

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas.

***Marchantia polymorpha* como modelo para el estudio de interacciones funcionales con endófitos de raíz fina Mucoromycotina (MFRE)**

Lic. Tamara Melina Ledesma

Director de Tesis: Dr. Javier Edgardo Moreno

Laboratorio de Biotecnología Vegetal
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral
UNL / CONICET

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a la Universidad Pública Argentina que me formó. En particular a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), mi *alma mater*, que me dio mi título de grado y me formó con conciencia social y ambiental. A la Universidad Nacional del Litoral (UNL), la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y al Consejo Nacional de Investigaciones Científico Tecnológicas (CONICET), por darme la posibilidad de realizar mis estudios de posgrado.

Quiero agradecer al Dr. Javier Edgardo Moreno, por haber confiado en mí. Por su paciencia y por haberme formado dentro de la biología molecular, cuando este campo estaba muy alejado de mi formación de grado. Y en particular, le agradezco por este trabajo, porque todas esas discusiones dentro de nuestras reuniones lograron integrar nuestras formaciones y llegar a este trabajo del cual me siento orgullosa.

A todos mis compañeros del subsuelo y la sala de becarios, que han acompañado este camino, dando consejos y siendo un soporte emocional muy importante. Sobre todo a Juan Ignacio Tolopka, mi compañero de laboratorio que además se ha convertido en un mentor y un gran amigo del que he aprendido mucho.

Al Dr. Martín Scervino, que nos dio un espacio en su laboratorio para comenzar con este estudio, y se convirtió en un gran aliado del tema.

A toda mi familia. Porque a pesar de nuestros recursos limitados, me apoyaron siempre en este camino y porque fueron los responsables de alimentar el amor y la curiosidad por la naturaleza.

Y por último, me gustaría agradecerle y dedicarle todo este trabajo a Walter Horacio Ledesma quien desde el 2007 ya no está con nosotros. A pesar de eso, sus enseñanzas me acompañan hasta el día de hoy. Dejándome con lo que ha sido un gran motor para mi vida que fue aprender a tener una vocación y servicio. A él, que inició la chispa por la curiosidad y al que le debo la emoción y la pasión por la biología. A él le dedico todo este camino y trabajo, porque sin él nada de esto hubiera pasado.

Aportes Científico-Tecnológicos

El trabajo de investigación que se describe en este trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas ha sido realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL) ubicado en el Centro Científico Tecnológico Santa Fe (CCT-Santa Fe).

Los resultados han sido dados a conocer parcialmente en las siguientes publicaciones.

Publicaciones directamente relacionadas con el trabajo de Tesis:

1. **Ledesma, T. M.**, Tolopka, J. I., Rausch, A. O., Svriz, M., Scervino, J. M., & Moreno, J. E. (2025). Phosphorus-related traits of fungal endophyte communities in *Marchantia polymorpha* across sites with varying human disturbance. *Plant and Soil*.

<https://doi.org/10.1007/s11104-025-08090-2>

Publicaciones relacionadas con el trabajo de Tesis:

1. Tolopka, J. I., Svriz, M., **Ledesma, T. M.**, Lanari, E., Scervino, J. M., & Moreno, J. E. (2024). Environmental pollutant anthracene induces ABA-dependent transgenerational effects on gemmae dormancy in *Marchantia polymorpha*. *Plants*, 13(21), 2979.

<https://doi.org/10.3390/plants13212979>

2. Catania, M. D. V., Albornoz, P. L., Rausch, A. O., **Ledesma, T. M.**, Dong, S., Cai, Y., Zeng, Y., Liu, Y., Suárez, G. M., & Moreno, J. E. (2025). Discovery of arbuscular mycorrhizae in mosses of the Pottiaceae family from the Chaco Serrano (Tucumán, Argentina). *Plants*, 14(7), 1048. <https://doi.org/10.3390/plants1407104>

3. Rausch, A. O., Tolopka, J. I., **Ledesma, T. M.**, Li, L., Wang, S., Dong, S., Liu, Y., Arce, A. L., & Moreno, J. E. (2026). *Plant transcription factors. Methods and protocols*. Springer Science+Business Media, LLC.

Índice

Agradecimientos.....	2
Aportes Científico-Tecnológicos.....	3
Índice.....	4
Abreviaturas y símbolos.....	7
Resumen.....	13
Introducción.....	17
Introducción General: La conquista del ambiente terrestre.....	17
Diversidad de interacciones planta–hongo.....	19
Evolución de las vías moleculares de la simbiosis.....	22
Briofitas como modelos para estudiar simbiosis.....	28
<i>Marchantia polymorpha</i> como hepática modelo.....	31
El rol de hongos del suelo en la disponibilidad de fósforo.....	33
Endofitos Mucoromycotina de raíces finas en la nutrición vegetal.....	35
Objetivos generales.....	38
Objetivos específicos.....	38
Capítulo 1: Comunidades fúngicas endofíticas y sus rasgos asociados al fósforo en <i>Marchantia polymorpha</i> a lo largo de un gradiente de disturbio antrópico.....	40
Introducción.....	40
Objetivos.....	42
Objetivo general.....	42
Objetivos específicos.....	42
Materiales y métodos.....	42
Muestreo de plantas y sitios de colección.....	42
Determinación molecular de especies y subespecies de <i>Marchantia</i> sp.....	43
Esterilización superficial, ensayo de impresión, aislamiento de endófitos fúngicos y bancos de muestreo.....	44
Análisis de suelo.....	45

Identificación de aislamientos fúngicos a partir de cultivos puros.....	45
Extracción de ADN total de plantas de <i>M. polymorpha</i> y análisis de metabarcoding.....	45
Mediciones de mineralización y solubilización de fósforo (P).....	46
Actividad de fosfatasas extracelulares.....	47
Análisis estadístico.....	48
Resultados.....	49
Comunidades fúngicas endofíticas asociadas a niveles de antropización.....	49
Caracterización fisicoquímica del suelo en cada sitio de muestreo.....	54
Caracterización de la capacidad de mineralización y solubilización de fósforo para cada aislamiento fúngico.....	55
Discusión.....	59
Capítulo 2: Endofitos Mucoromycotina de raíces finas en <i>Marchantia polymorpha</i> : evidencia de asociaciones fúngicas en una hepática no hospedadora de micorrizas arbusculares.....	65
Introducción.....	65
Objetivos.....	66
Objetivo general.....	66
Objetivos específicos.....	66
Materiales y métodos.....	67
Cultivo axénico de <i>M. polymorpha</i> Tak-1 y cultivo del MFRE.....	67
Ensayos de infección con el MFRE.....	67
Ensayos de infección en condiciones de hambreado.....	68
Tinción de tejidos infectados para visualización de MFRE.....	68
Generación de plantas transgénicas usando CRISPR/Cas9.....	69
Experimento de RNAseq y su análisis bioinformático.....	70
Extracción de ARN y retrotranscripción para ensayos de qRT-PCR.....	71

Experimentos de hambreado nutricional en <i>Marchantia paleacea</i> y <i>Solanum lycopersicum</i>	71
Resultados.....	72
Resíntesis experimental revela interacciones distintas entre <i>M. polymorpha</i> y hongos Mucoromycotina.....	72
<i>M. hiemalis</i> promueve el crecimiento de <i>M. polymorpha</i> condicionado por la disponibilidad de nutrientes.....	75
Rearreglo transcripcional en respuesta a la infección por <i>M. hiemalis</i>	80
Identificación y caracterización funcional de MpbHLH4, un regulador negativo de la rizoidogénesis inducida por MFRE.....	81
MpRBOH2 es necesaria para la simbiosis con <i>M. hiemalis</i> bajo condiciones de deficiencia nutricional.....	85
<i>M. hiemalis</i> promueve el crecimiento en linajes de plantas con una CSSP funcional.....	89
Discusión.....	93
Conclusión.....	98
Bibliografía.....	103
Anexo.....	121

Abreviaturas y símbolos

°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
μmol m ⁻² s ⁻¹	Micromoles por metro cuadrado por segundo
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMT	Transportadores de amonio
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg / gARN	ARN guía
ARNm	ARN mensajero
Asc	Ascomycota
ASVs	Variantes de secuencia de amplicón
ATP	Adenosín trifosfato
Bas	Basidiomycota
bHLH	Factores de transcripción hélice–bucle–hélice básicos
bp	Pares de bases
Cas9	Endonucleasa asociada a CRISPR 9
CCaMK	Quinasa dependiente de calcio y calmodulina
CE	Conductividad eléctrica
Chyt	Chytridiomycota
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado

COs	Quitooligosacáridos
CRISPR/Cas9	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas / proteína asociada a CRISPR 9
CSSP	Vía común de señalización simbiótica
Ct	Ciclo umbral de qRT-PCR
CYCLOPS	Factor de transcripción Cyclops
DADA2	Algoritmo de inferencia de variantes de secuencia de amplicones
DEG	Gen diferencialmente expresado
dpi	Día post infección
DSE	Endofitos septados oscuros
dS/m	Decisiemens por metro
FUNGuild	Herramienta bioinformática para la asignación funcional de hongos en base a gremios ecológicos
g	Gramos
g/kg	Gramos por kilogramo
GC	Contenido de guanina–citosina
GO	Ontología génica
h	Horas
HMA	Hongos micorrízicos arbusculares
ITS	Espaciador transcritpo interno
JA	Ácido jasmónico
JAZ	Represores de la señalización de ácido jasmónico
K	Potasio

L	Litros
LCOs	Lipoquitooligosacáridos
log ₁₀	Logaritmo en base 10
log ₂ FC	Logaritmo en base 2 del cambio de expresión
LysM	Quinasas tipo receptor que contienen dominios lisina
<i>M. circinelloides</i>	<i>Mucor circinelloides</i>
<i>M. hiemalis</i>	<i>Mucor hiemalis</i>
<i>M. paleacea</i>	<i>Marchantia paleacea</i>
<i>M. polymorpha</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>
Mb	Megabases
McMhEF1a	Gen marcador de biomasa fúngica del gen <i>ELONGATION FACTOR 1a</i>
MFRE	Endofitos Mucoromycotina de raíces finas
mg	Miligramos
mg/kg	Miligramos por kilogramo
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minutos
ml	Mililitros
mmol	Milimol
Mp	Prefijo que indica <i>Marchantia polymorpha</i>
MpbHLH4	Factor de transcripción tipo bHLH de <i>Marchantia polymorpha</i>
Mpbhlh4	Mutante de MpbHLH4

MpJAZ	<i>Marchantia polymorpha</i> proteína con dominio ZIM regulada por jasmonatos (<i>Jasmonate ZIM-domain</i>)
MpMYB14	Factor de transcripción tipo MYB de <i>Marchantia polymorpha</i> asociado a respuestas de defensa
MpPBLa	Gen de <i>Marchantia polymorpha</i> que codifica la quinasa tipo PBLa
Mppbla	Mutante de MpPBLa
MpPR1	<i>Marchantia polymorpha</i> proteína relacionada con la patogénesis 1 (<i>Pathogenesis-Related protein 1</i>)
MpPR4	Proteína relacionada con patogénesis 4 (<i>Pathogenesis-Related protein 4</i>) de <i>Marchantia polymorpha</i>
MpPR6a	Proteína relacionada con patogénesis 6a (<i>Pathogenesis-Related protein 6a</i>) de <i>Marchantia polymorpha</i>
MpRBOH1	Gen de <i>Marchantia polymorpha</i> que codifica una oxidasa NADPH tipo RBOH1
Mprboh1	Mutante de MpRBOH1
MpRBOH2	Gen de <i>Marchantia polymorpha</i> que codifica una oxidasa NADPH tipo RBOH2
Mprboh2	Mutante de MpRBOH2
MpWRKY3	Factor de transcripción tipo WRKY de <i>Marchantia polymorpha</i> involucrado en defensa
mRNA	ARN mensajero
Muc	Mucoromycota
Myc-LCOs	Lipoquitooligosacáridos micorrízicos
N	Nitrógeno

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NGS	Secuenciación de nueva generación
Olpid	Olpidiomyota
OTU	Unidades taxonómicas operacionales
P	Fósforo
p	Valor de significancia estadística
P-Olsen	Fósforo extraíble determinado por el método de Olsen
PAM	Motivo adyacente al protospacer
PBL	Quinasas tipo receptor asociada a la familia receptor-like cytoplasmic kinases (RLCKs) of the AVRPPHB SUSCEPTIBLE 1 (PBS1)-like (PBL)
PBLa	Quinasa tipo receptor asociada a la familia PBL tipo a
PBL–RBOH	Módulo de señalización PBL–RBOH
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
pH	Potencial de hidrógeno
PHT1	Transportadores de fosfato de alta afinidad
PNP	p-nitrofenilfosfato
PR	Proteínas relacionadas con patogénesis
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PSF	Hongos solubilizadores de fosfato
PTI	Inmunidad disparada por patrones

Q30	Umbral de calidad de secuenciación correspondiente a un valor Phred ≥ 30
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real de reacción de retrotranscripción
RAD1	Factor de transcripción RAD1 (<i>REQUIRED FOR ARBUSCULE DEVELOPMENT</i>)
RBK	Quinasas relacionadas con RLCK tipo RBK
RBOH	Oxidasa NADPH respiratoria
RIN	Número de integridad del ARN
RNA-seq	Secuenciación de ARN
RNS	Simbiosis fijadora de nitrógeno en nódulos radiculares
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
S1, S2, S3	Sitios de muestreo 1, 2 y 3
SA	Ácido salicílico
SL	Estrigolactonas
SYMRK	Quinasa tipo receptor de simbiosis
Tak-1	Línea silvestre de referencia de <i>Marchantia polymorpha</i>
TSM	Medio selectivo para Trichoderma
UE	Unidad enzimática
UV	Luz ultravioleta
WT	Tipo salvaje

Resumen

Las interacciones simbióticas entre plantas y hongos han sido centrales para la terrenalización de las plantas. Tradicionalmente, la vía común de señalización simbiótica (CSSP, del inglés Common Symbiosis Signaling Pathway) fue considerada un requisito para el establecimiento de mutualismos entre plantas y hongos, sin embargo, se conoce poco acerca de cómo plantas que carecen de una CSSP funcional interactúan con hongos endofíticos y si estas interacciones pueden ser funcionalmente beneficiosas. El objetivo de esta tesis fue aislar e identificar hongos endofíticos de plantas salvajes de *Marchantia polymorpha* sp. *polymorpha*, una especie que carece de una CSSP funcional, con el propósito de evaluar su capacidad para establecer una relación simbiótica con esta planta hepática. Los resultados del Capítulo 1 revelaron que *M. polymorpha* alberga un consorcio diverso de endofitos fúngicos, cuya composición varía según el ambiente y las condiciones edáficas. Entre los endofitos fúngicos se identificaron recurrentemente hongos del género *Mucor*, conocidos como endofitos Mucoromycotina de raíces finas (MFRE), con características metabólicas propias de hongos mineralizadores. Para el Capítulo 2 establecimos un sistema axénico entre *Marchantia polymorpha* Tak-1 y *M. hiemalis*. Estos ensayos de infección nos permitieron demostrar que *M. hiemalis* establece una interacción intracelular estable y no patogénica con *M. polymorpha*, sin inducir una activación exacerbada de respuestas de defensa. Las hifas intracelulares de *M. hiemalis* forman unos ensanchamientos terminales que podrían constituir los sitios de intercambio con la célula vegetal, de forma análoga a los arbuscúlos de hongos micorrízicos. Bajo condiciones de hambreado nutricional esta asociación mejora el crecimiento y desarrollo de rizoides. Estos resultados demuestran que una interacción fúngica intracelular, estable y beneficiosa puede establecerse en ausencia completa de una CSSP funcional.

El módulo PBLa-RBOH1/2 controla la producción de ROS para modular la fase inicial de la interacción con micorrizas arbusculares en plantas con una CSSP funcional. Nuestros resultados usando mutantes de *M. polymorpha* muestran que el MFRE necesita de MpRBOH2 para inducir más rizoides en plantas infectadas, mientras que MpPBLa modula la magnitud de esa respuesta. Este patrón apunta a una conservación evolutiva de estos elementos para las interacciones con MFRE y HMA y muestra que estas vías comparten algunos elementos fundamentales. El análisis transcriptómico de plantas infectadas con *M. hiemalis* permitió identificar al factor de transcripción MpbHLH4 como uno de los genes inducidos durante la infección. El mutante *Mpbhlh4*, bajo condiciones de hambreado, desarrolla más rizoides exclusivamente en presencia de MFRE, sin otras consecuencias para el área del talo o el área de rizoides. En plantas salvajes Tak-1, en condiciones de

hambreando, el MFRE dispara la formación de rizoides dependiente de MpRBOH2, mientras induce la expresión de MpbHLH4 para contener la iniciación exagerada de rizoides. En este contexto, MpbHLH4 emerge como un regulador negativo clave que integra señales fúngicas y nutricionales para modular el programa de desarrollo de rizoides. En conjunto, nuestros datos apoyan un modelo en el cual la señalización dependiente de MpRBOH2 promueve la iniciación de rizoides en respuesta al MFRE, mientras que MpbHLH4 limita esta respuesta, asegurando un desarrollo controlado.

También demostramos que el MFRE puede establecer asociaciones compatibles y promotoras del crecimiento con plantas que tienen una CSSP funcional como la hepática *M. paleacea* y la planta vascular *Solanum lycopersicum*. Este resultado sugiere la existencia de una nueva vía simbiótica para los MFRE conservada en plantas terrestres.

En conjunto, los resultados de esta tesis indican que *M. polymorpha* es capaz de establecer interacciones funcionales con endofitos fúngicos del tipo MFRE a través de mecanismos independientes de la CSSP. Estas asociaciones podrían representar un estado ancestral de las interacciones planta–hongo, previo a la especialización de micorrizas arbusculares, y aportan un nuevo marco conceptual para comprender la diversidad y evolución de las simbiosis en plantas terrestres.

Abstract

Symbiotic interactions between plants and fungi have been central to the terrestrialization of plants. Traditionally, the Common Symbiosis Signaling Pathway (CSSP) was considered a requirement for the establishment of plant–fungus mutualisms; however, little is known about how plants lacking a functional CSSP interact with endophytic fungi and whether these interactions can be functionally beneficial. The aim of this thesis was to isolate and identify endophytic fungi from wild plants of *Marchantia polymorpha* sp. *polymorpha*, a species that lacks a functional CSSP, in order to evaluate their ability to establish a symbiotic relationship with this liverwort. The results of Chapter 1 revealed that *M. polymorpha* harbors a diverse consortium of fungal endophytes, whose composition varies depending on the anthropization degree and soil conditions. Among these endophytes, fungi of the genus *Mucor* were recurrently identified, known as Mucoromycotina fine root endophytes (MFRE), with metabolic traits characteristic of mineralizing fungi. For Chapter 2, we established an axenic system between *M. polymorpha* Tak-1 and *Mucor hiemalis*. These assays demonstrated that *M. hiemalis* forms a stable, non-pathogenic intracellular interaction with the plant, triggering a controlled activation of defense responses. The intracellular hyphae of *M. hiemalis* form terminal swellings that may be the sites of metabolic exchange with the plant cell, analogous to the arbuscules of mycorrhizal fungi. Under nutrient starvation conditions, this association enhances growth and number of rhizoids. These results demonstrate that a stable and beneficial intracellular fungal interaction can be established in plants lacking a functional CSSP.

The PBLa–RBOH1/2 module controls ROS production to modulate the early phase of the interaction with arbuscular mycorrhizae in plants with a functional CSSP. Our results using *M. polymorpha* mutants show that MFRE requires MpRBOH2 to enhance rhizoid formation in infected plants, while MpPBLa modulates the magnitude of this response. This pattern shows that MFRE and HMA symbiosis signaling pathways share some fundamental components. Transcriptomic analysis of plants infected with *M. hiemalis* identified the strong induction of the transcription factor MpbHLH4 gene upon infection. Under starvation conditions, the Mpbhlh4 mutant develops more rhizoids exclusively in the presence of MFRE, with no other effects on thallus area or rhizoid area. In Tak-1 plants under starvation, MFRE triggers MpRBOH2-dependent rhizoid formation while also inducing MpbHLH4 expression to restrain excessive rhizoid initiation. In this context, MpbHLH4 emerges as a key negative regulator integrating fungal and nutritional signals to modulate the rhizoid developmental program.

Altogether, our data support a model in which MpRBOH2-dependent signaling promotes rhizoid initiation in response to MFRE, while MpbHLH4 limits this response to ensure controlled development.

We also demonstrated that MFRE can establish compatible, growth-promoting associations with plants that possess a functional CSSP, such as the liverwort *M. paleacea* and the vascular plant *Solanum lycopersicum*. This finding suggests the existence of a novel symbiotic pathway for MFRE that is conserved across land plants.

Overall, the results of this thesis indicate that *M. polymorpha* is capable of establishing functional interactions with MFRE-type fungal endophytes through CSSP-independent mechanisms. These associations may represent an ancestral state of plant–fungus interactions, predating the specialization of arbuscular mycorrhizae, and provide a new conceptual framework for understanding the diversity and evolution of symbioses in land plants.

Introducción:

Introducción General: La conquista del ambiente terrestre

La transición de las plantas desde ambientes acuáticos hacia el medio terrestre constituye uno de los eventos más trascendentales en la historia evolutiva de la vida. Este proceso, ocurrido hace aproximadamente 450 millones de años, implicó la adquisición de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que permitieron a las primeras embriofitas enfrentar condiciones ambientales extremas, tales como la desecación, la elevada radiación UV, las fluctuaciones térmicas y la escasa disponibilidad de nutrientes en parches en los suelos primitivos (Delwiche & Cooper, 2015; Puginier et al., 2022). Un aspecto central de esta transición fue el establecimiento temprano de interacciones íntimas con hongos del suelo. La evidencia fósil del Chert de Rhynie, datada en más de 407 millones de años, revela estructuras intracelulares que recuerdan notablemente a los arbuscúlos de micorrizas actuales, lo que sugiere que las primeras plantas terrestres pueden haber dependido de simbiosis fúngicas para su nutrición mineral (Remy et al., 1994; Taylor et al., 1995; Strullu-Derrien et al., 2014).

La hipótesis clásica propuesta por Pirozynski & Malloch (1975), según la cual la conquista de las plantas del ambiente terrestre fue posible gracias a la micotrofia, ha sido ampliamente respaldada por diferentes líneas de investigación. Análisis filogenómicos indican que la diversificación de numerosos linajes fúngicos coincidió temporalmente con la radiación de las primeras plantas terrestres, apoyando un modelo de coevolución que favoreció la adquisición de nutrientes en suelos incipientes y oligotróficos (Lutzoni et al., 2018). Este marco conceptual posiciona a las simbiosis hongo-planta como motores evolutivos fundamentales, capaces de permitir la terrestreización de nuevos nichos ecológicos mediante la provisión de fósforo, nitrógeno y otros nutrientes limitantes, particularmente en ambientes terrestres donde suelen tener un fuerte heterogeneidad (Puginier et al., 2022).

La evidencia fósil y molecular converge en demostrar que la simbiosis no fue un atributo adquirido tardíamente por las plantas terrestres, sino un rasgo profundo y ancestral que antecede incluso a la evolución de órganos especializados como raíces y hojas (Delaux et al., 2015; Du et al., 2019). Los fósiles del Chert de Rhynie muestran hifas fúngicas penetrando células vegetales y formando redes intracelulares comparables a estructuras simbióticas modernas (Strullu-Derrien et al., 2014). Paralelamente, los análisis de relojes moleculares realizados por Heckman et al. (2001) y más recientemente Szánthó et al. (2025) indican que los hongos terrestres surgieron millones de años antes que las embriofitas,

ofreciendo un contexto ecológico propicio para la emergencia de interacciones simbióticas antes de la diversificación de las plantas terrestres. Estos resultados se complementan con descubrimientos de genes asociados a la vía común de señalización de la simbiosis (CSSP) en algas carofitas (estrechamente relacionadas con las embriofitas) y briofitas, lo que demuestra que la maquinaria molecular necesaria para el establecimiento de simbiosis intracelulares evolucionó antes de la terrestreización terrestre (Delaux et al., 2012; Radhakrishnan et al., 2020). De este modo, la presencia de receptores, canales nucleares y factores de transcripción conservados sugiere la existencia de programas ancestrales de las plantas que fueron co-optados para facilitar el establecimiento de interacciones íntimas con microorganismos.

El impacto de las simbiosis planta–hongo sobre la evolución y ecología de las plantas terrestres ha sido profundo y duradero. La mejora en la adquisición de nutrientes minerales, especialmente fósforo y nitrógeno, permitió a las plantas expandirse hacia ambientes diversos, sortear limitaciones edáficas y reducir los costos metabólicos asociados a la exploración del suelo (Bennett & Groten, 2022; van der Heijden et al., 2015). Los hongos micorrízicos, particularmente los Glomeromycotina (*Phylum* Mucoromycota; *Subphylum* Glomeromycotina), han desempeñado un papel protagónico al incrementar la absorción de fósforo mediante la expansión de la zona de exploración del suelo más allá del alcance físico de las raíces. Sin embargo, investigaciones recientes han ampliado sustancialmente este paradigma, mostrando que otros linajes fúngicos, como los Mucoromycotina (*Phylum* et al 2015Mucoromycota; *Subphylum* Mucoromycotina), también formaron asociaciones con varios linajes de plantas y podrían haber tenido un rol crucial en su nutrición (Field et al., 2015a; Spatafora et al., 2016., Szánthó et al., 2025). Estos resultados reconfiguran la visión clásica de las simbiosis, mostrando que las primeras plantas podrían haber interactuado simultáneamente con diversos grupos de hongos, generando redes simbióticas complejas y dinámicas. Además de su impacto en la nutrición de las plantas, los hongos simbiotes y, en particular los hongos micorrízicos, contribuyen a la regulación del desarrollo vegetal, a la modulación del metabolismo secundario, a la tolerancia al estrés abiótico y a la defensa frente a patógenos y herbívoros (Delaeter et al., 2024; Storb et al., 2025; Weng et al., 2022). Desde esta perspectiva, las simbiosis deben entenderse no sólo como un mecanismo de resiliencia nutricional, sino también como interacciones ecológicas integrales que han moldearon la historia evolutiva de las plantas terrestres (Shi et al., 2023).

En el actual contexto marcado por la intensificación agrícola, la alteración de los ciclos biogeoquímicos, el cambio climático y la degradación de suelos, comprender el funcionamiento y la diversidad de las simbiosis planta–hongo adquiere una relevancia renovada. Los hongos responden de manera sensible a cambios en la disponibilidad de

nutrientes, lo que puede modificar tanto su comunidad como su funcionalidad, afectando la nutrición vegetal y la estabilidad de los ecosistemas (Rousk et al., 2011; van der Heijden et al., 1998). Esto es especialmente relevante en linajes como las briofitas, un linaje hermano al de las traqueofitas, cuyas interacciones simbióticas conservan rasgos ancestrales y ofrecen un modelo único para reconstruir los procesos evolutivos que dieron origen a las asociaciones intracelulares. El estudio de estas plantas permite identificar mecanismos profundamente conservados que posibilitaron la expansión de las plantas terrestres y que continúan siendo esenciales para su funcionamiento en ecosistemas actuales.

Diversidad de interacciones planta–hongo

La simbiosis entre plantas y hongos ha constituido uno de los pilares fundamentales de la terrestreización. Desde una perspectiva evolutiva, las asociaciones simbióticas no surgieron como innovaciones secundarias dentro de las plantas vasculares, sino como mecanismos profundamente ancestrales que acompañaron a las primeras embriofitas desde su transición fuera del agua. La hipótesis de que los hongos desempeñaron un papel determinante en la conquista terrestre, planteada inicialmente por Pirozynski & Malloch (1975), ha sido posteriormente corroborada por múltiples líneas de evidencia fósil, morfológica, fisiológica y molecular (Lutzoni et al., 2018; Puginier et al., 2022; Redecker et al., 2000; Wang & Qiu, 2006). Esta confluencia de estudios establece que la simbiosis no fue un componente accesorio, sino un rasgo esencial que permitió a las plantas superar las severas limitaciones edáficas de los suelos paleozoicos, definidos por su inmadurez, oligotrofia y baja capacidad de retención de nutrientes (Dahl & Arens, 2020; Retallack, 2000).

Durante el Devónico temprano (Figura 1A-B), las primeras plantas terrestres carecían de raíces verdaderas, tejidos complejos de conducción y sistemas extensos de absorción. En este contexto, los hongos ofrecieron una solución biológica clave al suplir funciones que las plantas no habían desarrollado aún. La evidencia paleobotánica del Chert de Rhynie (Escocia), una de las ventanas fósiles más completas del Devónico, demuestra que las plantas terrestres primitivas establecen asociaciones íntimas con hongos altamente ramificados dentro de sus tejidos corticales (Figura 1C) (Remy et al., 1994; Strullu-Derrien et al., 2014). La morfología de esas estructuras fúngicas intracelulares recuerda la de los actuales arbuscúlos de las micorrizas fúngicas, unas estructuras en las que ocurre el intercambio directo de nutrientes con el hospedador. Este paralelismo indica que la biología simbiótica posee una profunda continuidad evolutiva desde los orígenes de las plantas terrestres hasta la actualidad.

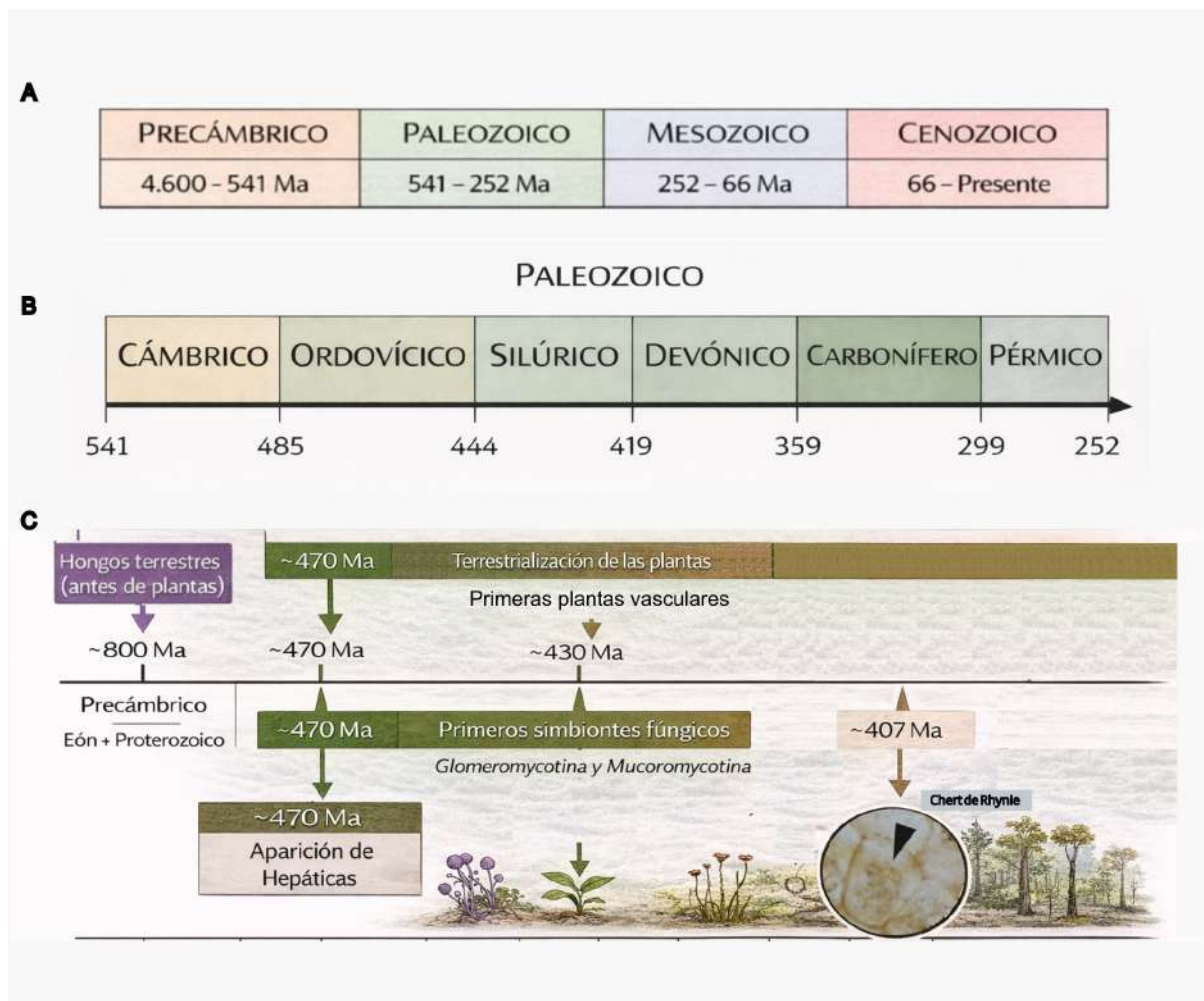


Figura 1. Marco temporal de la terrestreización y de las interacciones tempranas planta–hongo. A) Eras geológicas y su duración aproximada. B) Períodos del Paleozoico. C) Principales hitos evolutivos relacionados con la presencia temprana de hongos terrestres, la aparición de las primeras plantas y la evidencia fósil de asociaciones simbióticas durante el Devónico temprano, incluyendo registros del Chert de Rhynie.

Además de la evidencia fósil, estudios filogenómicos han revelado que múltiples linajes de hongos experimentaron radiaciones casi simultáneas con la diversificación temprana de las plantas terrestres (Delaux & Schornack, 2021; Lutzoni et al, 2018., Szánthó et al., 2025). Los análisis filogenéticos presentados por Szánthó et al. (2025) indican que varios linajes fúngicos presentes en interacciones simbióticas con plantas terrestres ya estaban diversificados en ambientes continentales antes de la terrestreización de las plantas (Figura 1C). Este patrón sugiere una coevolución temprana, donde la expansión de las plantas en tierra firme promovió el surgimiento de nichos edáficos nuevos y con poca competencia para los hongos, mientras que la presencia de hongos facilitó el establecimiento vegetal en un

ambiente desfavorable. En este sentido, los análisis de relojes moleculares indican que los hongos terrestres antecedieron a las plantas por decenas de millones de años, proporcionando un sistema edáfico dominado por comunidades metabólicamente activas antes de la llegada de las primeras embriofitas (Heckman et al., 2001; Szánthó et al., 2025). Además, Szánthó et al. (2025) proponen que estos primeros ecosistemas terrestres, dominados por hongos, desempeñaron un papel importante en la transformación geoquímica del sustrato, favoreciendo el reciclaje de nutrientes, la movilización de fósforo y nitrógeno y la generación de microambientes más favorables para la vida vegetal. Esta secuencia temporal resulta crucial, ya que posiciona a los hongos como organismos pioneros capaces de modificar químicamente el sustrato, reciclar nutrientes y aumentar la disponibilidad de fósforo y nitrógeno, procesos decisivos que permitieron la vida vegetal.

Otro avance decisivo proviene de la genómica comparada. La identificación de componentes de la vía común de señalización de la simbiosis en briofitas e incluso en algas charofitas (Delaux et al., 2012; Delaux et al., 2015) relacionadas con las embriofitas, demuestra que la maquinaria genética necesaria para reconocer señales fúngicas es mucho más antigua que la aparición de las raíces o los tejidos vasculares (Delaux et al., 2012; Radhakrishnan et al., 2020). La conservación de receptores de quitina, canales nucleares y factores de transcripción a lo largo de cientos de millones de años en diferentes linajes de plantas sugiere que la simbiosis formó parte del repertorio molecular básico de las plantas desde sus inicios (Clear & Hom, 2019). Estos mecanismos conservados refuerzan la idea de que la simbiosis fue una innovación crítica en la historia evolutiva de las plantas.

Las micorrizas arbusculares son hongos del *subphylum* Glomeromycotina que han sido consideradas como el mutualismo predominante durante la terrestreización. Sin embargo, investigaciones recientes demostraron la presencia de otros grupos fúngicos como los Mucoromycotina en *Haplomitrium* sp., un linaje hermano de todas las hepáticas, sugiriendo que esta asociación podría haber antecedido a las micorrizas arbusculares o, al menos, jugado un rol igual de importante que el de las micorrizas arbusculares (Field et al., 2015b; Humphreys et al., 2010; Orchard et al., 2017; Spatafora et al., 2016). Los llamados Endofitos Mucoromycotina de raíces finas (MFRE del inglés *Mucoromycotina Fine Root Endophytes*) se encuentran ampliamente distribuidos tanto en plantas vasculares como en briofitas, y ya existen los primeros estudios demostrando su capacidad de proveer fósforo, nitrógeno y carbono en interacciones mutualistas funcionales (Field et al., 2015a; Hoysted et al., 2023), mejorando parámetros de crecimiento y fotosíntesis de la planta (Humphreys et al., 2010). A esto se suma un número creciente de registros de plantas co-infectadas (Hoysted et al., 2019) por micorrizas arbusculares y MFRE (Della Monica et al., 2015), o infectadas con uno u otro pero siempre en plantas que tienen intacta la vía CSSP. Este hallazgo plantea que la

asociación ancestral entre plantas y hongos fue, desde sus orígenes, más diversa y ecológicamente versátil de lo que se pensaba. Lejos de ser un sistema basado en un único tipo de hongo simbiote, la conquista terrestre puede haber involucrado redes complejas de hongos pertenecientes a distintos linajes, cada uno aportando funciones complementarias para la supervivencia vegetal en un ambiente hostil y en constante transformación. Y, aún más importante, estos resultados sugerían que las asociaciones con micorrizas arbusculares y con MFRE dependían en ambos casos de una CSSP funcional en la planta hospedera.

En conjunto, toda esta evidencia —fósil, molecular, fisiológica y ecológica— describe un proceso de terrestalización profundamente asociado a la simbiosis con hongos, que aportaron capacidades metabólicas esenciales para enfrentar un ambiente desafiante. Este marco conceptual redefine la visión clásica de la evolución vegetal: la vida terrestre no emergió como una innovación puramente autónoma de las plantas, sino como el resultado de asociaciones íntimas y metabólicamente integradas con hongos. Por ello, comprender las simbiosis ancestrales no sólo permite reconstruir la historia profunda de las plantas terrestres, sino también interpretar la diversidad actual de estrategias simbióticas presentes en linajes como las briofitas.

Evolución de las vías moleculares de la simbiosis

Este tipo de interacciones entre plantas y hongos representan uno de los fenómenos más antiguos, influyentes y determinantes en la evolución de la vida terrestre. La simbiosis no surgió como un episodio marginal dentro de la historia de las plantas, sino como una condición estructural, profundamente integrada en la biología de las primeras embriofitas. En las últimas décadas, avanzamos en la comprensión de estas interacciones gracias al análisis combinado de fisiología, genética, biología molecular y evolución comparada. Estas nuevas perspectivas revelan que la terrestalización de las plantas no sólo se sustentó en la presencia de simbiontes fúngicos Glomeromycotina y Mucoromycotina, sino también en la evolución temprana de mecanismos moleculares altamente conservados, entre los cuales se destaca la CSSP y, por qué no, otras vías de señalización simbióticas aún no descritas.

A nivel evolutivo, pero sobre todo por su impacto en cultivos de importancia económica, los hongos Glomeromycotina han sido los más estudiados y considerados los principales simbiontes de las plantas, debido a su capacidad de formar micorrizas arbusculares. Estas asociaciones se caracterizan por la formación de arbusculos intracelulares altamente ramificados, donde ocurre el intercambio de nutrientes: el hongo transfiere mayormente fósforo y nitrógeno, mientras que la planta provee carbono en forma de azúcares y lípidos (Luginbuehl et al., 2017; Rich et al., 2021). La presencia de estructuras compatibles con

micorrizas arbusculares en fósiles devónicos, así como su presencia en más del 80% de las plantas terrestres, demuestra que este mutualismo ha sido un motor fundamental en la expansión vegetal (Smith & Read, 2010). Sin embargo, esta visión tradicional se ha ampliado gracias al descubrimiento en briofitas de relaciones íntimas y funcionales con hongos Mucoromycotina, especialmente los denominados MFRE.

Los MFRE fueron durante mucho tiempo considerados hongos Glomeromycotina, debido a la presencia de hifas finas y estructuras intracelulares simples. No obstante, estudios genómicos demostraron que forman un linaje independiente (*Phylum* Mucoromycota; Subphylum Mucoromycotina) (Spatafora et al., 2016). A diferencia de Glomeromycotina, que poseen un modo especializado de transferencia de fósforo, los MFRE muestran una mayor versatilidad funcional, contribuyendo de manera significativa al suministro tanto de fósforo como de nitrógeno orgánico e inorgánico (Field et al., 2019). Esta capacidad los posiciona como simbioses particularmente importantes en ambientes oligotróficos, donde las limitaciones edáficas hacen imprescindible la obtención eficiente de nutrientes. De hecho, estudios funcionales revelaron que los MFRE pueden establecer mutualismos intracelulares incluso en condiciones monoaxénicas, confirmando que no dependen de comunidades microbianas complejas para sostener interacciones nutricionales activas (Field et al., 2019).

La coexistencia de Glomeromycotina y Mucoromycotina (Figura 2) en embriofitas sugiere que las interacciones planta–hongo en el Paleozoico constituyeron una red simbiótica diversa y dinámica, y no una relación exclusiva con un único grupo fúngico. En linajes de hepáticas como Haplomitriopsida, se ha demostrado experimentalmente que los MFRE participan en la adquisición de nutrientes como lo hacen los Glomeromycotina (Field et al., 2015a). Esta evidencia modifica la narrativa evolutiva: en lugar de un mutualismo único, el antecesor de la embriofitas pudo haber interactuado simultáneamente con múltiples hongos que aportaban funciones diferentes y complementarias. Esa diversidad funcional pudo aportar resiliencia metabólica en suelos extremadamente pobres en nutrientes, condición típica del Paleozoico temprano (Dahl & Arens, 2020; Retallack, 2000).

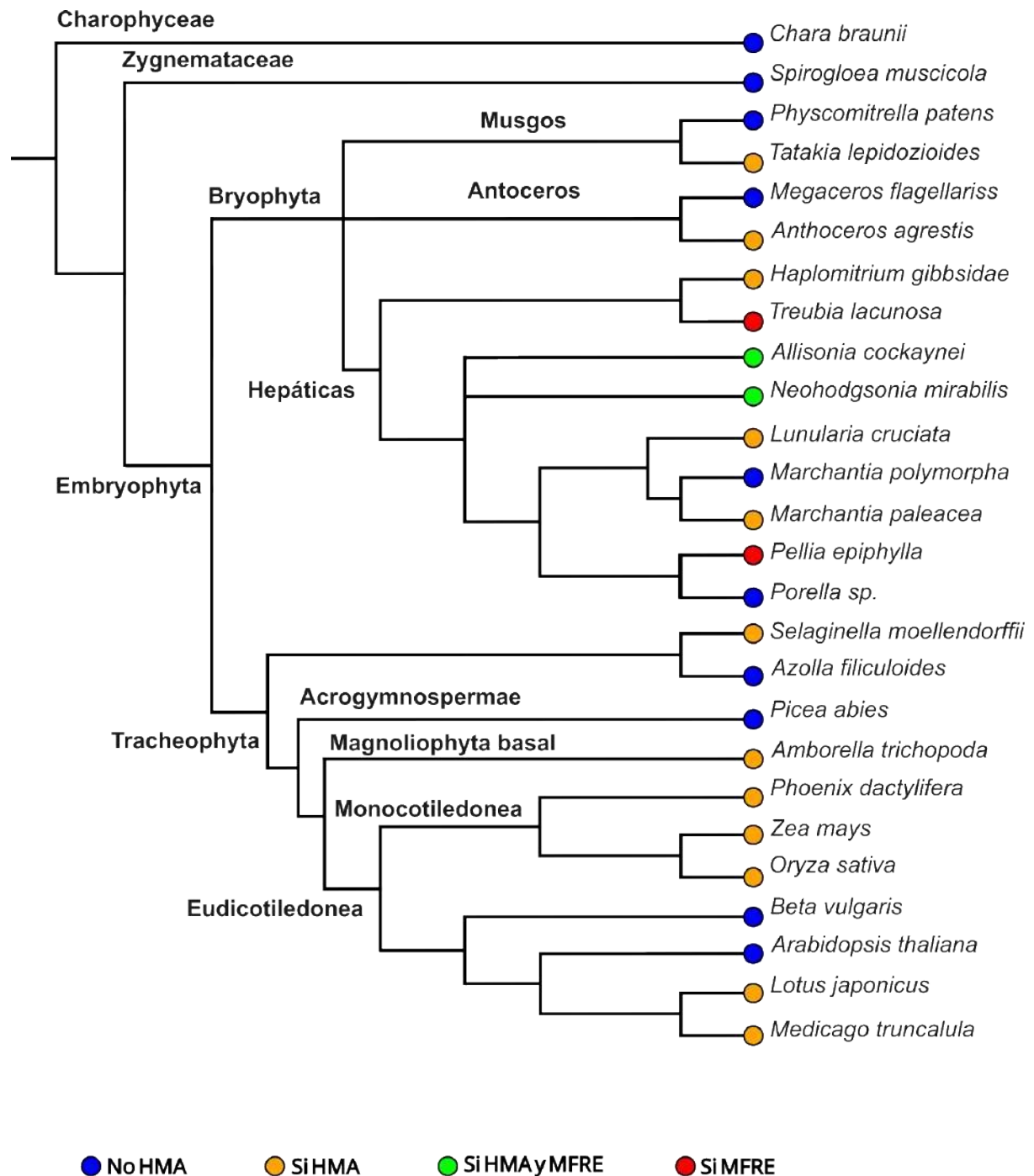


Figura 2. Árbol filogenético esquemático de las asociaciones con micorrizas arbusculares y hongos endofíticos de Mucoromycotina (MFRE). *M. polymorpha* era considerada una especie no hospedadora de micorrizas arbusculares, sin registros de MFRE. Los puntos de color en las puntas de las ramas indican el estado de asociación de cada taxón: azul, especies no hospedadoras de micorrizas arbusculares (HMA); naranja, especies hospedadoras de micorrizas arbusculares; verde, especies hospedadoras tanto de micorrizas arbusculares como de hongos endofitos Mucoromycotina de raíces finas (MFRE); rojo, especies hospedadoras de MFRE. La clasificación de los principales clados taxonómicos se indica sobre las ramas del árbol. La topología filogenética utilizada corresponde a una síntesis de filogenias publicadas para plantas terrestres y algas verdes, incluyendo

estudios filogenómicos recientes (Bidartondo et al., 2011; Field et al., 2015a; Field et al., 2016; Field et al., 2019; Rimington et al., 2019; Sgroi, 2021; Romani et al., 2022).

La clave para comprender cómo las plantas pudieron interactuar con hongos tan diversos reside en la existencia de vías moleculares conservadas, que permiten la percepción, transducción y respuesta a señales fúngicas. Dado que las interacciones micorrízicas ocurren en más del 80% de las plantas terrestres, incluyendo numerosos cultivos de importancia agronómica, la CSSP constituye la vía molecular mejor estudiada. Estudios filogenómicos y funcionales han demostrado que varios de sus componentes centrales—incluyendo receptores de señales fúngicas, canales de calcio asociados a la envoltura nuclear, quinasas dependientes de Ca^{2+} y factores de transcripción— estaban ya presentes en las primeras embriofitas, y algunos de ellos incluso en linajes de algas estreptofitas, lo que respalda un origen evolutivamente antiguo de esta vía (Delaux et al., 2012; Radhakrishnan et al., 2020).

La activación de la CSSP ocurre preferentemente bajo condiciones nutricionales limitantes, en particular deficiencia de fósforo o nitrógeno. En este contexto, la planta incrementa la secreción de estrigolactonas a la rizosfera (Kodama et al., 2022), atrayendo al hongo micorrízico y facilitando el intercambio de señales (Kodama et al., 2022; López-Ráez et al., 2009; Oldroyd, 2013a). La vía CSSP se inicia con la percepción de moléculas fúngicas derivadas mayoritariamente de la pared celular, rica en quitina. Entre estas señales se encuentran los lipoquitooligosacáridos micorrízicos (Myc-LCOs) y los quitooligosacáridos (COs), que son reconocidos por complejos receptores localizados en la membrana plasmática. En plantas vasculares y en briofitas, esta etapa de percepción está mediada principalmente por receptores tipo LysM (Lysin Motif), que detectan lipoquitooligosacáridos (Myc-LCOs) y oligómeros (COs) de la pared fúngica, que pueden actuar en combinación con co-receptores específicos (Delaux et al., 2015; Genre et al., 2013; Oldroyd, 2013b; Yotsui et al., 2023). Estos receptores permiten discriminar señales simbióticas de patrones microbianos asociados a patógenos, estableciendo un primer nivel de decisión entre defensa y simbiosis. Una vez activados, los receptores desencadenan la transmisión de la señal hacia el núcleo a través de una ruta altamente conservada que constituye el núcleo de la CSSP.

El segundo nivel de transmisión ocurre en la envoltura nuclear e involucra canales iónicos como CASTOR y POLLUX, junto con el receptor quinasa SYMRK. Estos componentes regulan la entrada y liberación rítmica de Ca^{2+} en el núcleo, generando oscilaciones características conocidas como *calcium spiking* (Delaux et al., 2015; Radhakrishnan et al., 2020). Este patrón de señalización cálcica no es simplemente un aumento de Ca^{2+} citosólico,

sino una firma temporal específica que codifica información sobre la naturaleza simbiótica de la interacción.

En un tercer nivel, las oscilaciones de Ca^{2+} nuclear son decodificadas por la quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina CCaMK, que actúa como un integrador central de la señal. CCaMK fosforila y activa al factor de transcripción CYCLOPS, junto con otros reguladores, induciendo un programa transcripcional específico de simbiosis. Este programa controla genes involucrados en la remodelación de la pared celular, la reorganización del citoesqueleto, la acomodación intracelular del hongo y la expresión de transportadores especializados para el intercambio de nutrientes, como fósforo y nitrógeno.

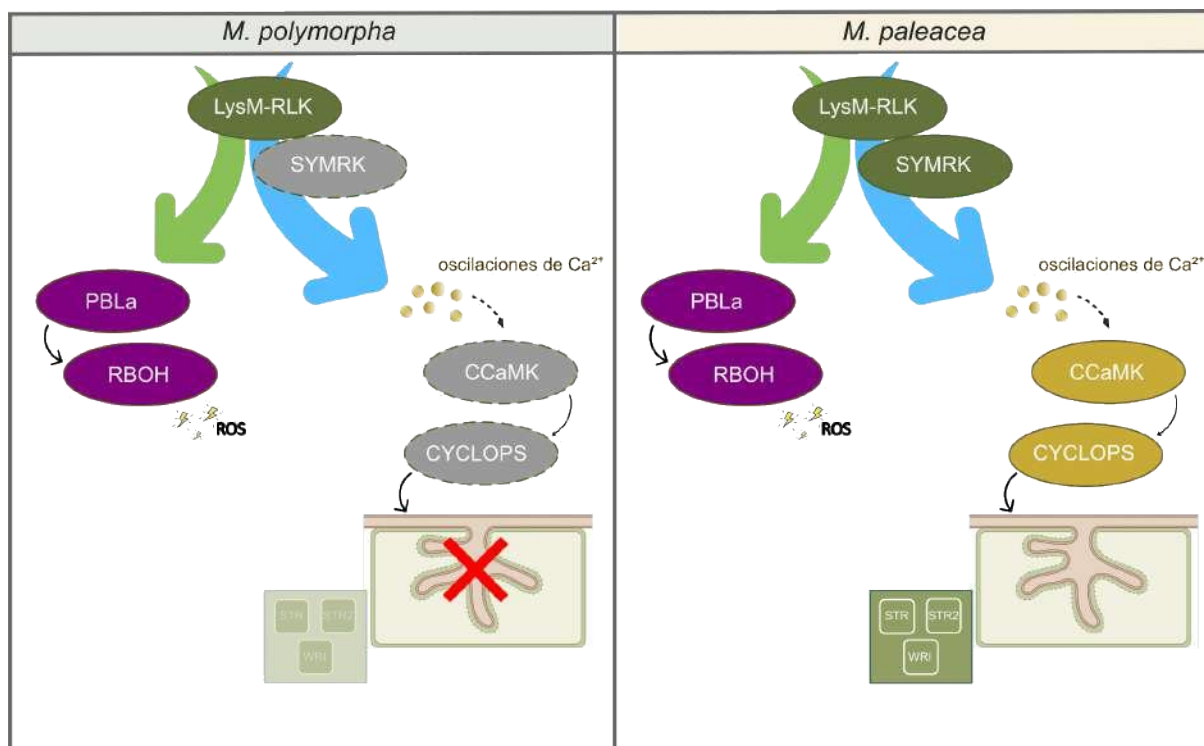


Figura 3. Comparación de la vía común de señalización de la simbiosis (CSSP) y de las respuestas celulares asociadas a la micorrización en *M. polymorpha* y *M. paleacea*. La percepción de señales fúngicas en *M. paleacea* (panel derecho) a través del módulo receptor LysM-RLK/SYMRK activa dos ramas de respuesta. Por un lado, PBLa transmite la señal derivada de la percepción fúngica hacia las NADPH oxidasas RBOH, desencadenando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En paralelo, la señalización mediada por SYMRK induce oscilaciones nucleares de Ca^{2+} , las cuales son decodificadas por CCaMK, permitiendo la activación del factor transcripcional CYCLOPS. Esta cascada habilita respuestas celulares downstream asociadas a la simbiosis intracelular, permitiendo el desarrollo de la simbiosis y la activación del módulo metabólico STR/STR2/WRI, responsable del intercambio lipídico hospedador-hongo. En *M. polymorpha* (panel izquierdo), PBLa y RBOH participan en una respuesta temprana conservada asociada a la percepción fúngica y a la producción

de ROS. Los genes *SYMRK*, *CCaMK* y *CYCLOPS* están presentes como pseudogenes (indicados en gris), lo que impide la transmisión efectiva de la señal de Ca^{2+} y la activación de respuestas simbióticas intracelulares. Como consecuencia, el módulo STR/STR2/WRI no se acopla funcionalmente a la vía. Las flechas continuas indican relaciones funcionales conocidas entre los componentes de la vía; las flechas punteadas indican dependencias funcionales sin implicar activación directa; los símbolos de ROS representan producción de especies reactivas de oxígeno mediada por RBOH; y los esquemas celulares ilustran la ausencia o presencia de arbusculos en *M. polymorpha* y *M. paleacea*.

Estudios recientes han mostrado que la activación temprana de la CSSP está estrechamente acoplada a la producción controlada de especies reactivas de oxígeno (ROS), mediada por oxidasas NADPH de tipo RBOH (Chu et al., 2023). Lejos de constituir únicamente una respuesta defensiva, las ROS actúan como segundos mensajeros que interactúan con la señalización de Ca^{2+} , contribuyendo a la reorganización celular necesaria para la colonización simbiótica. Esta integración entre señales de Ca^{2+} y ROS permite a la planta modular finalmente su respuesta inmune, favoreciendo la simbiosis sin desactivar completamente los mecanismos de defensa basal.

No obstante, la conservación funcional de la CSSP varía entre linajes. En la hepática *Marchantia polymorpha*, estudios recientes han demostrado la presencia de receptores LysM funcionales implicados en la percepción de quitina y en la activación de respuestas inmunes basales, lo que indica una conservación robusta de la inmunidad disparada por patrones (*pattern-triggered immunity*, PTI) (Yotsui et al., 2023). Sin embargo, esta especie carece de varios componentes clave necesarios para la activación completa de la vía simbiótica, lo que explica su incapacidad para establecer simbiosis micorrízicas funcionales (Radhakrishnan et al., 2020). En contraste, la hepática *Marchantia paleacea* y numerosas plantas vasculares conservan la CSSP funcional, permitiéndoles discriminar activamente entre señales patogénicas y beneficiosas y priorizar la simbiosis, especialmente bajo condiciones de limitación de fósforo (Tan et al., 2025).

Uno de los aspectos más fascinantes de esta vía es su profunda conservación evolutiva. Componentes clave de la CSSP han sido identificados no sólo en plantas vasculares, sino también en briofitas y en algas carofitas, estrechamente relacionadas con las embriofitas. Esto indica que la maquinaria molecular necesaria para la simbiosis intracelular no evolucionó de manera paralela en embriofitas, sino que ya estaba presente en el ancestro común de las Estreptofitas (carofitas y Embriofitas) (Delaux et al., 2012; Radhakrishnan et al., 2020). En consecuencia, los mecanismos actuales para percibir hongos simbioses forman parte de mecanismos conservados que precedieron la aparición de órganos

especializados y probablemente desempeñaron un papel determinante en el proceso de terrestreización.

La integración de las vías de señalización con la fisiología nutricional es otro aspecto esencial en la evolución de las simbiosis. Los Glomeromycotina dependen de la expresión de transportadores específicos en las membranas periarbusculares o en interfaces equivalentes. Transportadores de fosfato (PHT1), transportadores de amonio (AMT) y proteínas dedicadas a la transferencia de lípidos evolucionaron en paralelo con la complejización de las asociaciones simbióticas (Hoysted et al., 2023). La presencia de estos transportadores, así como de genes asociados a la modificación de la pared celular (expansinas, hidrolasas, remodeladores de pectinas), demuestra que la simbiosis requiere un reacomodamiento profundo a nivel celular y tisular, no meramente un intercambio metabólico pasivo.

Considerada en su conjunto, la evidencia sugiere que la terrestreización de las plantas no habría sido posible sin la existencia previa de estas vías moleculares y sin la capacidad de interactuar con hongos simbios. Las rutas de señalización, los transportadores específicos y los mecanismos de intercambio nutricional constituyen rasgos ancestrales conservados que permitieron a las plantas adaptarse a ambientes edáficos pobres y a condiciones extremas. La presencia de estos mecanismos en briofitas, no representa un vestigio del pasado, sino una característica central en los orígenes mismos de la vida terrestre.

Briofitas como modelos para estudiar simbiosis

Las briofitas constituyen uno de los linajes más antiguos y fundamentales dentro de las plantas terrestres, y su estudio ha sido clave para comprender los mecanismos evolutivos que permitieron la transición desde ambientes acuáticos hacia el medio terrestre. Este grupo, que incluye musgos, hepáticas y antoceros, conserva una serie de rasgos morfológicos, fisiológicos y genéticos que permiten aproximarse a los estados ancestrales que caracterizaron a las primeras embriofitas. En este sentido, las briofitas representan un punto de referencia esencial para reconstruir la evolución de las simbiosis planta–hongo y entender cómo estas asociaciones moldearon la historia temprana de las plantas terrestres (Glime, 2007; Ligrone et al., 2007).

La relevancia de las briofitas en el estudio de la evolución de las simbiosis se basa en varios factores. En primer lugar, su organización corporal relativamente simple, dominada por un gametofito fotosintético independiente y la ausencia de raíces verdaderas, permite analizar interacciones simbióticas sin la complejidad estructural y funcional que caracteriza a las

plantas vasculares. En segundo lugar, su posición filogenética como linaje hermano de las traqueofitas ofrece un marco comparativo único para evaluar la conservación o divergencia de componentes moleculares asociados a la simbiosis, tales como receptores, factores regulatorios y vías de señalización compartidas con plantas vasculares (Radhakrishnan et al., 2020). Además, la capacidad de muchas briofitas para establecer asociaciones con hongos del suelo revela que las simbiosis no son una innovación exclusiva de las plantas superiores, sino un rasgo ancestral que probablemente precedió a la aparición de raíces, tallos y tejidos vasculares.

Históricamente, las interacciones simbióticas en briofitas fueron subestimadas debido a la percepción de que estos grupos carecían de asociaciones comparables a las micorrizas arbusculares presentes en plantas vasculares. De hecho, salvo excepciones (Catania et al., 2025), la mayoría de los musgos no puede asociarse a micorrizas arbusculares, fundamentalmente por la pérdida de algunos genes de la CSSP (Wang et al., 2010). Sin embargo, investigaciones pioneras demostraron que las hepáticas establecen relaciones íntimas con hongos Glomeromycotina y, también con hongos pertenecientes al subfilo Mucoromycotina (Field et al., 2015a; Ligrone et al., 2007; Rimington et al., 2020). Estas asociaciones incluyen la formación de estructuras intracelulares similares a arbúsculos, la formación de hifas que penetran los tejidos del gametofito y el intercambio funcional de nutrientes como fósforo, nitrógeno y carbono. En particular, el descubrimiento de que los hongos MFRE infectan tanto briofitas como plantas vasculares representa uno de los hallazgos más significativos de las últimas dos décadas, dado que sugiere un origen evolutivo profundo y versátil de esta nueva interacción simbiótica (Field et al., 2019; Orchard et al., 2017; Spatafora et al., 2016).

La evidencia funcional demuestra que los MFRE establecen mutualismos activos con diversas especies de hepáticas, proveyendo nitrógeno y fósforo a las plantas a través de mecanismos fisiológicos distintos a los observados en Glomeromycotina (Field et al., 2019). Los MFRE se han estudiado como mutualistas nutricionales en condiciones donde la disponibilidad de nutrientes del suelo es un factor limitante para las plantas, transfiriendo nitrógeno y fósforo a los hospedadores y sugiriendo un rol ecológico importante para facilitar la nutrición vegetal (Field et al., 2015a; Field et al., 2016; Hoysted et al., 2019). Es por este motivo que nos permiten pensar que podrían haber sido simbioses particularmente relevantes durante los primeros millones de años de la vida terrestre. Las briofitas, al carecer de raíces, dependen en gran medida de su superficie talosa o de estructuras como rizoides para interactuar con microorganismos del suelo, lo que confiere a las asociaciones simbióticas un papel esencial en su nutrición mineral. Desde esta perspectiva, estudiar estas

interacciones en briofitas ofrece una ventana privilegiada hacia los mecanismos que facilitaron el acceso a nutrientes en los primeros ecosistemas terrestres.

Además de Glomeromycotina y Mucoromycotina, las briofitas también se asocian con hongos endofíticos oscuros (DSE, *Phylum Ascomycota*), los cuales forman hifas melanizadas dentro de sus tejidos y pueden modificar la disponibilidad de nutrientes mediante procesos de mineralización y solubilización del fósforo (Della Monica et al., 2015). Estos hongos habitan comúnmente ambientes estresantes o empobrecidos nutricionalmente, desempeñando funciones complementarias o sinérgicas con respecto a los simbiontes micorrízicos tradicionales. La multiplicidad de simbiontes fúngicos en briofitas refuerza la idea de que las primeras plantas terrestres no dependían exclusivamente de un tipo de hongo, sino que mantenían relaciones más flexibles y diversas que lo observado en muchas plantas vasculares modernas.

La complejidad y diversidad de las relaciones simbióticas en briofitas adquieren aún mayor relevancia al considerar los cambios ambientales contemporáneos. Diversos estudios han documentado que las briofitas responden de manera sensible a cambios en los nutrientes del suelo, especialmente al incremento o disminución de N y P, lo cual afecta la composición y funcionalidad de sus comunidades fúngicas asociadas (Cedrés-Perdomo et al., 2023; Liao et al., 2025). Estos organismos, que suelen dominar en ecosistemas frágiles como bosques húmedos, turberas y biocostras, pueden actuar como indicadores sensibles de alteraciones antropogénicas o climáticas. La diversidad fúngica asociada puede incluir desde hongos solubilizadores de fósforo hasta simbiontes mutualistas, lo que resalta la importancia de estudiar cómo las briofitas integran señales ambientales con sus vías simbióticas.

El avance de tecnologías moleculares ha permitido caracterizar con mayor precisión las comunidades fúngicas asociadas a briofitas. Herramientas como FUNGuild, DADA2 y Swarm (Nguyen et al., 2016) han revelado que estas comunidades poseen niveles de diversidad funcional comparables o incluso superiores a los observados en la rizosfera de plantas vasculares. Además, la secuenciación del genoma de diversas briofitas, incluida *M. polymorpha*, ha permitido identificar ortólogos de genes asociados a la señalización simbiótica utilizados por hongos en interacciones intercelulares (Bowman et al., 2017). Este hallazgo sugiere que las vías moleculares que regulan la simbiosis no surgieron con las plantas vasculares, sino que estuvieron presentes en linajes más antiguos y fueron reutilizadas o modificadas durante la evolución.

En síntesis, las briofitas constituyen modelos excepcionales para estudiar la evolución de las vías simbióticas, la diversidad de sus simbiontes, la dependencia en estas interacciones para la adquisición de nutrientes y la conservación de rutas moleculares presentes en las

plantas terrestres. Su estudio no sólo permite reconstruir la historia de las relaciones planta–hongo, sino también comprender cómo estas asociaciones continúan siendo fundamentales en la ecología y evolución de plantas actuales. Las briofitas ofrecen, por lo tanto, un puente entre el pasado y el presente de la biología vegetal, permitiendo desentrañar cómo las simbiosis moldearon la vida terrestre.

Marchantia polymorpha como hepática modelo

M. polymorpha se ha consolidado en la última década como uno de los modelos experimentales más importantes para el estudio de la biología, evolución y ecología comparativa de plantas terrestres. Esta hepática talosa, ampliamente distribuida en ambientes húmedos y perturbados, combina características ancestrales propias de las primeras plantas terrestres con una batería de herramientas genéticas modernas comparables a las usadas en angiospermas. Esta singular combinación convierte a *M. polymorpha* en un sistema ideal para investigar aspectos fundamentales de la simbiosis planta–hongo, la adquisición de nutrientes, la regulación hormonal, el metabolismo secundario y la evolución de mecanismos conservados a través de cientos de millones de años (Bowman et al., 2017; Poveda, 2020).

Uno de los rasgos más destacados de *M. polymorpha* es su organización corporal talosa, dominada por un gametofito fotosintético aplanado que crece horizontalmente sobre el sustrato. Esta arquitectura, más simple que la de las plantas vasculares, facilita la observación y manipulación de procesos celulares, fisiológicos y simbióticos. El talo posee cámaras aéreas, poros rígidos y una red interna de tejidos que permiten el intercambio gaseoso y la distribución de compuestos, proporcionando un modelo accesible para estudiar interacciones planta–microorganismo en tejidos superficiales y profundos. La presencia de rizoides unicelulares, que funcionan de manera análoga a las raíces en términos de anclaje y absorción, proporciona un punto de entrada natural para hongos simbiotes y otros microorganismos, lo que permite estudiar la infección y dinámica simbiótica sin la complejidad estructural de los sistemas radiculares de plantas vasculares.

A nivel molecular, *M. polymorpha* destaca por poseer un genoma pequeño, con un grado de redundancia génica notablemente bajo para genes relacionados a vías de señalización, lo que facilita los estudios de genética funcional y la interpretación de fenotipos mutantes (Bowman et al., 2017). El método de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* descrito por Kubota et al. (2013) posibilita la generación rápida de plantas transgénicas a partir de la regeneración de fragmentos del talo, lo cual facilitó la adopción de *M. polymorpha* en estudios de biología del desarrollo y señalización. También, se han

optimizado herramientas de edición génica, líneas mutantes, marcadores moleculares y protocolos de transformación altamente eficientes.

Un rasgo distintivo de las hepáticas y particularmente relevante en *M. polymorpha* es la presencia de cuerpos oleosos, organelas exclusivas de este linaje que son considerados las estructuras secretorias más antiguas de plantas terrestres (He et al., 2013; Romani et al., 2022). Estos cuerpos oleosos contienen una amplia variedad de compuestos bioactivos, incluyendo terpenoides, ácidos grasos, compuestos aromáticos y moléculas involucradas tanto en defensa contra herbívoros como en interacciones con microorganismos (Asakawa, 2008; Ludwiczuk & Asakawa, 2019; Romani & Moreno, 2021). Su diversidad química y funcionalidad han sido evaluadas en estudios que demuestran propiedades antimicrobianas, antiproliferativas y de defensa frente a artrópodos (Romani et al., 2020; Vollár et al., 2018). Queda pendiente conocer su efecto sobre el microbioma de las hepáticas. En este sentido, la secuenciación masiva de más de un centenar de genomas de briofitas y la identificación de su microbioma nos permitirá conocer el grado de asociación entre el tipo de cuerpos oleosos y su microbioma (Dong et al., 2025).

Otro aspecto de relevancia es la capacidad de *M. polymorpha* para responder a la deficiencia de fósforo (P), un nutriente esencial que limita el crecimiento de las plantas en ambientes terrestres. Estudios recientes han demostrado que bajo condiciones de deficiencia de P, esta hepática reorganiza su pared celular, modifica la expresión de genes relacionados con el transporte de fosfato, ajusta su metabolismo interno y altera la actividad de enzimas asociadas a la adquisición de nutrientes (Rico-Reséndiz et al., 2020). Estas respuestas muestran paralelismos notables con las observadas en angiospermas, lo que sugiere que los mecanismos de adaptación a la deficiencia de P tienen un origen evolutivo profundo. Al mismo tiempo, ciertas respuestas parecen ser específicas de briofitas, lo que ofrece oportunidades únicas para estudiar cómo la evolución modificó, integró o reemplazó funciones ancestrales en traqueofitas.

Finalmente, el creciente interés en *M. polymorpha* como modelo experimental está impulsado por su capacidad de integrar información ecológica, evolutiva y molecular. Su combinación de rasgos ancestrales, herramientas modernas de manipulación y diversidad simbiótica ofrece un sistema excepcionalmente robusto para estudiar preguntas fundamentales sobre la biología de las plantas. Desde la perspectiva de esta tesis, *M. polymorpha* constituye un excelente modelo para estudiar interacciones con hongos simbios y endofitos del suelo. Al no desarrollar raíces verdaderas, sus rizoides y el tejido del talo funcionan como sitios de infección para diversos hongos. La gran mayoría de las hepáticas pueden ser micorrizadas, incluyendo la mayoría de las especies del género *Marchantia*, como ocurre con *M. paleacea*. Sin embargo, se ha demostrado que *M.*

polymorpha no puede ser infectada por Glomeromycotina, dado que ha perdido genes centrales de la CSSP (Radhakrishnan et al., 2020). La posibilidad de que *M. polymorpha* se asocie en la naturaleza a hongos mutualistas la convierte en una herramienta estratégica para desentrañar la evolución de la señalización simbiótica, los mecanismos de reconocimiento entre plantas y hongos y los mecanismos usados para obtener nutrientes esenciales, especialmente fósforo, a través de la interacción con hongos.

El rol de hongos del suelo en la disponibilidad de fósforo

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para todas las plantas terrestres y es uno de los macronutrientes que limita la productividad primaria a escala global. Su forma biodisponible en el suelo, principalmente ortofosfato inorgánico, suele encontrarse en concentraciones bajas debido a su tendencia a inmovilizarse mediante procesos de adsorción, precipitación con cationes como Fe^{3+} , Al^{3+} y Ca^{2+} , o incorporación en complejos orgánicos recalcitrantes (Carter & Gregorich, 2007). Esta baja disponibilidad ha generado presiones selectivas que favorecieron la evolución de mecanismos fisiológicos y ecológicos destinados a mejorar la adquisición del nutriente. Entre ellos, se destacan las asociaciones con hongos del suelo como una de las estrategias más efectivas en plantas terrestres. El rol de los hongos en la dinámica del fósforo es particularmente compleja y abarca funciones de solubilización, mineralización, transporte, almacenamiento y transferencia a las plantas.

En la naturaleza, una parte significativa del fósforo del suelo se encuentra en formas orgánicas o en minerales insolubles que las plantas no pueden absorber directamente. En este contexto, los hongos actúan como mediadores clave para movilizar y facilitar estas fuentes inaccesibles. Numerosos hongos saprótrofos, endofíticos y simbioses producen enzimas fosfatasas alcalinas y ácidas y fitasas capaces de liberar fosfato a partir de compuestos orgánicos complejos (Elias et al., 2016). Estos procesos de mineralización constituyen un componente crítico de los ciclos biogeoquímicos del suelo y determinan, en muchos casos, la disponibilidad real del nutriente para la planta. Asimismo, hongos solubilizadores de fosfato (PSF, por sus siglas en inglés) modifican el microambiente edáfico mediante la producción de ácidos orgánicos y quelantes que alteran el pH local o movilizan iones asociados, permitiendo la liberación de fósforo desde minerales insolubles (Etesami et al., 2021; Ma et al., 2022). Estas actividades se encuentran ampliamente distribuidas entre géneros fúngicos y muestran una alta variabilidad dependiendo de factores como la especiación del fósforo, el tipo de suelo y el estado fisiológico de la planta hospedadora.

Las asociaciones simbióticas entre plantas y hongos micorrízicos constituyen uno de los mecanismos más reportados y eficientes de adquisición de fósforo en la naturaleza. Los

hongos Glomeromycotina, responsables de la formación de micorrizas arbusculares, presentan extensas redes de hifas extrarradiculares que exploran volúmenes de suelo inaccesibles para las raíces o rizoides. Estas hifas poseen alta afinidad por el fosfato y expresan transportadores especializados que facilitan su absorción desde zonas de baja concentración. El fosfato captado se transloca hacia las estructuras intracelulares de intercambio en la planta, como los arbúsculos, donde es transferido al hospedador a cambio de compuestos carbonados (Parniske, 2008; Thirkell et al., 2016). Este mecanismo ha sido ampliamente documentado en plantas vasculares, pero también se encuentra presente en briofitas, donde Glomeromycotina se asocian formando estructuras funcionales similares, sugiriendo una conservación profunda del mutualismo a lo largo de la evolución (Field et al., 2015a; Ligrone et al., 2007).

Sin embargo, en los últimos años se ha reconocido que no todas las asociaciones fúngicas involucradas en la adquisición de fósforo responden al modelo clásico de las micorrizas arbusculares. Uno de los hallazgos más relevantes ha sido el reconocimiento de los hongos MFRE como simbioses nutricionales activos tanto en briofitas como en traqueofitas (Orchard et al., 2017; Spatafora et al., 2016). Estos hongos presentan patrones de intercambio de nutrientes distintos a los Glomeromycotina y pueden desempeñar un papel central en la obtención de fósforo bajo condiciones de baja disponibilidad. Estudios funcionales han demostrado que los MFRE transfieren fósforo, nitrógeno y carbono a plantas hospedadoras mediante rutas fisiológicas particulares y con eficiencias variables según el contexto edáfico y la identidad de la planta (Field et al., 2019; Hoysted et al., 2023). Esta diversidad funcional sugiere que en ambientes oligotróficos, donde el fósforo constituye un factor especialmente limitante, los MFRE podrían haber sido simbioses clave para las primeras plantas terrestres.

Los hongos endofíticos septados oscuros (DSE), caracterizados por hifas melanizadas y estructuras microscleróticas, también desempeñan funciones relacionadas con la dinámica del fósforo. Aunque su papel no ha sido tan extensamente estudiado como el de los hongos micorrízicos, evidencia experimental muestra que los DSE son capaces de solubilizar formas insolubles de fósforo y mineralizar compuestos orgánicos, modificando así los pools internos de nutrientes en plantas hospedadoras (Della Monica et al., 2015). La coexistencia entre DSE, Glomeromycotina y Mucoromycotina puede generar interacciones sinérgicas o competitivas, alterando la eficiencia con la que los distintos simbioses contribuyen al estado nutricional de la planta. Estos resultados subrayan la importancia de considerar la complejidad de las comunidades fúngicas al estudiar patrones de disponibilidad de fósforo, ya que las plantas suelen interactuar con múltiples simbioses simultáneamente.

El contexto ambiental también juega un rol decisivo en determinar la función de los hongos del suelo en la dinámica del fósforo. Cambios antropogénicos como el uso intensivo de fertilizantes, la contaminación, la deforestación y las alteraciones en los ciclos de nitrógeno y fósforo pueden modificar la estructura de las comunidades fúngicas y, por ende, la eficiencia de las asociaciones simbióticas (Goyette et al., 2016). En particular, el exceso de fósforo disponible suele disminuir la dependencia de las plantas de hongos micorrízicos, lo que puede traducirse en una reducción de la diversidad y abundancia de estos simbiosistas. Por el contrario, en ecosistemas perturbados, como áreas afectadas por incendios o degradación, algunos hongos solubilizadores o endofíticos pueden volverse más relevantes para sostener la nutrición vegetal, especialmente en briofitas y plantas pioneras (Cedrés-Perdomo et al., 2023).

La interacción entre plantas y hongos del suelo es, en última instancia, un proceso dinámico y altamente regulado que depende de factores edáficos, climáticos, fisiológicos y evolutivos. Los hongos no sólo actúan como proveedores de fósforo, sino también como moduladores de la arquitectura radicular o talosa, del metabolismo interno y de la expresión génica asociada a la adquisición de nutrientes. Desde esta perspectiva, la disponibilidad real de fósforo para una planta no depende únicamente de las características físico-químicas del suelo, sino también de la diversidad y funcionalidad de los hongos asociados a sus tejidos o a la rizosfera.

Para briofitas como *M. polymorpha*, que dependen de estructuras simples como rizoides unicelulares y tejidos superficiales del talo para la absorpci n, el papel de los hongos del suelo es aún más crítico. El estudio de estas interacciones no sólo permite identificar los mecanismos que sostienen la nutrición mineral en briofitas, sino también reconstruir procesos ancestrales que fueron fundamentales para la terrestreización y la diversificación posterior de las plantas.

Endofitos Mucoromycotina de raíces finas en la nutrición vegetal

Los endofitos Mucoromycotina de raíces finas (MFRE, por sus siglas en inglés por Mucoromycotina Fine Root Endophytes) han emergido en los últimos años como actores clave en la compresión de las simbiosis planta-hongo. Durante décadas, estos organismos fueron clasificados erróneamente dentro de Glomeromycotina, debido a la similitud morfológica de sus hifas finas y estructuras intracelulares con las de las micorrizas arbusculares. Sin embargo, los estudios morfológicos, citológicos y, especialmente, los análisis moleculares desarrollados por Spatafora et al. (2016) y más tarde reforzados por Orchard et al. (2017), demostraron de forma concluyente que estos hongos pertenecen al

subfilo Mucoromycotina, redefiniendo la visión evolutiva y ecológica de las asociaciones simbióticas en plantas terrestres. Este descubrimiento transformó la comprensión clásica de la evolución de las micorrizas, revelando que la diversidad de hongos simbioses ancestrales fue sustancialmente mayor de lo que se creía. Estas observaciones están siendo refrendadas por nuevos estudios taxonómicos basados en análisis moleculares y bioquímicos (Szánthó et al., 2025).

Los MFRE presentan una biología particular que los distingue tanto de los hongos Glomeromycotina como de los DSE. Sus hifas extrarradiculares son extremadamente finas, su esporulación es menos conspicua y las estructuras intracelulares que forman no se organizan en arbuscúlos elaborados, sino en formas irregulares o globulares. A nivel fisiológico, se caracterizan por su capacidad para infectar y asociarse a embriofitas (briofitas y traqueofitas), lo que sugiere un origen ancestral de este tipo de mutualismo (Field et al., 2015a; Field et al., 2015b; Rimington et al., 2020). En muchos casos, coexisten en los mismos tejidos con Glomeromycotina, formando simbiosis mixtas que complejizan la dinámica de adquisición de nutrientes en la planta hospedadora (Hoysted et al., 2021). Y, en todos los casos, los MFRE han sido encontrados en plantas con una CSSP intacta, lo cual hacía suponer que estos hongos usaban la vía CSSP para establecer la interacción.

Uno de los aportes más significativos de los MFRE es su rol en la adquisición y transferencia de nutrientes esenciales. Estudios funcionales en sistemas experimentales controlados demostraron que estos hongos participan activamente en el intercambio de nitrógeno, fósforo y carbono con sus plantas hospedadoras. Field et al. (2019) mostraron que los MFRE transfieren cantidades significativas de nitrógeno orgánico e inorgánico, así como fósforo, a las hepáticas *Haplomitrium gibbsiae*, *Neohodgsonia mirabilis* y *M. paleacea*, mientras que reciben, a cambio, compuestos fotosintéticos carbonados. Este hallazgo resulta fundamental, ya que revela que los MFRE poseen un modo de intercambio nutricional diferente al modelo establecido para Glomeromycotina. En lugar de especializarse principalmente en la adquisición de fósforo, como las micorrizas arbusculares, los MFRE parecen tener una estrategia más generalista, siendo particularmente eficientes en la transferencia de nitrógeno. En plantas vasculares, los MFRE demostraron ser capaces de establecer intercambios directos de nutrientes con sus hospedadores en cultivos monoxénicos, lo que confirma que su relevancia no se limita a hepáticas (Hoysted et al., 2023). Estos resultados sugieren que los MFRE han coexistido con las plantas durante largos períodos evolutivos y que pudieron haber desempeñado funciones esenciales en ambientes paleozoicos caracterizados por una baja disponibilidad de nutrientes minerales. De hecho, Field et al. (2015a) demostraron que en linajes de hepáticas como Haplomitriopsida, los MFRE forman mutualismos funcionales que responden incluso a

cambios atmosféricos simulados de dióxido de carbono, lo cual evidencia una adaptabilidad simbiótica estrechamente ligada a condiciones paleoambientales.

Desde una perspectiva evolutiva, los MFRE representan una pieza clave para comprender la historia profunda de las simbiosis planta–hongo. Su distribución en linajes divergentes y su capacidad para establecer infecciones intracelulares sugieren que los mecanismos básicos de reconocimiento y señalización simbiótica (como los asociados a la CSSP) ya estaban presentes cuando estos hongos interactúan con las primeras embriofitas. Esto es congruente con estudios que muestran la presencia de componentes de la CSSP en briofitas y algas estrechamente relacionadas con las plantas terrestres (Delaux et al., 2012; Radhakrishnan et al., 2020). Aunque los MFRE no forman arbusculos, la activación de vías paralelas podría explicar cómo estos hongos establecen asociaciones íntimas que permiten el intercambio de recursos sin requerir estructuras morfológicas complejas.

Los MFRE también desempeñan un papel importante en las comunidades microbianas del suelo. La interacción entre MFRE, Glomeromycotina y DSE puede generar relaciones de competencia, complementariedad funcional o incluso sinergias que modulan la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Esta complejidad ecológica implica que la función real de los MFRE no debe analizarse de manera aislada, sino dentro de una red simbiótica más amplia. En algunos casos, la coexistencia de MFRE con Glomeromycotina parece mejorar la eficiencia de adquisición de P y N, mientras que en otros contextos, los MFRE pueden prevalecer como simbioses principales cuando las micorrizas arbusculares son menos eficientes debido a limitaciones edáficas o climáticas (Field et al., 2019).

En conjunto, la evidencia disponible posiciona a los MFRE como simbioses versátiles, ancestrales y funcionalmente esenciales para numerosas plantas terrestres, especialmente aquellas que ocupan ambientes oligotróficos. Su estudio no sólo amplía el concepto clásico de simbiosis micorrízica, sino que obliga a reconsiderar cómo se originaron y diversificaron los mutualismos intracelulares en la historia evolutiva de las plantas. Para investigaciones centradas en briofitas como *M. polymorpha*, los MFRE representan un componente crucial para comprender cómo las plantas primitivas adquirieron nutrientes esenciales como el fósforo, y cómo estos procesos simbióticos permitieron la expansión de las plantas terrestres hacia ambientes desafiantes.

Objetivos generales

Las simbiosis entre plantas y microorganismos son cruciales para la homeostasis de los ecosistemas y la productividad de sistemas agrícolas. Entre estas asociaciones, la simbiosis entre plantas y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) está presente en más de 80% de las plantas terrestres y probablemente estuvo presente en su ancestro común, jugando un papel clave en la terrestreización de las plantas. La asociación de las plantas de distintos linajes con HMA depende de la vía común de señalización de la simbiosis (CSSP, por sus siglas en inglés). Durante la evolución, algunas plantas co-optaron esta vía para iniciar la simbiosis en nódulos radiculares fijadores de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés), mientras que otras perdieron componentes de la CSSP y su capacidad para asociarse a HMA. Los endofitos de raíz fina Mucoromycotina (MFRE, por sus siglas en inglés) fueron descritos recientemente como un nuevo tipo de simbiontes en plantas vasculares y no vasculares. Hasta el momento, todas las plantas descritas que poseen simbiosis por MFRE también se asociaban con HMA, lo que llevó a plantear que la vía CSSP también era necesaria para la simbiosis por MFRE. Si bien la simbiosis con HMA se observa de manera generalizada en el género *Marchantia*, está ausente en *M. polymorpha*, especie que ha perdido genes centrales de la CSSP y genes de la vía de síntesis de estrigolactonas (SL), necesarios para la atracción del HMA.

El objetivo general de este proyecto es caracterizar los endofitos fúngicos asociados a *M. polymorpha* en su ambiente natural, con el fin de identificar y describir una vía simbiótica alternativa a la CSSP, aportando evidencia para la existencia de un nuevo mecanismo de simbiosis en plantas terrestres.

Objetivos específicos

Este Plan de Trabajo propone los siguientes objetivos específicos:

- 1) Aislar, identificar y caracterizar funcionalmente la biodiversidad de endofitos fúngicos de poblaciones naturales de *M. polymorpha*, haciendo foco en MFRE.
- 2) Estudiar el efecto de la infección por MFRE en *M. polymorpha* crecidas en diferentes condiciones nutricionales.
- 3) Identificar las vías moleculares que median la interacción con el MFRE.

- 4) Identificar y validar funcionalmente nuevos genes candidatos que regulan la interacción con el MFRE.
- 5) Evaluar si MFRE contribuye al crecimiento de angiospermas en hambreado, y comparar estas respuestas con las observadas en briofitas.

Capítulo 1: Comunidades fúngicas endofíticas y sus rasgos asociados al fósforo en *Marchantia polymorpha* a lo largo de un gradiente de disturbio antrópico

Introducción

Las briofitas, el grupo hermano de las plantas vasculares (traqueofitas), se separaron de su ancestro común más reciente hace aproximadamente 450 millones de años (Delwiche y Cooper, 2015; Morris et al., 2018). Las briofitas, que incluyen musgos, hepáticas y antocerotes, representan el segundo grupo más grande de plantas terrestres, con más de 20.000 especies que se distribuyen en una amplia variedad de ambientes, desde la tundra ártica hasta las selvas tropicales, así como en sotobosques húmedos y superficies rocosas. A pesar de su arquitectura rudimentaria, que incluye rizoides en lugar de raíces verdaderas y, en algunas briofitas, células conductoras simples como hidroides y leptoides en lugar de verdaderos tejidos vasculares, estas plantas desempeñan un importante rol ecológico en múltiples ecosistemas, especialmente participando de los ciclos biogeoquímicos del agua y los nutrientes, y en la estabilización de suelos en paisajes perturbados (Glime, 2007; Wang et al., 2022). Las briofitas presentan una notable plasticidad fisiológica y tolerancia al estrés, lo que los convierte en biomarcadores ideales para estudios de ecología, cambio climático e impacto humano (Tuba et al., 2011).

Muchos nichos de briofitas están siendo afectados por perturbaciones humanas, incluyendo la deforestación (Gradstein, 2008), la agricultura (Norris, 1990), las actividades industriales y otras actividades antropogénicas como el fuego (Cedrés-Perdomo et al., 2023; Monteiro et al., 2024; Nepstad et al., 2008; Tolopka et al., 2024). Una característica interesante de la hepática *Marchantia polymorpha* es su relación con hongos endofíticos, ya que se encuentra entre las pocas hepáticas reportadas que no forman asociaciones con hongos micorrízicos arbusculares (Alcaraz et al., 2018; Puginier et al., 2022; Radhakrishnan et al., 2020). Los endofitos se entienden comúnmente como microorganismos que habitan tejidos vegetales vivos y libres de síntomas (Nelson et al., 2018; Stone, 2000). Operativamente esto se refiere a microorganismos, desde simbioses benéficos hasta patógenos latentes, que persisten tras la esterilización superficial de partes sanas de la planta. Si bien no todos los endofitos pueden solubilizar fósforo orgánico, existen otros con una alta capacidad para producir enzimas fosfatasas en cantidades notables (Della Monica et al., 2015; Jiang et al., 2021). Estas enzimas tienen el potencial de liberar fósforo a partir de materia orgánica, aumentando su disponibilidad como nutriente y favoreciendo el crecimiento vegetal. Esto se enmarca dentro de la “hipótesis aditiva” general de las interacciones planta–microorganismo (Bashan

& Levanony, 1990), que postula que varios mecanismos sinérgicos interactúan para mejorar la acumulación y disponibilidad de nutrientes. En este Capítulo, planteamos la hipótesis de que la comunidad fúngica endofítica de *M. polymorpha* está moldeada por el entorno nutricional y que estos endofitos pueden desempeñar un rol funcional en la adquisición de nutrientes bajo condiciones limitantes. Como *M. polymorpha* carece de la vía común de señalización de la simbiosis (CSSP) y no forma asociaciones con hongos micorrízicos arbusculares, el estudio de sus endofitos fúngicos nos permite caracterizar potencialmente asociaciones simbióticas alternativas. Es por esto, que este trabajo se enmarca en el objetivo general de caracterizar los endofitos fúngicos asociados a *M. polymorpha* y contribuye a los objetivos 1 y 2, orientados a aislar, identificar y caracterizar funcionalmente endofitos, así como a evaluar su impacto sobre el crecimiento vegetal en diferentes condiciones nutricionales.

En plantas hepáticas se han identificado hongos pertenecientes a los *Phylum* Ascomycota, Basidiomycota y *Subphylum* Glomeromycotina. Algunas especies de hepáticas muestran comportamientos mutualistas micorrízicos con Glomeromycotina (Cottet et al., 2018; Radhakrishnan et al., 2020), Mucoromycotina (Field et al., 2015a; Prout et al., 2024; Rimington et al., 2019) y con el ascomycota micorrízico ericoide *Pezoloma ericae* (Kowal et al., 2018; Pressel et al., 2010). Un número creciente de estudios sobre asociaciones fúngicas con briofitas respalda la existencia de una diversidad mucho mayor más allá de los principales grupos mutualistas (Catania et al., 2025; Kelly et al., 2024; Nelson et al., 2018; Pressel et al., 2021), aunque aún no se conoce cómo interactúan algunos de estos otros endofitos con la planta.

Sobre la base de estas consideraciones, planteamos la hipótesis de que la composición de la comunidad fúngica endofítica en *M. polymorpha* puede estar influenciada por el grado de perturbación antropogénica. En particular, predecimos que los hongos endofíticos aislados de ambientes más perturbados exhibirán mejor adquisición de fósforo, relacionado a una mayor actividad fosfatasa, lo que reflejaría una respuesta adaptativa a condiciones específicas de limitación de nutrientes. Tales cambios funcionales, de existir, podrían conferir ventajas a la planta hospedadora en hábitats degradados y sugerir un posible rol ecológico de estos hongos en el sostén del desempeño vegetal bajo condiciones alteradas por la actividad humana.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la influencia del gradiente de disturbio antrópico sobre la composición y las capacidades funcionales relacionadas con el fósforo de las comunidades fúngicas endofíticas asociadas a *M. polymorpha* en ambientes naturales de la región andina patagónica.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la diversidad taxonómica de los hongos endofitos asociados a *M. polymorpha* en tres sitios con diferente grado de antropización mediante aproximaciones complementarias como el aislamiento por cultivo y la secuenciación masiva del ADN (*metabarcoding*).
2. Analizar las propiedades físico-químicas del suelo en cada sitio de muestreo, con especial énfasis en las formas totales y disponibles de fósforo.
3. Determinar la capacidad de los endofitos fúngicos para producir fosfatasas ácidas y alcalinas, así como su habilidad para solubilizar fósforo inorgánico en condiciones de laboratorio.
4. Comparar la diversidad y los rasgos funcionales de las comunidades endofíticas en función del nivel de perturbación antrópica y las características del suelo.
5. Identificar géneros fúngicos con potencial ecológico relevante por su persistencia y posible rol simbiótico en *M. polymorpha*.

Materiales y Métodos

Muestreo de plantas y sitios de colección

Se seleccionaron tres sitios de muestreo con un nivel decreciente de influencia antropogénica (Sitio 1 > Sitio 2 > Sitio 3) en el bosque templado-frío de San Carlos de Bariloche, Argentina. El Sitio 1 representa el área con el mayor nivel de antropización y se

ubicó en las acequias de riego del barrio Belgrano Sudeste, en 41°08'33.6"S 71°18'36.5"W, donde el agua de deshielo fluye de manera continua y es utilizada como zona de descarga de residuos cotidianos. Los Sitios 2 y 3 se localizaron en 41°07'32.3"S 71°23'14.3"W, en el kilómetro 4 de la ciudad de Bariloche. Aunque ambos sitios se encontraban geográficamente cercanos, fueron muestreados como sitios independientes por sus características diferentes. El Sitio 2 correspondió a una planta cultivada en maceta en un vivero, que recibía riego constante pero estaba limitada por el volumen de sustrato. En contraste, el Sitio 3 se ubicó en el suelo del bosque, en un área de sotobosque no perturbada, cercana a un arroyo de deshielo y con tránsito peatonal mínimo.

En todos los sitios, se recolectó un parche de aproximadamente 15 cm de diámetro que incluía varias plantas y el suelo adherido a los rizoides. Las plantas recolectadas se transportaron al laboratorio en bolsas de polietileno y se procesaron el mismo día de la siguiente manera: se enjuagaron exhaustivamente con agua y, bajo un estereomicroscopio, se retiraron cuidadosamente las partículas de suelo remanentes. Luego, los talos se cortaron en fragmentos pequeños de aproximadamente 1 cm² utilizando una hoja de bisturí estéril.

Determinación molecular de especies y subespecies de *Marchantia* sp.

El ADN vegetal se extrajo utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Bethesda, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para identificar la subespecie de *M. polymorpha*, se amplificó una región polimórfica del gen *CCaMK*, previamente reportada como discriminante entre *M. paleacea* y las subespecies de *M. polymorpha* (Radhakrishnan et al., 2020). La amplificación por PCR se realizó utilizando los *primers* fwdMpaCCAMK-2 (5'-CGAAAGAGAGCACAACACACAG-3') y rvMpaCCAMK-2 (5'-CACGCAAGAACAAACAGAGATAAGCAG-3'), bajo el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 98 °C durante 1 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 20 s, y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los amplicones fueron corridos en un gel de agarosa y purificado usando el Wizard® SV Gel and PCR Clean up System (Promega, Bethesda, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los amplicones purificados fueron secuenciados por Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias de la región polimórfica fueron comparadas con secuencias de los genomas de referencia de *M. paleacea* y de todas las subespecies de *M. polymorpha*, incluyendo el genoma de referencia Tak-1 (*M. polymorpha* Reference Genome Sequences ver. 7.1) y las subespecies *polymorpha*, *ruderalis* y *montivagans* reportadas previamente (Radhakrishnan et al., 2020), para asignar la identidad de subespecie.

Esterilización superficial, ensayo de impresión, aislamiento de endofitos fúngicos y bancos de muestreo

Los fragmentos de talo fueron esterilizados superficialmente durante 1 minuto en una solución compuesta por hipoclorito de sodio al 1% (3.5 ml), 10 ml de ampicilina a 0.1 mg/ml, 10 ml de estreptomicina a 0.1 mg/ml y 20 µl de Tween 80, seguida de tres enjuagues con agua destilada esterilizada (Silvani et al., 2012). Para verificar la eficacia de la esterilización, se realizó un ensayo de impresión. Brevemente, los fragmentos esterilizados se presionaron suavemente sobre placas de Petri estériles que contenían agar papa dextrosa (PDA) o medio selectivo para *Trichoderma* (TSM). Cada placa con PDA o TSM recibió cuatro fragmentos de talo y fue incubada a temperatura ambiente (aprox. 23 °C). El ensayo de impresión y el procedimiento de aislamiento se realizaron simultáneamente en placas separadas. Las placas fueron monitoreadas cada 24 horas durante 72 h bajo un estereomicroscopio. Los fragmentos vegetales que mostraron crecimiento fúngico superficial fueron descartados para el aislamiento de endofitos. Para asegurar el correcto aislamiento de endofitos, los endofitos fúngicos fueron recolectados bajo estereomicroscopio, evitando contaminaciones cruzadas con otros micelios. Cada aislamiento fúngico se transfirió a una nueva placa de Petri con el mismo medio de cultivo.

Se realizaron dos muestreos independientes en los tres sitios durante abril y mayo de 2022, ambos entre 4 y 6 días posteriores a una nevada. Durante el primer muestreo (abril de 2022), la mayoría de los aislamientos correspondieron al género *Mucor*, típicamente descrito como saprótrofo. En ese primer momento, consideramos que su presencia era resultado de contaminación del suelo más que una infección endofítica verdadera, por lo que este primer muestreo fue descartado y procedimos a realizar una segunda recolección en mayo de 2022 en los mismos sitios. El segundo muestreo produjo resultados consistentes con el primero, identificando nuevamente a *Mucor* como el género dominante en plantas silvestres de *M. polymorpha*. Las colonias de *Mucor* se caracterizaron macroscópicamente como masas algodonosas de color blanco a gris, con morfología blanda y expansiva, fácilmente distinguibles de hongos más compactos o pigmentados (Seifert, 2008). Los rasgos de las colonias, incluyendo apariencia, color, textura, altura, presencia de esporangios gris oscuro y color del reverso, se utilizaron para seleccionar aislamientos morfológicamente distintos para su identificación molecular. En consecuencia, se procedió con los análisis moleculares y bioquímicos únicamente sobre este segundo conjunto de muestras.

Análisis de suelo

Se recolectaron dos muestras de suelo por sitio de muestreo. El suelo se tomó del área circundante a los rizoides, a una profundidad de 10 cm desde el punto de extracción de la planta. Se realizaron diversos análisis, incluyendo la determinación potenciométrica del pH en agua (Thomas, 1996); la conductividad eléctrica (CE) mediante la relación suelo:agua; la extracción con acetato de amonio neutro 1 N para medir potasio (K) intercambiable y más soluble (Thomas, 1996); la mineralización por digestión seca para fósforo total (P total) (Carter & Gregorich, 2007); la extracción con solución tampón alcalina (0.5 N NaHCO₃) para fósforo extraíble (P-Olsen) (Thomas, 1996); y la determinación de carbono total (C) y nitrógeno total (N) mediante un analizador carbono-nitrógeno, con combustión a 900 °C, utilizando el equipo Thermo Electron Corporation NC Soil Analyzer Flash EA 1112 (Thomas, 1996).

Identificación de aislamientos fúngicos a partir de cultivos puros

Los aislamientos correspondieron a cepas fúngicas individuales obtenidas en cultivo puro. Por lo tanto, las secuencias *internal transcribed spacer* (ITS) derivadas de estos aislamientos proporcionaron información directa a nivel de especie, en lugar de unidades definidas computacionalmente. El ADN se extrajo a partir de aislamientos fúngicos puros utilizando un protocolo modificado para tejido vegetal con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Bethesda, EE. UU.). Usando PCR se amplificó un fragmento del gen de ARN ribosomal que incluye la región ITS, utilizando los *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White, 1990). El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 27 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 55 °C (alineamiento) y 1 min a 72 °C (extensión), con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los amplicones fueron secuenciados por Celemics, y los aislamientos fúngicos se identificaron comparando las secuencias ITS1-ITS4 con la base de datos GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, consultada el 2 de febrero de 2024).

Extracción de ADN total de plantas de *M. polymorpha* y análisis de metabarcoding

Los fragmentos de talo de *M. polymorpha* esterilizados superficialmente fueron congelados rápidamente en tubos estériles de 1.5 ml y se almacenaron a -80 °C. Los talos congelados fueron molidos en tubos de 1.5 ml utilizando un molinillo Retsch, con tres ciclos de 30 segundos a 30 Hz. El ADN total se extrajo utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Bethesda, EE. UU.), siguiendo el protocolo del fabricante. Para

caracterizar la microbiota fúngica, se amplificó la región ITS3-ITS4 (ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Liu et al., 2021), que proporciona una alta resolución taxonómica debido a su variabilidad entre especies. Para el análisis comparativo, se incluyeron tanto muestras de campo (Sitios 1–3) como controles (WT) de plantas de *M. polymorpha* Tak-1 mantenidas en placas de Petri bajo condiciones estériles. Las muestras fueron preparadas por el servicio de secuenciación de MacroGen Inc. (Seúl, Corea) siguiendo el flujo de trabajo estándar para bibliotecas NGS y secuenciadas en una plataforma Illumina. La secuenciación paired-end (2 × 250 bp) fue realizada por MacroGen Inc. (Corea del Sur). Todas las muestras presentaron un índice Q30 superior al 75%, indicando que la mayoría de las lecturas tuvo valores Phred ≥ 30 (probabilidad de error $< 0,1\%$), y por lo tanto una alta calidad general de secuenciación. Para el análisis de datos, se replicó un flujo de trabajo ya publicado para el análisis de amplicones y metagenómica de microbiomas (Liu et al., 2021). Inicialmente, las lecturas se unieron y se eliminaron los códigos de barras y *primers*, seguidos por una evaluación de calidad de las secuencias crudas mediante FastQC (Andrews, 2010). Posteriormente, se aplicaron procedimientos estrictos de descontaminación, utilizando métodos basados en alineamiento de secuencias (Bowtie 2) para identificar y eliminar secuencias asociadas a la planta hospedadora, minimizando interferencias en los análisis posteriores (Langmead y Salzberg, 2012). La eliminación de ruido se realizó con el algoritmo DADA2 (Callahan et al., 2016), se eliminaron secuencias quiméricas y la asignación taxonómica se efectuó utilizando la base de datos UNITE ITS para hongos (v9, octubre de 2022). El análisis se centró en variantes de secuencia de amplicón (ASVs, del inglés *amplicon sequence variants*), que permiten una resolución elevada al inferir variantes exactas de secuencia sin imponer umbrales de similitud, a diferencia de los enfoques basados en OTUs (del inglés *operational taxonomic units*). Los datos obtenidos se compararon con bases de datos de referencia (incluyendo GenBank) para identificar las ASVs fúngicas presentes y evaluar la composición del consorcio fúngico. Las asignaciones finales se validaron frente a NCBI GenBank (consultado entre febrero y junio de 2024). Estos parámetros de filtrado se seleccionaron siguiendo criterios establecidos para el análisis de comunidades microbianas (Bokulich et al., 2013; Davis et al., 2018), equilibrando la retención de señales biológicamente relevantes con la eliminación de ruido técnico. Tras el filtrado de calidad, se retuvieron un total de 1.524 ASVs de alta confianza para los análisis posteriores.

Mediciones de mineralización y solubilización de fósforo (P)

El estudio de la mineralización y solubilización de P se llevó a cabo utilizando medios líquidos según lo descrito previamente (Della Monica et al., 2015). Los cultivos líquidos se

mantuvieron en condiciones controladas a 20 °C en oscuridad, y la disponibilidad de P se evaluó como se describe a continuación. El micelio fúngico fue homogeneizado con agua destilada estéril para obtener una suspensión uniforme. Un volumen de 100 µl de esta suspensión se combinó con medio líquido NBRIP (del inglés *National Botanical Research Institute*) ajustado a pH 6.5 (glucosa 10 g/L, MgSO₄ 0.12 g/L, KCl, MgCl₂·6H₂O 5 g/L y (NH₄)₂SO₄ 0.1 g/L), suplementado con ampicilina. El medio incluyó Ca₃(PO₄)₂ (5 g/L) como fuente inorgánica de P, con cinco réplicas por condición. Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, se filtraron mediante una membrana de celulosa. El sobrenadante resultante se recolectó y almacenó a -20 °C para su análisis posterior. Los niveles de fósforo soluble en los cultivos líquidos fueron determinados siguiendo una metodología ya reportada, utilizando el kit comercial Spectroquant Phosphate-Test (Merck, Darmstadt, Alemania) (Scervino et al., 2010).

Actividad de fosfatasas extracelulares

Las actividades de fosfatasas ácida (pH 5,5) y alcalina (pH 9,0) se determinaron utilizando p-nitrofenilfosfato (PNP) como sustrato en muestras del sobrenadante de los cultivos líquidos (Pawar y Thaker, 2009). Una unidad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima proveniente de un gramo de micelio seco que hidroliza 1 mmol de PNP por minuto, medida en 1 ml de sobrenadante (Figura 4). La liberación de fósforo por UE fue expresada en miligramos de fósforo por UE.

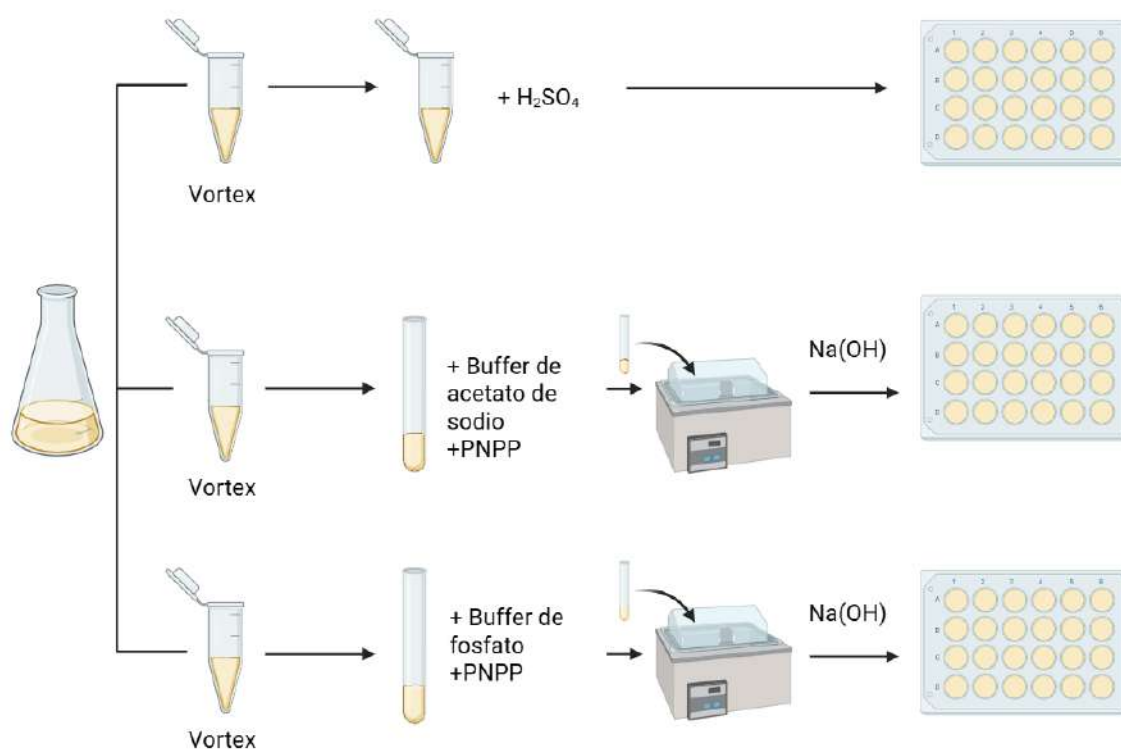


Figura 4. Esquema de los ensayos de actividad fosfatasa y de la medición de fósforo soluble. A partir del filtrado de los cultivos, se evaluó la concentración de fósforo inorgánico soluble a partir del sobrenadante de los cultivos utilizando el kit colorimétrico Spectroquant Phosphate-Test (Merck); y la actividad fosfatasa mediante la hidrólisis de p-nitrofenil fosfato (PNPP) en buffer de acetato de sodio (actividad fosfatasa ácida) o buffer fosfato (Actividad fosfatasa alcalina), seguida de la detención de la reacción con NaOH y la posterior lectura de fenolfosfato (PNP) utilizando un espectrofotómetro.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en RStudio (versión 4.0.2). Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA, del inglés *Analysis of Variance*) para evaluar diferencias en la actividad de fosfatasas entre los aislamientos fúngicos, seguido de la prueba de rangos múltiples de Tukey para comparaciones *post hoc* a distintos niveles de significancia ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.0001$). Para datos que no siguieron una distribución normal (solubilización de fósforo), se aplicó la prueba de Kruskal–Wallis seguida de un test *post hoc* de Dunn con corrección de Bonferroni ($p < 0.05$). Se calculó el índice de diversidad de Shannon utilizando el paquete Vegan (Oksanen et al., 2012). El índice de Shannon se comparó entre los sitios de muestreo mediante un ANOVA de una vía, considerando significancia estadística en $p < 0.05$ (Shannon, 1948).

Resultados

Comunidades fúngicas endofíticas asociadas a niveles de antropización

Para evaluar el impacto de la antropización, caracterizamos las comunidades fúngicas de poblaciones silvestres de la hepática modelo *M. polymorpha* en tres sitios con distintos niveles de perturbación ($S1 > S2 > S3$). Dado que las subespecies de *M. polymorpha* y la especie estrechamente relacionada *M. paleacea* pueden coexistir, confirmamos la identidad taxonómica de nuestras muestras mediante la secuenciación de una región polimórfica del gen *CCaMK* (Radhakrishnan et al., 2020). Los resultados de la secuenciación confirmaron que todas las plantas recolectadas pertenecían a *M. polymorpha* subsp. *polymorpha* (Figura 5). Si bien la mayoría de los polimorfismos nucleotídicos estuvieron conservados entre subespecies, el alineamiento de secuencias reveló características diagnósticas clave: 1) la presencia de una delección de 8 nucleótidos característica de *M. paleacea* (flecha roja); y 2) dos polimorfismos específicos de *M. polymorpha* subsp. *polymorpha* (flecha azul).



Figura 5. Confirmación genética de la planta hospedadora. Alineamiento de secuencias de un fragmento del gen *CCaMK* proveniente de los controles y de las muestras silvestres. Se indican las características diagnósticas clave: una delección característica de 8 nucleótidos en *M. paleacea* (flecha roja) y dos polimorfismos exclusivos de *M. polymorpha* subsp. *polymorpha* (flechas azules). Todas las muestras recolectadas en campo (S1–S3) fueron confirmadas genéticamente como *M. polymorpha* subsp. *polymorpha*. Véanse los Métodos para los detalles de las condiciones de PCR

Se prepararon talos de *M. polymorpha* esterilizados superficialmente y se confirmó la eficacia de la esterilización mediante un ensayo de impresión (véase Materiales y Métodos). A partir de talos esterilizados de los tres sitios de muestreo, se aislaron un total de 144 endofitos fúngicos. De ellos, 48 aislamientos fueron morfológicamente distintos (18 del Sitio 1, 16 del Sitio 2 y 14 del Sitio 3) y se identificaron mediante PCR seguida de la secuenciación de la región ITS1–ITS4. El análisis de secuencias reveló 22 aislamientos fúngicos únicos, con 15 aislamientos en el Sitio 1, 7 en el Sitio 2 y 4 en el Sitio 3. Algunos aislamientos fueron compartidos entre sitios (Figura 6). Solo siete aislamientos se obtuvieron

en más de un sitio, como *Rhizopus* sp. y *Mucor circinelloides*, ambos pertenecientes al *Phylum* Mucoromycota, identificados en los Sitios 1 y 2. Varios aislamientos se recuperaron exclusivamente en un único sitio, como *Alternaria* en el Sitio 1, *Trichoderma atroviride* en el Sitio 2 y *Mucor racemosus* en el Sitio 3. *Mucor hiemalis* fue el único aislamiento presente en los tres sitios de muestreo. En contraste, los demás aislamientos fúngicos fueron específicos de cada sitio, con 12 exclusivos del Sitio 1, cuatro del Sitio 2 y tres del Sitio 3 (Figura 6).

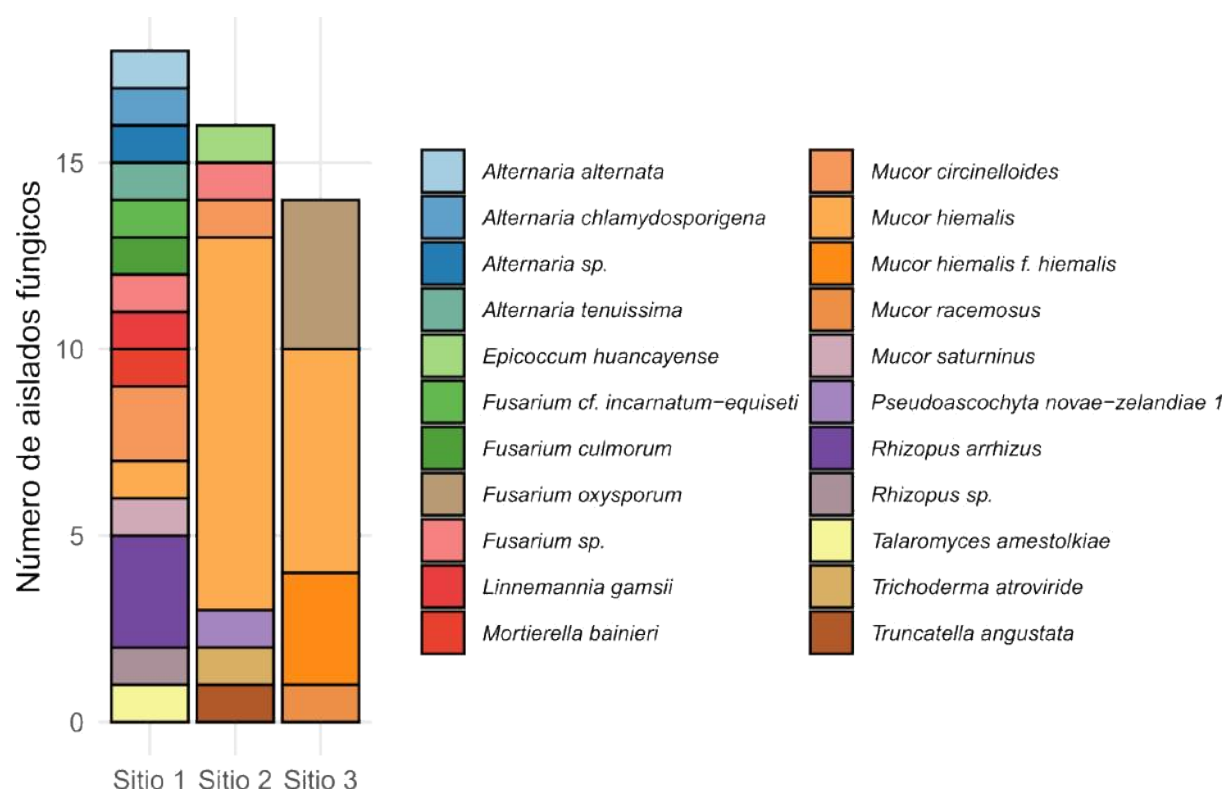
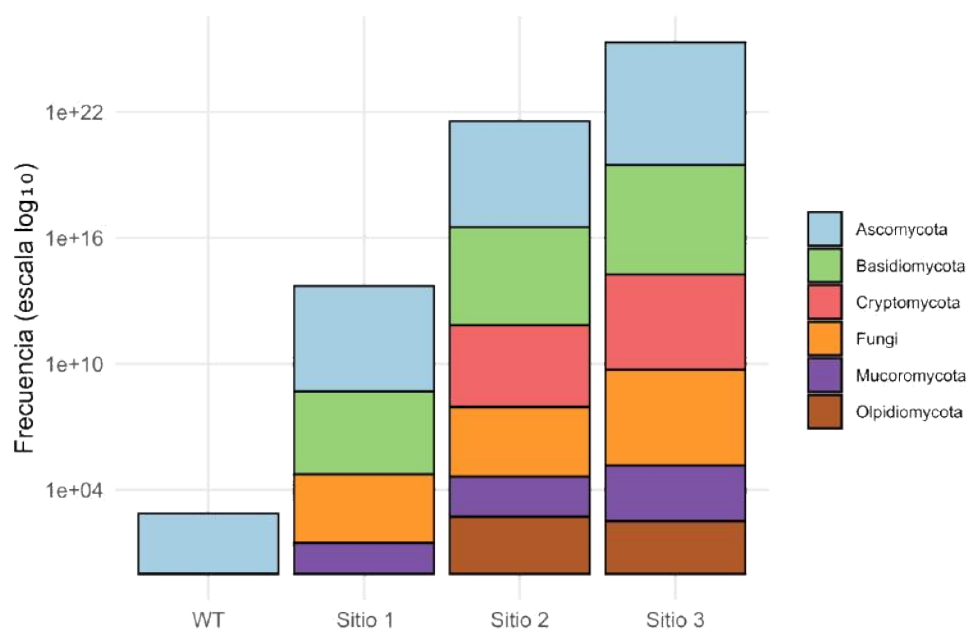


Figura 6. Hongos endofíticos aislados de *M. polymorpha* recolectadas en diferentes sitios de muestreo. El gráfico cuantifica los aislamientos fúngicos por sitio de muestreo. La identificación molecular mediante secuenciación ITS permitió la clasificación taxonómica, aunque la resolución varió desde nivel de género hasta especie, dependiendo de la calidad de la secuencia, el porcentaje de identidad y las coincidencias con bases de datos de referencia en NCBI. Cabe destacar que algunos aislamientos que presentaban diferencias morfológicas fueron identificados genéticamente como conespecíficos.

A



B

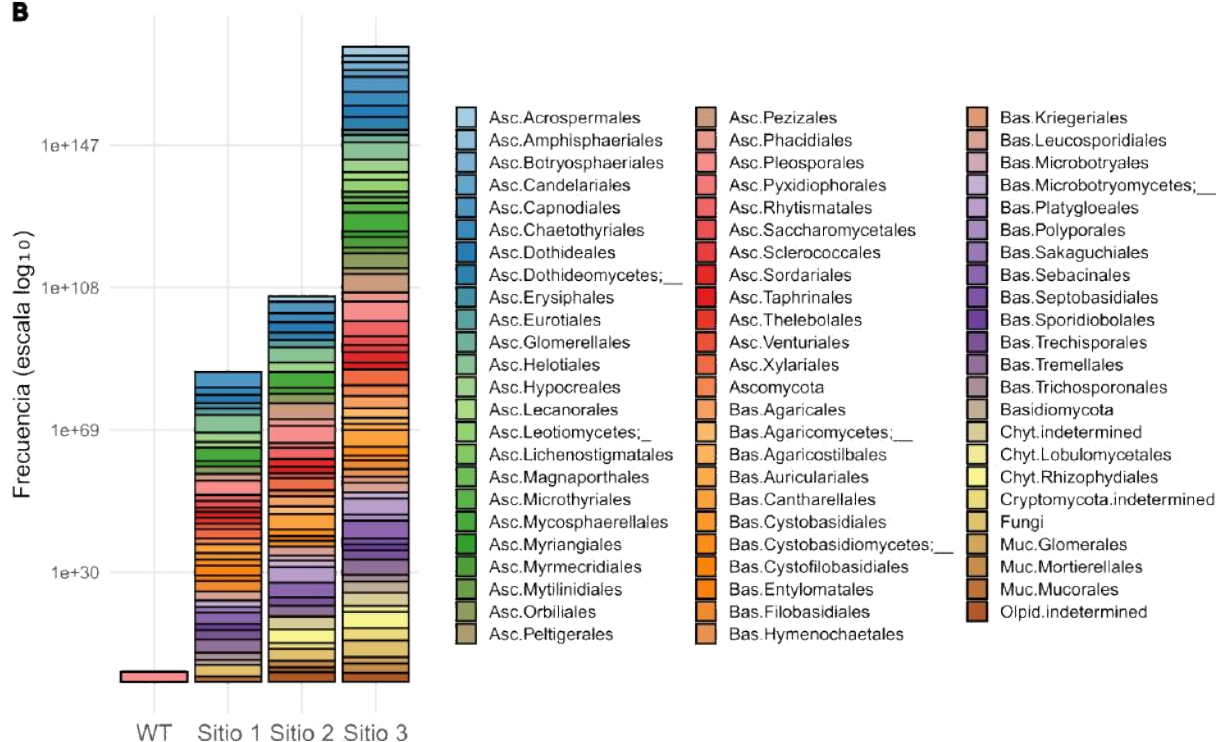


Figura 7. Composición de la comunidad fúngica determinada mediante secuenciación de alto rendimiento de la región polimórfica ITS3–ITS4. Los gráficos muestran las frecuencias absolutas de las variantes de secuencia de amplicón (ASVs) en escala log₁₀, a distintos niveles taxonómicos (*Phylum* u orden), para muestras recolectadas en tres sitios de campo, así como para plantas de *M. polymorpha* Tak-1 (WT, del inglés *wild type*) cultivadas en laboratorio bajo condiciones axénicas. A) Frecuencias de ASVs clasificadas a nivel de *Phylum*. B) ASVs clasificadas a nivel de orden. En la leyenda, el prefijo Asc. se refiere a Ascomycota, Bas. a Basidiomycota, Chyt. a Chytridiomycota, Muc.

a Mucoromycota y Olpid. a Olpidiomyota. En ambos paneles, el eje Y representa la frecuencia en una escala $\log_{10}$ para facilitar la visualización de categorías de baja abundancia. En ambos paneles, la categoría Fungi representa lecturas que no pudieron asignarse a un *Phylum* u orden específico por el análisis bioinformático.

La secuenciación de alto rendimiento de la región polimórfica ITS3–ITS4 se realizó sobre ADN total extraído de talos de *M. polymorpha* esterilizados superficialmente, con el objetivo de identificar las comunidades fúngicas endofíticas de tres sitios de campo (Sitios 1–3) y en plantas de *M. polymorpha* Tak-1 (WT) cultivadas en laboratorio bajo condiciones axénicas. La secuenciación metagenómica (Figura suplementaria 1) reveló una comunidad fúngica altamente diversa, que abarca múltiples *Phyla* y órdenes en los tres sitios. La figura 7 muestra las frecuencias absolutas de las ASVs a nivel de orden (escala $\log_{10}$), destacando la amplitud taxonómica detectada. La composición del consorcio estuvo dominada por miembros de Ascomycota (los cuatro órdenes más abundantes fueron Pleosporales, Mycosphaerellales, Helotiales y Pezizales) y Basidiomycota (principalmente de los órdenes Sebaciniales, Cantharellales y Platygloeales), que en conjunto representaron >95 % del total de secuencias (Figura 7A). Chytridiomycota, Cryptomycota y Mucoromycota se detectaron en abundancias menores (<5 % combinadas) (Figura 7A). En contraste, los controles WT cultivados en laboratorio presentaron muy pocas lecturas correspondientes únicamente a dos taxones de Ascomycota (*Pseudoaschochyta* y *Epicoccum*), ambos también identificados en el Sitio 2 (Figura 7B). Dado que las plantas control cultivadas en laboratorio no mostraron síntomas de colonización fúngica, las secuencias detectadas en baja abundancia podrían representar (i) artefactos técnicos derivados de la secuenciación o del procesamiento bioinformático, o (ii) contaminación ambiental residual, como esporas aéreas introducidas durante la recolección.

El número total de pares de bases aumentó progresivamente en el siguiente orden: WT, Sitio 1, Sitio 2 y Sitio 3 (52,7; 71,8; 73,8 y 101,9 Mb, respectivamente), lo que sugiere una mayor carga microbiana en el Sitio 3, observación que también se ve respaldada por el incremento de lecturas coincidentes con secuencias ITS fúngicas. Adicionalmente, el contenido de GC disminuyó a lo largo de este gradiente (62.1; 60.9; 59 y 50.1 %GC, respectivamente), reforzando esta interpretación. El análisis mostró un aumento progresivo en el número de órdenes detectados por muestra, que varió desde 2 en WT hasta 39 en el Sitio 1, 42 en el Sitio 2 y 63 en el Sitio 3.

De manera notable, las ASVs recuperadas de talos silvestres de *M. polymorpha* revelaron un microbioma diverso que incluyó tanto taxones saprofiticos como varios géneros que, en otros hospedadores, suelen comprender patógenos asociados a plantas. Entre los géneros

detectados con cepas patogénicas conocidas se encontraron *Alternaria*, *Cercospora*, *Leptosphaeria*, *Phaeosphaeria*, *Plenodomus*, *Neoascochyta*, *Pyrenochaetopsis*, *Neofabraea* y *Fusarium*. Si bien no se realizaron ensayos de patogenicidad y el rol de estos taxones en el microbioma de *M. polymorpha* permanece desconocido, su presencia pone de manifiesto el potencial de las hepáticas para albergar hongos de relevancia para la sanidad vegetal en ecosistemas agrícolas y naturales.

La diversidad fúngica se evaluó mediante enfoques dependientes de cultivo y de *metabarcoding*, utilizando el índice de diversidad de Shannon, que incorpora la abundancia de especies para proporcionar una medida integral de la diversidad (Konopiński, 2020; Shannon, 1948). Tal como se esperaba a partir de las figuras, el índice de Shannon reveló tendencias contrastantes en cada caso. En el método basado en cultivos (Figura 6), el Sitio 1 presentó el valor más alto del índice de Shannon (2.63), mientras que los Sitios 2 y 3 mostraron valores más bajos y similares (1.33 y 1.24, respectivamente) (Tabla 1). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre el Sitio 1 y los Sitios 2 ($p < 0.0007$) y 3 ($p < 0.001$), mientras que no se observaron diferencias significativas entre los Sitios 2 y 3 ($p = 0.8435$; Tabla 1). Por el contrario, los datos de *metabarcoding* a nivel taxonómico de orden (Figura 7B) mostraron el patrón opuesto, con un aumento de la diversidad a lo largo del gradiente de perturbación: Sitio 3 > Sitio 2 > Sitio 1 (Figura 7B; Tabla 2). Este resultado refleja diferencias robustas en la diversidad de órdenes taxonómicos entre los sitios de muestreo (Figura 7B), al tiempo que pone de manifiesto la dependencia metodológica de las estimaciones de diversidad.

Tabla 1. Diversidad de endofitos fúngicos cultivables y número de taxones detectados por sitio. (Indicá: Sitio 1 = urbano; Sitio 2 = vivero; Sitio 3 = bosque natural.

	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
Cepas aisladas	15	7	4
Individuos	18	16	14
Índice de Shannon	2.63	1.33	1.24

Tabla 2. Riqueza de órdenes (ASVs), número de secuencias individuales e índice de diversidad de Shannon asociados a *M. polymorpha*. WT corresponde a la muestra control, mientras que Sitio 1, Sitio 2 y Sitio 3 representan los sitios naturales de muestreo. El índice de Shannon se calculó utilizando el paquete Vegan en RStudio (Oksanen et al., 2012).

	WT	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
Orden de ASVs	1	38	42	62
Individuos	760	116370	171670	940380
Índice de Shannon	0.01	1.43	2.28	2.34

La comparación de los endofitos fúngicos obtenidos mediante los enfoques de cultivo y *metabarcoding* mostró diferencias marcadas. Esta comparación resalta el escaso solapamiento entre los aislamientos cultivables y la diversidad más amplia capturada por el *metabarcoding*, al tiempo que identifica miembros de los principales grupos fúngicos, como Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycota. La combinación de aislamientos fúngicos derivados de talos y de enfoques de secuenciación permitió además identificar taxones fúngicos distintos, incluyendo representantes de Cryptomycota y Olpidiomyxota en los Sitios 2 y 3.

Caracterización fisicoquímica del suelo en cada sitio de muestreo

Dado que las propiedades del suelo pueden verse alteradas por actividades antropogénicas, planteamos la hipótesis de que estos cambios pueden afectar tanto al talo de la planta hospedadora como a su comunidad de endofitos fúngicos asociada. Por lo tanto, se caracterizaron los parámetros fisicoquímicos del suelo en cada sitio de muestreo. Mientras que algunos factores, incluyendo el pH, la conductividad eléctrica, el potasio (K) y el nitrógeno (N), se mantuvieron constantes entre los sitios, los parámetros relacionados con el fósforo mostraron variaciones marcadas (Tabla 3). El fósforo total (P total) fue mayor en los suelos de los Sitios 2 y 3 en comparación con los niveles más bajos observados en el Sitio 1. En contraste, el fósforo Olsen (P-Olsen), que representa el fósforo extraíble disponible para la absorción por las plantas, fue más bajo en el Sitio 3, mientras que se mantuvo similar en los Sitios 1 y 2.

Tabla 3. Resumen de las propiedades fisicoquímicas del suelo de los tres sitios de muestreo. Esta tabla destaca las variaciones en nutrientes y propiedades edáficas clave que podrían influir en la composición de la comunidad fúngica en cada sitio. Los parámetros medidos incluyen pH, conductividad eléctrica (CE, en dS/m), potasio (K, en g/kg), fósforo total (P total, en mg/kg), fósforo extraíble (P-Olsen, en mg/kg), contenido de carbono (C, en g/kg) y contenido de nitrógeno (N, en g/kg).

	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
pH	6.40	6.50	6.40
CE (dS/m)	0.22	0.21	0.19
K (g/Kg)	0.03	0.03	0.10
P (mg/Kg)	260	452	437
P-Olsen (mg/Kg)	12	13	6.2
C (g/Kg)	23	24	29
N (g/Kg)	1.8	1.8	2.1

Caracterización de la capacidad de mineralización y solubilización de fósforo para cada aislamiento fúngico

Para examinar las actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del fósforo en los aislamientos fúngicos, se midieron las actividades de fosfatasa ácida y alcalina. Los cultivos líquidos se inocularon con cada aislamiento fúngico para cuantificar los procesos de mineralización de fósforo. Los ensayos de actividad fosfatasa (Figuras 8 y 9) revelaron diferencias claras en las actividades de fosfatasa ácida y alcalina entre los aislamientos fúngicos, con variaciones evidentes dependiendo del sitio de muestreo.

Al medir la actividad de fosfatasa ácida, varios aislamientos fúngicos provenientes del Sitio 1 exhibieron valores superiores a 0.004 mg/mL, destacándose *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus* sp. y *Talaromyces amestolkiae* como los que presentaron las mayores actividades (Figura 8). En contraste, sólo *Pseudoaschochyta novae-zelandiae* del Sitio 2 alcanzó niveles enzimáticos comparables, seguida de cerca por *Fusarium* sp. (Figura 8). Los aislamientos fúngicos del Sitio 3 no mostraron actividad de fosfatasa ácida detectable (Figura 8). Es

destacable que, en todos los sitios de muestreo, la mayoría de los aislamientos presentó actividades de fosfatasa ácida reducidas o no detectables (Figura 8).

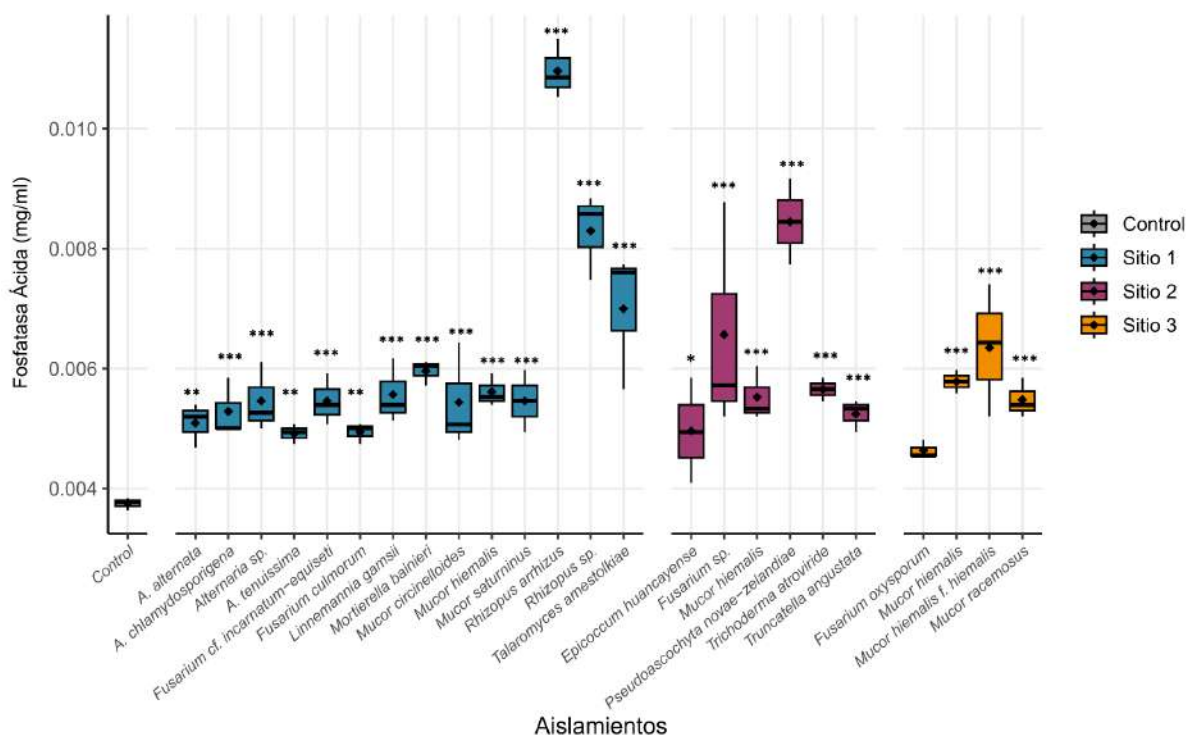


Figura 8. Actividad de fosfatasa ácida de los aislamientos fúngicos separada por sitio de muestreo. Los aislamientos fúngicos evaluados según su actividad enzimática se muestran en el eje X, separados según el sitio de muestreo (Sitio 1, 2 y 3). Los diagramas de caja representan la distribución de las mediciones replicadas para cada aislamiento, agrupadas por sitio (Control en gris, Sitio 1 en azul, Sitio 2 en violeta y Sitio 3 en naranja). La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana, las líneas señalan el rango, y el rombo negro corresponde a la media. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control (línea base). Todos los análisis estadísticos se realizaron en RStudio. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar las diferencias entre aislamientos fúngicos, seguido de la prueba de rangos múltiples de Tukey para las comparaciones *post hoc*, con niveles de significancia de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (***).

En contraste, la actividad de fosfatasa alcalina fue, en general, más elevada que la de fosfatasa ácida, alcanzando valores máximos de hasta 0.02 UE, frente a 0.008 UE registrados para las fosfatasas ácidas. De manera similar a lo observado para la fosfatasa ácida, los aislamientos provenientes del Sitio 1 exhibieron la mayor actividad de fosfatasa alcalina, destacándose *Rhizopus arrizus*, *Rhizopus sp.* y *Talaromyces amestolkiae* entre los

más activos. Adicionalmente, *Mortierella bainieri*, *Alternaria* sp. y *Alternaria alternata* también mostraron una actividad de fosfatasa alcalina relevante (Figura 9).

Varios aislamientos del Sitio 2, incluyendo *Pseudoascochyta novae-zelandiae*, *Fusarium* sp., *Truncatella angustata* y *Epicoccum huancayense*, presentaron actividad de fosfatasa alcalina medible (Figura 9). Sin embargo, en el Sitio 3, únicamente *Mucor racemosus* exhibió actividad de fosfatasa alcalina (Figura 9).

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la diversidad relacionada al metabolismo del fósforo de los aislamientos fúngicos. La fuerte actividad enzimática observada en determinados taxones fúngicos sugiere un rol potencial en la mineralización del fósforo, probablemente influenciado por las condiciones ambientales y los factores antropogénicos.

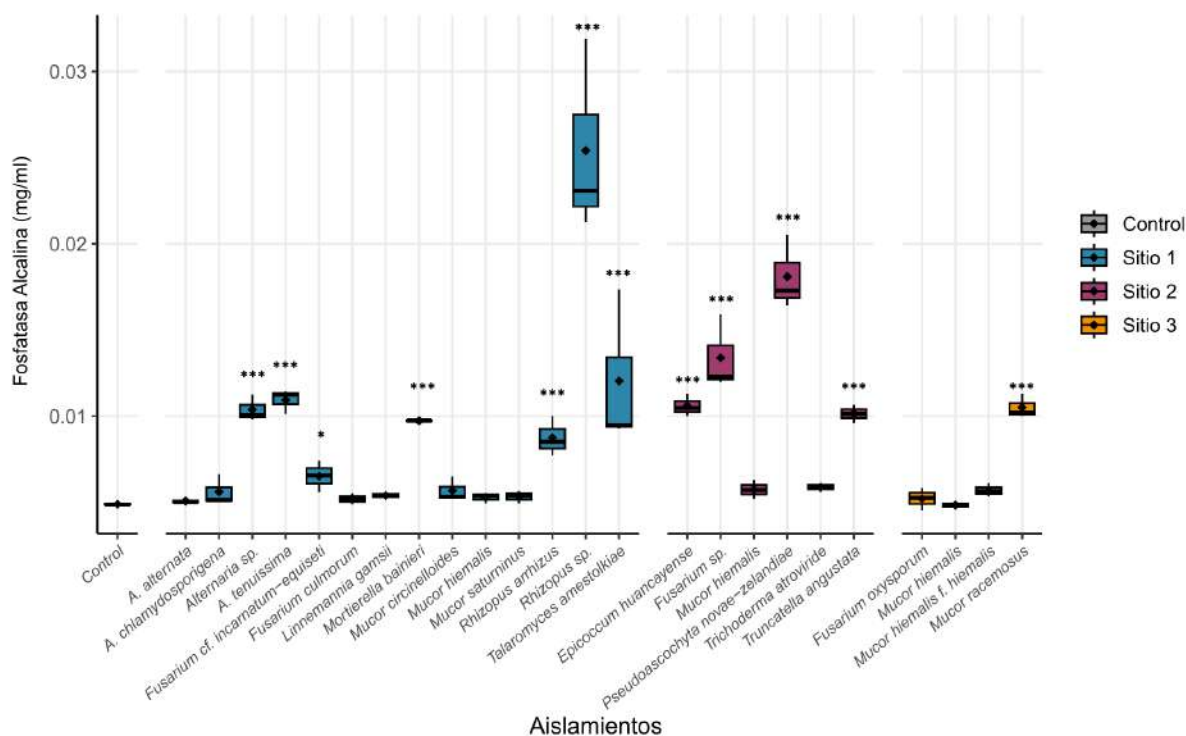


Figura 9. Actividad de fosfatasa alcalina (mg/ml) medida en aislamientos fúngicos obtenidos de los tres sitios de muestreo. Los diagramas de caja muestran la distribución de las mediciones replicadas para cada aislamiento, agrupadas por sitio (Control en gris, Sitio 1 en azul, Sitio 2 en violeta y Sitio 3 en naranja). La línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana, las líneas indican el rango, y el rombo negro corresponde a la media. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control (línea base). Todos los análisis estadísticos se realizaron en RStudio. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar las diferencias entre

aislamientos fúngicos, seguido de la prueba de rangos múltiples de Tukey para las comparaciones *post hoc*, con niveles de significancia de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (***).

Para evaluar la capacidad de solubilización de fósforo de los aislamientos fúngicos, se midió su habilidad para solubilizar fósforo inorgánico (P). Los cultivos líquidos fueron inoculados con cada aislamiento fúngico para cuantificar los procesos asociados a la solubilización de fósforo. De manera notable, tras tres días de incubación, algunos cultivos se tornaron visiblemente más claros (Figura Suplementaria 2), lo que indica una solubilización activa del fósforo inorgánico. Esta observación visual fue corroborada por un aumento significativo del fósforo soluble, determinado mediante un ensayo colorimétrico (Figura 10).

El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($p < 0.05$) en la capacidad de solubilización entre los aislamientos. En el Sitio 1 (Figura 10), *Rhizopus* sp., *Rhizopus arrhizus* y *Talaromyces amestolkiae* exhibieron los niveles más altos de solubilización. En el Sitio 2 (Figura 10), *Fusarium* sp. y *Pseudoascochyta novae-zelandiae* superaron significativamente al resto de los aislamientos. En contraste, los aislamientos fúngicos del Sitio 3 (Figura 10) no modificaron la fracción soluble de fósforo inorgánico, lo que indica una ausencia de actividad de solubilización en este grupo.

En conjunto, los valores de solubilización sugieren que ciertas especies fúngicas presentan una mayor capacidad para liberar fósforo, destacando su rol potencial en el ciclado de nutrientes. En particular, los aislamientos de los géneros *Rhizopus* y *Fusarium* mostraron capacidades de solubilización diferenciadas, lo que podría reflejar estrategias metabólicas específicas para la liberación de fósforo o, alternativamente, diferencias en la regulación e intensidad de procesos metabólicos compartidos, como el tipo y la cantidad de ácidos orgánicos liberados, la dinámica de su secreción u otros factores fisiológicos que influyen en la reducción del pH y la movilización del fósforo.

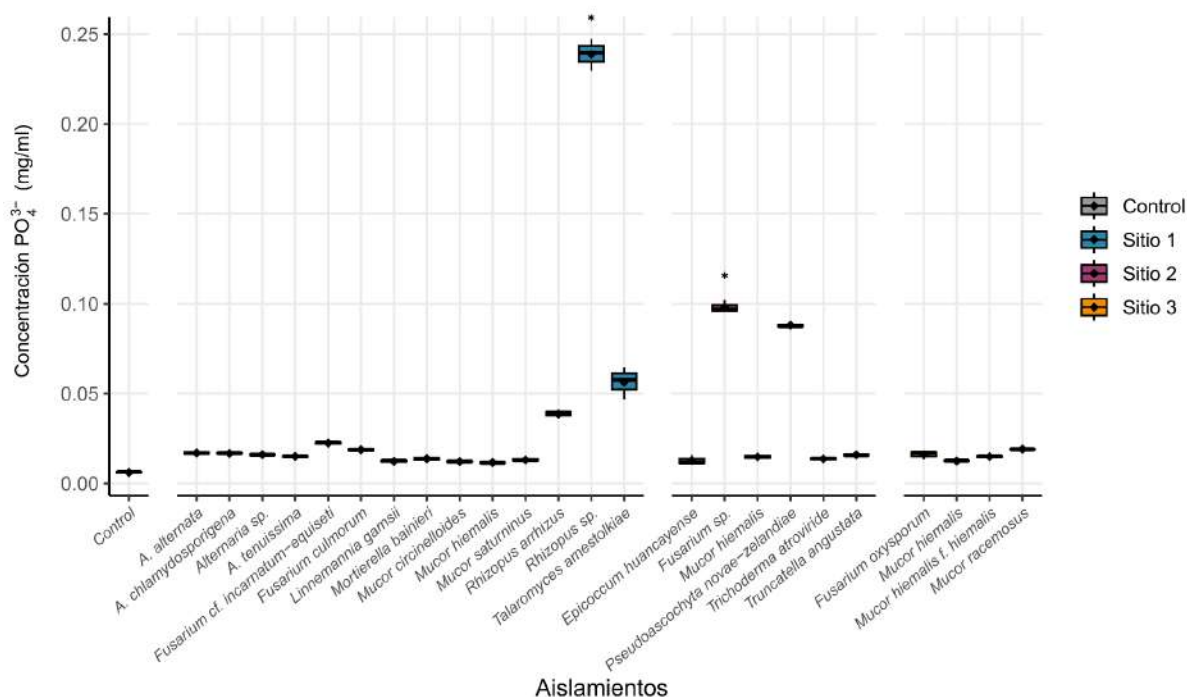


Figura 10. Solubilización de fósforo por aislamientos fúngicos individuales provenientes de diferentes sitios de muestreo. Todos los aislamientos fúngicos evaluados por su actividad se muestran en el eje X, separados según el sitio de muestreo (Sitio 1, 2 y 3). Los diagramas de caja representan la distribución de las mediciones replicadas para cada aislamiento, agrupadas por sitio (Control en gris, Sitio 1 en azul, Sitio 2 en violeta y Sitio 3 en naranja). La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana, las líneas señalan el rango, y el rombo negro corresponde a la media. Para evaluar las diferencias en la solubilización de fósforo entre los aislamientos fúngicos se utilizó la prueba de Kruskal–Wallis, seguida de la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni para las comparaciones *post hoc*, con un nivel de significancia de $p < 0.05$ (*). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control (línea base). Todos los análisis estadísticos se realizaron en RStudio.

Discusión

La disponibilidad de fósforo en el suelo es un factor crítico para el crecimiento vegetal y está influenciada por una compleja interacción entre las propiedades del suelo, las especies vegetales, los microorganismos asociados y las condiciones ambientales (Shen et al. 2011; Siles et al. 2014). Nuestros resultados contribuyen a la idea general de que las actividades antropogénicas alteran la disponibilidad de fósforo, actuando potencialmente como una fuerza selectiva que influye en la estructura y función de las comunidades fúngicas del suelo. En nuestros sitios de estudio, los análisis de suelo indicaron que las actividades humanas se

asociaron con un aumento de la disponibilidad de fósforo (P-Olsen, Tabla 3), un fenómeno consistente con observaciones realizadas en otros paisajes modificados por el ser humano (Goyette et al. 2016). Está claramente establecido que los microorganismos son impulsores clave de la dinámica de nutrientes, ya que incrementan la biodisponibilidad de minerales poco solubles como el fósforo mediante acciones enzimáticas y la producción de ácidos orgánicos (Della Monica et al. 2015; Scervino et al. 2010). Mientras que las plantas vasculares han evolucionado estrategias sofisticadas para mejorar la captación de fósforo, frecuentemente estableciendo asociaciones especializadas con microorganismos como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la interfaz raíz-suelo (Etesami et al. 2021), la naturaleza y la relevancia ecofisiológica de asociaciones microbianas análogas en briófitas, incluidas las hepáticas, siguen siendo poco comprendidas (Catania et al. 2025; Kelly et al. 2024; Rimington et al. 2020; Rimington et al. 2018; Valdés et al. 2023).

Sobre esta base, nuestro estudio aporta evidencia exploratoria de que la comunidad de endofitos fúngicos en *M. polymorpha* está estrechamente vinculada a las características locales del suelo, en particular a la disponibilidad de fósforo. Observamos que tanto la riqueza como el perfil funcional de estos hongos parecen responder a los niveles de nutrientes del suelo, lo que podría estar asociado al impacto antropogénico de cada sitio. En concreto, los sitios con mayor perturbación humana tendieron a presentar niveles más altos de fósforo fácilmente disponible (Tabla 3), un patrón que coincidió con una menor diversidad de hongos cultivables capaces de movilizar fósforo (Figuras 6–10, Tabla 3). Esto concuerda con tendencias más amplias observadas en otros ecosistemas, donde los cambios en el uso del suelo, como la deforestación, la agricultura intensiva y la fertilización, tienden a incrementar los niveles de fósforo del suelo al modificar su estructura y dinámica de nutrientes (Qin et al. 2020; Shi et al. 2019; Wright et al. 2024). Sin embargo, este enriquecimiento suele conducir a descensos marcados en la diversidad fúngica, en particular entre hongos saprótrofos y micorrízicos, incluidos taxones clave solubilizadores de fósforo como *Penicillium* sp. (Ma et al. 2022). El fósforo elevado puede alterar la composición de las comunidades fúngicas, favoreciendo especies competitivas o incluso patógenas por sobre mutualistas beneficiosos, y modificar la complejidad de las redes fúngicas, dando lugar a comunidades microbianas del suelo más simples y menos resilientes (Liu et al. 2018; Ma et al. 2020). Estos cambios pueden reducir la eficiencia del ciclado de nutrientes y comprometer interacciones planta-hongo esenciales para la recuperación de los ecosistemas, amenazando en última instancia su estabilidad y sostenibilidad (Ma et al. 2020; Widdig et al. 2020).

Si bien no validamos experimentalmente el potencial patogénico de los ASVs o de los aislamientos fúngicos, resulta notable que algunos de los géneros endofitos detectados,

como *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium* (también aislado por cultivo) y *Plenodomus*, están comúnmente asociados con importantes enfermedades foliares o radiculares. La presencia de estos taxones plantea la posibilidad de que las hepáticas contribuyan al mantenimiento y la dispersión de patógenos en ecosistemas naturales o agrícolas. Desde una perspectiva ecológica y evolutiva, la detección de taxones potencialmente patógenos en hepáticas respalda la hipótesis de que las interacciones planta - patógeno tienen una historia evolutiva profunda. Las hepáticas podrían actuar como reservorios a largo plazo que preservan linajes fúngicos a través del paisaje y de las estaciones, sirviendo como fuentes potenciales de inóculo que influyen en la dinámica de enfermedades de plantas vasculares. Aunque estas hipótesis exceden el alcance de este estudio, nuestros resultados sugieren líneas futuras de investigación sobre los roles ecológicos y la relevancia de los hongos asociados a hepáticas.

Asimismo, nuestro estudio reveló un contraste marcado con un relevamiento previo a gran escala de *M. polymorpha* realizado en múltiples sitios de Canadá y Estados Unidos (Nelson et al. 2018). En ese trabajo no se obtuvieron aislamientos de *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* ni *Trichoderma*, y sólo se detectaron OTUs de *Alternaria* y *Penicillium* en baja abundancia mediante secuenciación de amplicones. En contraste, en nuestro muestreo en bosques patagónicos logramos aislar representantes de los cuatro géneros. Esta discrepancia podría reflejar diferencias biogeográficas en la composición de las comunidades fúngicas entre América del Norte y la región andina austral, así como efectos de condiciones ambientales locales como el clima, la microbiota del suelo y la estructura de la vegetación. Obviamente, no descartamos que haya factores metodológicos también puedan contribuir a las diferencias observadas entre ambos estudios, relacionadas a diferencias en los medios de cultivo, los procedimientos de aislamiento o la estrategia de muestreo, que pudieron favorecer la recuperación de ciertos géneros de crecimiento rápido. En conjunto, estos resultados destacan la importancia de los estudios regionales para capturar el espectro completo de endofitos fúngicos asociados a *M. polymorpha* y sugieren que esta hepática puede albergar consorcios fúngicos distintos según el contexto geográfico.

De manera destacada, nuestro enfoque combinado de aislamiento dependiente de cultivo y *metabarcoding* reveló un solapamiento limitado en la diversidad fúngica capturada por cada método, un desafío común en ecología microbiana. Aunque miembros de Ascomycota y Basidiomycota se recuperaron tanto por cultivo como por secuenciación de amplicones, con representación menor de Chytridiomycota, Cryptomycota y Mucoromycota, el solapamiento entre los métodos fue reducido para los taxones centrales. Esta discrepancia está bien documentada en la literatura y se atribuye principalmente a la presencia de taxones fúngicos no cultivables (Cuadros-Orellana et al. 2013). La secuenciación de alto rendimiento y la metagenómica revelan una diversidad oculta mucho mayor, que incluye numerosos linajes

nunca cultivados ni descriptos morfológicamente. Por ejemplo, estudios que aplican ambos métodos sobre las mismas muestras suelen encontrar cientos de ASVs mediante secuenciación frente a sólo unas pocas decenas mediante cultivo (Jayawardena et al. 2018; Wijayawardene et al. 2021). El caso de *M. hiemalis*, que dominó la colección de cultivos pero fue raro en los datos de secuenciación, ejemplifica esta discrepancia (Figuras 6 y 7). Su recuperación frecuente en todos los sitios probablemente refleje la influencia de las condiciones de cultivo *in vitro*, que favorecieron su proliferación. Esto subraya el valor de combinar ambos enfoques para obtener una visión más completa de la composición de las comunidades fúngicas.

Además, el comportamiento funcional de las cepas fúngicas aisladas en la solubilización y mineralización de fósforo no fue uniforme. Aunque el número limitado de sitios muestreados impide una confirmación estadística robusta de un patrón dependiente del sitio, observamos tendencias descriptivas. En particular, las cepas aisladas de los sitios más antropizados (S1 y S2) exhibieron mayores actividades promedio de fosfatasas y una mayor capacidad para solubilizar fósforo inorgánico. Esta posible intensificación de la actividad enzimática podría representar una respuesta adaptativa a condiciones ambientales locales, como el aporte de fertilizantes orgánicos y residuos domésticos, que enriquecen los suelos y promueven selectivamente taxones microbianos con capacidades aumentadas de mineralización de nutrientes. Por ejemplo, *Rhizopus arrhizus* mostró baja solubilización de fósforo inorgánico (Figura 10) pero alta actividad de fosfatasa ácida (Figura 9), lo que sugiere una especialización en la hidrólisis de fósforo orgánico. En contraste, cepas como *Talaromyces amestolkiae* y *Fusarium* sp. demostraron tanto una fuerte solubilización como actividad de fosfatasas, indicando una estrategia dual de adquisición de fósforo. *M. hiemalis*, la única especie aislada en los tres sitios, presentó una actividad fosfatasa moderada, lo que resalta un rol más limitado en la mineralización del fósforo en comparación con otros taxones más especializados. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que muestran que la disponibilidad de carbono, nitrógeno y, especialmente, fósforo puede influir significativamente en la actividad microbiana y en la distribución de rasgos funcionales en los suelos (Beauregard et al. 2010).

El aislamiento recurrente de *M. hiemalis* en todos los sitios la convierte en una candidata fascinante para estudios futuros sobre interacciones planta-hongo en briófitas, independientemente del efecto de la antropización. Evidencia creciente indica que miembros del *Phylum* Mucoromycota coevolucionaron tanto con plantas vasculares como no vasculares (Field et al. 2019; Hoysted et al. 2021; Sinanaj et al. 2021), lo que pudo haberles permitido desarrollar una notable flexibilidad en estrategias de absorción de nutrientes. En este contexto, se ha demostrado que la simbiosis entre endofitos Mucoromycota y hepáticas

mejora el acceso al nitrógeno y facilita el retorno de fósforo a bajo costo de carbono para la planta (Field et al. 2019), lo que sugiere un potencial rol mutualista que merece mayor investigación en *M. polymorpha*. Esta posibilidad es ecológicamente relevante dado que *M. polymorpha* ha perdido varios genes centrales de la vía conservada de señalización simbiótica, como *CCaMK*, *CYCLOPS*, *RAD1* y *SymRK*, y en consecuencia, la capacidad de asociarse con micorrizas arbusculares del *Subphylum* Glomeromycotina (Radhakrishnan et al. 2020). Por lo tanto, la asociación de *M. polymorpha* con *M. hiemalis* podría representar una estrategia simbiótica alternativa, planteando la posibilidad de que la pérdida de la simbiosis con micorrizas arbusculares haya creado una oportunidad evolutiva para que otros endofitos fúngicos establezcan mutualismos protectores. A nivel técnico, nuestros resultados también subrayan la importancia crítica de la verificación genética en estudios ecológicos del microbioma para evitar artefactos derivados de la variación genética del hospedador.

Las implicancias ecológicas de estos hallazgos son relevantes para comprender la ecología de las hepáticas. Comunidades microbianas que albergan diversos mecanismos para aumentar la disponibilidad de fósforo pueden mejorar el ciclado global de este nutriente en los ecosistemas. La presencia de especies como *R. arrhizus*, que dependen de la actividad de fosfatasa ácida, podría ser particularmente beneficiosa en ambientes donde predomina el fósforo orgánico. Por el contrario, especies con alta capacidad de solubilización, como *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Pseudoaschochyta novae-zelandiae* y *Talaromyces amestolkiae*, podrían ser más relevantes para plantas que crecen en suelos donde el fósforo mineral es abundante pero insoluble. Estas diferencias sugieren que la composición de las comunidades fúngicas asociadas a *M. polymorpha* está moldeada no solo por la planta hospedadora, sino también por las condiciones nutricionales del entorno. Esto plantea una pregunta fundamental: ¿es la planta el principal selector de sus socios microbianos, o son las condiciones externas de nutrientes las que determinan qué microorganismos logran asociarse con éxito? De manera interesante, desde un punto de vista nutricional, varias cepas fúngicas aisladas del talo estuvieron más consistentemente asociadas a la producción de fosfatasas que a la solubilización directa de fosfato. Esto podría estar vinculado a su estilo de vida endofito especializado, donde la mineralización enzimática del fósforo orgánico constituye una estrategia eficiente de adquisición de nutrientes en estrecha asociación con el hospedador. Esta naturaleza biotrófica podría, por lo tanto, favorecer la hidrólisis enzimática por sobre la solubilización inorgánica, reforzando la idea de que factores internos del hospedador y condiciones ambientales externas moldean conjuntamente la estructura y función del consorcio microbiano.

En conclusión, a pesar de la replicación limitada del gradiente de perturbación, nuestro estudio aporta nuevos conocimientos sobre la complejidad de las estrategias microbianas de

adquisición de fósforo en el microbioma de la hepática modelo *M. polymorpha* y subraya la necesidad de considerar tanto la solubilización de fosfatos como la hidrólisis enzimática al examinar interacciones planta-microorganismo. Los patrones observados sugieren que la perturbación antropogénica afecta a la comunidad de endofitos fúngicos con rasgos potenciados de movilización de fósforo, lo que podría conferir una ventaja adaptativa al hospedador en ambientes alterados. Investigaciones futuras, con diseños experimentales replicados a lo largo de gradientes ambientales más amplios, deberían explorar los determinantes genéticos y ecológicos de estas estrategias funcionales, así como sus impactos más amplios sobre la aptitud de las plantas y el ciclado de nutrientes en distintos tipos de suelo y niveles de impacto humano.

Capítulo 2: Endofitos Mucoromycotina de raíces finas en *Marchantia polymorpha*: evidencia de asociaciones fúngicas en una hepática no hospedadora de micorrizas arbusculares

Introducción

Las simbiosis mutualistas entre plantas y hongos fueron fundamentales para la terrestreización de las plantas y continúan sosteniendo la productividad de los ecosistemas modernos (Pirozynski & Malloch, 1975; Puginier et al., 2022). Entre ellas, la simbiosis micorrízica arbuscular, mediada por hongos Glomeromycotina, es la más extendida, ocurriendo en más del 80% de las plantas terrestres (Bennett & Groten, 2022; van der Heijden et al., 2015). El establecimiento de micorrizas arbusculares, así como de la simbiosis fijadora de nitrógeno en nódulos radiculares de leguminosas, depende de la vía común de señalización de la simbiosis (CSSP del inglés *Common Symbiosis Signaling Pathway*), una vía de señalización conservada que regula el reconocimiento microbiano, la supresión de la inmunidad y la reprogramación transcripcional del hospedador para permitir la infección (Debellé, 2020; Delaux & Schornack, 2021). La CSSP está tan expandida en diferentes linajes que se ha propuesto como una característica del ancestro común de todas las plantas terrestres, y su pérdida en linajes como *Arabidopsis thaliana* y la hepática *Marchantia polymorpha* se correlaciona con la incapacidad de formar simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Radhakrishnan et al., 2020).

Recientemente se describió un nuevo tipo de simbionte fúngico: los endofitos Mucoromycotina de raíces finas (MFRE). Estos hongos establecen asociaciones mutualistas con una amplia variedad de plantas vasculares y no vasculares, facilitando el intercambio bidireccional de nutrientes, como fósforo y nitrógeno, a cambio de compuestos fotosintéticos (Field et al., 2015a; Hoysted et al., 2019, 2023). Basados en que los MFRE fueron tradicionalmente aislados de plantas que también son micorrizadas se propone que la CSSP era también la vía usada para la simbiosis con MFRE.

En este Capítulo, proponemos la hipótesis de que existe una vía de señalización alternativa, independiente de la CSSP, que facilita las simbiosis con MFRE. Para poner a prueba esta hipótesis usaremos a la hepática *M. polymorpha* que carece de componentes centrales de la CSSP y de la biosíntesis de estrigolactonas (Kodama et al., 2022; Radhakrishnan et al., 2020; Rich et al., 2021) y por lo tanto, ha perdido su capacidad de asociarse con HMA. Esta vía independiente de la CSSP le permite ser colonizada naturalmente por MFRE, desafiando el dogma predominante de que la CSSP es la clave universal del mutualismo planta-hongo. Para evaluar esta hipótesis, integramos enfoques de ecología microbiana, genómica

funcional y fisiología para: 1) caracterizar el tipo de asociación de Mucoromycotina endofítica con plantas axénicas de *M. polymorpha*; 2) demostrar los beneficios de esta interacción bajo diferentes regímenes nutricionales; 3) identificar los componentes genéticos vegetales que median el establecimiento de la simbiosis mediante transcriptómica; y 4) validar funcionalmente genes candidatos clave utilizando edición génica CRISPR/Cas9.

Proponemos que *M. polymorpha* conserva una vía de señalización simbiótica ancestral, independiente de la CSSP, que le permite establecer asociaciones simbióticas con MFRE. Esta vía alternativa implica la cooptación de mecanismos inmunes conservados y estaría modulada por el estado nutricional de la planta, confiriendo una ventaja adaptativa bajo condiciones de estrés (Dong et al., 2025).

La naturaleza de esta vía alternativa representa una frontera fundamental en la biología de las interacciones planta-microorganismo. ¿Implica el reclutamiento de componentes inmunes vegetales conservados, como el módulo PBL–RBOH (Chu et al., 2023), con fines simbióticos? ¿Esta vía está enmascarada o modulada en plantas que poseen una CSSP funcional? ¿Confieren estas simbiosis ventajas adaptativas únicas, particularmente bajo estrés nutricional, que expliquen su persistencia en linajes que han perdido la asociación con HMA?

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la naturaleza y funcionalidad de la interacción entre *M. polymorpha* y un hongo MFRE en condiciones controladas, con el fin de determinar si *M. polymorpha* es capaz de establecer asociaciones simbióticas funcionales independientes de la vía común de señalización de la simbiosis (CSSP), y de identificar los mecanismos fisiológicos y moleculares que sustentan esta interacción.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el tipo de asociación establecida entre *M. polymorpha* y MFRE, mediante ensayos de infección en condiciones axénicas, determinando el patrón de infección fúngica y su localización a nivel tisular e intracelular.

2. Evaluar la interacción planta–hongo, comparando la respuesta de *M. polymorpha* frente a 2 hongos Mucoromycotina, para determinar si la infección produce necrosis y activación de respuestas de defensa en todos los casos.
3. Determinar el impacto funcional de la interacción fúngica sobre el crecimiento y la morfología de *M. polymorpha*, analizando parámetros como área del talo y rizoides, y número de rizoides por planta, bajo distintas condiciones nutricionales.
4. Analizar los cambios transcriptómicos inducidos por la interacción con MFRE, con el objetivo de identificar rutas moleculares involucradas en la interacción simbiótica.
5. Evaluar la interacción planta–MFRE en plantas con una CSSP funcional como *M. paleacea* y *S. lycopersicum*.

Materiales y métodos

Cultivo axénico de *M. polymorpha* Tak-1 y cultivo del MFRE

Plantas clonales de *M. polymorpha* subsp. *ruderalis* Tak-1 fueron utilizadas para obtener propágulos asexuales, conocidas como gemas. Las plantas fueron cultivadas en cajas de Petri de 9 x 2,5 cm ventiladas con medio 0.5x Gamborg B5 (pH 5,5) (Phytotechlabs, Kansas, EE.UU.) con agar al 1% (p/v), en cámaras de crecimiento con fotoperíodo de 16/8 h, luces blancas de 60-70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a 23 °C.

Los hongos MFRE del género *Mucor* (*Phylum*: Mucoromycotina, *Subphylum*: Mucoromycota) fueron aislados de plantas salvajes *M. polymorpha* subsp. *polymorpha* (Ledesma et al., 2025). Cada MFRE fue cultivado en placas de Petri de 9 cm con medio APG bajo las mismas condiciones de crecimiento de las plantas (16 h luz/ 8 h oscuridad, 23 °C) hasta que el micelio cubrió completamente la placa. Posteriormente, se prepararon tacos de agar con micelio activo, los cuales fueron conservados a 4 °C como cultivos de stock.

Ensayos de infección con el MFRE

Se realizaron dos tipos de ensayos de infección con *M. hiemalis*: infección mediante suspensión de esporas, utilizada en la mayoría de los experimentos, e infección mediante tacos de agar utilizada para caracterización mediante microscopía y el RNA-seq.

La suspensión de esporas, se obtuvo a partir de placas de Petri con cultivos fúngicos de siete días de crecimiento, agregando 1000 μL de H_2O destilada estéril sobre la superficie de la placa con el cultivo fúngico. Usando la punta descartable de la pipeta se raspa la

superficie del cultivo para recuperar el mayor número de esporas posible, luego se recolecta la suspensión y se transfiere a tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL. La concentración de esporas se determinó mediante recuento en, cargando una alícuota de 1 ul de la suspensión homogénea y realizando el conteo bajo microscopio óptico. El número de esporas se calculó utilizando la fórmula estándar del hemocitómetro (Green & Sambrook, 2019), considerando el volumen conocido de la cámara y el factor de dilución correspondiente, siguiendo metodologías previamente descritas (Caligiore-Gei & Valdez, 2015; Zhang et al., 2020). La solución de esporas del MFRE fue usada a una concentración final de 1×10^5 esporas. El tratamiento de la plantas con esporas inoculadas consistió en agregar 1 gota de solución de esporas de 1 ul a cada lóbulo del talo, cuidando que no se derrame hacia afuera de la planta.

En los ensayos de RNAseq y en las tinciones usamos infección mediante tacos de agar. En estos casos, 1 taco de agar de 1 cm² con micelio crecido a saturación de *M. hiemalis* de una semana de edad, fue colocado a 1 cm de distancia de las plantas, llamándose día 0 (cero) al día en que el micelio hacía contacto con el talo.

Ensayos de infección en condiciones de hambreado

Las gemas fueron cultivadas en placas con medio 0.5x Gamborg B5 (1% agar, pH 5.5) durante 10 días hasta ser transferidas a una nueva placa usando pinzas estériles. Esas placas contenían el mismo medio (control) o 0.01x Gamborg B5 (hambreado), como ya lo hicimos previamente en nuestro grupo (Romani et al., 2020). Tras 10 días adicionales, las plantas fueron inoculadas con la suspensión de esporas del MFRE (1×10^5 esporas). El área del talo y de rizoides y el número de rizoides fue cuantificada a partir de fotografías tomadas cada 7 dpi usando cámara Kodak PixPRO AZ251 y analizadas mediante el software de imágenes ImageJ (Schneider et al., 2012).

Tinción de tejidos infectados para visualización de MFRE

Para verificar si las plantas estaban infectadas con el MFRE y para estudiar el crecimiento del MFRE dentro de la planta y el tipo de estructuras formadas por el MFRE intracelularmente, realizamos tinciones siguiendo el protocolo de Fonseca et al, (2014) con algunas modificaciones. Las plantas utilizadas para las tinciones, se cultivaron *in vitro* a partir de gemas. Pasado 10 días, las plantas fueron colocadas individualmente en placas de Petri y se infectaron utilizando discos de agar que contenían micelio de *M. hiemalis*. Se infectaron 15 plantas en total, recolectadas en grupos de 5 a diferentes tiempos: 1 , 3, 5, 7, 14, 21 y 28 dpi (día post infección).

El protocolo de tinción se inicia con un paso de fijación y decoloración de los tejidos en etanol 70% por 16 h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se enjuaga con agua destilada y se clarifican en KOH al 1% (v/v) (90 °C, 1 h). Luego, se vuelven a enjuagar con agua destilada y se colocan con HCl al 1% (v/v) (5 min, temperatura ambiente) para neutralizar el exceso de KOH. Pasado ese tiempo, los talos se enjuagan con agua destilada para sacar restos del HCl, y se tiñen con azul de tripano al 0.05% (p/v) (90 °C, 20 min). Las plantas son mantenidas en agua destilada hasta su observación.

Generación de plantas transgénicas usando CRISPR/Cas9

Las plantas mutantes de *M. polymorpha* Tak-1 fueron obtenidas usando la técnica de edición génica mediada por CRISPR/Cas9 siguiendo protocolos descritos previamente (Sugano et al., 2014; Sugano & Nishihama, 2018). El diseño de ARN guía (ARNg) específicos fue realizados con la herramienta CASFINDER disponible en el sitio Marchantia.info teniendo en consideración que los posibles *off-targets* carezcan de un sitio de motivo adyacente al *protospacer* (PAM) asociado (Aach et al., 2014). Brevemente, el gARN (ARN guía) correspondiente fue clonado en pMpGE_En03 usando el sitio de restricción *BsaI* y luego transferido mediante una reacción LR (Invitrogen, California, EE.UU.) al vector binario pMpGE010, que porta el cassette con la enzima Cas9D10A (nickasa) (Ran et al., 2013; Sakuma et al., 2014; Shen et al., 2014). El vector final fue chequeado por secuenciación y usado para transformar *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101.

Las plantas de *M. polymorpha* Tak-1 fueron transformadas siguiendo el método de transformación de fragmentos de talos cortados descrito por Kubota et al, (2013). Talos jóvenes fueron cortados en fragmentos pequeños (~5 × 5 mm) y preincubados durante 3 días a 24 °C en medio 0.5x Gamborg B5 con sacarosa para inducir la regeneración de tejidos. Los fragmentos de talo regenerantes fueron co-cultivados en medio OM51C durante 3 días a 28 °C con la suspensión bacteriana y posteriormente transferidos a medio selectivo suplementado con higromicina y carbenicilina para la selección de transformantes. Pasadas dos semanas, fueron seleccionadas al menos 8 líneas transgénicas independientes y transferidas a placas con medio selectivo fresco por otras 3 semanas hasta generar sus propias gemas. De cada línea independiente, se extrajo ADN genómico para realizar PCR seguida de secuenciación para confirmar las mutaciones inducidas en el gen blanco. Las secuencias fueron comparadas contra el genoma de referencia disponible en www.marchantia.info

Experimento de RNAseq y su análisis bioinformático

Las plantas fueron cultivadas *in vitro* a partir de gemas, a una densidad de cinco plantas por placa, en medio 0.5x Gamborg B5. En todos los casos, aplicamos dos tratamientos: el control sin infectar y plantas infectadas con tacos de agar de 1 cm² con micelio esporulado de *M. hiemalis*. Las muestras control e infectadas fueron recolectadas a 6 dpi luego de iniciado el contacto del micelio con la planta (día 0), con tres réplicas biológicas independientes por condición. Las plantas fueron cosechadas y congeladas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

El ARN total se extrajo usando el kit comercial FastPure Plant Total RNA Isolation (Vazyme, Nanjing, China) basado en columnas de adsorción de sílice y lavados con soluciones de etanol en columna. La integridad y concentración del ARN total fue chequeada usando un Bioanalyzer Agilent 2100, seleccionando muestras con RIN ≥ 8 . Las bibliotecas de RNA-seq se prepararon con el protocolo Illumina TruSeq Stranded mRNA con selección de poli(A) (Illumina, San Diego, EEUU) y se secuenciaron en una plataforma Illumina para generar lecturas paired-end de 2 × 150 pb. La secuenciación fue realizada por la empresa BGI Genomics (Schenzhen, China). Las lecturas crudas se evaluaron con FastQC (Andrews, 2010) y se resumieron con MultiQC (Ewels et al., 2016). El recorte de adaptadores y filtrado de bases de baja calidad se realizó con Trimmomatic (Bolger et al., 2014), descartando lecturas menores a 36 pb y reteniendo sólo aquellas con calidad Phred ≥ 30 . Las lecturas filtradas fueron mapeadas al genoma de referencia de *M. polymorpha* (versión 7.1; Bowman et al., 2017) usando el alineador STAR (Dobin et al., 2013). Aproximadamente el 50% de las lecturas mapearon de forma única a genes anotados, y el resto lo hizo de forma ambigua a múltiples isoformas, un patrón común en plantas no modelo. La cuantificación a nivel génico se obtuvo con quantMode GeneCounts de STAR, corrigiendo un problema inicial en el cual los conteos se asignaban erróneamente a nivel de exón.

El análisis de expresión diferencial fue realizado con DESeq2 (Love et al., 2014). El modelo estadístico incluyó efectos de lote y condición. Los genes diferencialmente expresados (DEGs) se definieron como aquellos con $|\log_2FC| \geq 2$ y p ajustado Benjamini–Hochberg < 0.05 . Para facilitar comparaciones, los DEGs se anotaron usando la versión 6.1 del genoma de *M. polymorpha* (Bowman et al., 2017). La anotación funcional se refinó comparando con recursos NCBI y ortología generada con OrthoFinder (bases de datos consultadas en Agosto 2024).

Extracción de ARN y retrotranscripción para ensayos de qRT-PCR

Para los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se purificó ARN total de plantas infectadas. Las extracciones de ARN total fueron realizadas con el kit comercial Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del ARN total fue chequeada usando un Nanodrop (ThermoFisher). Para la síntesis del ADN copia (cADN) se usó 1 µg de ARN total. El ARN fue transcrito inversamente usando oligo (dT) 18 y la RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) siguiendo el protocolo sugerido por el comerciante. La qRT-PCR fue realizada con el sistema *StepOnePlus* (Applied Biosystems). Cada reacción contenía un volumen final de 20 µl incluyendo 2 µl de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.), 8 pmol de cada *primer*, MgCl₂ 2 mM, 10 µl de una dilución 1/15 de la reacción RT y 0.1 µl de Taq Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los parámetros del termociclador fueron los siguientes: 94 °C 12 seg, 60 °C 12 seg, 72 °C 12 seg. La fluorescencia se cuantificó durante 40 ciclos a 72 °C. Los *primers* específicos para cada gen detallados en la Tabla suplementaria 1. Los niveles de ARNm se cuantificaron normalizando sus niveles a los niveles de *ACTIN 7* (Saint-Marcoux et al., 2015) utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicados técnicos sobre tres repeticiones biológicas.

Experimentos de hambreado nutricional en *M. paleacea* y *Solanum lycopersicum*

Para los ensayos de hambreado nutricional en *M. paleacea*, se utilizó el mismo procedimiento previamente descrito para *M. polymorpha*. Brevemente, las gemas fueron cultivadas en placas con medio 0.5x Gamborg B5 (1 % agar, pH 5.5) durante 10 días y luego transferidas a nuevas placas conteniendo el mismo medio (control) o 0.01x Gamborg B5 (hambreado) (Romani et al., 2020). Tras 10 días adicionales, las plantas fueron inoculadas con una suspensión de esporas de MFRE (1×10^5 esporas). El área del talo y de los rizoides, así como el número de rizoides, se cuantificaron a partir de fotografías tomadas cada 7 dpi utilizando una cámara Kodak PixPRO AZ251 y analizadas mediante el software ImageJ (Schneider et al., 2012).

Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Ailsa Craig) fueron esterilizadas superficialmente y expuestas a luz roja continua durante 48 h para promover su germinación. Luego, fueron mantenidas en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad. Las plántulas de 7 días de tamaño similar fueron seleccionadas y transferidas a frascos de vidrio, de 12 cm de alto por 7 de ancho, con medio Gamborg B5 0.5x o 0.01x. Se colocaron 3 plantas por frasco. Tras 7 días adicionales, las plantas fueron

inoculadas con una suspensión de esporas de *M. hiemalis* (1×10^5 esporas mL⁻¹), aplicada directamente sobre las hojas bajo condiciones estériles. Las plantas se cosecharon a los 14 dpi y se evaluó el peso fresco de la parte aérea y raíz.

Resultados

Resíntesis experimental revela interacciones distintas entre *M. polymorpha* y hongos *Mucoromycotina*

Dado que *M. polymorpha* carece de una CSSP funcional y, por lo tanto, no puede asociarse con HMA, planteamos la hipótesis de que podría albergar otros endofitos fúngicos beneficiosos que reemplacen al efecto de los HMA y, por ejemplo, le permitan hacer frente a condiciones estresantes del ambiente. Para evaluar esta posibilidad, realizamos un aislamiento sistemático y una caracterización metabólica de los endofitos fúngicos cultivables de talos silvestres de *M. polymorpha* subsp. *polymorpha* (Ledesma et al., 2025). Dos aislamientos de rápido crecimiento exhibieron características típicas del género *Mucor*, incluyendo micelio denso y aéreo, inicialmente blanco y posteriormente grisáceo, además de esporangióforos erectos (Figura suplementaria 3). La identificación molecular mediante secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal confirmó la identidad de estos aislamientos como *M. hiemalis* y *M. circinelloides*, basada en la identidad de secuencias depositadas en la base de datos NCBI (Ledesma et al., 2025). El hallazgo de *Mucor* spp. viviendo como posibles endofitos en *M. polymorpha* establece las bases para estudiarlos como potenciales socios en una simbiosis independiente de la CSSP.

En primer lugar, realizamos ensayos de resíntesis con dos objetivos principales: primero, confirmar que éramos capaces de aislar el endofito tras la infección de plantas axénicas, confirmando su identidad como el microorganismo causal; y segundo, evaluar el resultado de la interacción, ya no con plantas salvajes de *M. polymorpha*, sino con plantas axénicas de *M. polymorpha* Tak-1. Estas plantas fueron inoculadas con una suspensión de esporas de *M. hiemalis* o *M. circinelloides* y monitoreadas para observar la progresión fenotípica de la infección. Las dos especies fúngicas desencadenaron respuestas diferentes en la planta hospedadora. A los 14 días post-infección (dpi), las plantas inoculadas con *M. hiemalis* se mostraban robustas y saludables, sin signos visibles de estrés o daño tisular (Figura 11A). En contraste, ya a los 7 dpi, pudimos observar que el micelio de *M. circinelloides* creció sobre la planta y provocó la maceración y colapso completo del talo (Figura 11A). Esas plantas infectadas mostraron un crecimiento hifal intracelular extenso, con densas hifas espiraladas de *M. hiemalis* alojadas dentro de células intactas de *M. polymorpha* (Figura

11B). En las hifas, ya a los 14 días, pueden reconocerse unos ensanchamientos terminales. Estas estructuras sugieren la formación de una asociación íntima con la célula que podrían jugar un papel fisiológico en la planta. Las plantas infectadas con *M. hiemalis* fueron monitoreadas durante cuatro meses, período en el cual permanecieron sanas y continuaron creciendo sin desarrollar ningún síntoma de enfermedad.

Las diferencias en la respuesta de la planta a *Mucor* spp. nos llevó a investigar la respuesta de varios genes que responden a estímulos bióticos, bajo la hipótesis de que la planta despliega respuestas transcripcionales específicas para cada hongo: atenuadas en presencia de *M. hiemalis* para permitir el establecimiento, y fuertemente activadas en presencia de *M. circinelloides* como un intento inicial de restringir la infección. Consistente con esta hipótesis, los perfiles de expresión de genes marcadores revelaron respuestas claramente diferenciadas dependiendo del MFRE. La infección con *M. circinelloides* causó una fuerte inducción de genes relacionados con defensa, incluyendo MpMYB14 (Carella et al., 2019; Kubo et al., 2024), MpPR6a (Carella et al., 2019) y MpWRKY3 (Yotsui et al., 2023), mientras que MpPR4 (Carella et al., 2019) mostró una fuerte inducción a 3 dpi seguida de una caída a 6 dpi (Figura 12). En contraste, las plantas infectadas con *M. hiemalis* mostraron una inducción más leve de estos genes, comparada con la respuesta frente a *M. circinelloides* (Figura 12).

A partir de la expresión del gen *EF1a* en *M. circinelloides* y *M. hiemalis* (McMhEF1a), pudimos estimar un aumento sostenido de biomasa de *M. circinelloides* hasta los 6 dpi, mientras que *M. hiemalis* alcanzó una meseta a los 3 dpi (Figura suplementaria 4). Otros genes relacionados con defensa, como MpJAZ, MpRBOH1 y MpPR1, no se indujeron de manera clara, mientras que MpRBOH2 mostró una modesta inducción únicamente en respuesta a *M. circinelloides* (Figura suplementaria 4). La fuerte activación de genes de defensa coincide con la proliferación rápida de *M. circinelloides*, lo que sugiere que, a pesar de la respuesta de defensa incrementada, este hongo es capaz de evitar la inmunidad de la planta para generar síntomas agudos de enfermedad.

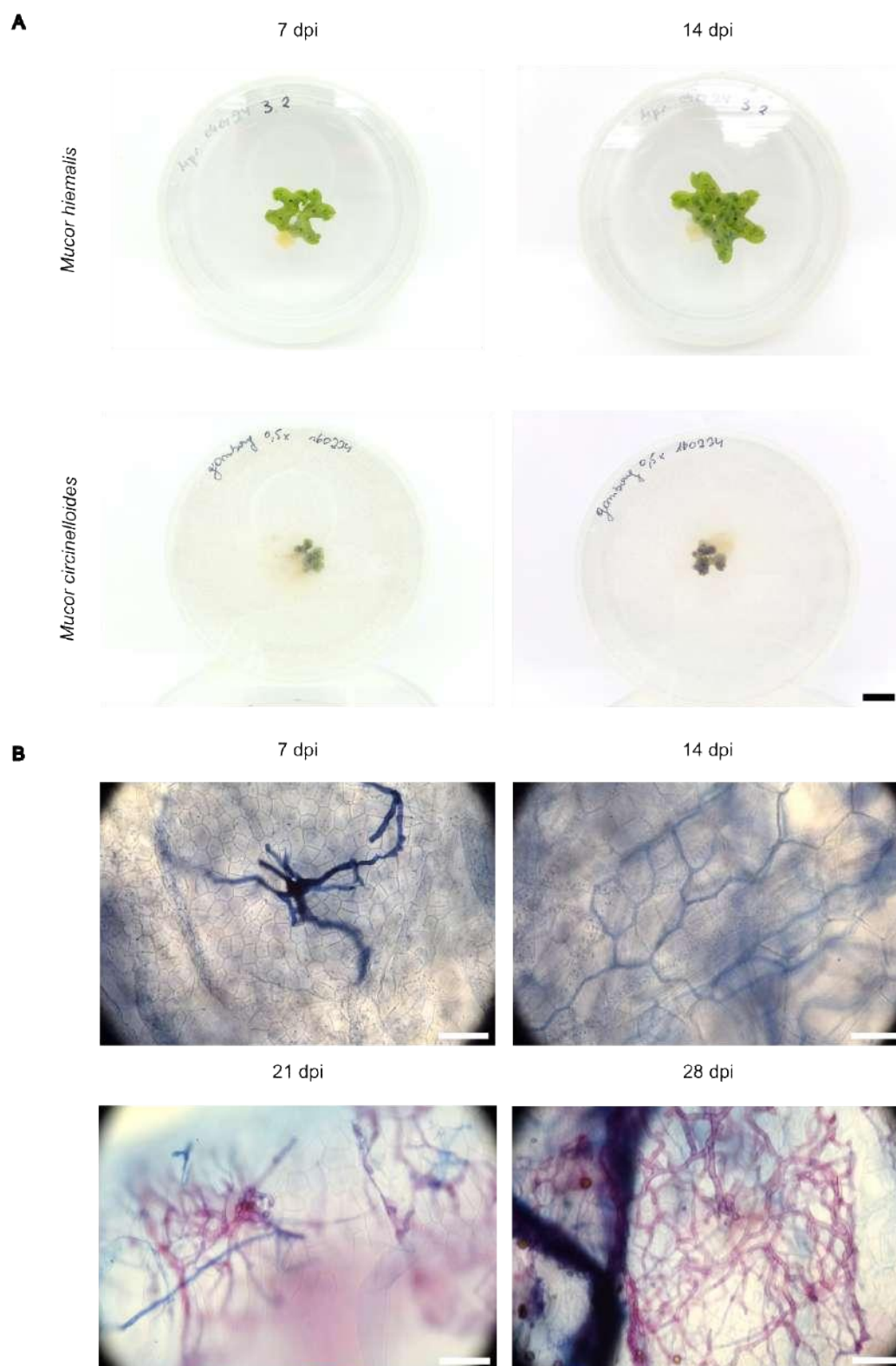


Figura 11. Impacto diferencial de hongos aislados de *M. polymorpha* durante la infección. (A) Progresión de la infección en plantas *M. polymorpha* Tak-1 inoculadas con *M. hiemalis* y *M. circinelloides* a 7 y 14 dpi. Barras de escala: 1 cm. (B) Progresión de la infección por *M. hiemalis* en talos de *M. polymorpha* a distintos tiempos. Barras de escala: 70 μ m.

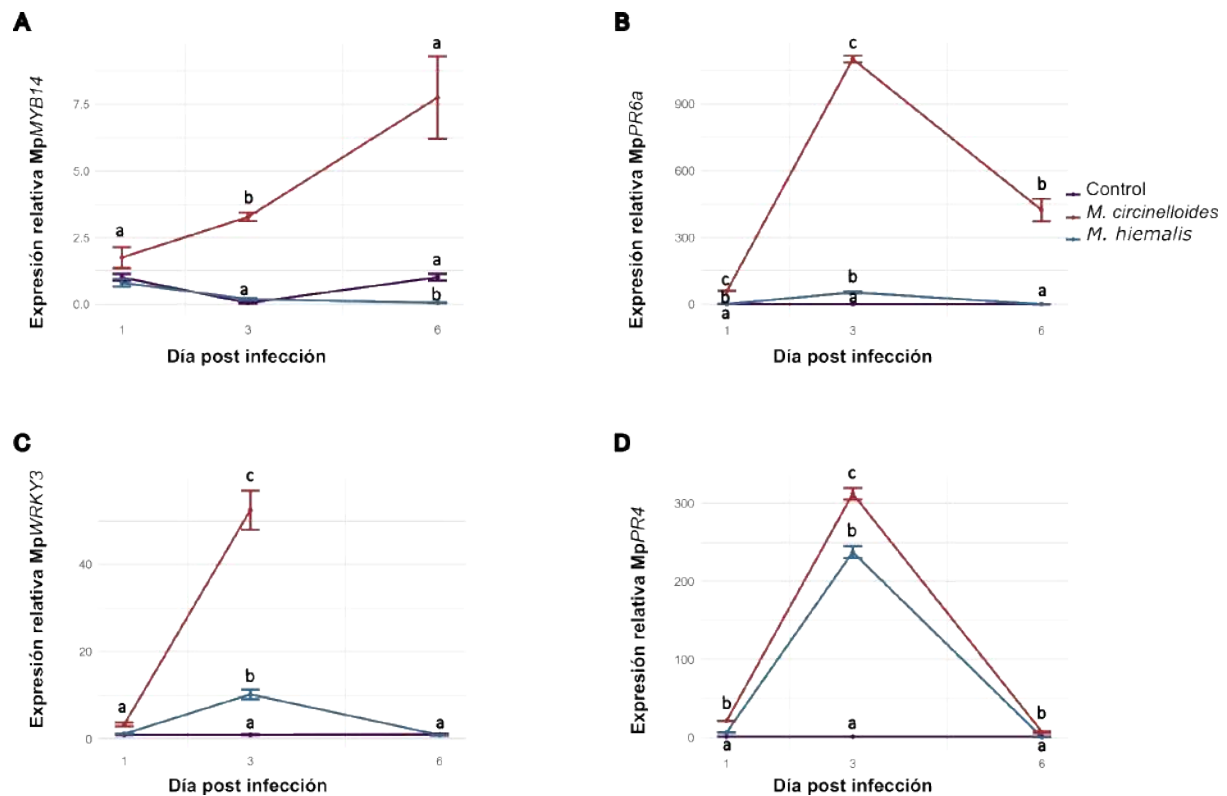


Figura 12. Análisis por qRT-PCR de la expresión relativa de genes marcadores de defensa en respuesta a *M. circinelloides* y *M. hiemalis* en 1, 3 y 6 dpi. La expresión fue cuantificada por qRT-PCR usando el método $\Delta\Delta C_t$ para los genes (A) *MpMYB14*, (B) *MpPR6a*, (C) *MpPR4* y (D) *MpWRKY3*. La línea roja corresponde a la infección con *M. circinelloides*, la línea azul a *M. hiemalis* y la línea violeta para plantas control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de cada tiempo de muestreo (ANOVA seguido de la prueba HSD de Tukey, $p < 0,01$). Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar de réplicas biológicas independientes. La expresión génica fue normalizada utilizando genes de referencia y expresada en relación al control.

M. hiemalis promueve el crecimiento de *M. polymorpha* condicionado por la disponibilidad de nutrientes

Dado que la simbiosis con HMA se ve favorecida bajo condiciones de deficiencia nutricional (Bennett & Groten, 2022; van der Heijden, 2015), planteamos la hipótesis de que los efectos beneficiosos de *M. hiemalis* serían más pronunciados en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. Para evaluar esto, establecimos un sistema monoaxénico para el efecto de la inoculación con *M. hiemalis* sobre el crecimiento de *M. polymorpha* Tak-1 bajo dos regímenes nutricionales: disponibilidad normal (0.5x Gamborg B5) y deficiencia severa (0.01x Gamborg B5). Pudimos observar que el impacto de la infección sobre el crecimiento del talo fue altamente dependiente del estado nutricional (Figura 13A). En el medio 0.5x Gamborg B5, la infección por *M. hiemalis* indujo una tendencia sugestiva, cercana a la

significancia estadística, en la cual el MFRE promueve el crecimiento del talo a los 14 y 21 dpi (Figura 13B). En contraste, bajo condiciones de deficiencia nutricional (0.01x), donde el crecimiento general del talo estuvo fuertemente limitado, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los momentos de la infección.

En cambio, para rizoides observamos un patrón diferente (Figura 14). En condiciones nutricionales normales, el área de rizoides creció progresivamente a lo largo del tiempo sin diferencias entre plantas control e infectadas (Figura 14A). Sin embargo, bajo el tratamiento de hambreado la infección fúngica revirtió significativamente la reducción del área de rizoides a 7 y 14 dpi inducida por la falta de nutrientes (Figura 14B). En esta condición de hambreado, la infección por MFRE también incrementó el número de rizoides por planta (Figura 14A). Este efecto fue evidente desde el primer punto (7 dpi) y la diferencia se amplió a los 14 dpi (Figura 14C).

En conjunto, estos resultados demuestran que la infección por *M. hiemalis* promueve el crecimiento de *M. polymorpha*, aunque este beneficio es órgano-específico y depende del contexto nutricional. El hongo estimula específicamente el desarrollo de rizoides bajo condiciones de deficiencia de nutrientes.

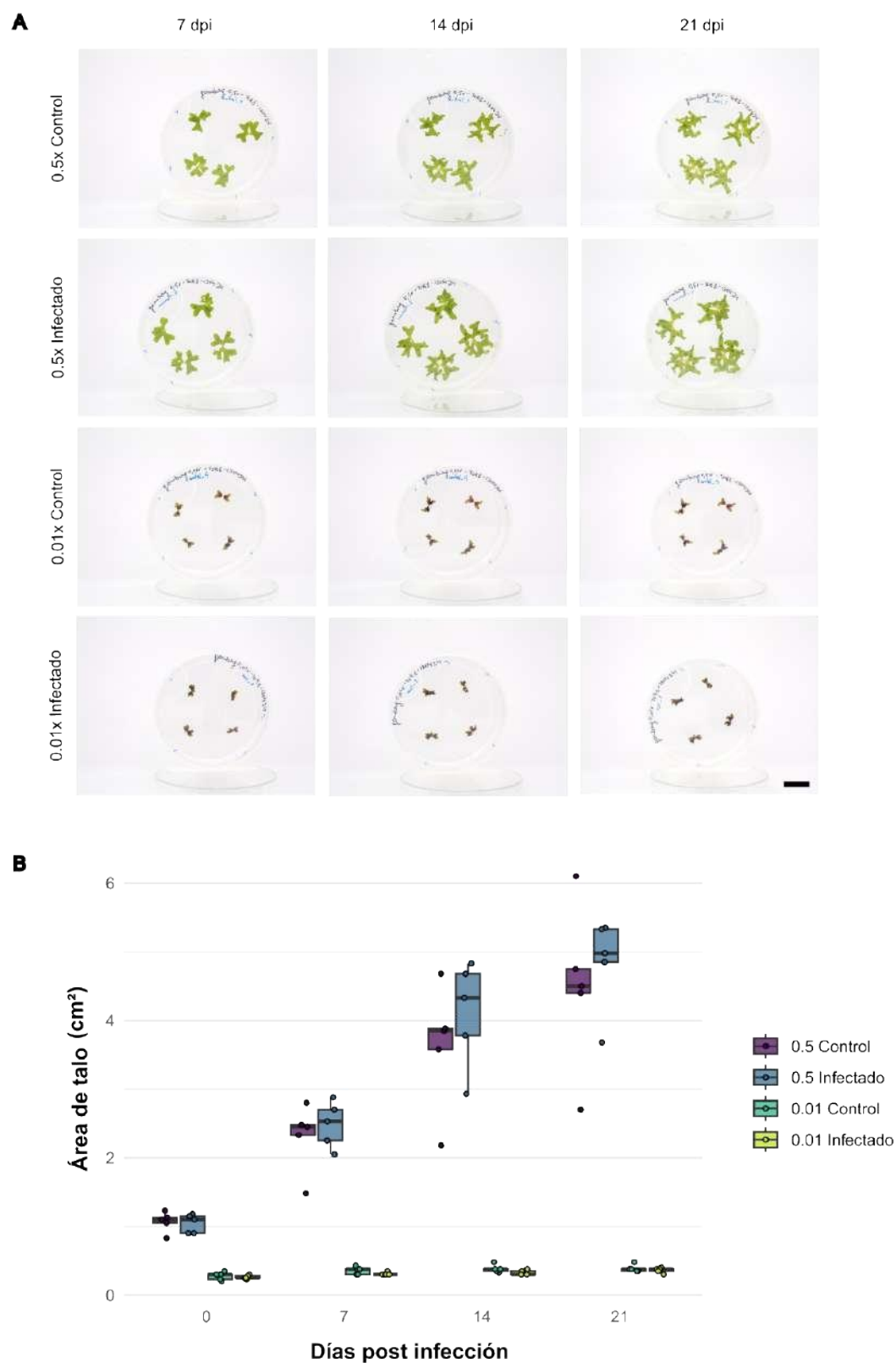


Figura 13. Efecto de la infección por MFRE sobre el crecimiento del talo en plantas *M. polymorpha* Tak-1 a lo largo del tiempo. Los diagramas de caja representan el área del talo (cm²) medida a 0, 7, 14 y 21 dpi. (A) Imágenes representativas de la infección a los 0, 7 y 14 dpi de las combinaciones entre el tratamiento de infección (Control/Infectado), y la condición nutricional (0.05x/0.01x Gamborg

B5). Barra de escala = 2 cm. (B) Los diagramas de caja representan el área de talo (cm²) medida a 0, 7, 14 y 21 dpi. Los tratamientos corresponden a 0.5x Control (violeta), 0.5x Infectado (azul), 0.01x Control (verde) y 0.01x Infectado (verde amarillento). Los datos se muestran como valores de la mediana con rangos intercuartiles, barra de error y puntos individuales. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. La ausencia de asteriscos indica que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

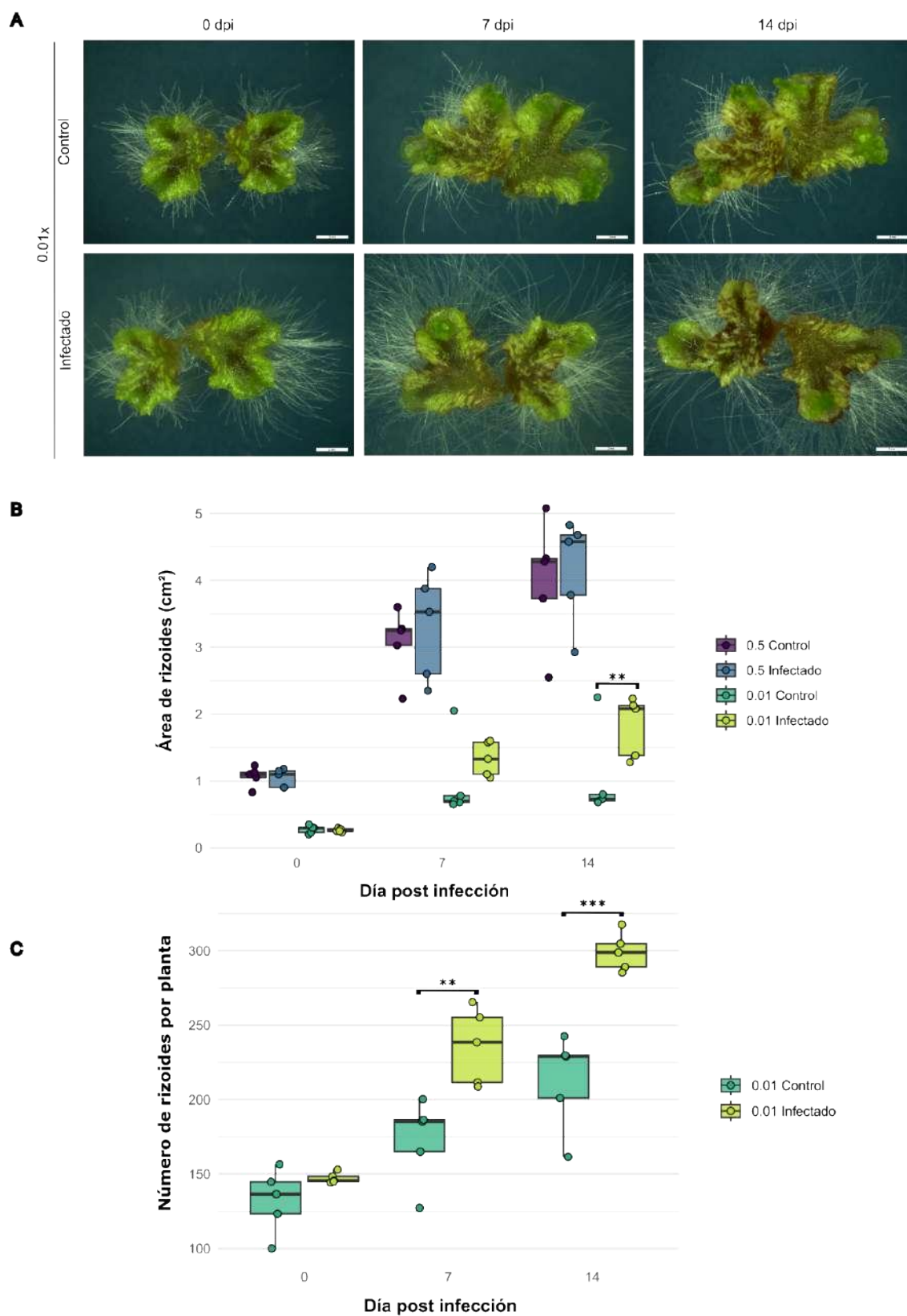


Figura 14. Efecto de la infección por MFRE sobre el crecimiento de los rizoides a lo largo del tiempo. (A) Imágenes representativas obtenidas con estereomicroscopio. Barra de escala = 2 mm. (B) Los diagramas de caja representan el área de rizoides (cm²) medida a 0, 7, 14 y 21 dpi. (C) Los

diagramas de caja representan el número de rizoides por planta, cuantificados únicamente bajo la condición de hambreado a los 14 dpi. En todos los casos, los tratamientos corresponden a Control (verde) e Infectado (verde amarillento). Los datos se muestran como valores de la mediana con rangos intercuartiles, barra de error y puntos individuales. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. Los niveles de significancia se indican como $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), y $p < 0.001$ (***).

Rearreglo transcripcional en respuesta a la infección por *M. hiemalis*

Para dilucidar los mecanismos moleculares que participan en los estadios tempranos de la interacción *M. polymorpha*-MFRE realizamos un ensayo de RNAseq para analizar los patrones de expresión génica en talos infectados (6 dpi), una etapa clave para identificar genes de respuesta temprana, incluyendo los factores de transcripción que orquestan el programa de respuesta de la planta (Figura 15A). El análisis transcriptómico comparativo entre plantas infectadas y control reveló una reprogramación moderada del transcriptoma del hospedador. Se identificó un total de 283 genes diferencialmente expresados (DEGs) ($\log_2FC > |1|$, valor p ajustado < 0.05), de los cuales 168 fueron reprimidos y 115 inducidos en respuesta a la infección por MFRE (Figura 15B). Esta inducción sugiere un activo reordenamiento transcripcional del hospedador frente a la presencia del hongo. Entre los genes inducidos se destaca *MpbHLH4*.

El análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* (GO) de los genes inducidos proporcionó las primeras pistas funcionales sobre la naturaleza de esta respuesta. Los términos enriquecidos más significativamente estuvieron asociados a la unión a ATP, actividad ubiquitina-proteína transferasa y procesos del metabolismo de lípidos (Figura 15C), lo que indica un posible rol de la ubiquitinación y el recambio proteico en la interacción simbiótica temprana. La inducción del metabolismo lipídico es particularmente interesante, ya que los lípidos son una moneda de intercambio conocida en las simbiosis micorrízicas tradicionales, lo que podría indicar un papel conservado en el intercambio de nutrientes también con los hongos MFRE.

Además, el análisis GO reveló un enriquecimiento significativo de términos asociados con la respuesta de defensa (Figura 15C). La inducción concomitante de genes relacionados con defensa sugiere un reconocimiento robusto del hongo por parte del hospedador, que luego es modulada para permitir el establecimiento de la interacción. Aún más, el enriquecimiento significativo del término “región extracelular” sugiere una comunicación y un intercambio de señales activas en la interfaz planta-hongo, un sello distintivo de las relaciones simbióticas.

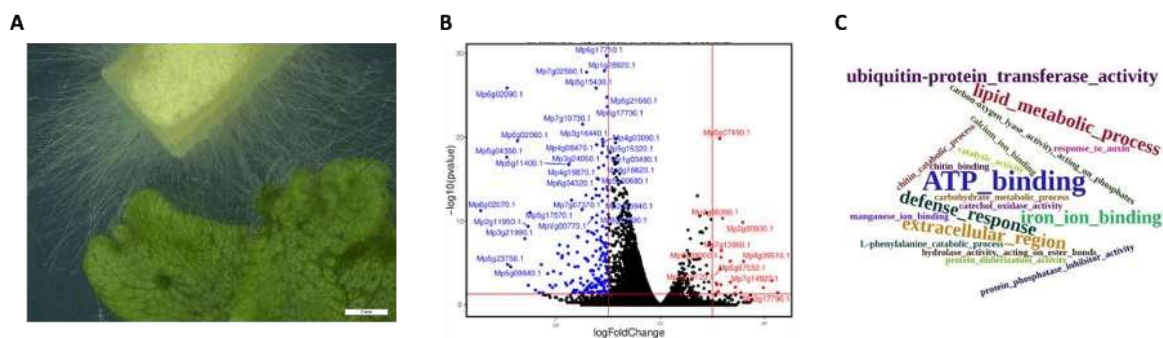


Figura 15. Respuesta transcriptómica de *M. polymorpha* a la infección por MFRE. (A) Imagen que representa el ensayo de infección 6 días después del contacto inicial del hongo con el talo. (B) Gráfico tipo volcano de la expresión génica durante la infección por MFRE en *M. polymorpha*. Los genes mostrados en este gráfico están diferencialmente expresados en plantas infectadas. El volcano plot se presenta como el cambio de pliegue log10 en comparación con plantas tratadas con control. (C) Comparación del enriquecimiento de términos de GO durante la infección por MFRE en *M. polymorpha*. Los colores del volcano plot corresponden a los valores *p* ponderados de Fisher para los respectivos términos GO.

Identificación y caracterización funcional de *MpbHLH4*, un regulador negativo de la rizoidogénesis inducida por MFRE

El análisis transcriptómico permitió identificar una inducción significativa del gen *MpbHLH4* (FC= 3.96), que codifica un factor de transcripción de tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH), en respuesta a la infección por MFRE. Para caracterizar funcionalmente el rol de *MpbHLH4*, generamos un mutante editado por CRISPR-Cas9 (*Mpbhlh4*) (Figura 16A) y evaluamos su respuesta fenotípica a la infección bajo condiciones de hambreado. Mientras que los alelos mutantes *Mpbhlh4* no mostraron diferencias con las plantas Tak-1 en cuanto al área del talo ni el área de rizoides en hambreado (Figuras 16C y 17B), observamos un fenotipo notable al cuantificar el número de rizoides por planta. Tras la infección con MFRE, el mutante *Mpbhlh4* desarrolló un número significativamente mayor de rizoides por planta que las plantas Tak-1 infectadas (Figura 17C). Este hallazgo sugiere que *MpbHLH4* no es esencial para el desarrollo general de la planta ni para el establecimiento de la infección con MFRE, pero funciona específicamente como represor de la iniciación de nuevos rizoides durante la interacción con MFRE. El mayor número de rizoides observado en el mutante sugiere que la infección fúngica activa una vía de señalización que, mediante la represión de *MpbHLH4*, modula el desarrollo del sistema de rizoides. En ausencia de este represor transcripcional, la respuesta de desarrollo de la planta frente al MFRE se ve exagerada, resultando en una proliferación pronunciada de rizoides.

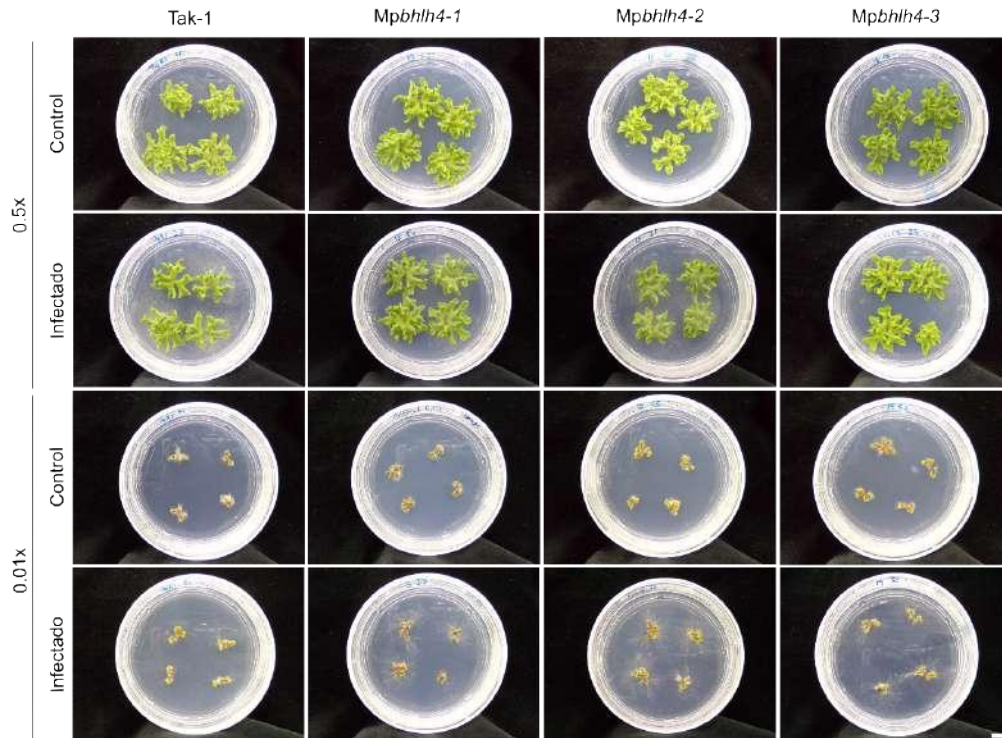
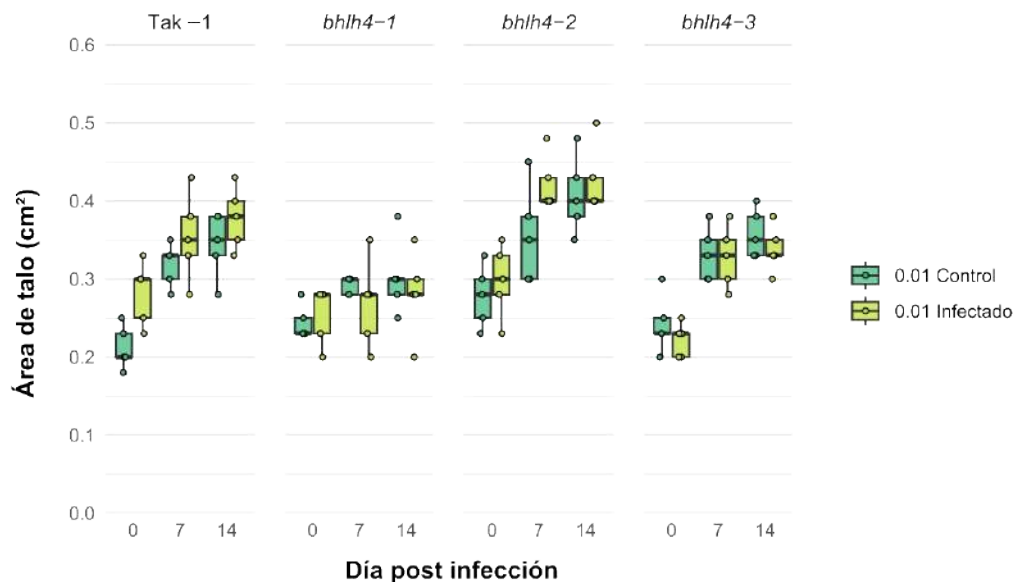
A**B****C**

Figura 16. La infección por MFRE no altera el crecimiento del talo en plantas mutantes *Mpbhlh4*. (A) Representación esquemática de los dominios del factor de transcripción *Mpbhlh4* y la ubicación de los gARNs diseñadas por CRISPR marcadas con una flecha negra. Las cajas coloreadas en rojo representan el dominio conservado bHLH. (B) Imágenes representativas de la infección a 14 dpi de

las combinaciones entre el tratamiento de infección (Control/Infectado), y la condición nutricional (0.05x/0.01x Gamborg B5). (C) Los diagramas de caja representan el área del talo cuantificados únicamente bajo la condición de hambreado. En todos los casos, los tratamientos corresponden a control (verde) e Infectado (verde amarillento) cada uno asociado a un alelo distinto de *Mpbhlh4*. Los datos se muestran como valores de la mediana con rangos intercuartiles, barra de error y puntos individuales. La ausencia de asteriscos indica que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey.

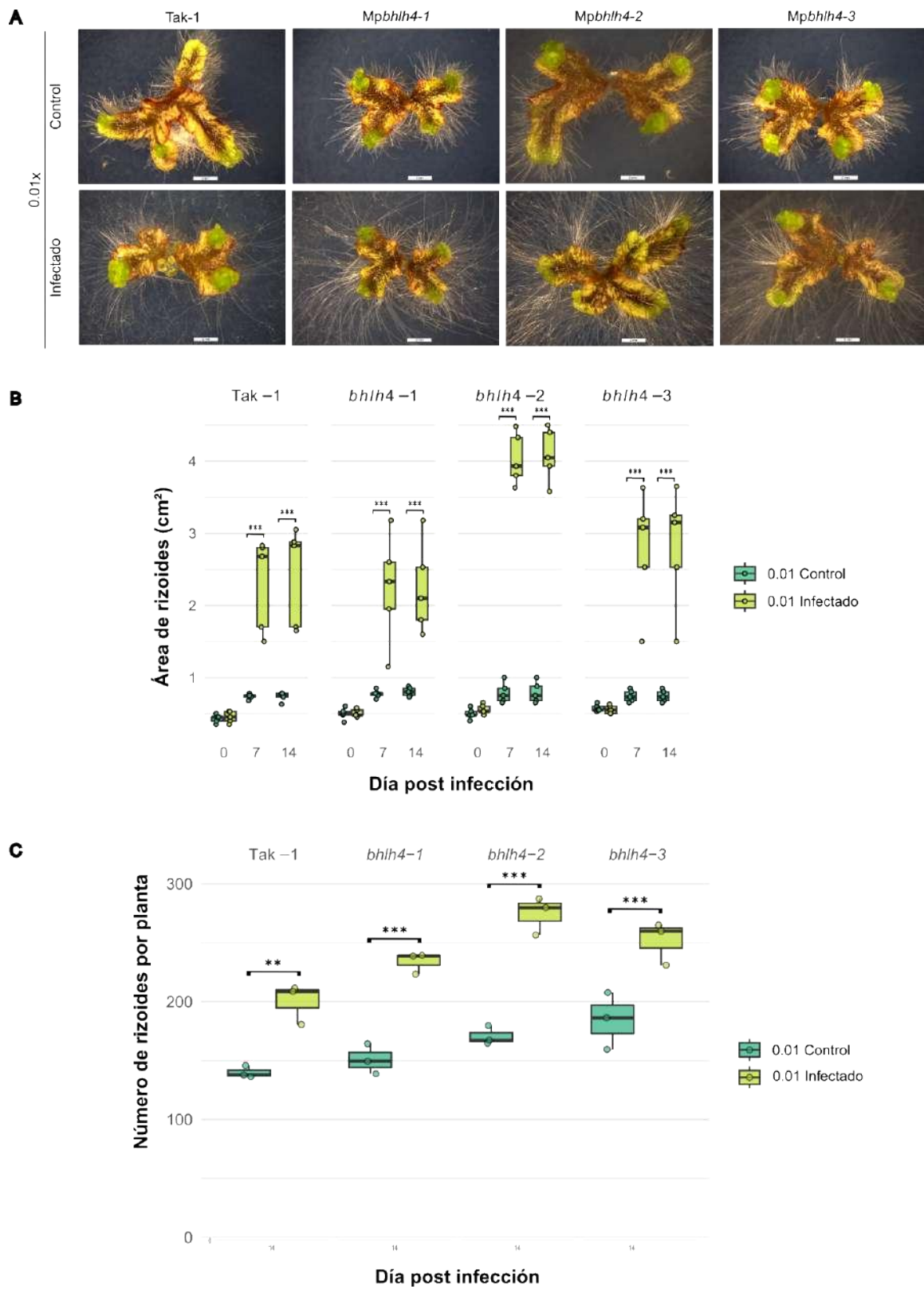


Figura 17. MpbHLH4 controla el número de rizoides por planta durante la infección por MFRE. (A) Imagen que representa el ensayo de infección a los 14 dpi. Las barras de escala en la imagen representan 2 mm. (B) Número de rizoides por planta en las plantas mutantes Mpbhlh4 bajo

condiciones control e infectadas, en comparación con plantas Tak-1. Los diagramas de cajas representan los conteos de rizoides a los 14 dpi. Los datos se muestran como valores individuales, medianas y rangos intercuartílicos. Los tratamientos corresponden a 0.01x control (verde) y 0.01x Infectado (verde amarillento). (C) Los diagramas de caja representan el número de rizoides por planta cuantificados bajo la condición de hambreado. En todos los casos, los tratamientos corresponden a control (verde) e Infectado (verde amarillento). Los datos se muestran como valores de la mediana con rangos intercuartiles, barra de error y puntos individuales. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. Los niveles de significancia se indican como $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), y $p < 0.001$ (***).

MpRBOH2 es necesario para la simbiosis con *M. hiemalis* bajo condiciones de deficiencia nutricional

Para evaluar la conservación de los mecanismos tempranos de reconocimiento de hongo, analizamos el efecto de la interacción con el MFRE sobre el crecimiento del talo y rizoides de los mutantes *Mppbla*, *Mprboh2* y *Mprboh1*. MpPBLa es una quinasa clave en la inmunidad inducida por quitina (el efector fúngico canónico) que activa por fosforilaciones a las proteínas NADPH oxidasa *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D* (RBOHD) (*MpRBOH1* y *MpRBOH2*) para gatillar la producción apoplástica de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inducir la respuesta de defensa.

Al igual que las plantas Tak-1, el área del talo del mutante *Mppbla* no mostró un cambio significativo a la infección por MFRE bajo deficiencia nutricional, permaneciendo fuertemente limitada por el contexto nutricional (Figura 18A). Un comportamiento similar se observó en los mutantes *Mprboh2* y *Mprboh1*, en los cuales la infección fúngica no promovió el crecimiento del talo en ninguno de los tiempos analizados (Figura 18A). Estos resultados indican que, bajo una deficiencia nutricional, la infección por MFRE no es suficiente para estimular el crecimiento del talo, independientemente del genotipo.

En contraste, el área de rizoides mostró una respuesta al MFRE dependiente del genotipo. Mientras el MFRE promovió significativamente el crecimiento de rizoides de plantas Tak-1 y del mutante *Mppbla* hambreadas (Figura 19A-B), los rizoides del mutante *Mprboh2* no se elongaron en presencia del MFRE (Figura 19A-B). Estos resultados indican que la infección por MFRE no fue suficiente para inducir el crecimiento del área de rizoides en ausencia de *MpRBOH2* (Figura 19B). El mutante *Mprboh1* no pudo ser evaluado dado que exhibe un defecto constitutivo en el desarrollo de rizoides. En todos los casos, en condiciones control, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos.

Un patrón similar se observó al analizar el número de rizoides por planta. En plantas Tak-1 y del mutante *Mppbla*, la infección por MFRE incrementó significativamente el número de

rizoides por planta bajo condiciones de hambreado (Figura 19C). Este efecto mejorador del MFRE se vió fuertemente disminuido en el mutante *Mprboh2* (Figura 19C).

Estos resultados indican que el crecimiento de rizoides inducido por MFRE bajo condiciones de deficiencia nutricional requiere de componentes asociados a la señalización inmune. Mientras que el crecimiento del talo permanece sin ser afectado en todos los genotipos evaluados, el efecto promotor del MFRE sobre el número de rizoides por planta es dependiente de *MpRBOH2*. Estos resultados sugieren que *MpRBOH2* podría ser un elemento central para la transducción de la señal inducida por MFRE, posicionando a este componente como un punto clave en la vía alternativa de señalización simbiótica.

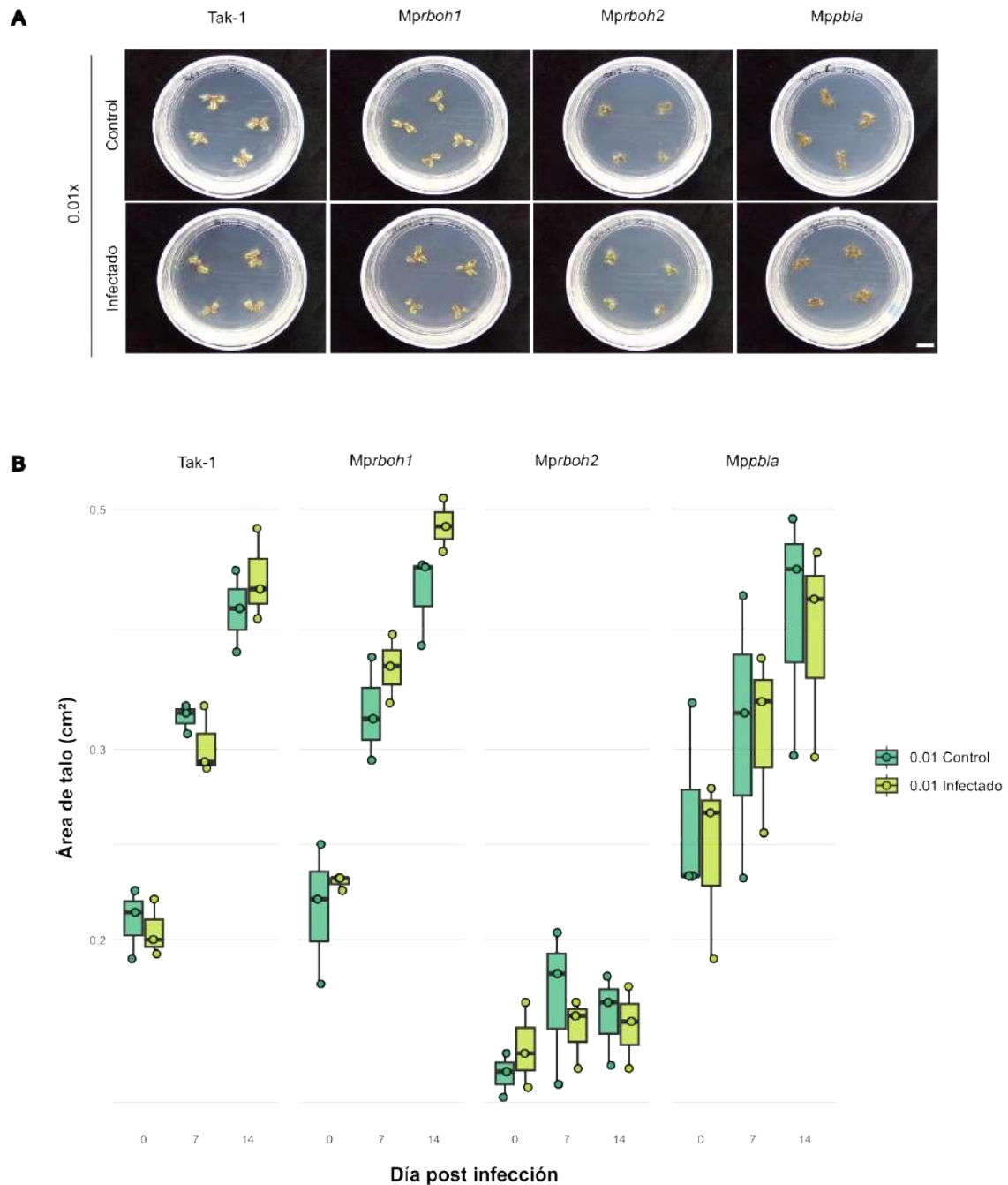


Figura 18. El MFRE no afecta el crecimiento del talo en plantas mutantes para los genes *MpRBOH1*, *MpRBOH2* y *MpPBLA*. (A) Imágenes representativas de la infección a los 14 dpi de las combinaciones entre Control/Infectado, y 0.01x Gamborg B5. (B) Los diagramas de caja representan el área del talo cuantificados únicamente bajo la condición de hambreado. En todos los casos, los tratamientos corresponden a Control (verde) e Infectado (verde amarillento). Los datos se muestran como valores de la mediana con rangos intercuartiles, barra de error y puntos individuales. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. La ausencia de asteriscos (*) indica que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

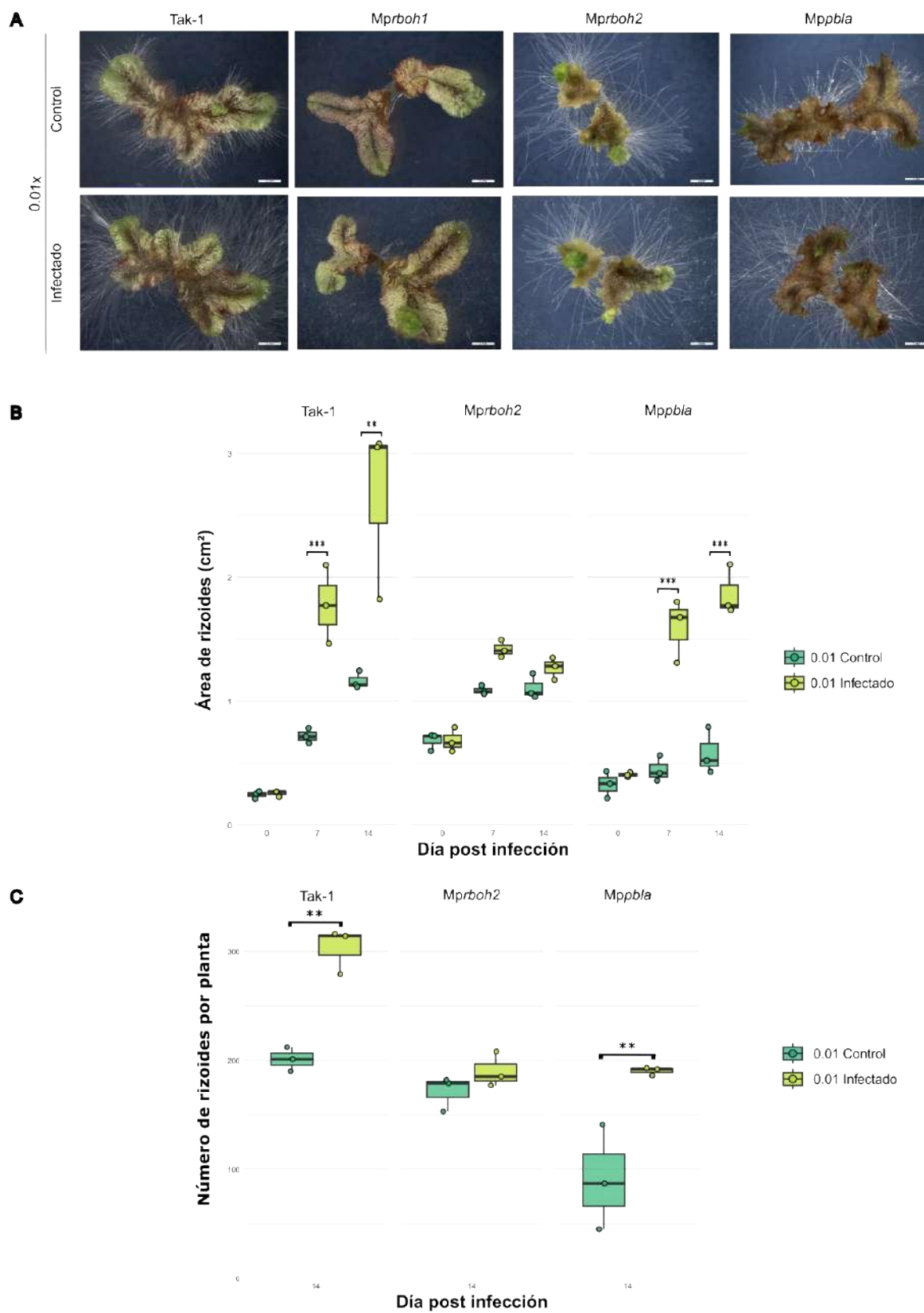


Figura 19. La inducción del número de rizoides por planta promovida por el MFRE está mediada por MprBOH2. (A) Imagen que representa el ensayo de infección a los 14 dpi en presencia (Infectada) o

ausencia (Control) del MFRE bajo condiciones de hambreado. Las barras de escala en la imagen representan 2 mm. (B) Área de rizoides en plantas mutantes *Mprboh2* y *Mppbla*. (C) Número de rizoides por planta. En todos los casos, los tratamientos corresponden a Control (verde) e Infectado (verde amarillento). Los datos se muestran como valores de la mediana con rangos intercuartiles, barra de error y puntos individuales. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. Los niveles de significancia se indican como $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), y $p < 0.001$ (***).

***M. hiemalis* promueve el crecimiento en linajes de plantas con una CSSP funcional**

Sabiendo que *M. hiemalis* infecta y promueve el crecimiento de *M. polymorpha* de manera dependiente del estado nutricional, nos propusimos determinar si esta interacción también ocurre en plantas que tienen una CSSP intacta. Planteamos la hipótesis de que el mecanismo simbiótico mediado por este MFRE está conservado en plantas terrestres y no depende de la presencia de la CSSP. Para poner a prueba esta hipótesis, realizamos ensayos de infección bajo distintas condiciones nutricionales utilizando dos plantas modelo con una CSSP funcional: la hepática *Marchantia paleacea* y la planta vascular *Solanum lycopersicum* (tomate). Nuestros resultados muestran que *M. hiemalis* pudo establecer una interacción que no mostró síntomas de patogenicidad durante periodos prolongados de infección (3 meses para *M. paleacea* y 1 mes para *S. lycopersicum*) bajo diferentes condiciones nutricionales para ambas plantas.

En el caso de *M. paleacea*, mientras las plantas infectadas de *M. polymorpha* en condiciones de hambreado exhibían un crecimiento del talo similar al de las plantas control, los talos infectados de *M. paleacea* mostraron una expansión significativamente mayor a 14 dpi (Figura 20A-B). Para los rizoides, la infección del MFRE promovió el desarrollo de rizoides en ambas especies de hepáticas, resultando en un aumento significativo tanto del área (Figura 21A-B) como del número de rizoides por planta (Figura 21C), en comparación con los controles.

En el caso del tomate, el peso fresco de la parte aérea mostró una respuesta dependiente del contexto nutricional (Figura 22A). Bajo condiciones de buena disponibilidad de nutrientes (0.5x Gamborg B5), las plantas infectadas presentaron un incremento significativo del peso fresco tanto de la parte aérea (Figura 22B) como de la radicular (Figura 22C) en comparación con las plantas no infectadas ($p < 0.001$). Sin embargo, bajo condiciones de hambreado, la parte aérea no fue significativamente diferente entre plantas infectadas y no infectadas ($p > 0.05$). Por otro lado, el efecto mejorador del MFRE en el peso fresco de la raíz fue observado únicamente en condiciones de hambreado (Figura 22C).

En conjunto, nuestros demuestran que la interacción con *M. hiemalis* también mejora el crecimiento de plantas con una CSSP intacta, incluso de plantas de linaje diferentes al de *M. polymorpha*.

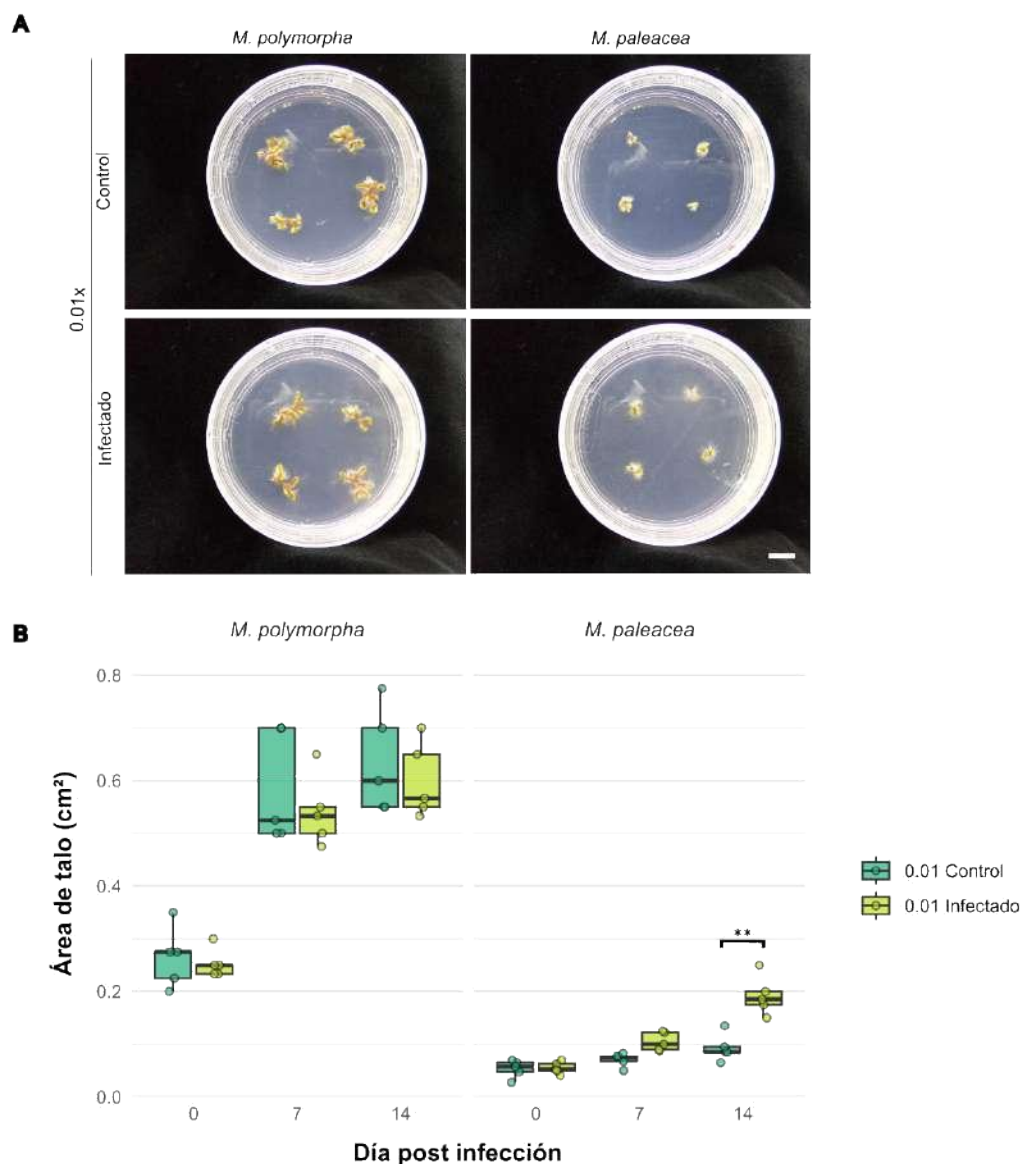


Figura 20. Efecto de la infección por MFRE en el crecimiento del talo de *M. polymorpha* y *M. paleacea*. (A) Imágenes representativas de plantas a los 0, 7 y 14 dpi. (B) Los diagramas de cajas muestran el área del talo de *M. polymorpha* (izquierda) y *M. paleacea* (derecha) medida a los 0, 7 y 14 dpi. Los tratamientos corresponden a Control (verde) e Infectado (verde amarillento). Los datos se presentan como valores medianos con rangos intercuartílicos, barra de error y puntos individuales. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. Los niveles de significancia se indican como $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), y $p < 0.001$ (***). Barra de escala = 1 cm.

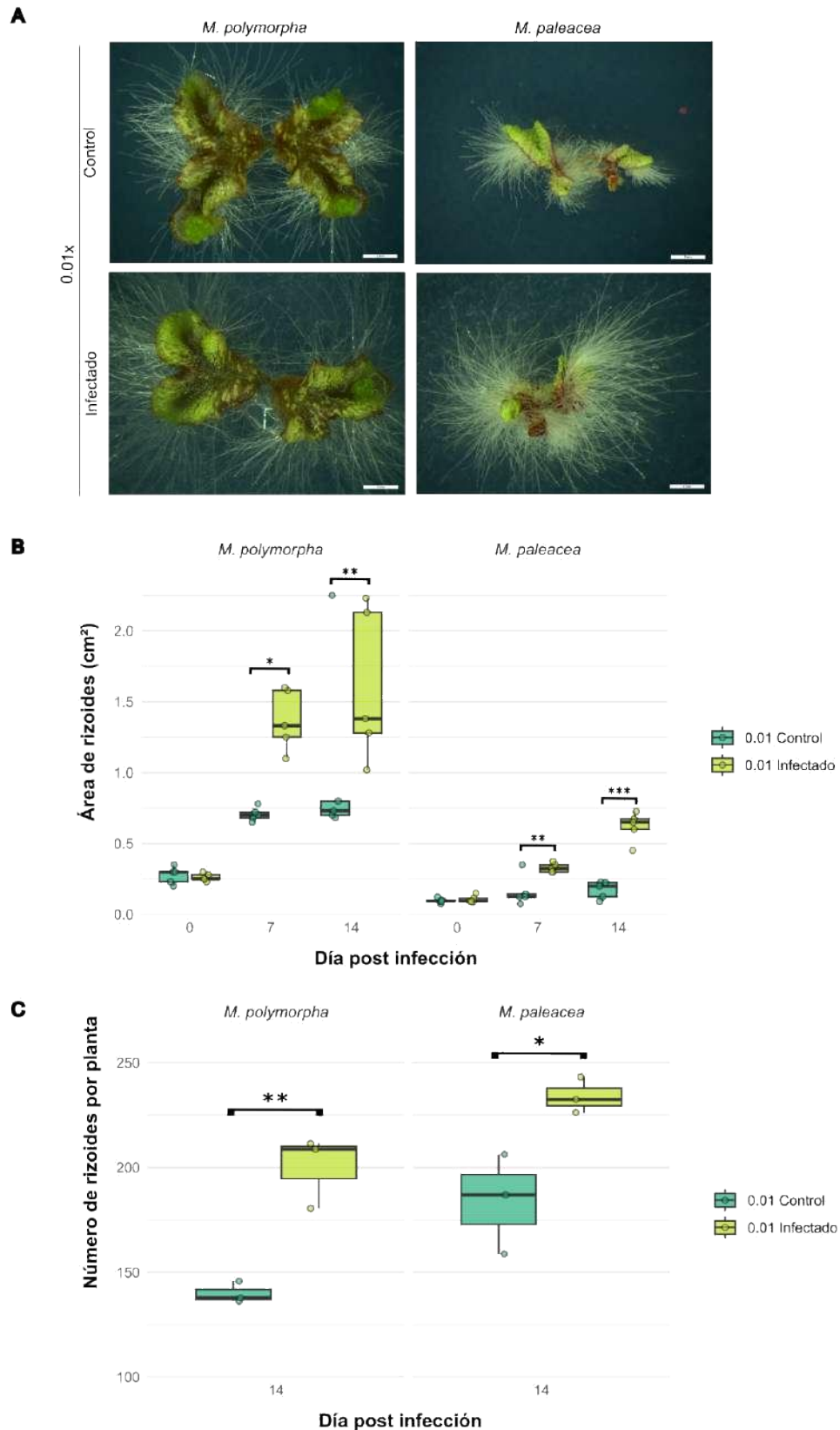


Figura 21. Efecto de la infección por MFRE en el área y número de rizoides de plantas de *M. polymorpha* y *M. paleacea*. (A) Imágenes representativas de plantas a los 14 dpi. Barra de escala = 2 mm. (B) Área de rizoides de *M. polymorpha* y *M. paleacea* medida a los 0, 7 y 14 dpi. C) Número de

rizoides por planta en dos especies de *Marchantia*. Los diagramas de cajas representan los conteos de rizoides a los 14 dpi en *M. polymorpha* (izquierda) y *M. paleacea* (derecha). Los datos se muestran como valores individuales, medianas y rangos intercuartílicos. En todos los casos, los tratamientos corresponden a Control (verde) e Infectado (verde amarillento). Los datos se presentan como valores medianos con rangos intercuartílicos, barra de error y puntos individuales. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. Los niveles de significancia se indican como $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), y $p < 0.001$ (***).

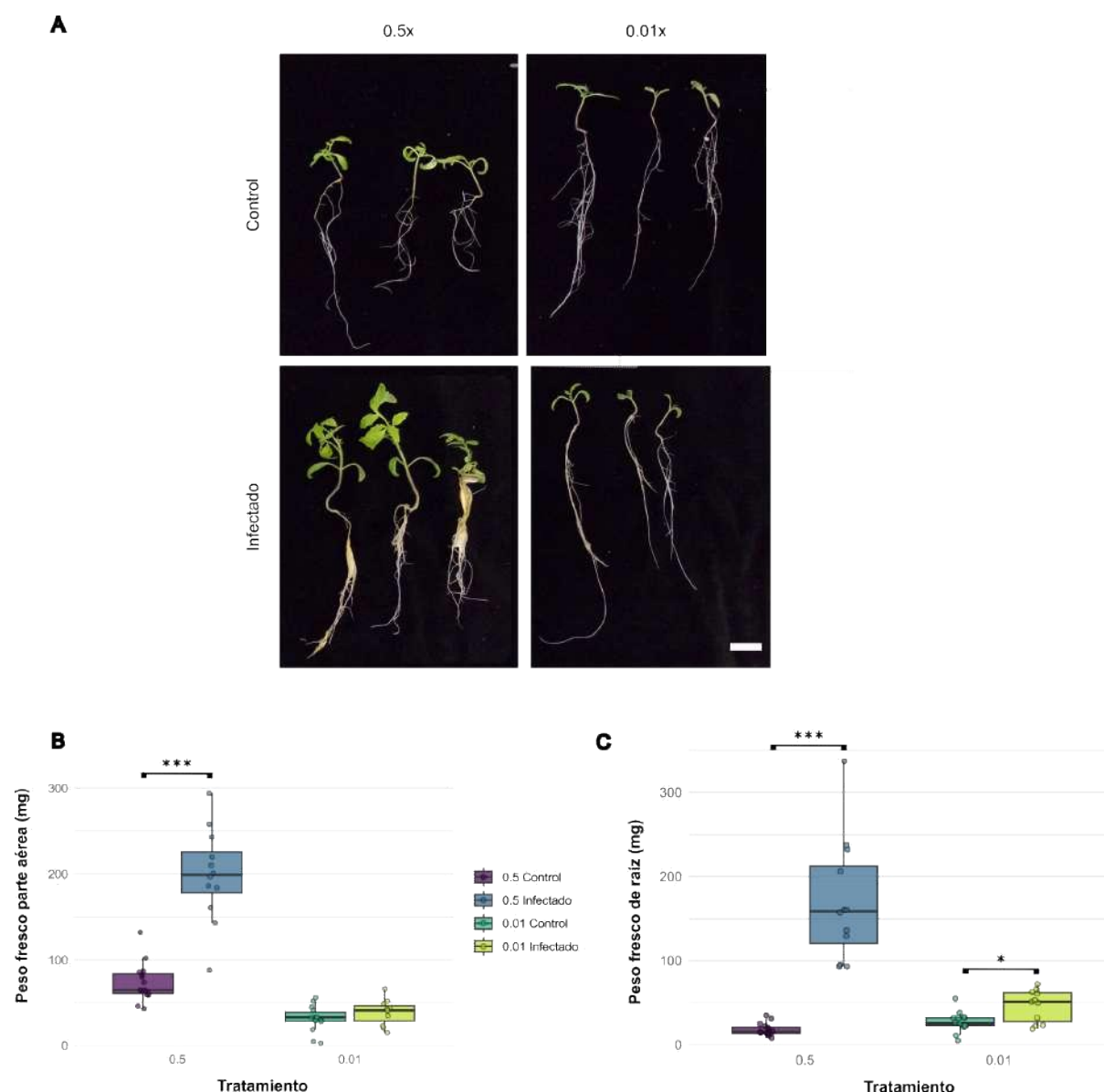


Figura 22. Impacto de la infección por MFRE en el peso fresco de la parte aérea y de raíz de *S. lycopersicum* bajo diferentes condiciones nutricionales. (A) Imágenes representativas de plantas de tomate a los 14 dpi. (B) Los diagramas de caja muestran el peso fresco de la parte aérea de plantas de tomate cultivadas bajo dos condiciones nutricionales (0.5x y 0.01x Gamborg B5). (C) Los

diagramas de caja muestran el peso fresco de la raíz de plantas de tomate cultivadas bajo las mismas condiciones nutricionales. Los tratamientos corresponden a 0.5x Control (púrpura), 0.5x Infectado (azul), 0.01x Control (verde) y 0.01x Infectado (verde amarillento). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA seguido del test post hoc de Tukey. Los niveles de significancia se indican como $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), y $p < 0.001$ (***). Barra de escala = 2 cm.

Discusión

El estudio de la simbiosis entre plantas y hongos ha estado dominada por la CSSP. Estudios filogenéticos y genómicos comparativos han propuesto que la CSSP surgió tempranamente durante la evolución de las plantas terrestres (Brundrett & Tedersoo, 2018; Delaux & Schornack, 2021). Esta vía ancestral es tan fundamental que su pérdida en algunos linajes fue interpretada como evidencia de una incapacidad para establecer interacciones íntimas y beneficiosas con hongos.

Nuestro trabajo revela que la hepática *M. polymorpha*, una especie que ha perdido la CSSP canónica y es incapaz de asociarse simbióticamente con HMA (Radhakrishnan, 2020), puede establecer una asociación benéfica con el MFRE *M. hiemalis*. Este hallazgo desafía la visión predominante de que la CSSP representa la vía universal de entrada para las interacciones simbióticas planta–hongo. Nuestros resultados respaldan la siguientes ideas: 1) la simbiosis con hongos fue un motor central en la terrestreización de las plantas, 2) la simbiosis con hongos MFRE puede haber surgido antes que la vía CSSP y 3) la simbiosis con hongos MFRE puede haber evolucionado cooptando maquinarias inmunes y celulares preexistentes, algunos de ellas compartidas con la CSSP.

Hasta la fecha, los MFRE habían sido encontrados en una amplia variedad de linajes de plantas terrestres, incluyendo briofitas y traqueofitas (Field et al., 2015a; Field et al., 2019; Howard et al., 2024; Hoysted et al., 2023). Todos estos reportes de interacciones con MFRE eran en especies con una CSSP funcional (Hoysted et al., 2019).

El Capítulo 1 describe el aislamiento de *M. hiemalis* y *M. circinelloides* a partir de plantas silvestres de *M. polymorpha subsp. polymorpha* (Ledesma et al., 2025), que sumados a los ensayos de resíntesis en condiciones axénicas usando *M. polymorpha* Tak-1 del Capítulo 2, demuestran que al menos una especie de *Mucor* se comporta como un endofito beneficioso en un hospedador genéticamente incapaz de establecer asociaciones micorrízicas. Las extensas hifas espiraladas intracelulares con engrosamientos terminales de *M. hiemalis* dentro de células vivas de *M. polymorpha* (Figura 11A) recuerdan la íntima interfaz formada por los arbuscúlos de los HMA (Glomeromycotina). En contraste, el comportamiento

virulento de *M. circinelloides*, que macera rápidamente el talo a pesar de activar una fuerte respuesta transcripcional de defensa, revela que aún MFREs estrechamente relacionados pueden establecer con la planta relaciones completamente diferentes, desde endofitos a patógenos, como se ha documentado ampliamente para otros linajes fúngicos (Tan et al., 2025). Este contraste entre *M. hiemalis* y *M. circinelloides* ofrece una herramienta poderosa para futuros estudios que busquen desentrañar qué programas inmunes y de desarrollo del hospedador permiten el mutualismo y cuáles fallan en controlar el crecimiento del patógeno. Desde la perspectiva del microorganismo, como un primer paso, la secuenciación genómica de *M. hiemalis* y *M. circinelloides* será crucial para entender el conjunto de efectores responsables del comportamiento como endofito o patógeno, y determinar cómo interactúan cuando forman parte de un consorcio del microbioma.

Un concepto central que emerge de la investigación de genomas de plantas terrestres es que la señalización simbiótica ha cooptado repetidamente componentes inmunes y módulos celulares generales (Debellé, 2020; Delaux & Schornack, 2021; Dong et al., 2025). Nuestros datos parecen apoyar este marco. Primero, la respuesta transcripcional global de *M. polymorpha* a *M. hiemalis* aunque modesta en magnitud (283 DEGs), está funcionalmente relacionada a dos procesos que también surgieron en interacciones simbióticas con HMA: el metabolismo lipídico y las defensas (Figura 15). El transporte de lípidos desde la planta al hongo es un sello distintivo de la simbiosis con HMA y se demostró como una característica ancestral de la simbiosis planta–HMA (Radhakrishnan et al., 2020; Kodama et al., 2022; Rich et al., 2021). La inducción de términos GO asociados al metabolismo de lípidos en respuesta a MFRE sugiere que, en esta interacción independiente de la CSSP, podrían estar intercambiándose tipos similares de compuestos orgánicos y utilizando, al menos en parte, maquinarias de tráfico celular comunes. Segundo, la regulación positiva de genes relacionados con defensa y metabolismo extracelular, junto con una reprogramación global relativamente leve, concuerda con un escenario en el que *M. hiemalis* es inicialmente percibido como un agente microbiano, pero finalmente acomodado dentro de la planta. Esto coincide con modelos teóricos y empíricos donde los pasos iniciales del reconocimiento simbiótico se superponen con la inmunidad activada por patrones (PTI, del inglés *pattern triggered immunity*) (Chu et al., 2023; Yotsui et al., 2023), y los microorganismos mutualistas logran un ajuste fino de la respuesta inmune de la planta (Delaux & Schornack, 2021). Finalmente, el requerimiento de MpRBOH2 para la promoción de rizoides inducida por MFRE representa un hallazgo clave que vincula la señalización inmune y simbiótica y pone de manifiesto la cooptación de parte de la señalización de la CSSP en esta nueva vía simbiótica. En angiospermas y briofitas, las quinasas PBLa/RBK y las oxidasas NADPH RBOH forman un módulo conservado río abajo de los PRRs que integran las dinámicas de

Ca²⁺ y ROS durante la inmunidad inducida por quitina (Chu et al., 2023; Yotsui et al., 2023). Llamativamente, el módulo PBLa-RBOH ha sido implicado en la fase pre-simbiótica de interacciones con HMA en plantas con una CSSP intacta, donde la producción controlada de ROS facilita la acomodación fúngica sin activar una inmunidad completa (Arthikala et al., 2014; Belmondo et al., 2016). El hecho de que el MFRE haya perdido la capacidad para inducir el número de rizoides en el mutante *Mprboh2* en condiciones de hambreado, en contraste con la respuesta robusta en *Tak-1* y *Mppbla*, indica que al menos parte de esta nueva vía simbiótica para los MFRE se ejecuta a través de un nodo conservado de señalización inmune. En otras palabras, la manipulación de la vía dependiente de *MpRBOH2* por el MFRE para mejorar el crecimiento de rizoides bajo condiciones de hambreado ejemplifica exactamente el tipo de cooptación de módulos inmunes con fines mutualistas que se ha propuesto desde la teoría evolutiva. Es destacable que, a pesar del fuerte requerimiento de *MpRBOH2* para la respuesta en rizoides, el crecimiento del talo permaneció mayormente inalterado tanto en *Tak-1* como en *Mprboh2* bajo nuestras condiciones, reforzando la idea de que el principal efecto del MFRE en *M. polymorpha* está localizado en el sistema de rizoides. Nuestros resultados indican que *MpRBOH2* es necesario para la activación del programa de desarrollo de rizoides inducido por el MFRE, mientras que PBLa desempeñaría un rol modulador ajustando la magnitud de esa respuesta. Este patrón funcional apunta a una conservación evolutiva de esta señalización para interacciones fúngicas compartidas entre MFRE y HMA.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que los efectos de *M. hiemalis* sobre el crecimiento de *M. polymorpha* son órgano-específicos y dependientes del estado nutricional. En contraste con los talos, los rizoides exhibieron una estimulación robusta inducida por el MFRE, tanto en área como en número, exclusivamente bajo condiciones de hambreado. Este incremento en el desarrollo de rizoides puede interpretarse como una estrategia funcional alternativa que cumple un rol análogo al del hongo micorrízico donde incrementa la superficie de exploración del suelo bajo limitaciones de fósforo mediante el crecimiento de hifas extrarradiculares que compensan la reducción en la absorción directa por raíz. Sin embargo, nuestros resultados se alinean con una visión matizada que es emergente para el MFRE. Experimentos con hepáticas (*Haplomitrium gibbsiae* y *Neohodgsonia mirabilis*) y plantas vasculares (*Plantago lanceolata* y *Trifolium repens*) han mostrado que los MFRE contribuyen sustancialmente a los flujos de nitrógeno, pero sus beneficios de crecimiento pueden depender del balance entre aporte de nutrientes, costos de carbono y etapa de desarrollo del hospedador (Field et al., 2019; Howard et al., 2024; Hoysted et al., 2023). En nuestro sistema MFRE-*Marchantia*, el hambreado limitó la capacidad del talo para producir biomasa mientras que el MFRE pudo revertir parcialmente el efecto sobre el sistema de

rizoides. En cambio, bajo suministro moderado de nutrientes, el hongo pudo contribuir modestamente al crecimiento del talo, quizás suplementando nutrientes específicos o modulando la señalización hormonal sin la severa limitación de carbono y otros macronutrientes impuesta en el tratamiento de hambreado. La respuesta centrada en los rizoides sugiere que el MFRE actúa principalmente reprogramando estas estructuras subterráneas para mejorar la capacidad exploratoria y posiblemente la interfaz de absorción. Esta especificidad espacial del efecto del MFRE puede reflejar sensibilidades o conexiones particulares de los módulos inmuno/simbióticos entre órganos y tejidos, en consonancia con el concepto más amplio de que raíces y rizoides despliegan programas especializados de inmunidad y simbiosis con respecto a los órganos aéreos (Chubierre et al., 2018). En un contexto natural, donde es común la heterogeneidad espacial de nutrientes, un sistema de rizoides ampliado entrelazado con hifas fúngicas podría proporcionar una fuerte ventaja ecológica al aumentar el acceso a parches de nutrientes y agua.

La identificación y validación funcional de *MpbHLH4* como un factor de transcripción sensible al MFRE que regula negativamente la iniciación de rizoides añade una capa mecánica a nuestro modelo. Los factores de transcripción bHLH son conocidos reguladores del destino celular, respuestas hormonales y desarrollo de raíces/rizoides tanto en briofitas como en angiospermas (Menand et al., 2007; Proust et al., 2016; Thamm et al., 2020). Nuestros datos transcriptómicos muestran que *MpbHLH4* es reprimido tras la infección con *M. hiemalis*, y que la infección del mutante con el MFRE, sólo bajo condiciones de hambreado, induce un mayor número de rizoides por planta, sin otras consecuencias para el área del talo o el área de rizoides. Esta interacción genética sugiere que *MpbHLH4* no es requerido para el establecimiento de la simbiosis *per se*, sino que actúa como un freno para la iniciación de nuevos rizoides durante la respuesta simbiótica. En plantas Tak-1, la infección por MFRE dispara una respuesta, en parte dependiente de *MpRBOH2*, que promueve tanto la formación de rizoides como la inducción de *MpbHLH4*, elevando así la represión sobre la iniciación de rizoides. Esta retroalimentación compensatoria está ausente en el mutante *Mpbhlh4* mostrando una proliferación exagerada de rizoides. Este diseño, donde una señal simbiótica induce transitoriamente un regulador negativo, se ajusta bien a la idea de que los circuitos de desarrollo ancestrales están organizados para conservar respuestas robustas y sólo permiten grandes reconfiguraciones morfológicas cuando múltiples componentes regulatorios cambian simultáneamente.

Un avance clave de este estudio es la demostración de que *M. hiemalis* puede establecer asociaciones compatibles y promotoras del crecimiento no sólo con la hepática no micorrízica *M. polymorpha*, sino también con plantas que tienen una CSSP funcional como la hepática *M. paleacea* y la planta vascular *Solanum lycopersicum*. Este rango de

hospedadores es consistente con estudios que muestran que los MFRE pueden infectar un amplio espectro filogenético de plantas terrestres, desde briofitas a traqueofitas, a menudo en combinación con HMA (Hoysted et al., 2019; Pressel et al., 2021; Sinanaj et al., 2021). Curiosamente, la magnitud y la naturaleza de la respuesta de crecimiento varían según el hospedador y las condiciones de nutrientes. *M. paleacea* muestra una mejora significativa en el crecimiento del talo y rizoides tras la infección por MFRE, mientras que *M. polymorpha* exhibe principalmente mejoras en rizoides. En tomate, la infección con *M. hiemalis* mejora la biomasa aérea y radicular bajo condiciones normales de nutrientes, pero no bajo condiciones de hambreado, lo opuesto a lo observado en *M. polymorpha*. Estas diferencias sugieren que, si bien existe una respuesta central conservada al MFRE, su integración con redes hormonales específicas del hospedador, arquitectura de raíces/rizoides y economía carbono–nutriente, difiere entre linajes.

El hecho de que MFRE pueda beneficiar a especies competentes en la CSSP implica que los programas simbióticos dependientes e independientes de CSSP pueden coexistir dentro del mismo hospedador y están conservados en distintas líneas de plantas. Aún no está claro si estas vías son funcionalmente independientes, parcialmente redundantes u organizadas jerárquicamente. Una posibilidad es que la señalización CSSP se active principalmente por HMA Glomeromycotina, mientras que MFRE explota preferentemente módulos derivados de la inmunidad como PBLa–RBOH, con cierta intercomunicación a nivel de Ca^{+2} , ROS y otros nodos transcripcionales. Alternativamente, la actividad de la CSSP en especies competentes podría modular u ocultar parte de la respuesta MFRE, convirtiendo a *M. polymorpha* en un modelo muy valioso para disectar los mecanismos independientes de CSSP.

Desde una perspectiva evolutiva, la simbiosis del MFRE dependiente de MpRBOH2 en una briofita que ha perdido la CSSP sugiere fuertemente que existen estrategias simbióticas alternativas a la simbiosis con HMA, amortiguando potencialmente las consecuencias ecológicas de tales pérdidas. Al mismo tiempo, nuestro trabajo arroja luz sobre varios aspectos de MFRE: el número limitado de aislamientos caracterizados, el desafío de identificar y caracterizar a los MFRE y el desafío de aislar los MFRE de los HMA en raíces/rizoides de plantas co-infectadas. Al establecer sistemas monoaxénicos *M. hiemalis*–*Marchantia* y combinarlos con herramientas genéticas y genómicas, proporcionamos una plataforma para responder preguntas relevantes bajo condiciones completamente controladas. Finalmente, no ha pasado desapercibido para nosotros que debemos poner futuros esfuerzos en caracterizar genéticamente esta nueva vía simbiótica de los MFRE, lo cual constituirá un desarrollo tecnológico para ofrecer nuevas asociaciones fúngicas beneficiosas para cultivos y ecosistemas naturales, complementaria a los esfuerzos actuales focalizados en la simbiosis con AMF.

Conclusión

Los resultados de esta tesis permiten revisar la noción ampliamente aceptada de que *M. polymorpha* carece de la capacidad de establecer interacciones simbióticas con hongos debido a la pérdida de elementos centrales de la vía CSSP, necesaria para el establecimiento de micorrizas arbusculares en plantas terrestres (Parniske, 2008; Delaux et al., 2015). En el Capítulo 1 describimos aislamientos de *Mucor* spp. provenientes de plantas salvajes de *M. polymorpha* y en el Capítulo 2 generamos evidencia histológica, fisiológica y molecular que demuestra que *M. polymorpha* interactúa íntima y funcionalmente con hongos del *Subphylum* Mucoromycotina. Estas asociaciones impactan positivamente en la planta bajo condiciones de deficiencias nutricionales, presentan importantes implicancias para la ecología y la evolución de las plantas terrestres. Sumados a los resultados en especies de otros linajes con una CSSP funcional, la hepática *M. paleacea* y *S. lycopersicum*, los resultados de esta tesis sugieren fuertemente la existencia de una nueva vía simbiótica independiente de la CSSP en plantas terrestres.

Los estudios realizados en ambientes naturales demostraron que *M. polymorpha* alberga un consorcio diverso de endofitos fúngicos, cuya composición varía en función del grado de perturbación del sitio y de las características edáficas del mismo (Ledesma et al., 2025). Este patrón coincide con trabajos sobre hepáticas que muestran que el microbioma fúngico asociado a estos linajes está estructurado por presiones ambientales y factores funcionales (Humphreys et al., 2010; Upson et al., 2007). En particular, el descubrimiento recurrente de hongos del *Subphylum* Mucoromycotina en sitios con baja disponibilidad de fósforo sugiere una relación ecofisiológica estrecha entre la planta y hongos relacionadas con la adquisición de nutrientes (Field et al., 2015a; Pirozynski & Malloch, 1975). La presencia de *M. hiemalis* en todos los sitios de muestreo y su perfil funcional, caracterizado por una elevada actividad fosfatasa ácida, refuerzan la idea de que estos hongos no sólo coexisten con *M. polymorpha*, sino que desempeñan funciones ecológicas relevantes facilitando el crecimiento vegetal en suelos pobres en nutrientes. A partir de estas consideraciones, proponemos que la asociación entre *M. polymorpha* y *M. hiemalis* no debería interpretarse como una coexistencia pasiva, sino como una interacción funcional en la que el hongo actúa como un intermediario metabólico que mejora la disponibilidad de recursos para la planta. Así, la interacción no se manifiesta como un mutualismo obligatorio, sino como una relación condicional, cuyo beneficio emerge bajo contextos de limitación nutricional. Este tipo de interacciones flexibles ha sido propuesto como característico de las primeras asociaciones planta–hongo durante la terrestreización de las plantas (Marin et al., 2018).

Desde una perspectiva ecológica y evolutiva, los resultados de esta tesis refuerzan la idea de que la disponibilidad de nutrientes, particularmente del fósforo, ha sido y sigue siendo un factor importante en la evolución de las interacciones planta–hongo. La fuerte relación entre ambientes pobres en fósforo, la presencia de hongos con capacidades metabólicas especializadas y el beneficio observado en la planta bajo condiciones de hambre sugiere que el mutualismo surge como una respuesta adaptativa frente a un recurso escaso (Field et al., 2019; Rimington et al., 2019). En este marco, la asociación entre *M. polymorpha* y *M. hiemalis* puede interpretarse como parte de una estrategia simbiótica ancestral que habría permitido a las primeras plantas terrestres superar las limitaciones de los suelos primitivos.

Enfoques recientes proponen que los distintos tipos de simbiosis no surgieron como interacciones especializadas, sino como asociaciones más simples basadas en la tolerancia inmunológica, la compatibilidad metabólica y la explotación de funciones ecológicas preexistentes del simbionte fúngico (Delaux et al., 2015; Delaux & Schornack, 2021; Pirozynski & Malloch, 1975). Es por esto que las hepáticas actuales son ideales para reconstruir los mecanismos tempranos que sostuvieron la interacción planta–hongo durante la terrestreización de las plantas (Field et al., 2019; Rimington et al., 2020). La capacidad para ajustar su crecimiento y arquitectura en respuesta a la presencia del MFRE podría sugerir que los principios básicos de la simbiosis pudieron haberse establecido antes de la aparición de las vías de señalización que caracterizan a las micorrizas arbusculares modernas (Field et al., 2015b; Pressel et al., 2021; Rimington et al., 2019).

Los resultados del Capítulo 2 permiten conocer los principales mecanismos que sostienen la interacción entre *M. polymorpha* y hongos MFRE. Un rasgo característico de la interacción con *M. hiemalis* es su capacidad para infectar intracelularmente el talo sin producir daño ni activar respuestas de defensas exacerbadas. Este tipo de infección, caracterizada por la presencia de hifas en células vivas y metabólicamente activas, ha sido entendida en otras hepáticas y musgos, como una relación funcional equilibrada con el hospedador (Duckett et al., 2006; Pressel et al., 2021). Si bien esta interacción comparte algunas características fundamentales con la interacción con HMA, como la infección intracelular con una activación contenida de las defensas inducibles y el intercambio de nutrientes con la planta, resta determinar si los ensanchamientos terminales del MFRE es el lugar de intercambio activo con la planta o buscar otras estructuras involucradas. Existe un número importante de estudios paleobotánicos y comparativos indicando que muchas de las potenciales simbiosis en registros fósiles presentan morfologías simples, con hifas intracelulares poco diferenciadas, lo que sugiere que las asociaciones tempranas planta–hongo no dependen necesariamente de arquitecturas complejas de intercambio (Strullu-Derrien et al., 2018).

El contraste con *M. circinelloides* es particularmente interesante. A pesar de formar parte del mismo consorcio endofítico, la infección con *M. circinelloides* en condiciones de laboratorio indujo una fuerte respuesta de defensa, como MpMYB14, MpPR6a, MpPR4 y MpWRKY3, y finalizó con la necrosis generalizada de la planta. Esta diferencia entre especies del género *Mucor* demuestra que la planta no responde de manera homogénea, sino que puede discriminar entre microorganismos benéficos y no benéficos y disparar respuestas de defensa completamente diferentes. Así, la interacción entre los organismos no depende de la entrada del hongo al tejido vegetal, sino del reconocimiento de efectores fúngicos específicos que, en un caso, permiten una interacción prolongada e íntima, y en el otro culmina con un daño generalizado de los tejidos. En este sentido, modelos recientes de inmunidad vegetal proponen que esta capacidad de modulación diferencial constituye un rasgo clave en la evolución de las interacciones benéficas, ya que permite tolerar simbiosis sin comprometer completamente la defensa frente a patógenos (Carella et al., 2019; Delaux & Schornack, 2021).

En angiospermas y briófitas, el módulo PBLa/RBOH es parte de la respuesta PTI que integra señales de Ca²⁺ y ROS durante la inmunidad inducida por quitina (Chu et al., 2023; Yotsui et al., 2023). Nuestros resultados indican que este mismo módulo pudo ser co-optado por *M. polymorpha* para mediar interacciones benéficas, apoyando la idea de que la señalización redox constituye uno de los mecanismos más tempranos de integración planta–microorganismo. La co-optación de componentes inmunes conservados coincide con modelos evolutivos que proponen que las simbiosis especializadas se originaron a partir de redes inmunes preexistentes (Marin et al., 2018). En este sentido, los resultados del Capítulo 2 nos permitieron establecer que existen mecanismos compartidos con la interacción con HMA, como la activación de defensas mediadas por Kinasas y la producción de ROS, modulando la interacción temprana entre *M. polymorpha* y MFRE. El análisis de mutantes afectados en la Kinasa tipo PBLa (MpPBLa) y en las NADPH oxidasas (MpRBOH) revela que el desarrollo de rizoides inducido por MFRE bajo condiciones de hambreado depende en gran medida de la producción de ROS mediada por MpRBOH2. El análisis de los mutantes de *Mppbla* y *Mprboh1/2* mostró que: 1) MpPBLa modula la intensidad de la respuesta al MFRE, pero no es estrictamente indispensable y 2) la pérdida de función de MpRBOH2, pero no de MpRBOH1, elimina la respuesta inducida por el MFRE, incluyendo área y número de rizoides. Dado que la producción de ROS en *M. polymorpha* en respuesta a quitina está mediada exclusivamente por MpRBOH1 y no por MpRBOH2 (Chu et al., 2023), nuestros resultados revelan una función desconocida para MpRBOH2 mediando el reconocimiento de *M. hiemalis*. Se necesitarán nuevos estudios para determinar otros efectores mayoritarios de *M. hiemalis*. La participación de MpRBOH2 inducida por MFRE

sugiere que la señalización redox podría haber constituido uno de los mecanismos más tempranos utilizados por las plantas para integrar señales microbianas y ajustar su desarrollo en función del ambiente. Nuestros resultados indican que este mismo módulo pudo ser co-optado por *M. polymorpha* para mediar interacciones benéficas, apoyando la idea de que la señalización redox constituye uno de los mecanismos más tempranos de integración planta–microorganismo. La co-optación de componentes inmunes conservados coincide con modelos evolutivos que proponen que las simbiosis especializadas se originaron a partir de redes inmunes preexistentes (Marin et al., 2018).

La comparación con *M. paleacea* y *S. lycopersicum* permite comprender la estrategia de *M. polymorpha* dentro de un continuo evolutivo. *M. paleacea*, que tiene intacta la CSSP y establece asociaciones con HMA, puede asociarse al MFRE para contrarrestar los efectos adversos del estrés nutricional, un efecto similar al observado en *M. polymorpha*. En *S. lycopersicum*, la asociación con *M. hiemalis* promueve el crecimiento bajo condiciones nutricionales normales, pero no bajo limitación de nutrientes, algo que podría sugerir una mayor especialización en plantas vasculares. En conjunto, estos resultados refuerzan la existencia de una vía simbiótica paralela e independiente de la CSSP que media las interacciones con MFRE.

Estos resultados sugieren que las hepáticas podrían presentar una mayor flexibilidad en sus interacciones con hongos, posiblemente asociada a su organización anatómica simple y a su contacto directo con el suelo, lo que pudo favorecer una mayor tasa de transferencia horizontal de genes en comparación con otros linajes de plantas (Dong et al., 2025). Esta flexibilidad de las briofitas pudo haber sido parte de su estrategia evolutiva, tanto durante la terrestreización del linaje como en los actuales escenarios donde crecen naturalmente.

Diversos marcos teóricos provenientes de la ecología de los hongos del suelo han enfatizado que los microorganismos fúngicos deben entenderse como componentes activos de los ecosistemas terrestres, capaces de modificar la disponibilidad de nutrientes, la estructura del suelo y la fisiología de las plantas hospedadoras (Marín, 2018). En este sentido, los hongos no son simples acompañantes de las plantas, sino agentes ecológicos que median de forma directa la interacción entre los organismos fotosintéticos y el ambiente abiótico. Los resultados de esta tesis, principalmente, la interacción entre *M. polymorpha* y *M. hiemalis* bajo condiciones de deficiencia nutricional, refuerzan esto y sugieren que la cooperación metabólica entre plantas y hongos pudo haber sido un factor importante en la terrestreización temprana.

Desde un enfoque de evolución multinivel, donde la selección natural no actúa exclusivamente sobre organismos individuales, sino también sobre asociaciones funcionales

que incrementan la aptitud de los participantes. Trabajos recientes sobre simbiosis, demuestran que pueden constituir unidades emergentes de organización biológica cuando la cooperación genera beneficios consistentes en escenarios ambientales recurrentes (Johnson & Marín, 2025). La interacción entre *M. polymorpha* y *M. hiemalis*, mejora el desempeño de la planta bajo condiciones de deficiencia nutricional y puede entenderse como una de estas unidades funcionales emergentes, en las cuales la interacción misma adquiere relevancia evolutiva. En este marco, los hongos habrían actuado como socios clave en la adquisición de nutrientes y ayudado a las plantas a enfrentar las condiciones ambientales de los primeros ecosistemas terrestres (Marín, 2015). La persistencia de interacciones funcionales entre hepáticas actuales y los MFRE sugiere que estas asociaciones no sólo fueron importantes en el pasado, sino que continúan siendo ecológicamente relevantes en la actualidad.

En conjunto, los resultados de esta tesis sostienen que *M. polymorpha* establece interacciones fúngicas funcionales mediante la modulación de su sistema inmune y la cooptación de componentes conservados de la señalización redox. Queda pendiente explorar si esto es a través de programas simbióticos altamente especializados o la cooptación de redes de señalización existentes. Esta estrategia, funcionalmente efectiva y ecológicamente condicionada por la disponibilidad de nutrientes, probablemente represente un estado ancestral de las interacciones planta–hongo que precedió a la evolución de la CSSP. Desde esta perspectiva, la interacción entre *M. polymorpha* y *M. hiemalis* constituye un registro funcional de los mecanismos tempranos que permitieron a las plantas colonizar ambientes terrestres pobres en nutrientes, sentando las bases para la posterior diversificación de las simbiosis planta–microorganismo.

Bibliografía

- Aach, J., Mali, P., & Church, G. M. (2014). CasFinder: Flexible algorithm for identifying specific Cas9 targets in genomes. *bioRxiv*, 005074. <https://doi.org/10.1101/005074>
- Alcaraz, L. D., Peimbert, M., Barajas, H. R., Dorantes-Acosta, A. E., Bowman, J. L., & Arteaga-Vázquez, M. A. (2018). *Marchantia* liverworts as a proxy to plants' basal microbiomes. *Scientific Reports*, 8, 12712. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31168-0>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data* [Software]. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arthikala, M. K., Sánchez-López, R., Nava, N., Santana, O., Cárdenas, L., & Quinto, C. (2014). RbohB, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *New Phytologist*, 202(3), 886–900. <https://doi.org/10.1111/nph.12714>
- Asakawa, Y. (2008). Liverworts—Potential source of medicinal compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 14(28), 3067–3088. <https://doi.org/10.2174/138161208786404272>
- Bashan, Y., & Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36(9), 591–608. <https://doi.org/10.1139/m90-105>
- Beauregard, M., Hamel, C., & St-Arnaud, M. (2010). Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in alfalfa. *Microbial Ecology*, 59(2), 379–389. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9583-z>
- Belmondo, S., Calcagno, C., Genre, A., Puppo, A., Pauly, N., & Lanfranco, L. (2016). NADPH oxidases in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Signaling & Behavior*, 11(4), e1165379. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1165379>
- Bennett, A. E., & Groten, K. (2022). The Costs and Benefits of Plant–Arbuscular Mycorrhizal Fungal Interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 237, 47–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-124504>
- Bidartondo, M. I., Read, D. J., Trappe, J. M., Merckx, V., Ligrone, R., & Duckett, J. G. (2011). The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biology Letters*, 7(4), 574–577. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.1203>

- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bowman, J. L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., Adam, C., Aki, S. S., Althoff, F., Araki, T., Arteaga-Vázquez, M. A., Balasubramanian, S., Barry, K., Bauer, D., Boehm, C. R., ... Schmutz, J. (2017). Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell*, 171(2), 287–304.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.030>
- Caligiore-Gei, P. F., & Valdez, J. G. (2015). Adjustment of a rapid method for quantification of *Fusarium* spp. spore suspensions in plant pathology. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 152–154. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.002>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carella, P., Gogleva, A., Hoey, D. J., Bridgen, A. J., Stolze, S. C., Nakagami, H., & Schornack, S. (2019). Conserved biochemical defenses underpin host responses to oomycete infection in an early-divergent land plant lineage. *Current Biology*, 29(14), 2282–2294.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.078>
- Carter, M. R., & Gregorich, E. G. (Eds.). (2007). *Soil sampling and methods of analysis* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420005271>
- Catania, M. del V., Albornoz, P. L., Rausch, A. O., Ledesma, T. M., Dong, S., Cai, Y., Zeng, Y., Liu, Y., Suárez, G. M., & Moreno, J. E. (2025). Discovery of arbuscular mycorrhizae in mosses of the Pottiaceae family from the Chaco Serrano (Tucumán, Argentina). *Plants*, 14(7), 1048. <https://doi.org/10.3390/plants14071048>
- Cedrés-Perdomo, R. D., Hernández-Hernández, R., Emerson, B. C., & González-Mancebo, J. M. (2023). Multiple responses of bryophytes in a chronosequence of burnt areas in

- non-fire prone subtropical cloud forests. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 58, 125702. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2022.125702>
- Chu, J., Monte, I., DeFalco, T. A., Köster, P., Derbyshire, P., Menke, F. L. H., & Zipfel, C. (2023). Conservation of the PBL–RBOH immune module in land plants. *Current Biology*, 33(6), 1130–1137.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.01.050>
- Chuberre, C., Plancot, B., Driouich, A., Moore, J. P., Bardor, M., Gügi, B., & Vitré, M. (2018). Plant immunity is compartmentalized and specialized in roots. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1692. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01692>
- Clear, M. R., & Hom, E. F. Y. (2019). The evolution of symbiotic plant–microbe signalling. In J. Roberts (Ed.), *Annual Plant Reviews Online* (Vol. 2, pp. 785–836). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0684>
- Cottet, A. C., Scervino, J. M., & Messuti, M. I. (2018). An improved staining protocol for the assessment of arbuscular mycorrhizal in bryophytes. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 53, 1–10.
- Cuadros-Orellana, S., Leite, L., Smith, A., Medeiros, J., Badotti, F., Fonseca, P., Vaz, A., Oliveira, G., & Góes-Neto, A. (2013). Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: A decade in review. *Fungal Genomics & Biology*, 3, 110. <https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000110>
- Dahl, T. W., & Arens, S. K. M. (2020). The impacts of land plant evolution on Earth's climate and oxygenation state – An interdisciplinary review. *Chemical Geology*, 547, 119665. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119665>
- Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A., & Callahan, B. J. (2018). Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*, 6, 226. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0605-2>
- Debellé, F. (2020). The common symbiotic signaling pathway. En *The Model Legume Medicago truncatula* (pp. 523-528). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119409144.ch64>
- Delaux, P. M., Nanda, A. K., Mathé, C., Sejalón-Delmas, N., & Dunand, C. (2012). Molecular and biochemical aspects of plant terrestrialization. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14(1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2011.09.001>
- Delaux, P. M., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J. D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., Rothfels, C. J., Sederoff, H. W., Stevenson, D. W., Surek, B., Zhang, Y., Sussman, M. R., Dunand, C., Morris, R. J., Roux, C., Wong, G. K., Oldroyd, G. E., & Ané, J. M. (2015). Algal ancestor of

- land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), 13390–13395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515426112>
- Delaux, P. M., & Schornack, S. (2021). Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science*, 371(6531), eaba6605. <https://doi.org/10.1126/science.aba6605>
- Delaeter, M., Magnin-Robert, M., Randoux, B., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2024). Arbuscular mycorrhizal fungi as biostimulant and biocontrol agents: A review. *Microorganisms*, 12(7), 1281. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071281>
- Della Monica, I. F., Saparrat, M. C. N., Godeas, A. M., & Scervino, J. M. (2015). The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal Ecology*, 17, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.04.004>
- Delwiche, C. F., & Cooper, E. D. (2015). The evolutionary origin of a terrestrial flora. *Current Biology*, 25(19), R899–R910. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.029>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dong, S., Wang, S., Li, L., Yu, J., Zhang, Y., Xue, J.-Y., Chen, H., Ma, J., Zeng, Y., Cai, Y., Huang, W., Zhou, X., Wu, J., Li, J., Yao, Y., Hu, R., Zhao, T., Villarreal A, J. C., Dirick, L., Liu, L., Ignatov, M., Jin, M., Ruan, J., He, Y & Liu, Y. (2025). Bryophytes hold a larger gene family space than vascular plants. *Nature Genetics*, 57(10), 2562–2569. <https://doi.org/10.1038/s41588-025-02325-9>
- Du, Z.-Y., Zienkiewicz, K., Vande Pol, N., Ostrom, N. E., Benning, C., & Bonito, G. M. (2019). Algal–fungal symbiosis leads to photosynthetic mycelium. *eLife*, 8, e47815. <https://doi.org/10.7554/eLife.47815>
- Duckett, J. G., Carafa, A., & Ligrone, R. (2006). A highly differentiated glomeromycotean association with the mucilage-secreting, primitive antipodean liverwort *Treubia* (Treubiaceae): Clues to the origins of mycorrhizas. *American Journal of Botany*, 93(6), 797–813. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.6.797>
- Elias, F., Woyessa, D., & Muleta, D. (2016). Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/5472601>

- Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2021). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant. *Frontiers in Plant Science*, 12, 699618. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699618>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Field, K. J., Rimington, W. R., Bidartondo, M. I., Allinson, K. E., Beerling, D. J., Cameron, D. D., Duckett, J. G., Leake, J. R., & Pressel, S. (2015a). First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. *New Phytologist*, 205(2), 743–756. <https://doi.org/10.1111/nph.13024>
- Field, K. J., Pressel, S., Duckett, J. G., Rimington, W. R., & Bidartondo, M. I. (2015b). Symbiotic options for the conquest of land. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(8), 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.05.007>
- Field, K. J., Rimington, W. R., Bidartondo, M. I., Allinson, K. E., Beerling, D. J., Cameron, D. D., Duckett, J. G., Leake, J. R., & Pressel, S. (2016). Functional analysis of liverworts in dual symbiosis with Glomeromycota and Mucoromycotina fungi under a simulated Palaeozoic CO₂ decline. *The ISME journal*, 10(6), 1514–1526. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.204>
- Field, K. J., Bidartondo, M. I., Rimington, W. R., Hoysted, G. A., Beerling, D. J., Cameron, D. D., Duckett, J. G., Leake, J. R., & Pressel, S. (2019). Functional complementarity of ancient plant–fungal mutualisms: Contrasting nitrogen, phosphorus and carbon exchanges between Mucoromycotina and Glomeromycotina fungal symbionts of liverworts. *New Phytologist*, 223(2), 908–921. <https://doi.org/10.1111/nph.15819>
- Fonseca, H. M. A. C., Berbara, R. L. L., & Pereira, M. L. (2014). Monoxenic cultures of light sensitive arbuscular mycorrhizal fungi with *Lunularia cruciata* (Marchantiopsida). *Nova Hedwigia*, 79-87. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2013/0147>
- Genre, A., Chabaud, M., Balzerque, C., Puech-Pagès, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Bécard, G., Bonfante, P., & Barker, D. G. (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist*, 198(1), 190–202. <https://doi.org/10.1111/nph.12146>
- Glime, J. M. (2007). *Bryophyte ecology*. Michigan Technological University, Digital Commons. <https://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology/>

- Goyette, J.-O., Bennett, E. M., Howarth, R. W., & Maranger, R. (2016). Changes in anthropogenic nitrogen and phosphorus inputs to the St. Lawrence sub-basin over 110 years and impacts on riverine export. *Global Biogeochemical Cycles*, 30(7), 1000–1014. <https://doi.org/10.1002/2016GB005384>
- Gradstein, S. R. (2008). Epiphytes of tropical montane forests—Impact of deforestation and climate change. *Göttingen Centre for Biodiversity and Ecology Series*, 2, 51–65.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Estimation of Cell Number by Hemocytometry Counting. *Cold Spring Harbor protocols*, 2019(11), 10.1101/pdb.prot097980. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot097980>
- He, X., Sun, Y., & Zhu, R.-L. (2013). The oil bodies of liverworts: Unique and important organelles in land plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(5), 293–302. <https://doi.org/10.1080/07352689.2013.765765>
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., & Hedges, S. B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*, 293(5532), 1129–1133. <https://doi.org/10.1126/science.1061457>
- Hoysted, G. A., Jacob, A. S., Kowal, J., Giesemann, P., Bidartondo, M. I., Duckett, J. G., Gebauer, G., Rimington, W. R., Schornack, S., Pressel, S., & Field, K. J. (2019). Mucoromycotina fine root endophyte fungi form nutritional mutualisms with vascular plants. *Plant Physiology*, 181(2), 565–577. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00729>
- Hoysted, G. A., Bidartondo, M. I., Duckett, J. G., Pressel, S., & Field, K. J. (2021). Phenology and function in lycopod–Mucoromycotina symbiosis. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.28.316760>
- Hoysted, G. A., Field, K. J., Sinanaj, B., Bell, C. A., Bidartondo, M. I., & Pressel, S. (2023). Direct nitrogen, phosphorus and carbon exchanges between Mucoromycotina “fine root endophyte” fungi and a flowering plant in novel monoxenic cultures. *New Phytologist*, 238(1), 70–79. <https://doi.org/10.1111/nph.18630>
- Howard, N., Williams, A., Durant, E., Pressel, S., Daniell, T. J., & Field, K. J. (2024). Preferential nitrogen and carbon exchange dynamics in Mucoromycotina “fine root endophyte”–plant symbiosis. *Current Biology*, 34(24), 5484–5493.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2024.10.028>
- Humphreys, C. P., Franks, P. J., Rees, M., Bidartondo, M. I., Leake, J. R., & Beerling, D. J. (2010). Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature Communications*, 1, 103. <https://doi.org/10.1038/ncomms1105>

- Jayawardena, R. S., Purahong, W., Zhang, W., Wubet, T., Li, X., Liu, M., Zhao, W., Hyde, K. D., Liu, J., & Yan, J. (2018). Biodiversity of fungi on *Vitis vinifera* L. revealed by traditional and high-resolution culture-independent approaches. *Fungal Diversity*, 90, 1–84. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0398-4>
- Jiang, F., Zhang, L., Zhou, J., George, T. S., & Feng, G. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance mineralisation of organic phosphorus by carrying bacteria along their extraradical hyphae. *New Phytologist*, 230(1), 304–315. <https://doi.org/10.1111/nph.17081>
- Johnson, N. C., & Marín, C. (2025). Functional team selection as a framework for local adaptation in plants and their belowground microbiomes. *The ISME Journal*, 19(1), wraf137. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wraf137>
- Kelly, K. H., Coleine, C., Coshland, C., & Stajich, J. E. (2024). Novel Glomeromycotina–moss associations identified in California dryland biocrusts. *bioRxiv*, 2024.12.27.630416. <https://doi.org/10.1101/2024.12.27.630416>
- Kodama, K., Rich, M. K., Yoda, A., Shimazaki, S., Xie, X., Akiyama, K., Mizuno, Y., Komatsu, A., Luo, Y., Suzuki, H., Kameoka, H., Libourel, C., Keller, J., Sakakibara, K., Nishiyama, T., Nakagawa, T., Mashiguchi, K., Uchida, K., Yoneyama, K., Tanaka, Y., Yamaguchi, S., Shimamura, M., Delaux, P. M., & Kyojuka, J. (2022). An ancestral function of strigolactones as symbiotic rhizosphere signals. *Nature Communications*, 13(1), 3974. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31708-3>
- Konopiński, M. K. (2020). Shannon diversity index: A call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in population genetics studies. *PeerJ*, 8, e9391. <https://doi.org/10.7717/peerj.9391>
- Kowal, J., Pressel, S., Duckett, J. G., Bidartondo, M. I., & Field, K. J. (2018). From rhizoids to roots? Experimental evidence of mutualism between liverworts and ascomycete fungi. *Annals of Botany*, 121(2), 221–227. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx126>
- Kubo, H., Sunhwa, K., Teramori, H., & Takanashi, K. (2024). MpR2R3-MYB2 is a key regulator of oil body formation in *Marchantia polymorpha*. *Planta*, 260(3), 68. <https://doi.org/10.1007/s00425-024-04498-9>
- Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., & Kohchi, T. (2013). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(1), 167–172. <https://doi.org/10.1271/bbb.120700>

- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Ledesma, T. M., Tolopka, J. I., Rausch, A. O., Svriz, M., Scervino, J. M., & Moreno, J. E. (2025). Phosphorus-related traits of fungal endophyte communities in *Marchantia polymorpha* across sites with varying human disturbance. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-025-08090-2>
- Liao, R., Zhang, W., Xu, R., Li, K., Wei, W., & Sheng, R. (2025). Endophytic microbial communities and functional shifts in *Hemarthria compressa* grass in response to silicon and selenium amendment. *BMC Plant Biology*, 25(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06178-6>
- Ligrone, R., Carafa, A., Lumini, E., Bianciotto, V., Bonfante, P., & Duckett, J. G. (2007). Glomeromycotean associations in liverworts: A molecular, cellular, and taxonomic analysis. *American Journal of Botany*, 94(11), 1756–1777. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.11.1756>
- Liu, M., Liu, J., Chen, X., Jiang, C., Wu, M., & Li, Z. (2018). Shifts in bacterial and fungal diversity in a paddy soil faced with phosphorus surplus. *Biology and Fertility of Soils*, 54(2), 259–267. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1258-1>
- Liu, Y.-X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & Cell*, 12, 315–330. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- López-Ráez, J., Matusova, R., Cardoso, C., Jamil, M., Charnikhova, T., Kohlen, W., Ruyter-Spira, C., Verstappen, F., & Bouwmeester, H. (2009). Strigolactones: Ecological significance and use as a target for parasitic plant control. *Pest Management Science*, 65, 471–477. <https://doi.org/10.1002/ps.1692>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ludwiczuk, A., & Asakawa, Y. (2019). Bryophytes as a source of bioactive volatile terpenoids – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110649. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110649>
- Luginbuehl, L., Ménard, G., Kurup, S., Van Erp, H., Radhakrishnan Gurú, G., Breakspear, A., Oldroyd, G. E. D., & Eastmond, J. P. (2017). Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*, 356(6343), 1175–1178. <https://doi.org/10.1126/science.aan0081>

- Lutzoni, F., Nowak, M. D., Alfaro, M. E., Reeb, V., Miadlikowska, J., Krug, M., Arnold, A. E., Lewis, L. A., Swofford, D. L., Hibbett, D., Hilu, K., James, T. Y., Quandt, D., & Magallón, S. (2018). Contemporaneous radiations of fungi and plants linked to symbiosis. *Nature Communications*, 9(1), 5451. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07849-9>
- Ma, L., Zhang, J., Li, Z., Xin, X., Guo, Z., Wang, D., Li, D., & Zhao, B. (2020). Long-term phosphorus deficiency decreased bacterial–fungal network complexity and efficiency across three soil types in China as revealed by network analysis. *Applied Soil Ecology*, 148, 103506. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103506>
- Ma, S., Chen, X., Su, H., Xing, A., Chen, G., Zhu, J., Zhu, B., & Fang, J. (2022). Phosphorus addition decreases soil fungal richness and alters fungal guilds in two tropical forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 175, 108836. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108836>
- Marín, C. (2015). Selección multinivel: Historia, modelos, debates, y principalmente, evidencias empíricas. *eVOLUCIÓN: Revista de la Sociedad Española de Biología Evolutiva*, 10(2), 51–70. <https://cesar-marin.com/wp-content/uploads/2018/10/2015dic-marc3adn-evolucic3b3n.pdf>
- Marín, C. (2018). Conceptos fundamentales en ecología de hongos del suelo: Una propuesta pedagógica y de divulgación. *Boletín Micológico*, 33(1), 32. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2018.33.1.1168>
- Menand, B., Yi, K., Jouannic, S., Hoffmann, L., Ryan, E., Linstead, P., Schaefer, D. G., & Dolan, L. (2007). An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* (New York, N.Y.), 316(5830), 1477–1480. <https://doi.org/10.1126/science.1142618>
- Monteiro, J., Domingues, I., Brilhante, M., Serafim, J., Nunes, S., Trigo, R., & Branquinho, C. (2024). Changes in bryophyte functional composition during post-fire succession. *Science of the Total Environment*, 925, 171592. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171592>
- Morris, J. L., Puttick, M. N., Clark, J. W., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Yang, Z., Schneider, H., & Donoghue, P. C. J. (2018). The timescale of early land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), E2274–E2283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719588115>

- Nelson, J. M., Hauser, D. A., Hinson, R., & Shaw, A. J. (2018). A novel experimental system using the liverwort *Marchantia polymorpha* and its fungal endophytes reveals diverse and context-dependent effects. *New Phytologist*, 218(3), 1217–1232. <https://doi.org/10.1111/nph.15012>
- Nepstad, D. C., Stickler, C. M., Filho, B. S., & Merry, F. (2008). Interactions among Amazon land use, forests and climate: Prospects for a near-term forest tipping point. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363(1498), 1737–1746. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.0036>
- Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J. S., & Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>
- Norris, D. (1990). Bryophytes in perennially moist forests of Papua New Guinea: Ecological orientation and predictions of disturbance effects. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 104(3), 281–291. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1990.tb02223.x>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Sólymos, P., Stevens, M. H. H., & Wagner, H. (2012). *vegan: Community ecology package* (R package version). <https://cran.r-project.org/package=vegan>
- Oldroyd, G. E. D. (2013a). Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Oldroyd, G. E. D. (2013b). Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Orchard, S., Hilton, S., Bending, G. D., Dickie, I. A., Standish, R. J., Gleeson, D. B., Jeffery, R. P., Powell, J. R., Walker, C., Bass, D., Monk, J., Simonin, A., & Ryan, M. H. (2017). Fine endophytes (*Glomus tenue*) are related to Mucoromycotina, not Glomeromycota. *New Phytologist*, 213(2), 481–486. <https://doi.org/10.1111/nph.14268>
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2009). Acid phosphatase and invertase activities of *Aspergillus niger*. *Mycoscience*, 50(5), 323–330. <https://doi.org/10.1007/S10267-009-0488-Y>

- Pirozynski, K. A., & Malloch, D. W. (1975). The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems*, 6(3), 153–164.
[https://doi.org/10.1016/0303-2647\(75\)90023-4](https://doi.org/10.1016/0303-2647(75)90023-4)
- Poveda, J. (2020). *Marchantia polymorpha* as a model plant in the evolutionary study of plant–microorganism interactions. *Current Plant Biology*, 23, 100152.
<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100152>
- Pressel, S., Bidartondo, M. I., Ligrone, R., & Duckett, J. G. (2010). Fungal symbioses in bryophytes: New insights in the twenty-first century. *Phytotaxa*, 9, 238–253.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.9.1.13>
- Pressel, S., Bidartondo, M. I., Field, K. J., & Duckett, J. G. (2021). Advances in understanding of mycorrhizal-like associations in bryophytes. *Bryophyte Diversity and Evolution*, 43, 284–306. <https://doi.org/10.11646/bde.43.1.20>
- Proust, H., Honkanen, S., Jones, V. A., Morieri, G., Prescott, H., Kelly, S., Ishizaki, K., Kohchi, T., & Dolan, L. (2016). RSL Class I Genes Controlled the Development of Epidermal Structures in the Common Ancestor of Land Plants. *Current biology : CB*, 26(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.042>
- Prout, J. N., Williams, A., Wanke, A., Schornack, S., Ton, J., & Field, K. J. (2024). Mucoromycotina ‘fine root endophytes’: A new molecular model for plant–fungal mutualisms?. *Plant Science*, 29, 650–661.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.11.014>
- Puginier, C., Keller, J., & Delaux, P. M. (2022). Plant–microbe interactions that have impacted plant terrestrializations. *Plant Physiology*, 190(1), 72–84.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiac258>
- Qin, Z., Zhang, H., Feng, G., Christie, P., Zhang, J., Li, X., & Gai, J. (2020). Soil phosphorus availability modifies the relationship between AM fungal diversity and mycorrhizal benefits to maize in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 144, 107790.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107790>
- Radhakrishnan, G. V., Keller, J., Rich, M. K., Vernié, T., Mbadinga Mbadinga, D. L., Vigneron, N., Cottret, L., Clemente, H. S., Libourel, C., Cheema, J., Linde, A.-M., Eklund, D. M., Cheng, S., Wong, G. K. S., Lagercrantz, U., Li, F.-W., Oldroyd, G. E. D., & Delaux, P.-M. (2020). An ancestral signalling pathway is conserved in intracellular symbioses-forming plant lineages. *Nature Plants*, 6(3), 280–289.
<https://doi.org/10.1038/s41477-020-0613-7>

- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR-Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380–1389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- Redecker, D., Kodner, R., & Graham, L. E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486), 1920–1921. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1920>
- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., & Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 11841–11843. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.11841>
- Retallack, G. J. (2000). Ordovician life on land and early Paleozoic global change. *The Paleontological Society Papers*, 6, 21–46. <https://doi.org/10.1017/S1089332600000693>
- Rich, M. K., Vigneron, N., Libourel, C., Keller, J., Xue, L., Hajheidari, M., Radhakrishnan, G. V., Le Ru, A., Issa Diop, S., Potente, G., Conti, E., Duijsings, D., Batut, A., Le Faouder, P., Kodama, K., Kyojuka, J., Sallet, E., Bécard, G., Rodriguez-Franco, M., Ott, T., Bertrand-Michel, J., Oldroyd, G. E. D., Szövényi, P., Bucher, M., & Delaux, P. M. (2021). Lipid exchanges drove the evolution of mutualism during plant terrestrialization. *Science*, 372(6544), 864–868. <https://doi.org/10.1126/science.abg0929>
- Rico-Reséndiz, F., Cervantes-Pérez, S. A., Espinal-Centeno, A., Dipp-Álvarez, M., Oropeza-Aburto, A., Hurtado-Bautista, E., Cruz-Hernández, A., Bowman, J. L., Ishizaki, K., Arteaga-Vázquez, M. A., Herrera-Estrella, L., & Cruz-Ramírez, A. (2020). Transcriptional and morpho-physiological responses of *Marchantia polymorpha* upon phosphate starvation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8354. <https://doi.org/10.3390/ijms21218354>
- Rimington, W. R., Pressel, S., Duckett, J. G., Field, K. J., Read, D. J., & Bidartondo, M. I. (2018). Ancient plants with ancient fungi: Liverworts associate with early-diverging arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the Royal Society B*, 285, 20181600. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1600>
- Rimington, W. R., Pressel, S., Duckett, J. G., Field, K. J., & Bidartondo, M. I. (2019). Evolution and networks in ancient and widespread symbioses between Mucoromycotina and liverworts. *Mycorrhiza*, 29(6), 551–565. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00918-x>

- Rimington, W. R., Duckett, J. G., Field, K. J., Bidartondo, M. I., & Pressel, S. (2020). The distribution and evolution of fungal symbioses in ancient lineages of land plants. *Mycorrhiza*, 30(1), 23–49. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00938-y>
- Romani, F., Banić, E., Florent, S. N., Kanazawa, T., Goodger, J. Q. D., Mentink, R. A., Dierschke, T., Zachgo, S., Ueda, T., Bowman, J. L., Tsiantis, M., & Moreno, J. E. (2020). Oil body formation in *Marchantia polymorpha* is controlled by MpC1HDZ and serves as a defense against arthropod herbivores. *Current Biology*, 30(14), 2815–2828.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.081>
- Romani, F., & Moreno, J. E. (2021). Molecular mechanisms involved in functional macroevolution of plant transcription factors. *New Phytologist*, 230(4), 1345–1353. <https://doi.org/10.1111/nph.17161>
- Romani, F., Flores, J. R., Tolopka, J. I., Suárez, G., He, X., & Moreno, J. E. (2022). Liverwort oil bodies: Diversity, biochemistry, and molecular cell biology of the earliest secretory structure of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 73(13), 4427–4439. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac134>
- Rousk, J., Brookes, P. C., & Bååth, E. (2011). Fungal and bacterial growth responses to N fertilization and pH in the 150-year “Park Grass” UK grassland experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(1), 89–99. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01032.x>
- Saint-Marcoux, D., Proust, H., Dolan, L., & Langdale, J. A. (2015). Identification of reference genes for real-time quantitative PCR experiments in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PloS one*, 10(3), e0118678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118678>
- Sakuma, T., Nishikawa, A., Kume, S., Chayama, K., & Yamamoto, T. (2014). Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4, 5400. <https://doi.org/10.1038/srep05400>
- Scervino, J. M., Mesa, M. P., Della Mónica, I., Recchi, M., Sarmiento Moreno, N., & Godeas, A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility of Soils*, 46(7), 755–763. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0482-8>
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis | *Nature Methods*. <https://www.nature.com/articles/nmeth.2089>
- Seifert, K. (2008). Compendium of soil fungi – by K. H. Domsch, W. Gams & T. H. Anderson. *European Journal of Soil Science*, 59(5), 1007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01052.x>

- Sgroi, M. (2021). *Evolutionary conservation of host responses to arbuscular mycorrhizal symbiosis in liverworts* (Doctoral thesis, University of Cambridge). Apollo – University of Cambridge Repository. <https://doi.org/10.17863/CAM.81124>
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 27, 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W., & Zhang, F. (2011). Phosphorus dynamics: From soil to plant. *Plant Physiology*, 156(3), 997–1005. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X., & Skarnes, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods*, 11(4), 399–402. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2857>
- Shi, J., Wang, X., & Wang, E. (2023). Mycorrhizal symbiosis in plant growth and stress adaptation: From genes to ecosystems. *Annual Review of Plant Biology*, 74, 569–607. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-061722-090342>
- Shi, L., Dossa, G. G., Paudel, E., Zang, H., Xu, J., & Harrison, R. D. (2019). Changes in fungal communities across a forest disturbance gradient. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(6), e00080–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00080-19>
- Siles, J. A., Pérez-Mendoza, D., Ibáñez, J. A., Scervino, J. M., Ocampo, J. A., García-Romera, I., & Sampedro, I. (2014). Assessing the impact of biotransformed dry olive residue application to soil: Effects on enzyme activities and fungal community. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.001>
- Silvani, V. A., Rothen, C. P., Rodríguez, M. A., Godeas, A., & Fracchia, S. (2012). The thalloid liverwort *Plagiochasma rupestre* supports arbuscular mycorrhiza-like symbiosis in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(12), 3393–3397. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1146-7>
- Sinanaj, B., Bidartondo, M. I., Pressel, S., & Field, K. J. (2021). Molecular evidence of Mucoromycotina “fine root endophyte” fungi in agricultural crops. *Biology and Life Sciences Forum*, 4, 88. <https://doi.org/10.3390/IECPS2020-08728>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed.). Academic Press.
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016). A

- phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Storb, R., Svriz, M., Aranda, E., Fracchia, S., Spinedi, N., & Scervino, J. M. (2025). Association between a liverwort and arbuscular mycorrhizal fungi: a promising strategy for the phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza*, 35(4), 44. <https://doi.org/10.1007/s00572-025-01217-4>
- Stone, J. (2000). An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. En C. W. Bacon & J. F. White Jr. (Eds.), *Microbial endophytes* (pp. 3-39). Marcel Dekker.
- Strullu-Derrien, C., Kenrick, P., Pressel, S., Duckett, J. G., Rioult, J.-P., & Strullu, D. G. (2014). Fungal associations in *Horneophyton ligneri* from the Rhynie Chert (c. 407 million-year-old) closely resemble those in extant lower land plants: Novel insights into ancestral plant–fungus symbioses. *New Phytologist*, 203(3), 964–979. <https://doi.org/10.1111/nph.12805>
- Strullu-Derrien, C., Selosse, M.-A., Kenrick, P., & Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: From palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, 220(4), 1012-1030. <https://doi.org/10.1111/nph.15076>
- Sugano, S. S., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., & Kohchi, T. (2014). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant & Cell Physiology*, 55(3), 475-481. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu014>
- Sugano, S. S., & Nishihama, R. (2018). CRISPR/Cas9-Based Genome Editing of Transcription Factor Genes in *Marchantia polymorpha*. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1830, 109-126. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8657-6_7
- Szánthó, L. L., Merényi, Z., Donoghue, P., Gabaldón, T., Nagy, L. G., Szöllősi, G. J., & Ocaña-Pallarès, E. (2025). A timetree of Fungi dated with fossils and horizontal gene transfers. *Nature ecology & evolution*, 9(11), 1989–2001. <https://doi.org/10.1038/s41559-025-02851-z>
- Tan, X., Wang, D., Zhang, X., Zheng, S., Jia, X., Liu, H., Liu, Z., Yang, H., Dai, H., Chen, X., Qian, Z., Wang, R., Ma, M., Zhang, P., Yu, N., & Wang, E. (2025). A pair of LysM receptors mediates symbiosis and immunity discrimination in *Marchantia*. *Cell*, 188(5), 1330–1348.e27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.12.024>
- Taylor, T. N., Remy, W., Hass, H., & Kerp, H. (1995). Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian. *Mycologia*, 87(4), 560–573. <https://doi.org/10.1080/00275514.1995.12026569>

- Thamm, A., Saunders, T. E., & Dolan, L. (2020). MpFEW RHIZOIDS1 miRNA-Mediated Lateral Inhibition Controls Rhizoid Cell Patterning in *Marchantia polymorpha*. *Current biology* : CB, 30(10), 1905–1915.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.032>
- Thirkell, T. J., Cameron, D. D., & Hodge, A. (2016). Resolving the “nitrogen paradox” of arbuscular mycorrhizas: Fertilization with organic matter brings considerable benefits for plant nutrition and growth. *Plant, Cell & Environment*, 39(8), 1683–1690. <https://doi.org/10.1111/pce.12667>
- Thomas, G. W. (1996). Soil pH and soil acidity. En D. L. Sparks (Ed.), *Methods of soil analysis: Part 3 – Chemical methods* (Vol. 5, pp. 475–490). *Soil Science Society of America*.
- Tolopka, J. I., Svriz, M., Ledesma, T. M., Lanari, E., Scervino, J. M., & Moreno, J. E. (2024). Environmental pollutant anthracene induces ABA-dependent transgenerational effects on gemmae dormancy in *Marchantia polymorpha*. *Plants*, 13, 2979. <https://doi.org/10.3390/plants13212979>
- Tuba, Z., Slack, N. G., & Stark, L. R. (2011). *Bryophyte ecology and climate change*. Cambridge University Press.
- Upton, R., Read, D. J., & Newsham, K. K. (2007). Widespread association between the ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* and a leafy liverwort in the maritime and sub-Antarctic. *New Phytologist*, 176(2), 460–471. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02178.x>
- Valdés, F. E., Peralta, D. F., Velázquez, M. S., Covacevich, F., Becerra, A. G., & Cabello, M. N. (2023). On the occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a bryophyte community of Punta Lara Natural Reserve, Buenos Aires, Argentina. *Diversity*, 15, 442. <https://doi.org/10.3390/d15030442>
- Van der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I. R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706), 69–72. <https://doi.org/10.1038/23932>
- van der Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406–1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- Vollár, M., Gyovai, A., Szűcs, P., Zupkó, I., Marschall, M., Csupor-Löffler, B., Bérdi, P., Vecsernyés, A., Csorba, A., Liktör-Busa, E., Urbán, E., & Csupor, D. (2018).

- Antiproliferative and antimicrobial activities of selected bryophytes. *Molecules*, 23(7), 1520. <https://doi.org/10.3390/molecules23071520>
- Wang, B., & Qiu, Y.-L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5), 299–363. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6>
- Wang, B., Yeun, L. H., Xue, J. Y., Liu, Y., Ané, J. M., & Qiu, Y. L. (2010). Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist*, 186(2), 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03137.x>
- Wang, Q. H., Zhang, J., Liu, Y., Jia, Y., Jiao, Y. N., Xu, B., & Chen, Z. D. (2022). Diversity, phylogeny, and adaptation of bryophytes: Insights from genomic and transcriptomic data. *Journal of Experimental Botany*, 73(13), 4306–4322. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac127>
- Weng, W., Yan, J., Zhou, M., Yao, X., Gao, A., Ma, C., Cheng, J., & Ruan, J. (2022). Roles of Arbuscular mycorrhizal Fungi as a Biocontrol Agent in the Control of Plant Diseases. *Microorganisms*, 10(7), 1266. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071266>
- White, T. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press.
- Widdig, M., Heintz-Buschart, A., Schleuss, P.-M., Guhr, A., Borer, E. T., Seabloom, E. W., & Spohn, M. (2020). Effects of nitrogen and phosphorus addition on microbial community composition and element cycling in a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 151, 108041. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108041>
- Wijayawardene, N. N., Bahram, M., Sánchez-Castro, I., Dai, D.-Q., Ariyawansa, K. G. S. U., Jayalal, U., Suwannarach, N., & Tedersoo, L. (2021). Current insight into culture-dependent and culture-independent methods in discovering ascomycetous taxa. *Journal of Fungi*, 7(9), 703. <https://doi.org/10.3390/jof7090703>
- Wright, S. J., Harms, K. E., Hernández, O., García, M. N., & Yavitt, J. B. (2024). Insights from a long-term, factorial nitrogen, phosphorus, and potassium addition experiment conducted in a mature lowland tropical forest in the Barro Colorado Nature Monument. In *The first 100 years of research on Barro Colorado: Plant and ecosystem science*. Smithsonian Institution Scholarly Press. <https://doi.org/10.5479/si.26880808>
- Yotsui, I., Matsui, H., Miyauchi, S., Iwakawa, H., Melkonian, K., Schlüter, T., Michavila, S., Kanazawa, T., Nomura, Y., Stolze, S. C., Jeon, H.-W., Yan, Y., Harzen, A., Sugano, S.

S., Shirakawa, M., Nishihama, R., Ichihashi, Y., Ibanez, S. G., Shirasu, K., ... Nakagami, H. (2023). LysM-mediated signaling in *Marchantia polymorpha* highlights the conservation of pattern-triggered immunity in land plants. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.07.068>

Zhang, M., Gu, L., Zheng, P., Chen, Z., Dou, X., Qin, Q., & Cai, X. (2020). Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(1), e23024. <https://doi.org/10.1002/jcla.23024>

Flujo de trabajo para el análisis de amplicones

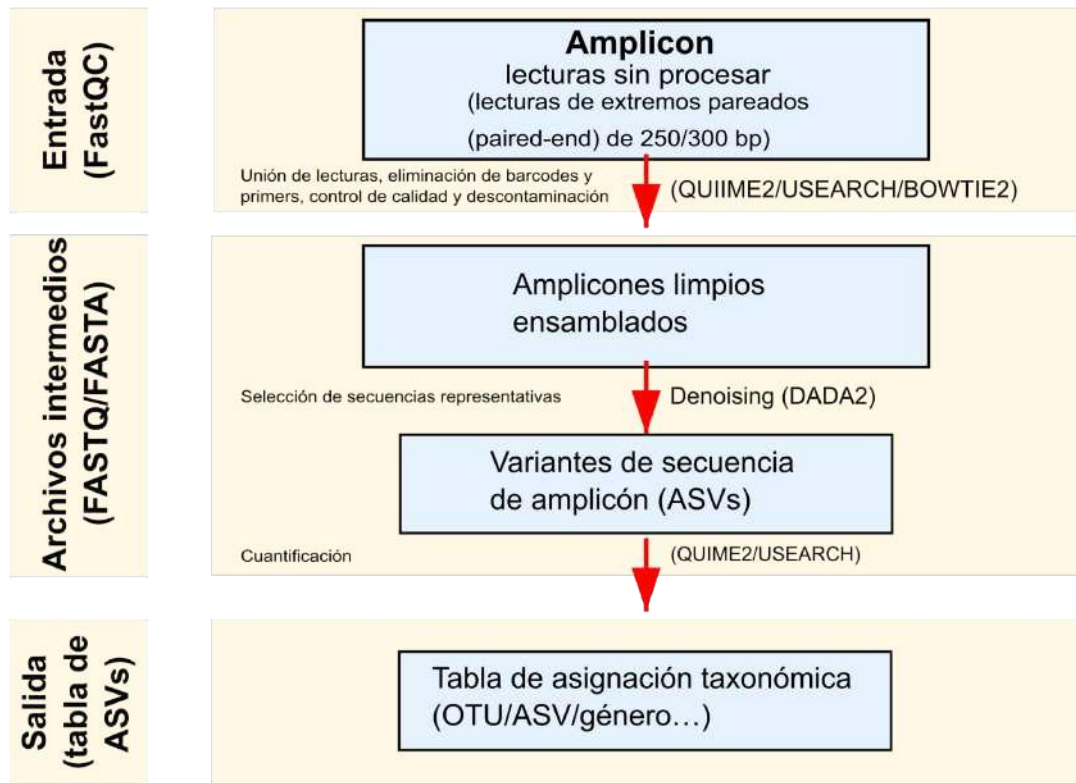


Figura 1. Flujo de trabajo para el análisis de metabarcoding fúngico en plantas de *M. polymorpha*. Las lecturas crudas de amplicones ITS obtenidas mediante secuenciación paired-end (2×250 bp, Illumina) se sometieron a unión de lecturas, eliminación de códigos de barras y cebadores, control de calidad y procedimientos de descontaminación. El control de calidad inicial se evaluó con FastQC, mientras que la eliminación de secuencias del hospedador se realizó mediante alineamiento con Bowtie 2. Las secuencias limpias ensambladas se procesaron mediante eliminación de ruido y detección de quimeras utilizando DADA2, lo que permitió la inferencia de variantes de secuencia de amplicón (ASVs). Las ASVs fueron cuantificadas y asignadas taxonómicamente utilizando bases de datos de referencia para hongos, generando la tabla final de asignación taxonómica utilizada en los análisis posteriores.



Figura Suplementaria 2. Solubilización de fosfato por cepas fúngicas aisladas utilizando el protocolo con TCP (fosfato tricálcico). Las placas control permanecen blancas debido a la insolubilidad del TCP en ausencia de inoculación fúngica. Los aislados fúngicos muestran diferentes capacidades para solubilizar el TCP precipitado, lo que se refleja en distintos grados de transparencia del medio.

Tabla Suplementaria 1. Primers utilizados en este estudio.

Nombre de Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia
MpPR1-qF	TAACAACTGTCAGCTGAAGACC	Este estudio
MpPR1-qR	CTTCCAGACAACCTGAGTGTA	Este estudio
MpPR4-qF	TTCTGTGGTTTGCAGTTTCTTG	Carella et al., 2019
MpPR4-qR	CGCCATTGTAGTGATTCGTTAG	Carella et al., 2019
MpPR6a-qF	TGGCTTTCAACGAAAATGGGA	Este estudio
MpPR6a-qR	CACACGTCTTCGGGAGTACC	Este estudio
MpMYB14-qF	TCGAAACTCTTCCACAGACAGA	Este estudio
MpMYB14-qR	GCTAATGAAGCCCGTACATAGG	Este estudio
MpJAZ-qF	AGAGGAAAGACAGGGTTCGTG	Este estudio

MpJAZ-qR	CAGAAGTCGGTGCTACGTACG	Este estudio
MpRBOH1-qF	TATCAGCGTGACATGCGGAAG	Este estudio
MpRBOH1-qR	CAGCAGTACGTCGTACTTGCGG	Este estudio
MpRBOH2-qF	TCAGGAGAGTTGAACAGCTCAGG	Este estudio
MpRBOH2-qR	ACATCCAGCATCACTTCCACC	Este estudio
MpWRKY3-qF	CAAGCGAATCCAGCAGCTTGAT	Este estudio
MpWRKY3-qR	GTCAGCCAGCATTTTTGGTCCC	Este estudio
McEF1-qF	GTCCGTGATATGCGTCAAACC	Valle-Maldonado et al., 2015
McEF1-qR	AGCGGCCTTGGTGACCTTAC	Valle-Maldonado et al., 2015

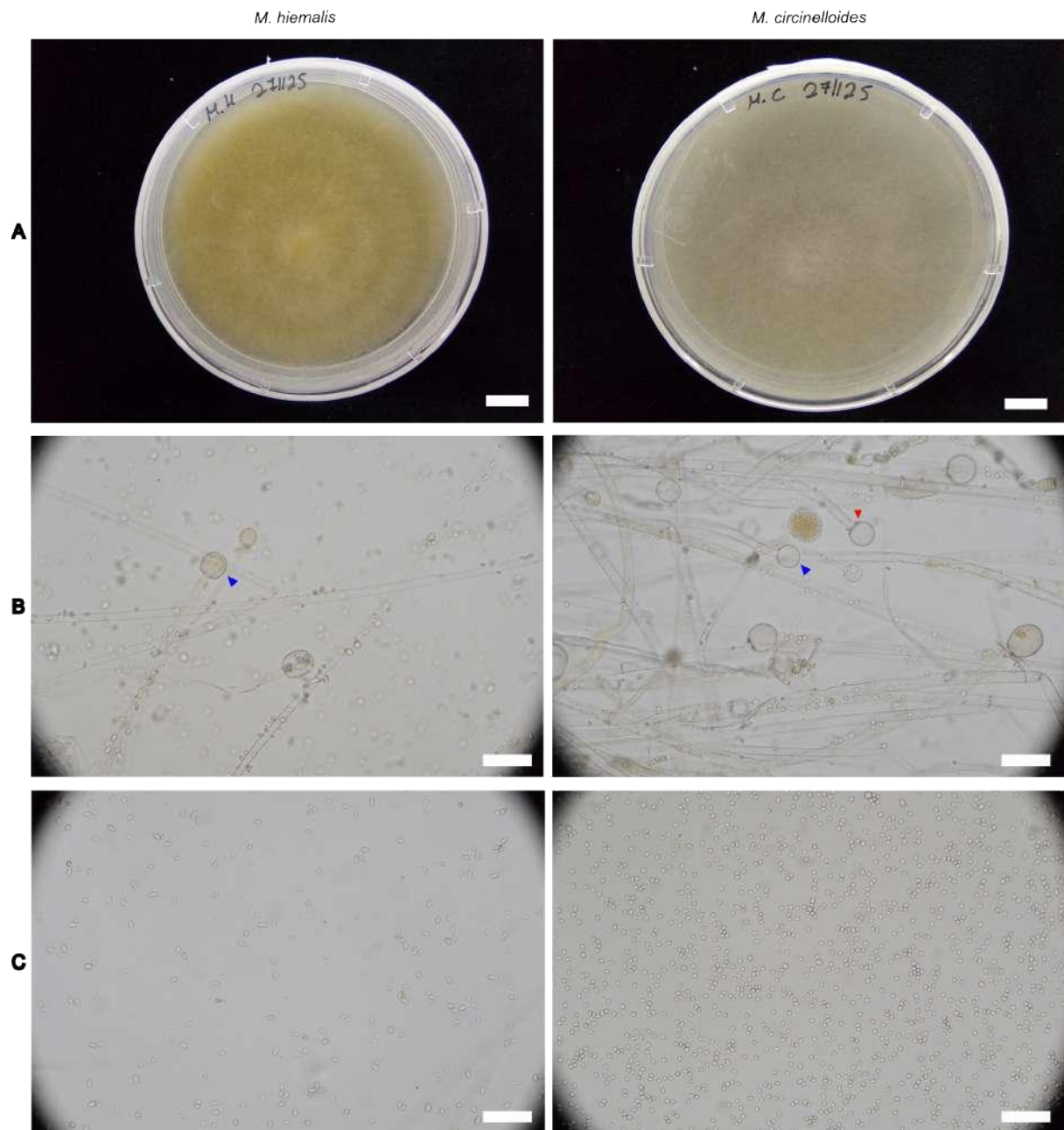


Figura suplementaria 3. Caracterización morfológica de *Mucor hiemalis* y *Mucor circinelloides*. (A) Colonias desarrolladas en medio sólido. *M. hiemalis* presenta colonias de tonalidad amarillenta a pardo claro, mientras que *M. circinelloides* muestra colonias de color blanquecino a grisáceo. (B) Microfotografías de estructuras reproductivas observadas mediante microscopía óptica (40×). *M. hiemalis* presenta esporangios (flechas azules) de menor tamaño y columelas subglobosas a elipsoidales, mientras que *M. circinelloides* presenta esporangios (flechas azules) de mayor tamaño, con paredes deliquescentes que dejan collares basales evidentes (flechas rojas) y columelas obovoides. (C) Microfotografías de esporangiosporas. En *M. hiemalis*, las esporangiosporas son subglobosas a elipsoidales, mientras que en *M. circinelloides* son elipsoidales a subglobosas y se presentan en mayor densidad. Las características morfológicas observadas concuerdan con las

descripciones taxonómicas clásicas de ambas especies (Schipper, 1973; Schipper, 1976). Barras de escala: placas, 1 cm; microfotografías, 60 μ m.

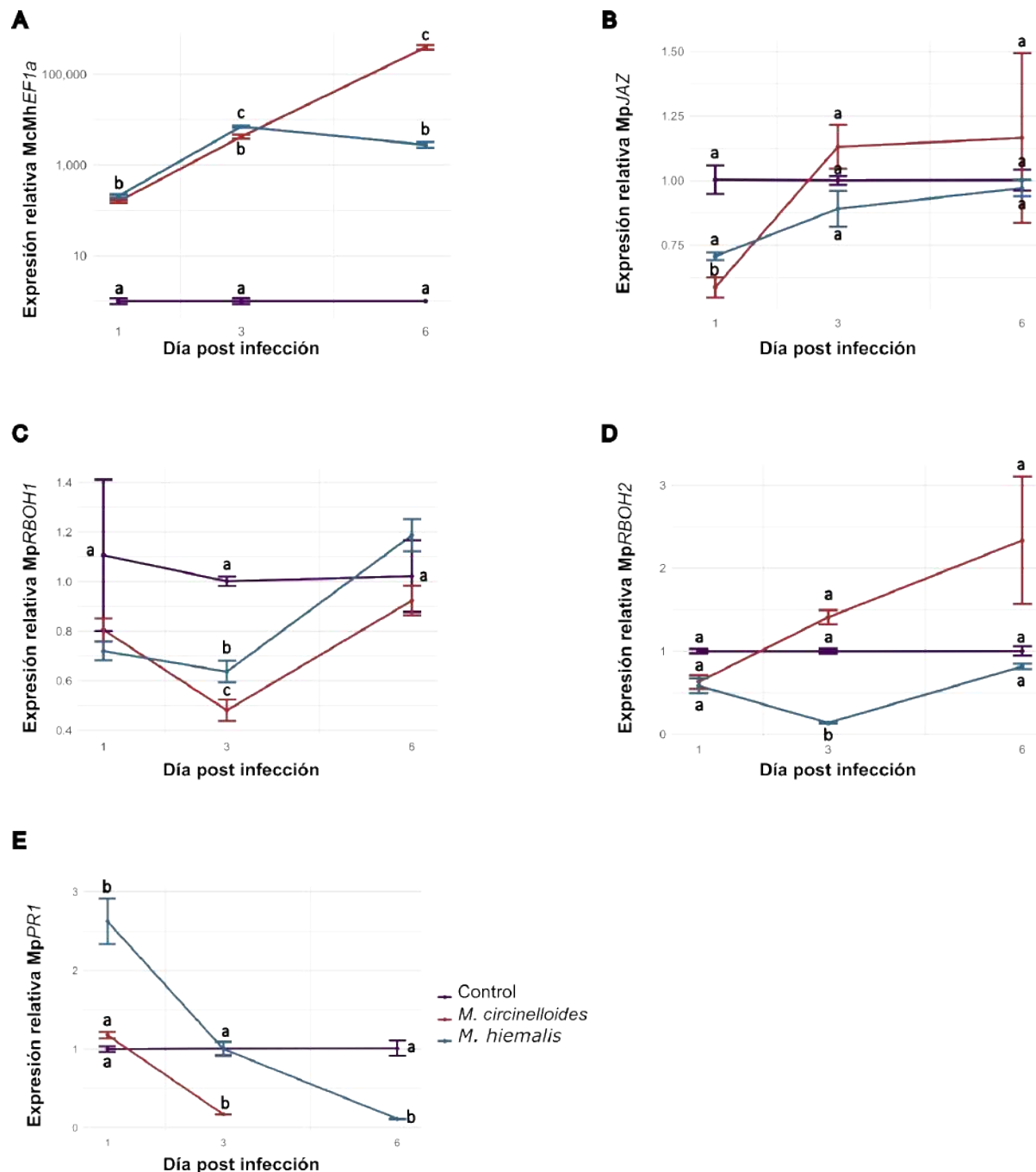


Figura suplementaria 4. Análisis por qRT-PCR de la expresión relativa de genes marcadores de defensa en respuesta a *M. circinelloides* y *M. hiemalis* en 1, 3 y 6 días post infección (dpi). (A) MpMcEF1, (B) MpJAZ, (C) MpRBOH1, (D) MpRBOH2 y (E) MpPR1. La expresión de McEF1a indicó un aumento sostenido de la biomasa de *M. circinelloides* hasta 6 dpi, mientras que *M. hiemalis*

alcanzó una meseta a 3 dpi. Los genes MpJAZ, MpRBOH1 y MpPR1 no mostraron una inducción clara en respuesta a la infección, mientras que MpRBOH2 presentó una inducción modesta únicamente en respuesta a *M. circinelloides*. La línea roja corresponde a la infección con *M. circinelloides*, la línea azul a *M. hiemalis* y la línea violeta para plantas control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de cada tiempo de muestreo (ANOVA seguido de la prueba HSD de Tukey, $p < 0,01$). Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar de réplicas biológicas independientes. La expresión génica fue normalizada utilizando genes de referencia y expresada en relación al control.

Bibliografía anexo

- Carella, P., Gogleva, A., Hoey, D. J., Bridgen, A. J., Stolze, S. C., Nakagami, H., & Schornack, S. (2019). Conserved biochemical defenses underpin host responses to oomycete infection in an early-divergent land plant lineage. *Current Biology*, 29(14), 2282–2294.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.078>
- Valle-Maldonado, M. I., Jácome-Galarza, I. E., Gutiérrez-Corona, F., Ramírez-Díaz, M. I., Campos-García, J., & Meza-Carmen, V. (2015). Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Molecular biology reports*, 42(3), 705–711. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3818-x>