva tanto para los hongos arbusculares como para los fitobiontes que generalmente se encuentran colonizando.

Por otro lado, los hongos arbusculares poseen enzimas que principalmente están involucradas en la incorporación de P, también confieren protección contra factores abióticos como la sequía y la salinidad y mejoran la estructura y salud del sustrato (Kariman *et al.*, 2018). Es posible que las ericáceas pudieran obtener estos beneficios a partir de la asociación con estos hongos. Por otra parte, es bien sabido que el micelio de las micorrizas arbusculares actúa como una extensión física del sistema radicular e incrementa la superficie para la toma de nutrientes, una característica que no muestran las micorrizas ericoides (Finlay, 2008). Sin embargo, todas estas son conjeturas puesto que no hay evidencia experimental del valor fisiológico que las micorrizas arbusculares pudieran aportar a las plantas de la familia Ericaceae.

Con respecto a la asociación con endófitos septados, las ventajas fisiológicas no son claras. Varios estudios demostraron que el uso de estos endófitos promueve el crecimiento de la planta, aumenta la tasa de supervivencia del hospedero y facilita el ciclaje mineral sugiriendo que la relación entre hospederos y endófitos es mutualista. Por ejemplo, en *Quercus hintonii* se demostró que los endófitos septados afectan positivamente el crecimiento de plántulas, aumentando la biomasa total y la longitud del vástago (Jaramillo *et al.*, 2020) así como también Newsham (2011) encontró que incrementan el contenido total de N y P en vástago de gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Similarmente, existe evidencia que indica que tienen efectos negativos o neutrales en el hospedero. Al respecto, Mayerhofer *et al.* (2013) determinaron los efectos de los endófitos septados oscuros en la biomasa vegetal y la concentración de nitrógeno mediante un meta-análisis. Estos autores hallaron que los endófitos septados disminuyeron la biomasa total en comparación con los tratamientos control, pero el efecto sobre las concentraciones de nitrógeno fue neutral.

Por otro lado, Wu *et al.* (2020) compararon los transcriptomas de plantas de *Vaccinium corymbosum* no inoculadas e inoculadas con *Anteaglonium* (ESO) y obtuvieron que los endófitos septados inducen una serie de cambios en el metabolismo celular y en las rutas de biosíntesis y señalización; especialmente en la absorción de iones metales y en la ruta de biosíntesis de la auxina, una fitohormona que tiene un rol central en las interacciones raíz-microbios. Parece que la verdadera razón de la variabilidad observada en estos organismos está relacionada con las distintas combinaciones particulares de cepas de ESO, hospederos y condiciones de crecimiento, por lo que el rol fisiológico de esta asociación en las especies estudiadas queda por dilucidar.

5. Conclusiones y Recomendaciones

- Las características morfológicas observadas indican que al menos tres grupos de hongos distintos están formando micorrizas ericoides en estas especies, cuya presencia se constató con el aislamiento y cultivo de los mismos, lo que permite dar soporte a la hipótesis planteada para concluir que en *Vaccinium floribundum* y *Vaccinium meridionale*, están presentes los hongos micorrícicos ericoides.
- La variabilidad observada en los tipos de colonización descritos sugiere que al menos tres hongos pertenecientes a tres gremios fúngicos morfológica y funcionalmente distintos, se encuentran formando micorrizas ericoides en estas especies; entre los cuales sin duda alguna se encuentran los basidiomicetos.
- Se observaron estructuras típicas de endófitos septados como la microesclerocia y la red laberíntica, así como también se observaron arbusculos y vesículas características de micorrizas arbusculares, evidenciando que las micorrizas ericoides no son el único tipo de simbiosis que tiene lugar en las raíces de estas especies.
- Las micorrizas ericoides, los hongos endófitos septados y las micorrizas arbusculares mostraron preferencias espaciales distintas.
- Los hongos endófitos septados oscuros y los hongos arbusculares cohabitan en el mismo nicho ecológico. Se requiere explorar si se correlacionan positiva o negativamente y los factores que modulan su coexistencia.
- Se obtuvieron 5 morfotipos, de los cuales tres corresponden presuntamente a hongos micorrícicos ericoides. No obstante, la caracterización morfológica de las colonias obtenidas en cultivo PDA no resultó ser una variable informativa dada la diversidad de simbiontes que se observaron en estas raíces. Se sugiere aplicar una metodología más específica que permita discriminar mejor entre los simbiontes y recolectar los hongos endófitos de interés. Si el tiempo y el espacio lo permiten, es recomendable utilizar más de un tipo de medio de cultivo que favorezca ciertos grupos fúngicos e inhiba otros.
- Este estudio demuestra que el uso de microscopio óptico es una metodología efectiva para documentar características morfológicas de las asociaciones que están teniendo lugar en los sistemas radiculares de las especies de *Vaccinium* en sus hábitats naturales. No obstante, para obtener mayor información de la naturaleza de estas asociaciones, se recomienda utilizar microscopía de transmisión electrónica y microscopía electrónica de barrido, así como también

aplicar herramientas moleculares que permitan determinar la identidad de los hongos observados y evaluar su diversidad genética.

- Se recomienda realizar estudios que comparen la diversidad de hongos dentro de las poblaciones de *Vaccinium* para escudriñar el posible rol que tengan los mismos tanto para las plantas hospederas como para todo el ecosistema donde las mismas habitan.

www.bdigital.ula.ve

6. Referencias Bibliográficas

- Abreu, O., Barreto, G. & Prieto, S. 2014. *Vaccinium* (Ericaceae): Ethnobotany and pharmacological potentials. *Emir. J. Food Agric.* 26(7): 577-591.
- Aldana, A. & Bosque, J. 2008. Cartografía de la cobertura/uso de la tierra del Parque Nacional Sierra de La Culata, estado Mérida-Venezuela. *Revista Geográfica Venezolana* 49(2): 173-200.
- Allen, F. 1972. Blueberry leaf extracts physiologic and clinical properties in relation to carbohydrate metabolism. *J. Am. Med.Assoc.* 89:1577-1581.
- Arjona, B. 2001. Mortiño como planta promisoría en la región del parque Arvi (Antioquia, Colombia). Presentado en el Seminario de Plantas Promisorias. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional, Sección Medellín. Colombia.
- Ávila, R.H., R.J. Cuspoa, G. Fischer, G.A. Ligarreto y C.M. Quicazan. 2007. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) almacenado 1 a 2 °C. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín* 60(2): 4179-4193.
- Azócar, A. & Fariñas, M. 2003. Páramos. En Aguilera, M., Azócar, A. & González, E. (Eds), *Biodiversidad de Venezuela Tomo II.* (pp. 716-733). Fundación Polar.
- Baba, T. Hirose, D., Sasaki, N., Watanabe, N., Kobayashi, N., Kurashige, Y, Karimi, F. & Ban, T. 2016. Mycorrhizal formation and diversity of endophytic fungi in hair roots of *Vaccinium oldhamii* Miq. in Japan. *Microbes and Environment* 31(2):186-189
- Bain, H. 1931. Production of synthetic mycorrhiza in the cultivated cranberry. *Journal of the Agricultural Research* 55(11): 811-835
- Balestrini, R. & Lumini, E. 2018. Focus on mycorrhizal symbioses. *Applied Soil Ecology.* 123:299-304. Doi: 10.1016/j.apsoil.2017.09.001

- Barnola, L. & Montilla, M. 1997. Vertical distribution of mycorrhizal colonization, hairs, and belowground biomass in three contrasting sites from the tropical high mountains, Mérida, Venezuela. *Arctic and Alpine Research*. 29: 206-212.
- Barrios, N. & Rondón, D. 2014. Anatomía de la madera de tres especies de Ericaceae en el Páramo de la Culata, Mérida, Venezuela. *Pittiera* 38: 135-146
- Bautista, J., Posadas, L., Urbina, J., Larsen, J. & Segura, S. 2017. Colonización por micorrizas en la producción de plántulas en vivero de arándano (*Vaccinium* spp.) cv Biloxi. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(3):695-703.
- Berch, S.M., Allen, T.R. & Berbee, M.L. 2002. Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244:55–66.
- Bizabani, C. 2015. The diversity of root fungi associated with *Erica* species occurring in the Albany centre of endemism. Trabajo especial de grado para obtener el título de Doctor en Filosofía en Microbiología. Universidad de Rhodes. Albania. 127pp.
- Bonfante-Fasolo, P. 1980. Occurrence of a basidiomycete in living cells of mycorrhizal hair roots of *Calluna vulgaris*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72:320-325.
- Bougoure, D.S. & Cairney, J.W.G. 2005. Assemblages of ericoid mycorrhizal and other root-associated fungi from *Epacris pulchella*. *Environmental Microbiology* 7: 819–827.
- Brand, F. 1991. Ektomykorrhizen an *Fagus sylvatica*- Charakterisierung und identifizierung, ökologische kennzeichnung und unsterile kultivierung. In: F. Brand (ed) *Libri Botanici*. IHW, Eching, 1–229 pp.
- Brantner, A. & Grain, E. 1994. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 44(1):35-40.

- Briceño, B. y Morillo, G. 2002. Catálogo abreviado de las plantas con flores de los páramos de Venezuela. Parte I. Dicotiledóneas (Magnoliopsida). Acta Bot. Venez. 25(1): 1-46. Recuperado el 08 de junio de 2015. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S008459062002000100001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0084-5906.
- Bruzzone, M., Fontenla, S. & Vohník, M. 2015. Is the prominent ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* absent in the Southern Hemisphere's Ericaceae? A case study on the diversity of root mycobionts in *Gaultheria* spp. From Northwest Patagonia, Argentina. Mycorrhiza 25:25-40
- Bruzzone, M., Fehrer, J.; Fontenla, S. & Vohník, M. 2017. First record of *Rhizoscyphus ericae* in Southern's Hemisphere's Ericaceae. Mycorrhiza 27: 147-163. Doi: 10.1007/s00572-016-0738-8
- Cáceres, Y. 2008. Intercambio gaseoso y mecanismos de resistencia a bajas temperaturas de *Vaccinium meridionale*, en el páramo de “La Aguada”. Trabajo especial de grado para optar al título de Licenciada en Biología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 62 pp.
- Cairney, J. & Meharg, A. 2003. Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. European Journal of Soil Science 54:735-740. doi: 10.1046/j.1365-2389.2003.00555.x
- Calderón, L. & Socha, A. 2009. Evaluación del estado fitopatológico del agraz (*Vaccinium meridionale* sw) en localidades del altiplano cundiboyacense (dos de Boyacá y una de Cundinamarca) Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Biología. Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia. 104 pp.
- Campa, V. 2017. Análisis de imágenes de microscopía con ImageJ & Fiji. 114 pp. ISBN-13: 978-1542671309 ISBN-10: 1542671302.
- Casieri, L., Anastasi, A., Prigione, V. & Varese, G. 2010. Survey of ectomycorrhizal, litter-degrading, and wood-degrading Basidiomycetes for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity. Anton Leeuw Int. J. G. 98: 483–504.

Chambers, S.M., Curlevski, N.J.A. & Cairney, J.W.G. 2008. Ericoid mycorrhizal fungi are common root inhabitants of non-Ericaceae plants in a south-eastern Australian sclerophyll forest. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65:263-270.

Chamorro, F. & Nates-Parra, G. 2015. Biología floral y reproductiva de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) en los Andes orientales de Colombia. *Rev. Biol. Trop.* 63(4): 1197-1212.

Coba, P., D. Coronel, K. Verdugo, M. Paredes, E. Yugsi & L. Huachi. 2012. Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja.* 16(2): 5-13. ISSN: 1390-3799.

Dalpé, Y., Litten, W. & Singler, L. 1989. *Scytalidium vaccinii*: a new species, an ericoid endophyte of *Vaccinium angustifolium* roots. *Mycotaxon* 35: 371-378.

Daghino, S., Martino, E., Voyron, S. & Perotto, S. 2022. Metabarcoding of fungal assemblages in *Vaccinium myrtillus* endosphere suggests colonization of above-ground organs by some ericoid mycorrhizal and DSE fungi. *Sci Rep* 12:11013. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15154-1>

Diagne, N., Ngom, M., Djighaly, P., Fall, D., Hocher, V. & Svistoonoff, S. 2020. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity.* 12(370):1-25. Doi:10.3390/d12100370

Duddridge, J., & Read, D. 1982. An ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas in *Rhododendron ponticum*. *Canadian Journal of Botany*, 60(11): 2345-2356.

Echeverry, A. & Toro, J. 2009. Conozcamos y usemos el mortiño. *Corantioquia*, 3ra ed.

Finlay, Roger. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59(5): 1115-1126.

Fukuchi, S., Obase, K., Tamai, Y., Yajima, T. & Miyamoto, T. 2011. Vegetation and colonization status of mycorrhizal and endophytic fungi in plant species on acidic barren at crater basin of volcano Esan in Hokkaido, Japan. *Eurasian Journal of Forest Research* 14(1): 1-11.

García, J. 2007. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos acuoso y etanólico de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en macrófagos de ratón. Trabajo de grado presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología. Universidad de Las Américas. Quito, Ecuador. 75 pp.

Gorzalak, M.A., Hambleton, S. & Massicotte, H.B. 2012. Community structure of ericoid mycorrhizas and root-associated fungi of *Vaccinium membranaceum* across an elevation gradient in the Canadian Rocky Mountains. *Fungal Ecol.* 5:36–45.

Grelet, G.A., Johnson, D., Vralstad, T., Alexander, I.J., & Anderson, I.C. 2010. New insights into the mycorrhizal *Rhizoscyphus ericae* aggregate: spatial structure and co-colonization of ectomycorrhizal and ericoid roots. *New Phytol* 188:210–222.

Grunewaldt-Stöcker, G., & Von Alten, H. 2016. Is the root-colonizing endophyte *Acremonium strictum* an ericoid mycorrhizal fungus? *Mycorrhiza* 26:429–440.

Hackett, C. 1969. A study of a root system of barley II: relationships between root dimension and nutrient uptake. *New Phytol* 68: 1023-1030.

Hambleton, S. & Currah, R. 1997. Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal Ericaceae. *Can. J. Bot.* 75: 1570-1581.

Haselwandter, K. & Read, D.J. 1980. Fungal associations of roots of dominant and sub-dominant plants in high-alpine vegetation systems with special reference to mycorrhiza. *Oecologia* 45:57-62.

Hofstede, Robert. 2014. Los Páramos Andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. UICN, Quito, Ecuador.

Jumponnen, A. & Trappe, J. 1998. Dark-septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.* 140:295-310 doi: 10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x

- Kariman, K.; Barker, S. & Tibbett, M. 2018. Structural plasticity in root-fungal symbioses: diverse interactions lead to improved plant fitness. *Peer J.* 6:e6030 doi 10.7717/peerj.6030
- Kit, S. M., R. V. Boichuk, L. I. Khananayev & T. T. Ozarkiv. 1972. Experimental study of the hypoglycemic effect of some plants found near *Carpathia*. *Farm Zh.* 27(4):61.
- Kjøller, R.; Olsrud, M. & Michelsen, A. 2010. Co-existence ericaceous plant species in a subarctic mire community share fungal root endophytes. *Fungal Ecology* 3: 205 – 214.
- Kolařík, M. & Vohník, M. 2018. When the ribosomal DNA does not tell the truth: The case of the taxonomic position of *Kurtia argillacea*, an ericoid mycorrhizal fungus residing among Hymenochaetales. *Fungal Biology* 122(1):1-18. doi: 10.1016/j.funbio.2017.09.006.
- Koske, R., Gemma, J. & Englander, L. 1990. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae in Hawaiian Ericales. *American Journal of Botany*, 77(1):64. doi:10.2307/2444793
- Lee, Y., Owens, I., Thrupp & Cesario, T. 2000. Does cranberry juice have antibacterial activity? *J. Am. Med. Ass.* 28(13): 1691.
- Leake, J. & Read, D. 1991. Experiments with ericoid mycorrhiza. En: Vohník, M. 2020. Ericoid mycorrhizal symbiosis: theoretical background and methods for its comprehensive investigation. *Mycorrhiza* 30:671-695. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00989-1>
- Llambí, LD. 2003. Succession in a High Tropical Andean Ecosystem Ecophysiology of Dominant Plant Species during Old-Field Succession in a High Tropical Andean Ecosystem. *Artic, Antarctic and Alpine Research.* 25(4): 447-453.
- Llambí LD. 2015. Estructura, diversidad y dinámica de la vegetación en el ecotono bosque-páramo: revisión de la evidencia en la Cordillera de Mérida. *Acta biol. Colomb.*; 20(3):5-19. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n3.46721>

- Lu, H., Wei, T., Lou, H., Shu, X. & Chen, Q. 2021. A critical review on communication mechanism within plant-endophytic fungi interactions to cope with biotic and abiotic stresses. *Journal of Fungi* 7(9):719. Doi: 10.3390/jof7090719
- Lukešová, T., Kohout, P., Větrovský, T. & Vohník, M. 2015. The Potential of dark septate endophytes to form root symbioses with ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal middle european forest plants. *PLoS ONE* 10(4): e0124752. Doi:10.1371/journal.pone.0124752
- Malicka, M., Magurno, F. & Piotrowska, Z. 2022. Plant association with dark septate endophytes: when the get going gets tough (and stressful), the tough fungi get going. *Chemosphere* 302:134830 doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134830>
- Mandyam, K. & Jumpponen, A. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud. Mycol.* 53:173-189.
- Massicotte, H.B., Melville, L.H. & Peterson, R.L. 2005. Structural characteristics of root-fungal interactions for five ericaceous species in eastern Canada. *Can. J. Bot.* 83: 1057–1064. doi: 10.1139/B05-046
- Mayerhofer, M., Kernaghan, G. & Harper, K. 2013. The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 23: 119–128. doi: 10.1007/s00572-012-0456-9
- McDonald, M.A., Hofny-Colins, A., Healy, J.R.T. & Goodland, C.R. 2003. Evaluation of trees indigenous to the montane forest of the Blue Mountains, Jamaica for reforestation and agroforestry. *Forest Ecol. Manag.* 175: 379-401
- McLean, C. & Lawrie, A. 1996. Patterns of root colonization in epacridaceous plants collected from different sites. *Ann. Bot.* 77: 405–411
- Mohanta, T. & Bae, H. 2015. Functional genomics and signaling events in mycorrhizal symbiosis. *Journal of Plant Interactions.* 10(1):21-40. Doi: 10.1080/17429145.2015.1005180

- Monasterio, M. 1980. Los Páramos Andinos como región natural. Características biogeográficas generales y afinidad con otras regiones andinas. En: Monasterio, M. (Ed): Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos. Editorial de la Universidad de Los Andes. Mérida, pp. 15-27.
- Montilla, M., Herrera-Peraza, R. Morales, S. Furrázola, E. & Monasterio, M. 2018. Distribución vertical de las micorrizas y pelos radicales en dos páramos andinos funcionalmente contrastantes. *Acta Botánica Cubana* 217(3):205-211.
- Mukerji, K. *et al.* 2002. *Techniques in Mycorrhizal studies*. Kluwer Academic Publishers (eds.) pág ISBN 978-90-481-5985-7 1st edition 554 pp.
- Newsham, K.K. 2011. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytol.* 190: 783-793. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03611.x
- Obase, K., Matsuda, Y., & Ito, S. 2013. *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae) is commonly associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 23(3):199-208. Doi: 10.1007/s00572-012-0462-y
- Pérez, S. & Valdivieso, C. 2007. Colección y caracterización morfológica *in situ* del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en la sierra norte del Ecuador (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Perotto, S., Perotto, R., Faccio, A., Schubert, A. & Bonfante, P. 1995. Ericoid mycorrhizal fungi: cellular and molecular bases of their interactions with the host plant. *Can. J. Bot.* 73(Suppl. 1): S557 - S568.
- Perotto, S., Actis-Perino, E., Perugini, J. & Bonfante, P. 1996. Molecular diversity of fungi from ericoid mycorrhizal roots. *Mol. Ecol.* 5: 123-131.
- Perotto, S., Girlanda, M. & Martino, E. 2002. Ericoid mycorrhizal fungi: some new perspectives and old acquaintances. *Plant and soil* 244: 41-53
- Peterson, R., Massicotte, H. & Melville, L. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. NRC Research Press.

- Phillips, J.N. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid-assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55(1): 158-161
- Protzman, E. 2021. Blueberries around the globe -past, present and future. Estados Unidos, Foreign Agricultural Service (FAS) U.S. Department of Agriculture (USDA). Recuperado de <https://www.fas.usda.gov/data/blueberries-around-globe-past-present-and-future> [01 de Julio del 2022]
- Qin, Y., Pan, X., Kubicek, C., Druzhinina, I., Chenthamara, K., Labbé, J. & Yuan, Z. 2017. Diverse plant-associated pleosporalean fungi from saline areas: ecological tolerance and nitrogen-status dependent effects on plant growth. *Front. Microbiol.* 8:158. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00158>.
- Queloz, V., Sieber, T., Holdenrieder, O., McDonald, B. & Grünig, C. 2011. No biogeographical pattern for a root-associated fungal species complex. *Global Ecol. Biogeogr.* 20:160–169. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00589.x>.
- Read, D. 1983. The Biology of mycorrhiza in the Ericales. *Can. J. Bot.* 61: 985-1004.
- Read, D. 1996. The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of botany* 77: 365-374.
- Read, D. & Haselwandter, K. 1981. Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant communities. *New Phytologist* 88: 341–352. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb01729.x>
- Read, D.J; Leake, J.R. & Perez-Moreno J. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany* 82:1243-1263 Doi: 10.1139/b04-12
- Reyes-Jaramillo, I., Montaña, M. & Silva-González, E. 2020. Septate endophytic fungi, but not arbuscular mycorrhizal fungi affect the early growth of *Quercus hintonii*, an endemic oak from Mexico State. *Botanical Sciences* 98(3):453-463. <https://doi.org/10.17129/botsci.2505>

- Sadowsky, J., Hanson, E. & Schilder, A. 2012. Root colonization by ericoid mycorrhizae and dark septate endophytes in organic and conventional blueberry fields in Michigan. *International journal of Fruit Science* 12:169-187.
- Schreckinger, M., Lila, M., Yousef, G. & González, E. 2012. Inhibition of α -Glucosidasa and α -Amilasa by *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis* proanthocyanidins. En: *Hispanic Foods: Chemistry and bioactive compounds*. ACS Symposium Series 1109: 71-82.
- Selosse, M.A., Setaro, S., Glatard, F., Richard, F., Urcelay, C. & Weiß, M. 2007. Sebaciniales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174: 864–878. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02064.x
- Setaro, S., Kottke, I. & Oberwinkler, F. 2006. Anatomy and ultrastructure of mycorrhizal associations of neotropical Ericaceae. *Mycol Progress* 5:243–254 Doi: 10.1007/s11557-006-0516-7
- Shadmani, L., Jamali, S. & Fatemi, A. 2021. Isolation, identification, and characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their role in enhancing phytoremediation. *Braz. J. Microbiol.* 52:1097–1106. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00493-4>.
- Smith, S. & Read, D. 2002. *Ericoid Mycorrhizas. Mycorrhizal Symbiosis*. 2da Edición. Elsevier Science Ltd. Cambridge, Great Britain, 323-346.
- Smith, S. & Read, D. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3ra Edición. Academic press.
- Tedersoo, L., Partel, K., & Jairus, T. 2009. Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environ. Microb.* 11:3166–3178.
- Tian, W., Zhang, C.Q., Qiao, P. & Milne, R. 2011. Diversity of culturable ericoid mycorrhizal fungi of *Rhododendron decorum* in Yunnan, China. *Mycologia* 103(4):703-709. Doi: 10.3852/10-296
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 30 de Julio de 2019. <http://www.tropicos.org/Name/50253390>

- Urcelay, C. 2002. Co-occurrence of three fungal root symbionts in *Gaultheria poeppigii* DC in Central Argentina. *Mycorrhiza* 12: 89–92.
- Usuki, F. & Narisawa, K. 2007. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*, and a non mycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia* 99:175-184.
- Valenzuela-Estrada, L., Vera-Caraballo, V., Ruth, L. & Eissenstat, D. 2008. Root anatomy, morphology, and longevity among orders in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). *American Journal of Botany* 95(12): 1506-1514. Doi:10.3732/ajb.0800092
- Vohník, M. 2020. Ericoid mycorrhizal symbiosis: theoretical background and methods for its comprehensive investigation. *Mycorrhiza* 30:671-695. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00989-1>
- Vohník, M. & Albrechtová, J. 2011. The Co-occurrence and morphological continuum between ericoid mycorrhiza and dark septate endophytes in 6 European *Rhododendron* species. *Folia Geobotanica* 46(4): 373-386.
- Vohník, M., Fendrych, M., Albrechtová, J. & Vosátka, M. 2007. Intracellular colonization of *Rhododendron* and *Vaccinium* roots by *Cenococcum geophilum*, *Geomyces pannorum* and *Meliniomyces variabilis*. *Folia Microbiol.* 52:407–414.
- Vohník, M., Sadowsky, J., Kohout, P., Lhotáková, Z., Nestby, R. & Kolarik, M. 2012. Novel root-fungus symbiosis in Ericaceae: sheathed ericoid mycorrhiza formed by a hitherto undescribed Basidiomycete with affinities to Trechisporales. *Plos One* 7(6): 1-16. Doi: 10.1371/journal.pone.0039524.
- Vohník, M., Sadowsky, J., Lukešová, T., Albrechtová, J. & Vosátka, M. 2012. Inoculation with wood decomposing basidiomycete, but not with root symbiotic ascomycetes, positively affects growth of highbush blueberry (Ericaceae) grown in a pine litter substrate. *Plant Soil.* 355: 341–352.
- Vohník, M., Pánek, M., Fehrer, J., & Selosse, M.A. 2016. Experimental evidence of mycorrhizal potential within Serendipitaceae (Sebacinales). *Mycorrhiza* 26: 831-846. Doi 10.1007/s00572-016-0717-0

- Vralstad, T., Fossheim, T. & Schumacher, T. 2000. *Piceirhiza bicolorata* – the ectomycorrhizal expression of *Hymenoscyphus ericae* aggregate? *New Phytol.* 145: 549-563.
- Wilbur, R.L. & Luteyn, J.L. 2008. A synopsis of the Mexican and Central American species of *Vaccinium* (Ericaceae). *J. Bot. Res. Inst. Texas* 2: 207-241.
- Wu, F., Li, Y., Tian, W., Sun, Y., Chen, F., Zhang, Y., Zhai, Y., Zhang, J., Su, H. & Wang, L. 2020. A novel dark septate endophyte positively affected blueberry growth and changed the expression of plant genes involved in phytohormone and flavonoid biosynthesis. *Tree Physiology* 40:1080-1094.
- Wurzburger, N., Higgins, B. & Hendrick, R. 2011. Ericoid mycorrhizal root fungi and their multicopper oxidases from a temperate forest shrub. *Ecology and Evolution* 2(1): 65–79. Doi: 10.1002/ece3.67
- Yang, H, Zhao, X., Liu, C., Bai, L., Zhao, M. & Li, L. 2018. Diversity and characteristics of colonization of root-associated fungi of *Vaccinium uliginosum*. *Scientific reports* 8:15283 Doi:10.1038/s41598-018-33634-1
- Zapata, I., Sepúlveda-Valencia, U. & Rojano, B. 2015. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las propiedades físico-químicas, probióticas y antioxidantes del yogurt saborizado con mortiño (*Vaccinium meridionale Sw*). *Información Tecnológica* vol. 26(2): 17-28
- Zijlstra, J. D., Van't Hof, P., Baar, J., Verkley, G. J., Summerbell, R. C., Paradi, I. & Berendse, F. 2005. Diversity of symbiotic root endophytes of the Helotiales in ericaceous plants and the grass, *Deschampsia flexuosa*. *Studies in Mycology.* 53:147-162.
- Zozulya, R., Musaeva, L. & Kuzmina, R. 1975. Biological activity of raw material from the above-ground part of bilberry. *Rast.Resur.* 11:87.

www.bdigital.ula.ve