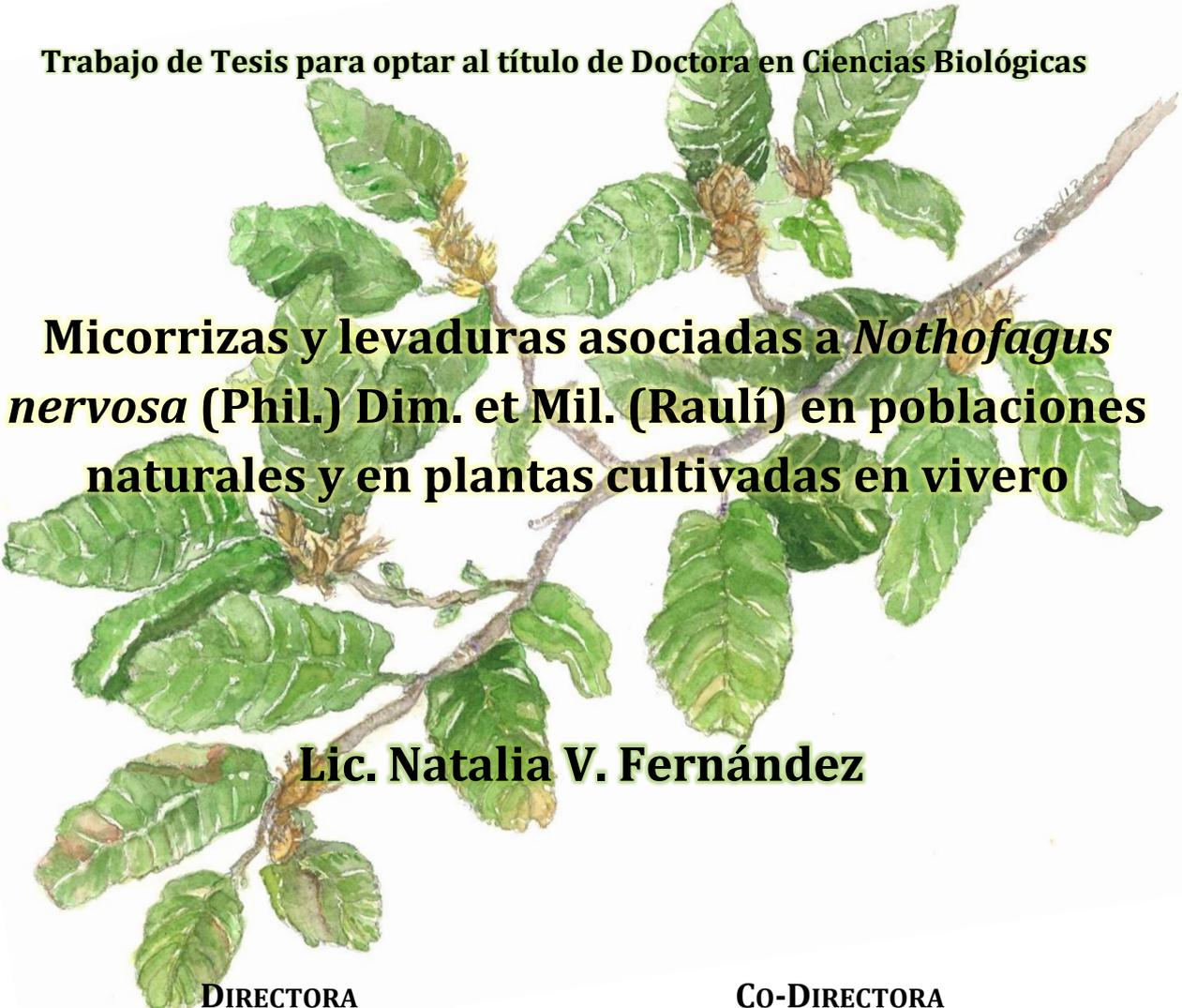




UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

Centro Regional Universitario Bariloche

Trabajo de Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas



Micorrizas y levaduras asociadas a *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. (Raulí) en poblaciones naturales y en plantas cultivadas en vivero

Lic. Natalia V. Fernández

DIRECTORA

Dra. Sonia Fontenla

CO-DIRECTORA

Dra. Paula Marchelli

2012

Este trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología del Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, y en la Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal del INTA EEA Bariloche

Lic. Natalia Fernández

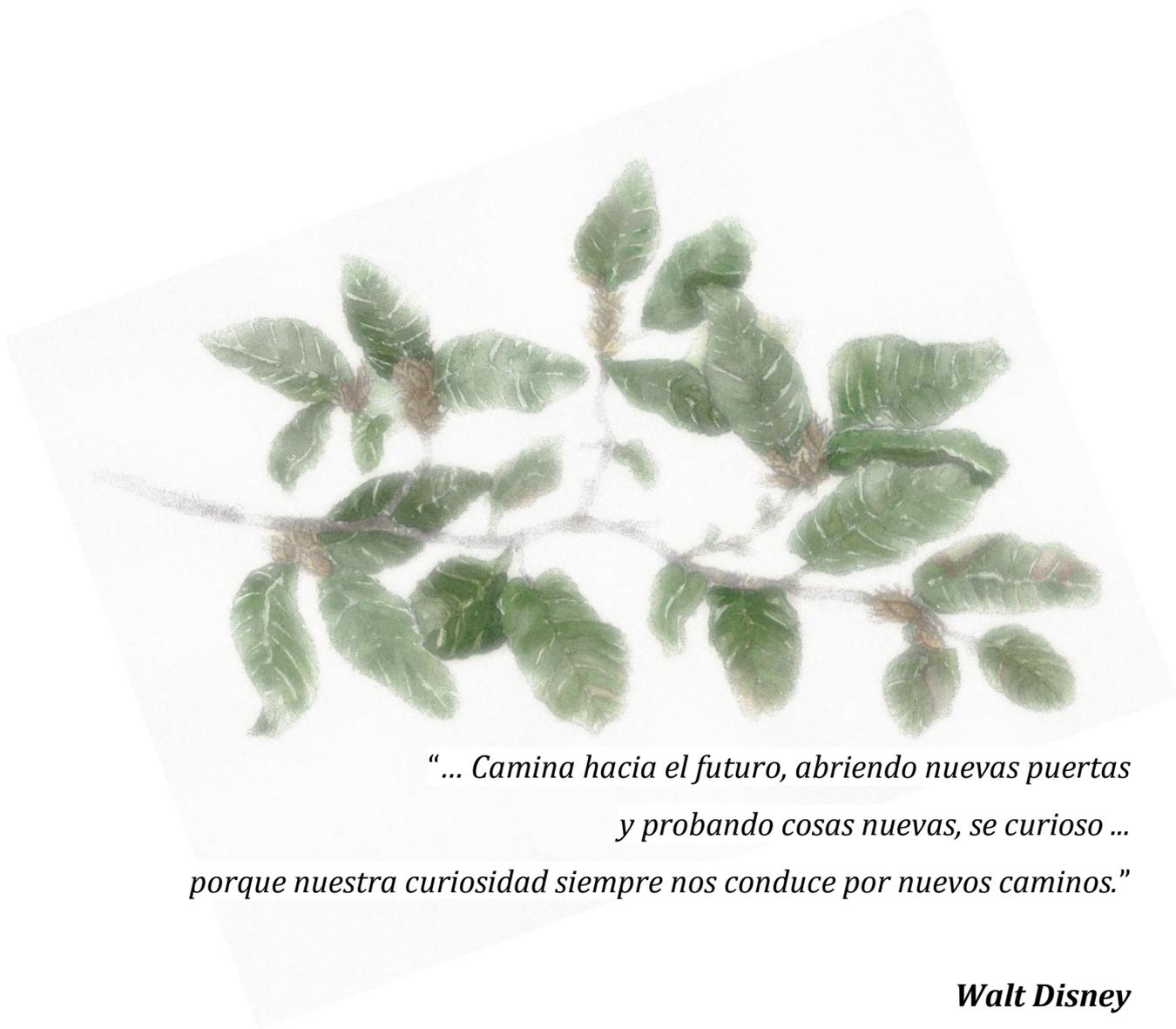
Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología
CONICET-INIBIOMA

Dra. Sonia Fontenla

Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología
INIBIOMA

Dra. Paula Marchelli

Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal
CONICET



*“... Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas
y probando cosas nuevas, se curioso ...
porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos.”*

Walt Disney

A mi familia por su amor, apoyo incondicional y por darme fuerza a cada paso, acompañándome a caminar hacia el futuro en todo instante.

A Ivan, por ser mi paz y el sol que ilumina cada día, y porque su curiosidad es la que abrirá las nuevas puertas del futuro.

AGRADECIMIENTOS

- ✿ A la Universidad Nacional del Comahue y particularmente al Centro Regional Universitario Bariloche por permitirme trabajar en sus instalaciones y por brindarme las herramientas necesarias para completar mi formación profesional.
- ✿ A la Comisión de Doctorado en Biología por el acompañamiento académico durante estos años y por brindarme la oportunidad única de seguir adelante con mi carrera profesional.
- ✿ A los miembros integrantes del jurado de esta Tesis doctoral, los Doctores Javier Puntieri, Christian Lopes y Alicia Godeas por sus valiosísimos aportes y por el gran esfuerzo realizado sin el cual me hubiera sido imposible darle continuidad a mi trabajo.
- ✿ A todos en el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología del Centro Regional Universitario Bariloche por brindarme un lugar de trabajo y su compañía durante todos estos años.
- ✿ Al personal del Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA) por su asesoramiento constante y colaboración con innumerables trámites y formularios.
- ✿ Al INTA EEA Bariloche por brindarme la posibilidad de trabajar en la Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal para llevar a cabo parte de este trabajo de Tesis.
- ✿ Al personal del INTA EEA Bariloche pertenecientes a la Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal, al Laboratorio de Semillas y al Vivero por haber colaborado con el desarrollo de este trabajo de Tesis.
- ✿ Al Señor Thomas, quien nos permitió realizar los muestreos en los ensayos instalados por el INTA EEA Bariloche bajo una plantación de pinos en la Estancia Santa Lucía, Meliquina.
- ✿ Al Jardín del INTA EEA Bariloche “Los Charitos” por cuidar y participar del crecimiento de Ivan durante sus dos primeros añitos de vida.
- ✿ Al personal del Departamento de Botánica del Centro Regional Universitario Bariloche por responder a innumerables preguntas siempre con buena predisposición (y por “prestarnos” yerba en situaciones de emergencia!).
- ✿ A la Lic. Ruffini Alejandra por su compañía y colaboración durante las tareas realizadas en el laboratorio de Mediana Complejidad del Centro Regional Universitario Bariloche.
- ✿ Al Dr. Moliné Martín, quien colaboró con los análisis de inducción, extracción y lectura de micosporinas llevados a cabo en este trabajo de Tesis y quien siempre contestó a mis inquietudes sobre este tema.

- ✿ Al Dr. Eduardo Nouhra por responder siempre a mis innumerables preguntas con excelente predisposición, por sus consejos y por sus valiosos aportes a este trabajo de Tesis y a mi formación como “ectomicorrizóloga”.
- ✿ Al Dr. Tenreiro Rogério y la Dra. Chaves Sandra del Laboratorio de Genómica Integrativa e Funcional (BioFIG), del Centro de Biodiversidade, de la Faculdade de Ciências, en la Universidade de Lisboa, Portugal por permitirnos realizar parte de este trabajo de tesis en su laboratorio y por los valiosos aportes realizados.
- ✿ Al Dr. Gerhard Kost y la Dra. Felicia Gherguel del Department of Systematic Botany & Mycology, Philipps Universität of Marburg, Alemania por colaborar con las técnicas moleculares de identificación molecular de ectomicorrizas.
- ✿ A la Administración Parques Nacionales por permitirme realizar los muestreos necesarios.
- ✿ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las Becas Internas de Postgrado Tipo I y II que me permitieron llevar adelante este doctorado.
- ✿ Al Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología (CABBIO) por brindarme la posibilidad de asistir a dos de sus cursos que me permitieron cumplimentar los puntos requeridos por el Doctorado y capacitarme en áreas de gran importancia para el desarrollo de esta Tesis.
- ✿ A los proyectos UNCO B121, UNCO B143, PICT2004 22200, PICT2006 1176 y al Proyecto específico INTA PNFOR044321 por otorgarme el financiamiento necesario para llevar a cabo las tareas experimentales de este trabajo de Tesis.

Quiero agradecer, de corazón, a todas aquellas personas que de distintas maneras me acompañaron en este camino ...

- ✿ a **Mis Dires**, uuuufffff ... que mujeres! Gracias a ellas he madurado como científica, pero sobre todo ... me regalaron una incontable cantidad de tiempo, cariño y el ímpetu necesarios para poder terminar esta Tesis y seguir adelante. Para formarse como biólogo y Doctor no es suficiente con aplicar el método científico, hace falta mucho más que eso! Gracias por marcarme el camino para llegar a serlo y por compartir conmigo tantas experiencias, las quiero mucho!
- ✿ a **mis papis y hermana**, quienes me apoyaron desde el primer momento en que decidí estudiar biología (allá ... hace muuuuchos años!). Gracias a su esfuerzo y apoyo incondicional pude seguir adelante con mi sueño. A ellos debo todo lo que soy y les agradezco haberme dado la oportunidad de volar y llegar hasta aquí. Gracias por acompañarme y ESTAR CONMIGO TOOOOOODO EL TIEMPO! Los amo mucho!

🌻 a **mi Gordi**, una parte muy importante de mi vida ... gracias por tolerar mis tropezones a lo largo de la carrera, pero sobre todo, por darme fuerza y ánimos cuando más los necesité, acompañarme en cada paso (incluso de muestreo!), estar siempre a mi lado, brindarme esa alegría que se necesita día a día y quererme tal cual soy ... una bióloga empedernida que te ama mucho!

🌻 a **Ivan y Juli**, los dos soles de mi vida que con su inocencia, espontaneidad, alegría y amor hacen de cada día una experiencia especial!! LOS AMOOOOOOOOOO!!

🌻 a **suegros y cuñados** que siempre me brindaron la mejor de las ondas, me dieron aliento y muchas veces una gran mano!!!!

🌻 a **mis amigos** con quienes disfruté muchísimos momentos que quedarán siempre en mí, juntos compartimos sonrisas, lágrimas, pizzas, pelis, partidos de truco, rezongos en fin ... quiero agradecer a quienes hacen el día a día más alegre y divertido y a quienes SIEMPRE ESTÁN, aunque sea a la distancia! Amigos ... gracias por estar en mi vida! Los quiero un montón!

Renglón aparte para **Viki, Patito, Dani, Ceci, Clari y Naty** ... GRACIASSSSSSS por acompañarme, enseñarme, tolerarme, divertirme y darme una mano cuando más la necesito (incluidos los múltiples días que cuidaron de Ivan para que pudiera realizar un curso de Postgrado)! Gracias a **Cintia** por estar siempre y por acompañar el crecimiento de Ivan con cariño y alegría.

🌻 a **mis Familias postizas**, sip ... a los de García y Mille! Es difícil estar lejos de casa y de la familia, pero ellos siempre han tenido un lugarcito, una palabra de consuelo o aliento, un abrazo y mucho más de un consejo ... gracias por abrirme las puertas, por la calidez y todo el amor que me han brindado estos años (aunque a veces pase mucho tiempo sin vernos!) y que han sido tan importantes para nosotros!

🌻 a **mis compañeros del Laboratorio de Micro** (tanto los “viejos” como los recientemente incorporados!), gracias por aceptarme en el “Lab” y darme un lugar allí, por brindarme siempre colaboración, cariño y “ese condimento” que se necesita para trabajar día a día... el “Lab” puede ser chiquito, pero el corazón es muy grande!

🌻 a la gente de los **Departamentos de Biología y Botánica**, muchísimas gracias por recibirme siempre con mis innumerables consultas y curiosidades, por su buenísima predisposición siempre, por los incondicionales préstamos de yerba y por todos los momentos compartidos.

🌻 a **las chicas de la Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal del INTA**, por recibirme siempre con la mejor de las ondas, por darme una mano e innumerables consejos y una palabra de aliento cuando las cosas “no daban”! INFINITAS GRACIAS!

- ✿ a **Abel y Mario del Vivero forestal del INTA** por colaborar con el desarrollo de mis ensayos y por brindarme la información necesaria para llevar a cabo los mismos.
- ✿ a **Leo Gallo y a los integrantes del Grupo de Genética forestal del INTA** por darme un lugarcito en el grupo y dejarme participar de sus actividades.
- ✿ a **profes y ayudantes**, que gente! Siempre he estado orgullosa de los “profes” que he tenido la oportunidad de conocer en el CRUB, no sólo por su carácter profesional y académico, y su capacidad de transmitirnos lo maravilloso de esta ciencia sino también por su calidez.
- ✿ Especialmente, Gracias a **Ceci Brion** (de nuevo!) por la buena onda y el hermosísimo dibujo que realizó para ilustrar esta Tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
RESUMEN	V
ABSTRACT	VIII

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN GENERAL

LOS BOSQUES ANDINO-PATAGÓNICOS Y DOMESTICACIÓN DE ESPECIES FORESTALES NATIVAS	1
CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO: <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i> (RAULÍ)	3
MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL SUELO Y AL SISTEMA RADICAL DE LAS PLANTAS	4
Las micorrizas	5
<i>Clasificación de las micorrizas</i>	7
<i>Micorrizas en especies del género <u>Nothofagus</u></i>	11
Las levaduras	13
APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA POTENCIAL DE LAS MICORRIZAS Y LEVADURAS	15
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
ESQUEMA DE DESARROLLO DEL TRABAJO DE TESIS	17
HIPÓTESIS	18
ÁREA DE ESTUDIO	19

CAPÍTULO 2

LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS ASOCIADOS A FRUTOS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA*

INTRODUCCIÓN

LA FILÓSFERA	21
DESCRIPCIÓN DE LOS FRUTOS DE <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i>	23
OBJETIVO	24

MATERIALES Y MÉTODOS

PROCESAMIENTO DE LOS FRUTOS	25
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS	26
ANÁLISIS MOLECULARES Y FILOGENÉTICOS	27
ANÁLISIS DE COMUNIDADES	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	30

RESULTADOS

DIVERSIDAD DE LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS EN SEMILLAS DE <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i>	30
ANÁLISIS DE COMUNIDADES	33
ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	33

DISCUSIÓN

DIVERSIDAD DE LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS	36
EFFECTOS DE LA CONSERVACIÓN Y EL LAVADO SOBRE LA DIVERSIDAD FÚNGICA	39
ADAPTACIONES DE LAS LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS A LA FILÓSFERA	41

POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LAS LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS AISLADOS	43
CONCLUSIONES PARCIALES	45

CAPÍTULO 3

COMPORTAMIENTO MICORRÍCICO DE LAS PLÁNTULAS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA* CULTIVADAS EN EL VIVERO

INTRODUCCIÓN

PRODUCCIÓN DE PLANTINES	46
IMPORTANCIA DE LAS MICORRIZAS EN LA PRODUCCIÓN DE PLANTINES EN VIVEROS	49

OBJETIVO	51
-----------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYO DE VIVERO	51
MEDICIONES MORFOMÉTRICAS	52
CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ECTOMORFOTIPOS	52
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ECTOMICORRIZAS	54
MICORRIZAS ARBUSCULARES	56
Conservación de las muestras y tinción del material	56
Estimación del porcentaje de raíz colonizada	57
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	57

RESULTADOS

CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS ANALIZADAS DURANTE EL ENSAYO DE VIVERO	57
DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO MICORRÍCICO	61
Cuantificación y caracterización de ectomicorrizas	61
Identificación molecular de hongos formadores de ectomicorrizas y árboles filogenéticos	65
Abundancia relativa de cada ectomorfofotipo	68
Ocurrencia de micorrizas arbusculares	68

DISCUSIÓN

ETAPAS DE CRECIMIENTO EN EL VIVERO Y SU RELACIÓN CON LAS ECTOMICORRIZAS	68
POSIBLES FUENTES DE INÓCULO	72
DIVERSIDAD Y ABUNDANCIA DE ECTOMICORRIZAS EN EL VIVERO	73

CONCLUSIONES PARCIALES	75
------------------------------	----

CAPÍTULO 4

MICORRIZAS EN INDIVIDUOS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA* PERTENECIENTES A BOSQUE NATIVO Y PROVENIENTES DEL PROCESO DE DOMESTICACIÓN

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DE IDENTIFICAR Y DESCRIBIR LAS MICORRIZAS EN AMBIENTES NATURALES	77
TIPOS EXPLORATORIOS DE ECTOMICORRIZAS	78
CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ECTOMICORRIZAS	81

OBJETIVO	83
-----------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREOS	83
DESCRIPCIÓN DE LAS COMUNIDADES DE ECTOMICORRIZAS	84

Cuantificación, clasificación y caracterización de ectomorfortipos	84
Identificación molecular de ectomicorrizas	86
Análisis de comunidades	88
<i>Riqueza</i>	88
<i>Abundancia relativa</i>	88
<i>Diversidad</i>	89
<i>Similitud</i>	89
MICORRIZAS ARBUSCULARES	90
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	90
RESULTADOS	
ECTOMICORRIZAS ASOCIADAS A <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i> EN EL BOSQUE NATIVO Y EN LA PLANTACIÓN DE PINOS	91
Porcentajes de colonización total y grupos de ectomorfortipos conformados	91
Identificación molecular de los hongos formadores de ectomicorrizas	96
ANÁLISIS DE POBLACIONES DE ECTOMICORRIZAS	101
Riqueza	101
Abundancia relativa	102
Diversidad	103
Similitud	104
Relación entre las ectomicorrizas, las categorías de edad y las estaciones	106
DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ECTOMORFORTIPOS MÁS ABUNDANTES	106
Tipo Exploratorio 1: Contacto	108
Tipo Exploratorio 2: Corta distancia	114
Tipo Exploratorio 3: Distancia moderada	119
ANÁLISIS DE MICORRIZAS ARBUSCULARES	122
DISCUSIÓN	
PORCENTAJES DE COLONIZACIÓN MICORRÍCICA	124
HONGOS FORMADORES DE ECTOMICORRIZAS EN <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i>	127
DINÁMICA DE COMUNIDADES DE ECTOMICORRIZAS	131
CONCLUSIONES PARCIALES	135

CAPÍTULO 5

COMUNIDADES FÚNGICAS ASOCIADAS AL SUELO Y A LOS ECTOMORFORTIPOS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA*

INTRODUCCIÓN	
EL AMBIENTE DINÁMICO DEL SUELO Y SUS INTERACCIONES	137
LA RIZÓSFERA, LA ECTOMICORRIZÓSFERA Y EL ECTOMICORRIZOPLANO	139
INFLUENCIA DEL GENOTIPO DE LA PLANTA SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS	141
TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS AL ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS	143
OBJETIVO	145
MATERIALES Y MÉTODOS	
COLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	146
CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL SUELO	148
LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS ASOCIADAS A ECTOMORFORTIPOS	148

Selección de los ectomorfotipos, aislamiento y agrupamiento de las cepas	148
Extracción de ADN genómico, análisis moleculares y filogenéticos de levaduras y hongos dimórficos asociadas a ectomorfotipos de <i>Nothofagus nervosa</i>	150
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE INDIVIDUOS DE <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i>	151
ANÁLISIS DE TGGE	152
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	153
RESULTADOS	
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DEL SUELO ASOCIADO A LOS ECTOMORFOTIPOS ANALIZADOS	155
LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS ASOCIADOS A ECTOMORFOTIPOS	156
DIVERSIDAD GENÉTICA EN EJEMPLARES JÓVENES DE <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i>	162
ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE BANDAS OBTENIDOS POR LA TÉCNICA DE TGGE	167
RELACIÓN DE LOS PERFILES CON LA DIVERSIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL	168
DISCUSIÓN	
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO EN EL BOSQUE Y LA PLANTACIÓN DE PINOS	174
LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS EN RELACIÓN CON EL MEDIO DE CULTIVO Y EL TIPO EXPLORATORIO	175
DIVERSIDAD DE LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS ASOCIADA A ECTOMORFOTIPOS DE <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i>	176
DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i> ANALIZADAS	180
RIQUEZA FÚNGICA ASOCIADA A EJEMPLARES CULTIVADOS DE <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i> EN DISTINTOS AMBIENTES	181
RELACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>NOTHOFAGUS NERVOSA</i> Y LAS COMUNIDADES FÚNGICAS DEL SUELO	184
CONCLUSIONES PARCIALES	186
CAPÍTULO 6	
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	
DISCUSIÓN GENERAL	189
CONCLUSIONES FINALES	192
CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE TRABAJO	193
ANEXOS	195
BIBLIOGRAFÍA	202
ARTÍCULO DE RESPALDO	222

RESUMEN

Las micorrizas son asociaciones simbióticas generalmente mutualistas que se establecen entre distintos hongos del suelo y las raíces de la mayoría de las plantas. Esta simbiosis influye en la aptitud vegetal ya que está directamente relacionada con la absorción de nutrientes y agua. Además, el micelio que las micorrizas forman en el suelo provee una mayor área de interacción con otros microorganismos, encontrándose entre éstos las levaduras y hongos dimórficos. En los bosques templados y boreales, el establecimiento, crecimiento y supervivencia de distintas especies arbóreas es generalmente dependiente de las ectomicorrizas (EcM) presentes en sus raíces. Las especies comprendidas en el género *Nothofagus* son las dominantes en los bosques templado-fríos de América del Sur, y todas ellas han sido descritas como ectomicorrícicas, presentando generalmente valores de colonización elevados. Entre ellas, *N. nervosa* (= *N. alpina*) corresponde a una especie de importancia económica, ya que posee madera de alta calidad apreciada en los mercados nacional e internacional. En Argentina, muchas de las poblaciones naturales de *N. nervosa* (Raulí) han sido drásticamente afectadas por la sobreexplotación. Esta situación llevó a que se implementaran programas de conservación y domesticación de esta especie forestal. Entre los diferentes aspectos que deben considerarse en estos programas se encuentran aquellos microorganismos que puedan incrementar el crecimiento de la planta, facilitando su establecimiento y posterior desarrollo en el campo. Entre ellos se encuentran las micorrizas y levaduras asociadas a la especie en estudio. Se planteó como objetivo general de este trabajo de Tesis analizar la diversidad y abundancia de micorrizas y levaduras asociadas a *N. nervosa* en condiciones naturales y en plantas cultivadas en vivero a fin de describir su comportamiento micorrícico y obtener información relevante para los programas de domesticación de esta especie forestal. Para la identificación de los hongos se emplearon técnicas tradicionales (anatomorfología macro y microscópica de los ectomorfitipos hallados y métodos convencionales de caracterización morfológica en el caso de las levaduras) y herramientas moleculares (microsatélites, amplificación de región D1/D2 e ITS) seguidas de secuenciación.

Se estudiaron las levaduras y hongos dimórficos presentes en la superficie de los frutos de *N. nervosa* que son utilizados para su cultivo en vivero. Se determinó que los procesos de conservación de los frutos en cámara de frío y de ruptura de la dormancia de las semillas (lavado en agua fría durante 5 días) alteran las comunidades de levaduras y hongos dimórficos: la primera reduce significativamente el número y diversidad de estos hongos, mientras que la última tiende a cambiar la composición de las comunidades. Se aislaron un

total de 17 especies, perteneciendo la mayor parte de ellas al Phylum Ascomycota. La mayoría de ellas eran pigmentadas, formaban micelio y sintetizaban micosporinas.

Se llevó a cabo un ensayo en el vivero del INTA EEA Bariloche que consistió en cultivar ejemplares de *N. nervosa* durante 2 años bajo las condiciones de cultivo utilizadas en los procesos de domesticación y evaluar el comportamiento micorrícico de las plántulas durante ese período de tiempo. Para ello se sembraron las semillas en un sustrato compuesto por turba y arena sin aporte externo de inóculo micorrícico y se analizaron las raíces de las plántulas periódicamente para estudiar la ocurrencia de EcM y micorrizas arbusculares (MA). Al año de edad la mitad de las plántulas fueron trasplantadas al cantero, que se encuentra a la intemperie y sin fertirriego. Las plántulas desarrollaron EcM entre los 6 meses y el año de edad. Los ejemplares trasplantados al cantero presentaron menor crecimiento y porcentaje de colonización. Las 2 especies formadoras de EcM más abundantes fueron *Tomentella ellisii* y EcM Ascomicética sp. 1. En las plántulas de 2 años instaladas en el cantero se identificaron especies de hongos ectomicorrícicos no registrados en el invernáculo. En ninguna de las plántulas se observaron MA.

Para estudiar el comportamiento micorrícico de *N. nervosa* en el campo se consideraron diferentes categorías de edad: plántulas nativas, jóvenes nativos, adultos nativos y jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados en ensayos bajo bosque nativo y bajo una plantación de pinos. Se muestrearon 5 individuos de cada una de estas categorías en 2 estaciones del año: otoño y primavera. Todos los ejemplares de *N. nervosa* analizados presentaron EcM en sus sistemas radicales. En el bosque los valores de colonización fueron superiores al 90 %. Se registraron diferencias en los porcentajes, riqueza y diversidad de EcM respecto de la edad de las plantas y de la estación del año. En los jóvenes implantados bajo pino los porcentajes de colonización y diversidad de EcM fueron significativamente menores que en el bosque nativo. Del total de 31 grupos de ectomorfortipos conformados en base a características macromorfológicas, se identificaron 26 especies formadoras de EcM, la mayoría de ellas comprendidas en el Phylum Basidiomycota. El orden Agaricales y las especies del género *Cortinarius* fueron las más abundantes y ampliamente distribuidas. No se observaron especies en común entre el bosque nativo y a la plantación de pinos. Los hongos formadores de EcM también presentaron patrones de distribución asociados a las distintas categorías de edad y estaciones. No se registraron MA en ninguno de los ejemplares analizados.

Para evaluar la diversidad fúngica del suelo circundante a las raíces de los individuos jóvenes de *N. nervosa* de diferentes procedencias implantados en el bosque y la plantación de pinos se realizó un análisis de Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura

(*Temperature Gradient Gel Electrophoresis* - TGGE). También se aislaron e identificaron levaduras y hongos dimórficos a partir de los ectomorfortipos correspondientes a jóvenes nativos y cultivados. A partir de ambos análisis se determinó que las comunidades de hongos presentes en el suelo y en la superficie de los ectomorfortipos fueron completamente diferentes entre el bosque nativo y la plantación de pinos, predominando los pertenecientes al Phylum Basidiomycota en el primero y aquellos incluidos en el Phylum Ascomycota en la última. A partir de los ectomorfortipos se aislaron 16 especies de levaduras y hongos dimórficos. A diferencia de las halladas en los frutos, la mayor parte de las mismas no presentaban pigmentos ni micelio y no sintetizaban micosporinas. También en base a los análisis de TGGE pudieron señalarse algunas tendencias que sugieren que la diversidad genética de las poblaciones de las cuales se coleccionan los frutos para cultivar las plántulas de *N. nervosa* influye sobre las comunidades fúngicas del suelo.

En cada Capítulo se discuten las implicancias ecológicas y las posibles aplicaciones de los resultados obtenidos, y se relacionan los mismos con la importancia que podrían tener en los procesos de domesticación de esta importante especie forestal. La información presentada en este trabajo de Tesis contribuye a la descripción de la bioecología de *N. nervosa* y de las comunidades fúngicas asociadas a esta especie. Asimismo, aporta información que puede ser tenida en cuenta en los programas de domesticación para plantear recomendaciones de cultivo, inoculación y manejo, a fin de establecer futuras estrategias de conservación y uso sustentable de los sistemas naturales.

ABSTRACT

Mycorrhizas are symbiotic associations between soil fungi and plant roots. They influence plant fitness since they usually increase water and nutrient uptake. In addition, the mycelia that mycorrhizas develop in the soil provide a greater area for interactions with other soil microorganisms, being among them yeasts and yeast-like fungi.

In temperate and boreal forests, the establishment, growth and survival of different tree species are usually dependent on the ectomycorrhizas (EcM) present in their roots. Several species belonging to the genus *Nothofagus* constitute the main component of South American cold-temperate forests. These species have been described as ectomycorrhizal, having high colonization rates. Among the species included in this genus, *N. nervosa* (= *N. alpina*) is an economically important species, since it yields a highly valuable wood suitable for regional and international commercialization. In Argentina, natural populations of *N. nervosa* have been seriously affected by overexploitation. This critical situation led to the implementation of conservation and domestication programs. Among the aspects that should be considered in these programs are the microorganisms related with *N. nervosa* (Raulf), which could improve plant growth and establishment of outplanted seedlings. Among these microorganisms are the mycorrhizas and yeasts associated with this species. The general aim of this work was to analyze the diversity and abundance of mycorrhizas and yeasts associated with *N. nervosa* and to compare them between native and nursery cultivated individuals in order to describe its mycorrhizal behavior and to obtain relevant information for domestication programs. Traditional techniques (macro and micromorphology of ectomorphotypes, morphological yeast characterization) as well as molecular tools (microsatellites, D1/D2 and ITS amplification) and sequencing were used for identifying these fungi.

Yeast and yeast-like fungi present on *N. nervosa* fruits destined for the propagation of this species in the nursery were studied. It was observed that the preservation process at low temperatures considerably reduced yeast and yeast-like fungal diversity, while the seed dormancy-breaking process (placing the fruits in cold running water for 5 days) tended to change community composition. A total of 17 species were recovered, most of which belong to the Phylum Ascomycota. The majority of the species develop mycelia, produce pigments and mycosporines.

For evaluating the mycorrhizal status of seedlings that are going to be taken to the field, a two-years trial was conducted following the cultivation conditions used in the INTA EEA Bariloche during domestication programs. This trial consisted in sowing *N. nervosa* seeds in a substrate composed of peat and sand and without external mycorrhizal inoculum.

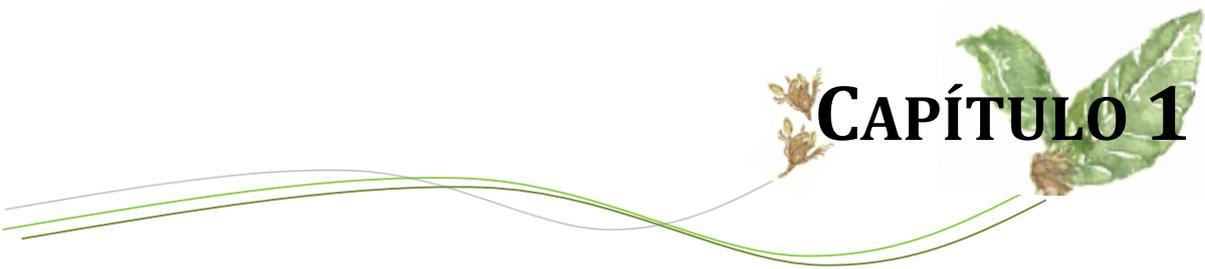
Seedlings' roots were examined at different times in order to determine the occurrence of EcM or arbuscular mycorrhizas (AM). When seedlings were one-year-old, half of them was outplanted in the soil outside the nursery without fertigation. It was observed that seedlings developed EcM between 6 and 12 months-old. Plants that were established in the soil outside the nursery presented lower growth and colonization rates. The most abundant ectomycorrhizal fungi colonizing seedlings roots were *Tomentella ellisii* and EcM *Ascomicética* sp. 1. In the 2-year seedlings outplanted in the soil, some ectomycorrhizal fungi that were not recorded in plants that continued growing inside the nursery were observed. Arbuscular mycorrhizas were not detected in any plant.

For analysing the mycorrhizal behaviour of *N. nervosa* in the field, different age categories were considered: seedlings, young and adult native plants, and nursery cultivated individuals corresponding to two field trials, one established within a native forest and the other beneath a *Pinus* plantation. Five trees of each category were sampled in two seasons: autumn and spring. All the examined plants had EcM. In the native forest EcM percentages were higher than 90 %. In this environment, differences in colonization values, EcM richness and diversity related with plant age and season were recorded. Ectomycorrhizal colonization rates, richness and diversity were significantly lower in young *N. nervosa* individuals established beneath the *Pinus* plantation. Out of the 31 groups of ectomorphotypes formed based on macromorphological features, 26 fungal species were identified, most of them were included in the Phylum Basidiomycota. In the native forest, species included in the Order Agaricales, and mainly corresponding to the genus *Cortinarius*, were the most abundant and widely distributed. No common fungal species between the native forest and the *Pinus* plantation were observed. Ectomycorrhizal fungal species also showed distribution patterns associated with plant age and seasons. Arbuscular mycorrhizas were not detected in any *N. nervosa* specimen.

To assess the fungal diversity of the soil surrounding the roots of young *N. nervosa* individuals cultivated from seeds corresponding to different populations established in the native forest and in the *Pinus* plantation, a Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) analysis was performed. In addition, yeast and yeast-like fungi were isolated from ectomorphotypes corresponding to native and cultivated young *N. nervosa* plants. It was observed that soil fungal communities as well as the yeast and yeast-like fungi present on the ectomorphotypes were completely different between the native forest and the *Pinus* plantation. In the former, most of the fungi corresponded to the Phylum Basidiomycota, whereas in the plantation most of them belonged to the Phylum Ascomycota. A total of 16 yeast and yeast-like fungal species were isolated from the ectomorphotypes. In contrast to

those found on the fruits, most of these species did not form mycelia and did not synthesize pigments or mycosporines. Based on TGGE analysis, some tendencies suggesting that genetic diversity of *N. nervosa* influence fungal communities present in the soil surrounding its roots were noted.

In each Chapter the ecological implications and possible application of the obtained results are discussed and related with domestication processes. The information presented in this Thesis contributes to the description of the bioecology of *N. nervosa* and of the fungal communities associated with this species. This work provides useful information that could be taken into account during domestication programs for making cultivation and inoculation recommendations, and to establish future strategies for conservation and sustainable use of natural systems.



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN GENERAL

LOS BOSQUES ANDINO-PATAGÓNICOS Y DOMESTICACIÓN DE ESPECIES FORESTALES NATIVAS

Los bosques Andino-patagónicos se encuentran en el extremo austral de Sudamérica y se extienden a lo largo de la Cordillera de Los Andes, entre los 35° y 55° de latitud Sur, tanto en Argentina como en Chile. En la Argentina, ocupan una estrecha franja de no más de 100 Km de ancho, que abarca desde el Norte de la Provincia del Neuquén hasta Tierra del Fuego. Estos bosques cubren una superficie de ~3000000 ha y representan aproximadamente el 10 % de la superficie boscosa total del país (Laclau 1997). La composición arbórea de éstos se caracteriza por un predominio de angiospermas, ya que la mayor parte de los mismos está constituida por especies latifoliadas del género *Nothofagus*. En nuestro país este género comprende un conjunto de seis especies de gran importancia ecológica y productiva, destacándose entre ellas el Raulí (*N. nervosa* = *N. alpina*), el Roble Pellín (*N. obliqua*) y la Lengua (*N. pumilio*) (Correa 1984, Arroyo *et al.* 1995, Gallo 2006). Estos bosques se encuentran acompañados por otros de menor extensión formados por gimnospermas longevas, tales como *Araucaria araucana* (Araucaria, Pehuén), que se encuentra presente sólo en la Provincia de Neuquén, y *Austrocedrus chilensis* (Ciprés), que forma bosques de transición que se desarrollan entre los bosques de *Nothofagus* y la estepa patagónica. Otras especies de angiospermas tales como *Maytenus boaria* (Maitén) y *Lomatia hirsuta* (Radal), pueden formar rodales de reducida extensión sin llegar a constituir masas forestales considerables (Roig 1998).

Un elevado valor paisajístico, la existencia de ecosistemas únicos, la alta diversidad de especies endémicas y la importante riqueza económica de sus recursos, hacen de los bosques Andino-patagónicos un patrimonio nacional de incalculable valor (Gallo *et al.* 2000). Debido a la elevada calidad de la madera de muchas de las especies nativas que crecen en esta región, y a que ésta resulta muy apreciada en el mercado local e internacional, estos bosques fueron explotados intensamente sin tener en cuenta un manejo silvícola adecuado. La implementación de sistemas agroganaderos y el establecimiento de plantaciones de especies exóticas como recursos madereros alternativos también influyen significativamente en el estado de conservación de estos bosques (Donoso & Lara 1995). En cuanto a las plantaciones de exóticas, se ha descrito que en Patagonia existen aproximadamente 68000 ha de plantaciones monoespecíficas con coníferas de rápido crecimiento, de las cuales el 80 % corresponden a pino ponderosa (*Pinus ponderosa*) y el resto a pino murrayana (*Pinus contorta*) y pino oregón (*Pseudotsuga menziesii*) (Godoy & Defossé 2004). En conjunto, estos factores han llevado a un estado crítico de los bosques Andino-patagónicos, generando una dramática reducción en la distribución de muchas especies y la extinción de otras (Armesto *et*

al. 1995, Gallo *et al.* 2000). En Argentina, la creación de Parques Nacionales en el año 1937 fue el primer paso tendiente a proteger gran parte de este ecosistema. Otro hecho de gran importancia relacionado con la protección de los bosques nativos es la sanción en el año 2007 de la “Ley de presupuestos mínimos de protección ambiental de los bosques nativos” (Ley 26.331), cuyo objetivo es “*establecer los presupuestos mínimos de protección ambiental para el enriquecimiento, la restauración, conservación, aprovechamiento y manejo sostenible de los bosques nativos, y de los servicios ambientales que éstos brindan a la sociedad*” (Capítulo 1, Disposiciones Generales, Artículo 1). Sin embargo, para poder implementar programas de conservación efectivos y llevar a cabo un uso sustentable de nuestros recursos forestales, es de fundamental importancia conocer primero la dinámica de estos bosques y la diversidad y ecología de las especies que los conforman.

Por lo tanto, las especies leñosas nativas de los bosques Andino-patagónicos no sólo forman parte de nuestro patrimonio natural, sino que además muchas de ellas se presentan como una alternativa productiva de cultivo (Azpilicueta *et al.* 2010). Desde el punto de vista económico, la forestación con estas especies tendría actualmente un costo más elevado respecto de la que se realiza tradicionalmente con pinos, pero éste se compensaría con la alta calidad y precio de su madera, y con la existencia de un mercado adecuado para su comercialización. Históricamente, el valor de la madera de las especies nativas se ha mantenido entre 3 y 4 veces por encima del valor de las especies exóticas (Boletín SAGPyA). Desde una perspectiva ecológica, domesticar y llevar a cultivo especies forestales autóctonas constituiría una manera de disminuir el impacto sobre el bosque nativo y de proveer con madera de alta calidad a los mercados regional, nacional e internacional a partir de actividades forestales sustentables. La domesticación de especies forestales se refiere a la forma en la que se seleccionan, manejan y propagan especies arbóreas a fin de incrementar su tasa de crecimiento, la resistencia a patógenos o distintos factores de estrés (ej. sequía), y/o la calidad de su madera (Simons & Leakey 2004). Fomentar esta actividad evitaría algunos problemas que generan las plantaciones de coníferas exóticas en esta región, tales como la fragmentación del hábitat, alteraciones de las características propias del suelo, la eliminación del sotobosque y un mayor riesgo de plagas, enfermedades e incendios (Ross 1996, Satti *et al.* 2003, Gallo 2006, Varela *et al.* 2008, Rivas *et al.* 2009). En este sentido, una de las actividades que se lleva a cabo actualmente en la Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal del INTA EEA Bariloche junto a otros grupos de investigación, es el proyecto denominado “PNFOR044321: Domesticación de especies forestales nativas patagónicas”, cuyo principal objetivo es “*generar el conocimiento y la tecnología necesarios para introducir exitosamente al cultivo especies del género Nothofagus con el objeto de producir*

madera de calidad, manteniendo la persistencia, las funciones ecosistémicas y la diversidad genética de sus bosques naturales" (Gallo 2009). Entre estas especies se encuentra el Raulí.

En la actualidad, se sabe que uno de los factores a tener en cuenta en los procesos de domesticación es el rol que juegan aquellos microorganismos capaces de favorecer el crecimiento de las plantas y su posterior establecimiento y desarrollo en el campo (Barroetaveña *et al.* 2009, Azpilicueta *et al.* 2010), encontrándose entre ellos los hongos micorrízicos y las levaduras asociadas a la especie vegetal. Por lo tanto, el análisis y descripción de estos dos grupos fúngicos asociados a especies forestales de interés comercial, tales como las incluidas en el género *Nothofagus*, nos brindaría la posibilidad de desarrollar estrategias que nos permitan manipular los mismos en prácticas agrícolas y forestales sustentables (Kowalchuk *et al.* 2010). Sin embargo, es escasa la información sobre las micorrizas y levaduras asociadas a especies de importancia forestal en los bosques Andino-patagónicos. Asimismo, no se ha explorado la potencialidad biotecnológica que podrían tener estos organismos. Llevar a cabo el estudio de estos hongos forma parte de las tareas que deben aún desarrollarse para fortalecer las técnicas utilizadas actualmente en los procesos de producción de plantas nativas (Azpilicueta *et al.* 2010). Es por ello que este trabajo de Tesis tiende a generar la información de base necesaria para comprender la dinámica de micorrizas en bosques de *Nothofagus*, en especial de *N. nervosa*, y sus relaciones con otros microorganismos asociados a la planta, tales como las levaduras.

CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO: *NOTHOFAGUS NERVOSA* (RAULÍ)

El Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst. = *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil.)¹ es una especie arbórea que se desarrolla en suelos derivados de cenizas volcánicas (Andisoles) de la Cordillera y Precordillera Andina, tanto en Argentina como en Chile (Donoso 1993). Esta especie se caracteriza por alcanzar un gran porte (hasta 40 m de altura) y por formar un tronco recto y cilíndrico de corteza estriada que puede alcanzar los 2 m de diámetro. Sus hojas son grandes en relación a las de otras especies del género, caducas, simples y alternas, de margen ondulado suavemente aserrado y nervadura muy notable en la cara inferior, característica a la que debe su nombre (Figura 1.1). Las hojas se tornan de un intenso color rojizo durante el otoño. Es una especie monoica, siendo la polinización y la dispersión de las semillas anemófila. La polinización tiene lugar entre los meses de Octubre y Noviembre, y la mayor liberación de semillas entre Febrero y Abril. Las semillas son

¹ En este trabajo de Tesis se utilizará el nombre científico *Nothofagus nervosa* para referirse al Raulí, según lo establecido por Lennon *et al.* (1987).

pequeñas y están contenidas dentro de un fruto tipo aquenio (Rodríguez *et al.* 1983, Correa 1984), que será descrito en mayor detalle en el Capítulo 2.

Entre los ecosistemas de los bosques Andino-patagónicos, los de *N. nervosa* constituyen uno de los más productivos en cuanto a biomasa comercial, con crecimientos que alcanzan en algunos sitios los 12 m³/ha x año (Chauchard *et al.* 1997). Dadas las particulares características y alta calidad de su madera, esta especie corresponde a una de las de mayor importancia comercial comprendidas en estos bosques y a una de las más explotadas, tanto en Argentina como en Chile (Gallo *et al.* 2000). La explotación forestal de esta especie se llevaba a cabo sin manejo silvícola, provocando así una reducción drástica en el número de individuos de muchas poblaciones (Gallo *et al.* 2000, Marchelli 2002). Debido a que la mayor parte de su área de distribución en Argentina se encuentra bajo jurisdicción de Parques Nacionales, en la actualidad el aprovechamiento forestal de *N. nervosa* se realiza solamente en la Zona de Reserva del Parque Nacional Lanín (cuenca del Lago Lácar) por empresas madereras que cuentan con planes de manejo y ordenación realizados y controlados por la Administración de Parques Nacionales. Dichos planes contemplan la regeneración natural de la especie manteniendo una cobertura sugerida como silvícolamente adecuada para la misma (Chauchard 1989).



Figura 1.1.- Características anato-morfológicas de *Nothofagus nervosa*. **a)** Tronco recto y cilíndrico de gran porte; **b)** Corteza estriada; **c)** Hojas simples, de margen ondulado y suavemente aserrado, nervadura muy marcada.

MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL SUELO Y AL SISTEMA RADICAL DE LAS PLANTAS

El suelo, las raíces de las plantas y su rizósfera proveen un nicho ecológico importante y de particulares características para muchos microorganismos (que será descrito en mayor detalle en el Capítulo 5), encontrándose entre ellos un numeroso grupo de hongos. Las relaciones ecológicas entre estos últimos y las plantas son muy variadas, pudiendo ser beneficiosas, perjudiciales o neutras (Saikkonen *et al.* 1998). Uno de los grupos fúngicos más importantes, tanto a nivel de biomasa como de los procesos ecológicos que llevan a cabo, son aquellos que forman asociaciones simbióticas con las raíces de la mayoría de las plantas. Estas interacciones, generalmente mutualistas, son conocidas como micorrizas y los hongos que las forman pertenecen a diferentes grupos taxonómicos (Phylum Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota) (Peterson *et al.* 2004, Moreira & Siqueira 2006, Smith & Read 2008).

Otros hongos presentes en el suelo y en las raíces de las plantas son las levaduras y los hongos dimórficos (Slavikova & Vadkertiova 2000, Maksimova & Chernov 2004, Frey 2007, Botha 2011, Mestre 2012, Yurkov *et al.* 2012). Ambos tipos de hongos constituyen un grupo polifilético ampliamente distribuido dentro del Reino Fungi, con representantes en los Phylum Ascomycota y Basidiomycota (Satyanarayana & Kunze 2009).

Las micorrizas

El término micorriza (*Gr.* “*mykes*”: hongo, “*rhiza*”: raíz) fue propuesto por el botánico alemán Albert B. Frank (1885), quien fue el primero en estudiar esta interacción. Actualmente, se define a las micorrizas como asociaciones simbióticas caracterizadas por el íntimo contacto y la perfecta integración morfológica entre un hongo (capaz de desarrollarse tanto en el suelo como en su hospedador) y las raíces u otros órganos sanos de las plantas que estén en contacto con el sustrato (Brundrett 2004, Smith & Read 2008). La base del funcionamiento de esta simbiosis es la transferencia de los carbohidratos elaborados durante la fotosíntesis desde la planta hacia el hongo, y de los nutrientes absorbidos por las hifas de éste último hacia el vegetal (Peterson *et al.* 2004, Smith & Read 2008), formándose así un órgano dual de absorción distinto a la raíz (Trappe 1996). Esta simbiosis permite incrementar la aptitud de uno o ambos organismos, es decir su capacidad de supervivencia, de competencia y de reproducirse exitosamente (Read 1999).

Las micorrizas tienen sobre el hospedador distintos efectos relacionados con la capacidad de la planta de alcanzar el estado reproductivo y de aportar genéticamente a las siguientes generaciones (ej. cantidad y calidad de semillas). Entre ellos se encuentra el incremento del vigor de la planta, dado que las micorrizas mejoran su estado fisiológico y su

capacidad de acceder a recursos antes no disponibles (Read 1999). Esto se debe a que el hongo incrementa el transporte de agua y nutrientes hacia la planta a partir del micelio que desarrolla en el suelo circundante a la raíz, compuesto por hifas de menor diámetro que los pelos radicales. Este micelio extrarradical amplía notablemente la superficie de absorción del sistema radical de la planta, aumentando la distancia de exploración y accediendo a poros de pequeño tamaño en los que los pelos radicales no pueden penetrar (Peterson *et al.* 2004, Smith & Read 2008) (Figura 1.2). De esta forma, las micorrizas le permiten a la planta acceder a nutrientes del suelo que se hallen en baja concentración, que presentan movilidad reducida (principalmente P, pero también a otros como S, Zn y Cu) o que se hallen en formas químicas no disponibles para los vegetales (ej. fuentes orgánicas). Por lo tanto, estos hongos simbiotes brindan a las plantas que colonizan acceso a fuentes de nutrientes que de otra manera serían inaccesibles para ellas (Peterson *et al.* 2004, Moreira & Siqueira 2006, Smith & Read 2008). Otra forma en la que las micorrizas afectan al hospedador es generando cambios en el tamaño, longevidad y forma del sistema radical y brindándole resistencia frente a diferentes patógenos, tales como bacterias, nematodos y hongos. Es por ello que en la actualidad se estudian estos hongos simbiotes como potenciales biocontroladores de distintas enfermedades vegetales (Killham 1994, Azcon-Aguilar & Barea 1996, Read 1999).

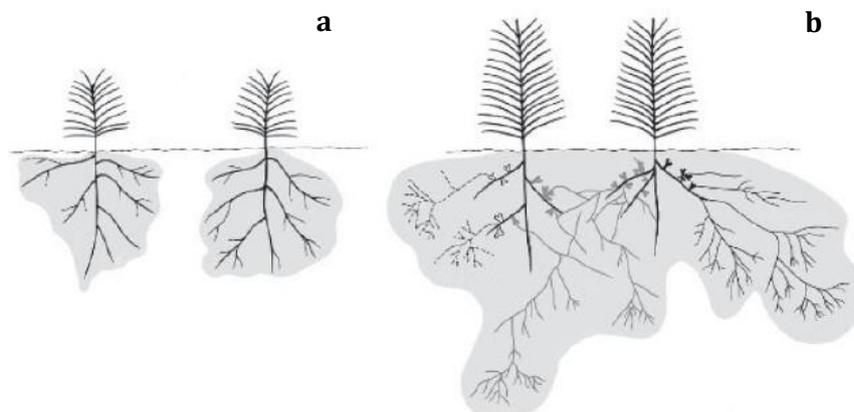


Figura 1.2.- Esquema que muestra sistemas radicales no micorrizados (a) y micorrizados (b), en los que la superficie de absorción se encuentra notablemente incrementada (de Mohammadi *et al.* 2011).

Algunas especies vegetales dependen de la simbiosis micorrícica para completar su ciclo de vida. Por ejemplo, las orquídeas poseen semillas sumamente pequeñas que contienen un embrión no diferenciado, por lo que la germinación, establecimiento y desarrollo de la plántula depende enteramente del C y minerales que la micorriza aporta a la misma. Asimismo, se ha determinado que la especie *Hyacinthoides nonscripta* (Jacinto de los bosques, que crece a partir de bulbos) necesita formar micorrizas arbusculares para desarrollar sus

bulbos, y por lo tanto para subsistir en la naturaleza. Por otra parte, distintos estudios han demostrado que las plantas micorrizadas pueden producir mayor cantidad de semillas que las no micorrizadas, que la calidad de éstas también suele ser mayor (en términos de composición nutricional y capacidad germinativa) y que las plántulas que emergen de las mismas suelen ser más vigorosas (Read 1999).

Debido a los numerosos efectos que las micorrizas generan en su hospedador, éstas influyen sobre la diversidad, estructura y productividad de las comunidades vegetales (van der Heijden *et al.* 1998). Por ello, su estudio resulta interesante y de gran importancia aplicada dado el potencial biotecnológico de esta simbiosis, principalmente relacionado con su capacidad de incrementar el crecimiento vegetal (biofertilización), de actuar como biocontroladoras contra diferentes patógenos y de biorremediar ambientes degradados o contaminados (Rai & Varma 2011).

Clasificación de las micorrizas

Durante su ciclo de vida, los hongos micorrícicos desarrollan una fase en el suelo y otra en las raíces de las plantas que los hospedan. La colonización fúngica intrarradical está restringida a la corteza de la raíz (no penetra en el cilindro vascular) y según la relación que posean las hifas con las células corticales, las micorrizas se separan en dos grandes grupos: ectotróficas (I) y endotróficas (II), los que a su vez se subdividen en 7 tipos de micorrizas (Anexo I), cuyos aspectos fundamentales se describen a continuación (Peterson *et al.* 2004, Moreira & Siqueira 2006, Smith & Read 2008, Figura 1.3):

I) Micorrizas Ectotróficas

En estos tipos de micorrizas, los hongos forman estructuras tanto en el interior como en el exterior de las raíces y generalmente no penetran en sus células, sino que se desarrollan extracelularmente entre las mismas. La raíz se modifica macromorfológicamente como resultado de la colonización fúngica.

a) Ectomicorrizas (EcM): Se caracterizan por formar un manto entorno a las raíces que altera la morfología de las mismas y una estructura compleja intrarradical constituida por hifas intercelulares denominada Red de Hartig. Las EcM también forman un sistema de hifas que se extiende desde el manto y se propaga en el sustrato, éste es llamado micelio extrarradical² y comprende las hifas emanantes (hifas extrarradicales individuales) y los rizomorfos (agregados de hifas extrarradicales). Los ápices radicales colonizados por EcM presentan características diferentes a los no colonizados por el hongo (ramificación,

² En este trabajo de Tesis se denominará al conjunto de hifas emanantes y rizomorfos con este nombre según lo descrito por Peterson *et al.* (2004) y Smith & Read (2008).

forma, color, textura), dando lugar a una nueva estructura denominada ectomorfofito (Figura 1.4)³.

Se conocen alrededor de 5500 especies de hongos capaces de formar este tipo de micorrizas, la mayoría de las cuales pertenecen al Phylum Basidiomycota y en menor medida al Ascomycota (existe una cita de un hongo formador de EcM perteneciente al Phylum Zygomycota). En general, los hongos formadores de EcM presentan especificidad por el hospedador. Si bien pueden hallarse en algunos arbustos y hierbas, en general estas micorrizas están asociadas a especies arbóreas, principalmente de las familias Pinaceae, Betulaceae y Fagaceae, y en algunas especies de las familias Myrtaceae, Junglandaceae, Salicaceae y Fabaceae (Wang & Qiu 2006).

b) *Ectendomicorrizas*: Se asemejan a las EcM por presentar manto (el cual puede ser muy fino o no existir) y Red de Hartig, pero difieren de ellas en que pueden penetrar en las células corticales de la raíz dando origen a estructuras intracelulares denominadas “complejos hifales”. Están formadas por un pequeño grupo específico de hongos del Phylum Ascomycota y algunos Basidiomycota. Hasta el momento, la mayor parte de ellas se han descrito en los géneros *Eucalyptus*, *Larix* y *Pinus*, principalmente en el estadio de plántulas.

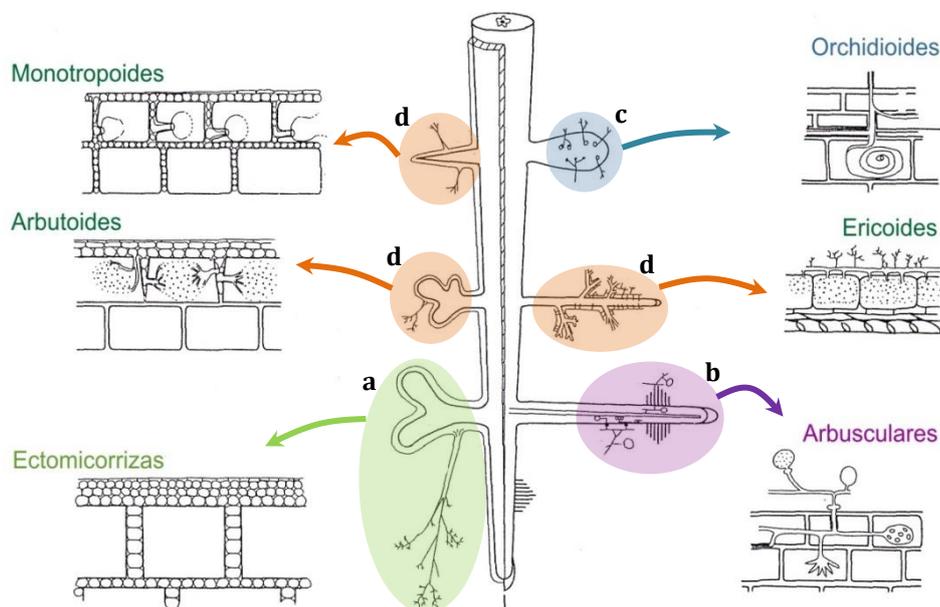


Figura 1.3.- Diagrama de seis de los diferentes tipos de micorrizas (modificado de Read 1999). **a)** Ectomicorrizas; **b)** Micorrizas arbusculares; **c)** Micorrizas orquidioides; **d)** Micorrizas ericáceas (Arbutoides, Ericoides y Monotropoides).

³ En este trabajo de Tesis utilizaremos el término “puntas ectomicorrícicas” para referirnos a las ramificaciones de los ectomorfofitos, los cuales corresponden a los ápices de las raíces morfológicamente modificados por la presencia del hongo simbionte.

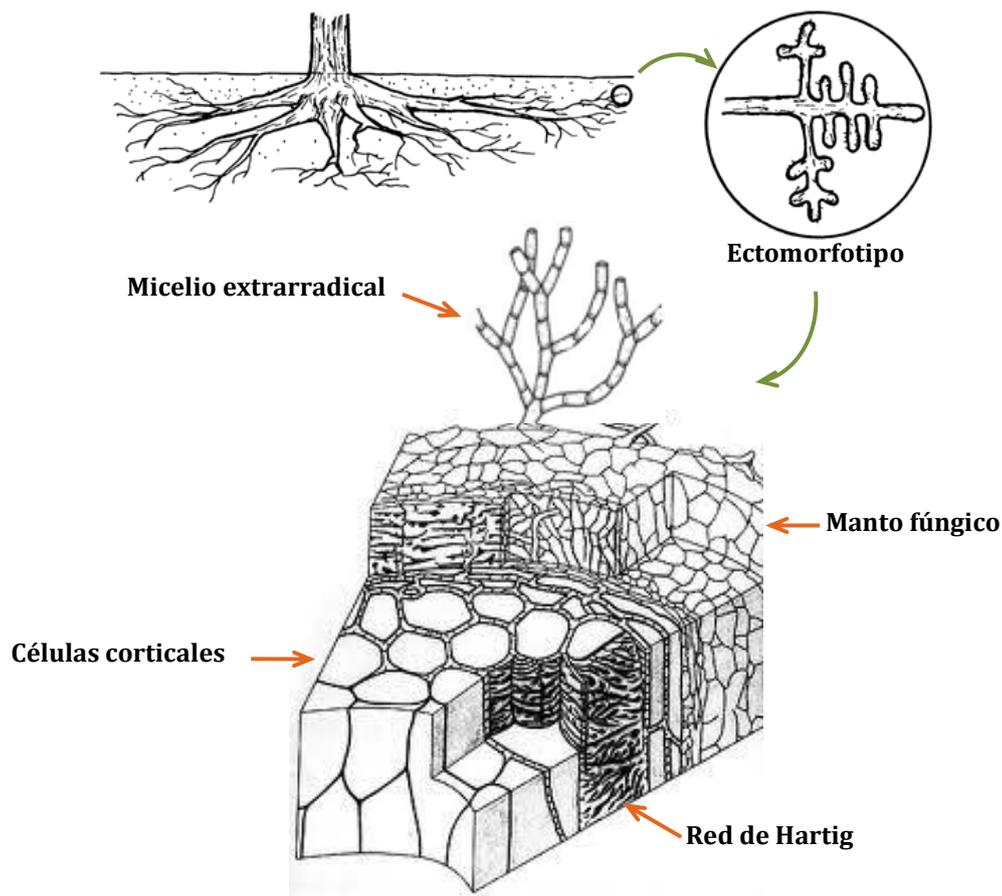


Figura 1.4.- Esquema del aspecto general de las raíces colonizadas por ectomicorrizas y principales estructuras fúngicas de las mismas.

II) Micorrizas Endotróficas

Estas micorrizas se diferencian de las ectotróficas en que el micelio de los hongos que las forman ingresa en las células corticales de la planta hospedadora y no produce cambios morfológicos macroscópicos en sus raíces. Dentro de este grupo se incluyen los 5 tipos de micorrizas que se describen a continuación:

a) *Micorrizas arbusculares (MA)*: Este tipo de simbiosis es una de las más generalizadas en la naturaleza; se halla en el 97 % de las plantas capaces de formar micorrizas (80 % de las plantas vasculares) y su característica diagnóstica son los arbuscúlos intracelulares que desarrollan al establecerse la interacción entre ambos organismos. Los arbuscúlos son estructuras relativamente efímeras (6-10 días) formadas por hifas que se ramifican dicotómicamente numerosas veces dentro de la célula (rodeándose de la membrana plasmática sin romperla). Es principalmente a través de estas estructuras que se establece el flujo de nutrientes de un organismo a otro. Estas micorrizas pueden también formar

rulos intracelulares y vesículas (intra o intercelulares). Estas últimas corresponden a porciones ensanchadas de hifas que contienen sustancias de reserva.

Las ~150 especies de hongos que dan origen a este tipo de micorrizas son capaces de colonizar plantas de distintas especies (no son específicas) y se encuentran incluidas en el Phylum Glomeromycota (Schubler *et al.* 2001). Se ha descrito este tipo de micorrizas en algunas plantas no-vasculares, como las briofitas, y en la mayor parte de las plantas vasculares, incluyendo helechos, algunas gimnospermas y la mayoría de las angiospermas.

- b) *Ericáceas*: Los hongos que dan origen a este tipo de micorrizas se caracterizan por formar simbiosis únicamente con plantas del orden Ericales y por presentar hifas intracelulares que nunca forman arbusculos. Se subdivide a estas micorrizas en Ericoides, Arbutoides y Monotropoides según la planta a la que colonicen. Las primeras se encuentran en la mayoría de las especies de las familias Ericaceae y Epacridaceae, en las que forman complejas estructuras en el interior de las células epidérmicas del hospedador. Las Arbutoides (que colonizan plantas de los géneros pertenecientes a la familia Ericaceae, tales como *Arbutus*, *Arctostaphylos* y *Pyrola*) y Monotropoides (que se desarrollan en especies del género *Monotropa*, también comprendido en la familia Ericaceae) se diferencian de las Ericoides por presentar manto y Red de Hartig, que en este caso no alteran la morfología radical (a diferencia de las micorrizas ectotróficas). Los hongos que forman micorrizas Ericáceas presentan baja especificidad y pertenecen tanto al Phylum Ascomycota como al Phylum Basidiomycota.
- c) *Orquidioides*: Este tipo de micorrizas se encuentran en las raíces de las especies de la familia más grande de las plantas vasculares: Orchidaceae. Los hongos que dan origen a esta simbiosis pertenecen al Phylum Basidiomycota y forman rulos en las células del hospedador, denominados “pelotones”. A diferencia del resto, estas micorrizas poseen una asociación particular con las células embrionales de las semillas de las plantas que colonizan, y son necesarias tanto para la germinación como para el desarrollo de las plántulas.

Las angiospermas corresponden al clado de plantas vasculares con mayor riqueza de especies y constituye el grupo dominante en la mayor parte de las comunidades vegetales del mundo. Mientras que el 85 % de las especies de angiospermas son micorrícicas, se ha determinado que casi la totalidad de las especies de gimnospermas estudiadas hasta el momento forman esta simbiosis (Wang & Qiu 2006).

En general, las plantas pertenecientes a un mismo género o inclusive a una misma familia presentan predominancia de un mismo tipo de micorrizas o son no-hospedadoras.

Algunas especies vegetales son micorrícicas obligadas, es decir que dependen del hongo para completar su ciclo de vida y por ello se las encuentra siempre asociadas a esta simbiosis. Existen especies que forman micorrizas pero no necesitan de ellas para completar su desarrollo, presentando entonces un comportamiento facultativo, es decir que se registran micorrizas en algunos individuos, pero no en otros (Wang & Qiu 2006, Smith & Read 2008). Existen distintas especies vegetales que pueden formar más de un tipo de micorrizas, ya sea en forma simultánea o en distintas etapas de crecimiento (Smith & Read 2008). En los estudios realizados por Moyersoen & Fitter (1999) y Wang & Qiu (2006) se citan diferentes casos de colonización mixta, tales como: MA+EcM en *Dryopteris filix-mas*, *Juniperus communis*, *Uapaca staudtii* y *Anthonotha fragans*; y ER+MA en *Vaccinium calycinum*, *V. dentatum* y *Styphelia tameiameia*. Entre los grupos de árboles de importancia económica o forestal también se han observado colonizaciones duales o mixtas en distintas especies (EcM + MA), como varias de las incluidas en los géneros *Pinus*, *Tsuga* y *Pseudotsuga* (Wang & Qiu 2006), *Salix* y *Populus* (Levisohn 1954), *Dicymbe* (McGuire *et al.* 2008) y *Quercus* (Dickiel *et al.* 2001). Un género de importancia forestal en el que frecuentemente se han descripto colonizaciones mixtas de MA y EcM es *Eucalyptus* (Lapeyrie & Chilvers 1985, Boudarga *et al.* 1990, Adjoud *et al.*, 1996, Adjoud-Sadadou & Halli-Hargas 2000). Lapeyrie & Chilvers (1985) sugirieron que este fenómeno es consecuencia de una sucesión micorrícica en la que las plántulas recién establecidas presentan MA pero a medida que crecen y se desarrollan estas micorrizas adquieren menor importancia y las EcM se vuelven dominantes.

Micorrizas en especies del género Nothofagus

De acuerdo a diferentes autores, los individuos adultos del género *Nothofagus* presentan una colonización del tipo ectomicorrícica, tanto en las especies de Argentina y Chile (Singer & Moser 1965, Singer 1971, Godoy *et al.* 1994, Godoy & Palfner 1997, Fontenla *et al.* 1998, Diehl 2006), como en las de Australia (Tedersoo *et al.* 2009) y Nueva Zelanda (Mejstrik 1971).

Los suelos de origen volcánico poco desarrollados (Andisoles) sobre los que se encuentran los bosques Andino-patagónicos, se caracterizan por una alta capacidad de estabilizar materia orgánica, almacenar agua y regular el pH. Su principal limitación es la alta retención de P, lo cual determina que este nutriente se encuentre poco disponible para las plantas, aunque los valores totales sean altos (Mazzarino & Gobbi 2005). En todos los individuos de distintas especies de *Nothofagus* estudiados hasta el momento en estos bosques (*N. dombeyi*, *N. pumilio*, *N. obliqua*, *N. nervosa*, *N. antarctica*), se han registrado valores de colonización ectomicorrícica elevados, generalmente superiores al 70 % (Singer 1971, Godoy

& Palfner 1997, Fontenla *et al.* 1998, Diehl 2006, Diehl *et al.* 2008), indicando una alta dependencia de estas especies por la simbiosis (Diehl 2006, Diehl *et al.* 2008). Este fenómeno junto al hecho de que las especies del género *Nothofagus* que se desarrollan sobre estos andisoles no presentan limitación por P, sugiere que las EcM promueven la absorción de este nutriente, constituyendo entonces una de las estrategias de adaptación al ambiente donde se desarrollan (Diehl *et al.* 2003, Diehl 2006, Diehl *et al.* 2008).

Son escasos los estudios que se han llevado a cabo para estudiar la diversidad de hongos ectomicorrícicos asociadas a diferentes especies de *Nothofagus*. En la Argentina, Nouhra *et al.* (2011) han descripto la ocurrencia de 28 especies fúngicas que desarrollan cuerpos fructíferos hipógeos y posibles formadores de EcM en *N. nervosa*, *N. obliqua* y *N. dombeyi*. Palfner (2001) cita 16 especies de hongos EcM asociados a *Nothofagus* de Chile. Un estudio amplio fue realizado por Terdersoo *et al.* (2009) en *N. cunninghamii* (Australia), quien halló 103 especies de hongos ectomicorrícicos presentes en las raíces de esta especie. En el Atlas de Ager (1987-2006), se incluyen cuatro ectomorfofotipos de EcM descriptos para plantas de este género: el formado por el hongo *Descolea antarctica* en *N. nervosa*, el desarrollado por las especies *Russula fuegiana* y *Thaxterogaster albocanus* en *N. pumilio*, y el morfotipo ectomicorrícico denominado “Nothofagirhiza vinicolor”, también hallado en *N. pumilio*. Además, Flores *et al.* (1997) describen la morfoanatomía de la EcM formada por el hongo *Cenococcum geophilum* en *N. alessandrii*.

Bidartiondo *et al.* (2002) mencionan la única cita correspondiente a la presencia de una especie del género *Glomus* (hongo formador de MA) en raíces de un individuo adulto de *N. dombeyi* hallado en la región Andino-patagónica. Este hecho plantea el interrogante de la posibilidad de encontrar ambos tipos de micorrizas (EcM+AM) en ejemplares del género *Nothofagus*. Este fenómeno no se ha observado en ejemplares de este género hasta el momento, pero sí en otras especies de plantas vasculares, como se mencionó anteriormente (Lapeyrie & Chilvers 1985, Boudarga *et al.* 1990, Adjoud *et al.*, 1996, Adjoud-Sadadou & Halli-Hargas 2000, Dickie *et al.* 2001, Wang & Qiu 2006).

Para *N. nervosa*, es escasa la información sobre la diversidad de EcM asociada a sus raíces en ambientes naturales, la colonización micorrícica en etapas tempranas de desarrollo y la influencia de la edad de los individuos sobre esta simbiosis. Asimismo, no se ha descripto el patrón de micorrización de los ejemplares cultivados en vivero durante los procesos de domesticación, ni se ha analizado el efecto posterior de esta simbiosis durante la etapa de implantación. Debido a que el establecimiento y posterior desarrollo de las plántulas depende en gran medida de la ocurrencia de EcM en sus raíces (Menkis *et al.* 2007), éste constituye

otro factor a tener en cuenta en los programas de domesticación por lo que resulta necesario su estudio.

Las levaduras

Otro de los grupos fúngicos presentes en el suelo son las levaduras y hongos dimórficos. Las primeras presentan un ciclo de vida predominantemente unicelular, se reproducen vegetativamente por gemación o fisión y forman estadios sexuales no incluidos en cuerpos fructíferos. Estos microorganismos presentan nutrición típicamente quimio-órgano-heterotrófica y pueden ser aerobios estrictos o semi-estrictos (Spencer & Spencer 1997, Kurtzman & Fell 1998, Yarrow 1998). Los hongos dimórficos poseen características comunes a levaduras y hongos filamentosos, ya que presentan ciclos de vida en los que alternan estadios unicelulares (fase levaduriforme) con filamentosos (es decir con la formación de hifas verdaderas o pseudohifas) (Spencer & Spencer 1997, Kurtzman & Fell 1998).

Las levaduras y hongos dimórficos se hallan en casi todo tipo de ambientes, desde frutos y materia orgánica en descomposición, hasta ambientes con condiciones extremas, tales como aquellos sujetos a elevadas temperaturas, alta exposición a la radiación UV o a estrés osmótico. Los hongos dimórficos están particularmente asociados a estos últimos (Sterflinger 2006), e incluso comprenden el grupo dominante de hongos de suelo en el área de mayor influencia del accidente de Chernobil (Zhdanova *et al.* 1994, 2007). Por otro lado, las levaduras y hongos dimórficos pueden ser causantes de enfermedades tanto en plantas como en animales, inclusive en el hombre. La distribución de estos hongos en el ambiente presenta patrones característicos que responden a la relación existente entre los sustratos que pueden colonizar y las capacidades metabólicas de cada especie (Lachance & Starmer 1998). Uno de los ambientes ampliamente colonizado por distintos tipos de levaduras y hongos dimórficos es el suelo, donde estos microorganismos se encuentran en menor proporción que las bacterias y hongos filamentosos (Martini 1992, Botha 2006). Si bien se ha registrado la existencia de levaduras y hongos dimórficos en suelos desnudos y con abundante vegetación, de variada estructura, composición química y pH, de diversas ubicaciones geográficas y diferentes condiciones climáticas (Martini 1992, Slavikova & Vadkertiova 2000, Maksimova & Chernov 2004, Frey 2007, Botha 2011, Mestre 2012, Yurkov *et al.* 2012), en general los estudios sobre ecología microbiana de suelos no contemplan la existencia de este grupo de hongos (Fitter & Garbaye 1994, de Azeredo *et al.* 1998, García-Romera *et al.* 1998, Fracchia *et al.* 2000, Botha 2006). Son escasos los trabajos sobre su rol

ecológico en ambientes naturales y sobre su relación con otros microorganismos (Vishniac 1995, Botha 2006).

Las plantas proporcionan un amplio rango de hábitats que pueden ser colonizados por levaduras y hongos dimórficos. Incluso en un mismo individuo vegetal existen diferentes microhábitats, generalmente asociados a alguno de los siguientes compartimientos: la endósfera, la rizósfera y la filósfera. La primera comprende el interior de la planta, rico en nutrientes y agua, pero donde el estrés osmótico es alto y la disponibilidad de oxígeno muy reducida. La filósfera corresponde a la superficie y parte interior de las estructuras aéreas de las plantas (Timms-Wilson *et al.* 2006, Whipps *et al.* 2008), mientras que la rizósfera se define como la fracción de suelo entorno a la raíz, en la cual la planta ejerce su influencia (Kowalchuk *et al.* 2010). Tanto la filósfera como la rizósfera serán descritas en mayor detalle en los Capítulos 2 y 5, respectivamente.

En la región Andino-patagónica, miembros del Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología del Centro Regional Universitario han realizado numerosos estudios sobre la diversidad de levaduras asociada a diversos hábitats y sustratos de ambientes naturales. Se ha descrito la ocurrencia de estos hongos en sistemas acuáticos (tales como lagos y lagunas, algunos de ellos de altura), en ambientes extremos (glaciares y ambientes ácidos) y en flores, frutos y hojas de distintas especies vegetales comprendidas en los bosques de *Nothofagus*. También se ha analizado la presencia de levaduras en cuerpos fructíferos de diferentes especies de *Cyttaria* (*C. darwinii*, *C. hariatii*, *C. hookeri*, *C. johowii*), hongos hemiparásitos del género *Nothofagus*, comúnmente llamados Llao-Llao o pan de indio (Brizzio & van Broock 1998, Libkind *et al.* 2003a, 2004, Russo *et al.* 2008, Ulloa *et al.* 2009, Moliné *et al.* 2011, Muñoz 2010, Brandao *et al.* 2011, de García 2007). Entre los hallazgos relacionados con el estudio de levaduras en estos ambientes nativos se destaca la elevada cantidad de especies nuevas no descritas hasta el momento, muchas de ellas pertenecientes a los géneros *Cryptococcus*, *Dioszegia*, *Mrakia*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces* y *Rhodotorula*.

Es escaso lo que se conoce sobre las levaduras asociadas a los suelos de esta región. Recientemente, Mestre (2012) ha abordado esta temática y ha estudiado la diversidad y fisiología de levaduras y hongos dimórficos presentes en distintas fracciones de suelo en bosques de *N. pumilio* y *N. antarctica*, hallando diferentes especies nuevas asociadas a este ambiente (Mestre *et al.* 2010, Mestre *et al.* 2011a,b). No se conocen hasta el momento las levaduras asociadas al suelo de bosques de *N. nervosa* ni a los sistemas radicales de esta especie forestal.

APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA POTENCIAL DE LAS MICORRIZAS Y LEVADURAS

Una de las principales razones para explorar la diversidad microbiana de diferentes hábitats es que los microorganismos presentes en ellos son capaces de sintetizar compuestos de relevancia para el ambiente y para la industria (enzimas, ácidos grasos, pigmentos y antibióticos). La diversidad microbiana es considerada entonces como una de las principales fuentes de innovación en biotecnología (Bull *et al.* 1992, Middelhoven 1997, Bhadra *et al.* 2008, Fell *et al.* 2000), y diversos hábitats han sido estudiados como fuentes de microorganismos biotecnológicamente importantes (Glickmann *et al.* 1998, Lindow & Brandl 2003, Whipps *et al.* 2008).

Debido a los efectos que las EcM generan en su hospedador, esta simbiosis presenta distintas aplicaciones biotecnológicas, entre las que destacan las siguientes: biocontrol de patógenos vegetales, biorremediación de ambientes degradados o contaminados e indicadores de estrés en diferentes ecosistemas. Asimismo, muchas de ellas son importantes en la industria alimenticia, ya que están formadas por hongos que desarrollan cuerpos fructíferos comestibles de gran valor en el mercado internacional. En este sentido, una estrategia ambiental sustentable y económicamente favorable es inocular especies forestales con EcM que posean cuerpos fructíferos comestibles. Algunos hongos ectomicorrícicos también producen metabolitos secundarios y moléculas quelantes de importancia biotecnológica (Rai & Varma 2011). En lo que respecta a actividades forestales sustentables, es cada vez más frecuente la aplicación de EcM durante la etapa de cultivo a fin de reducir la cantidad de fertilizantes y pesticidas químicos que se utilizan en viveros comerciales. Son numerosos los trabajos que afirman que esta simbiosis favorece el crecimiento de las plántulas. En ocasiones, estos cambios se notan mientras las plantas se encuentran en el vivero, pero frecuentemente resultan más evidentes cuando las mismas son llevadas a campo, donde deben resistir al estrés del trasplante y a las condiciones naturales del ambiente (Quoreshi 2003, Pera & Parladé 2005, Oliveira *et al.* 2010).

Con respecto a la aplicación biotecnológica de levaduras aisladas a partir de ambientes nativos de la región Andino-patagónica, se destacan aquellas relacionadas con la capacidad de estos hongos de producir enzimas extracelulares (de García 2011), pigmentos y otros compuestos fotoprotectores (Libkind *et al.* 2003b, Libkind *et al.* 2004b, Libkind & van Broock 2006, Moliné *et al.* 2009). Asimismo, en un trabajo reciente se ha demostrado que el genoma de la levadura *Saccharomyces pastorianus*, especie recientemente descrita y aislada hasta el momento únicamente de diferentes ambientes de Patagonia, forma parte del genoma híbrido de *S. bayanus*, que es la especie utilizada para la producción de cerveza rubia en la mayor parte del mundo (Libkind *et al.* 2011).

En base a lo anteriormente mencionado, se plantea la necesidad de estudiar las micorrizas y levaduras asociadas a especies vegetales de los bosques Andino-patagónicos. Estos estudios empíricos significarían un aporte al conocimiento de la diversidad y ecología de estos microorganismos en la región, existiendo la posibilidad de encontrar especies nuevas de posible aplicación biotecnológica. Algunas de ellas podrían resultar de importancia para los procesos de domesticación como biofertilizantes y/o biocontroladores de distintos patógenos vegetales, y su utilización tendería a la optimización de futuras prácticas de producción y aprovechamiento forestal.

OBJETIVO GENERAL

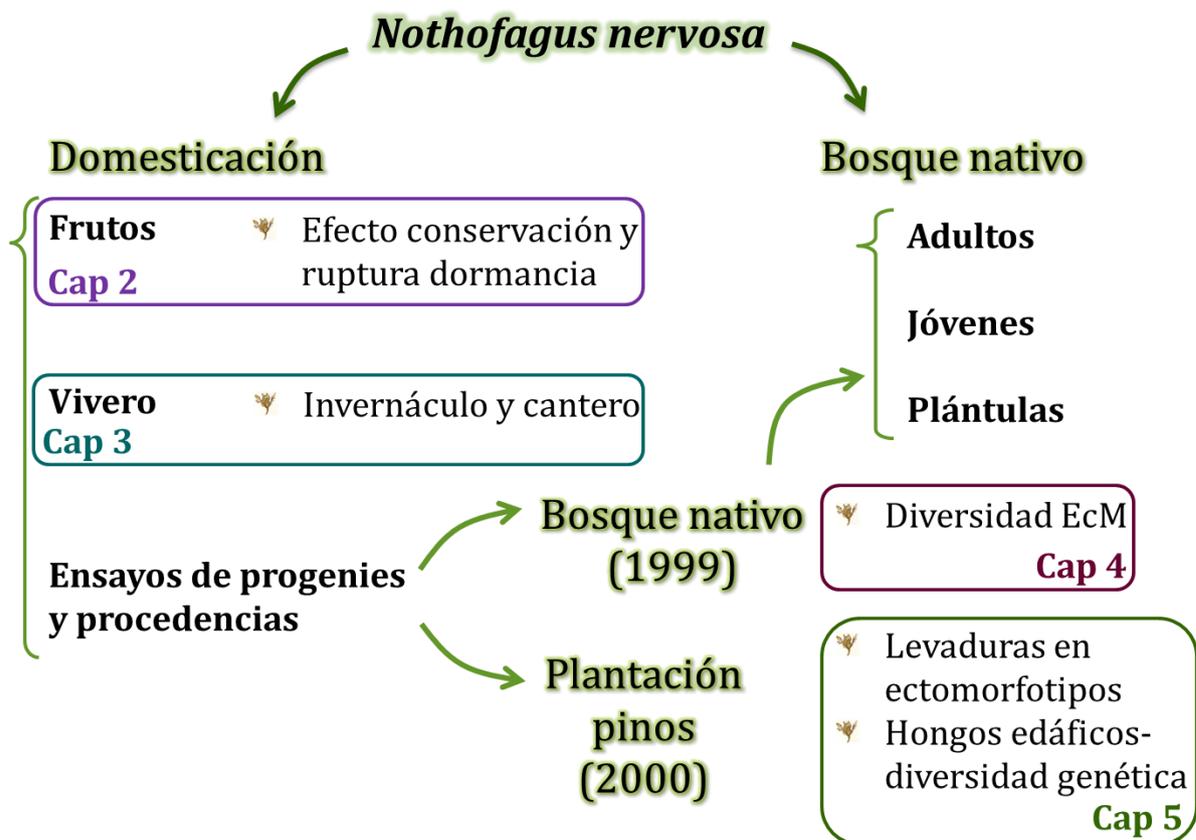
Analizar la diversidad y abundancia de micorrizas y levaduras asociadas a *Nothofagus nervosa* (Raulí) en condiciones naturales y en plantas cultivadas en vivero a fin de describir su comportamiento micorrízico y de obtener información relevante para los programas de domesticación de esta especie forestal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- A) Aislar e identificar levaduras asociadas a los frutos de *N. nervosa* que son utilizados en vivero para el cultivo de la especie.
- B) Analizar la ocurrencia de micorrizas en *N. nervosa* durante su fase de cultivo en vivero (desde la germinación hasta los 2 años de edad) e identificar los hongos formadores de EcM en los mismos.
- C) Describir el comportamiento micorrízico de *N. nervosa* e identificar los hongos ectomicorrízicos en individuos pertenecientes a bosque nativo y en plantas cultivadas en vivero y llevadas a campo bajo dos escenarios diferentes: bosque nativo y plantación de pinos.
- D) Analizar la influencia de diferentes categorías de edad (plántulas, individuos jóvenes y adultos) sobre la diversidad de micorrizas.
- E) Aislar e identificar levaduras asociadas a las EcM de individuos jóvenes de *N. nervosa* en las mismas condiciones que las descritas en el inciso C (ejemplares nativos y cultivados e implantados bajo bosque nativo y bajo pino).
- F) Evaluar si existen relaciones entre la diversidad genética de las poblaciones de *N. nervosa* y la composición microbiana de sus raíces.
- G) Analizar asociaciones entre el genotipo del árbol y las comunidades fúngicas asociadas al mismo.

El planteo de los objetivos particulares se corresponde con el orden de los Capítulos de este trabajo de Tesis. Los Capítulos fueron ordenados según la secuencia de acontecimientos que ocurren durante la domesticación de la especie y luego de su implantación en el campo y en relación a los ejemplares nativos. En este sentido, se presenta a continuación un esquema organizativo en el que se resumen las actividades llevadas a cabo en los distintos Capítulos incluidos en este trabajo de Tesis.

ESQUEMA DE TRABAJO



HIPÓTESIS

- A) En etapas tempranas del cultivo de *N. nervosa* en el vivero las plantas no se encuentran micorrizadas o bien presentan baja diversidad de ectomicorrizas.
- B) Los individuos cultivados en vivero presentan en sus raíces EcM diferentes a las asociadas al sistema radical de los ejemplares de *N. nervosa* llevados a campo.
- C) La composición de micorrizas asociadas a *N. nervosa* varía entre diferentes ambientes (bosque nativo y plantación de pinos), categorías de edad (plántulas, jóvenes y adultos) y estaciones (otoño y primavera).
- D) El suelo y las raíces asociadas a plantas de *N. nervosa* cultivadas a partir de semillas provenientes de poblaciones con elevada diversidad genética presentan una composición fúngica diferente a la de las poblaciones con menor diversidad genética.
- E) Las levaduras presentes en la superficie de los frutos de *N. nervosa* son diferentes a las asociadas a los ectomorfofitos de sus raíces.

ÁREA DE ESTUDIO

La distribución del Raulí en Argentina es fragmentada, limitándose a los valles de lagos de origen glaciar que corren en sentido Oeste-Este (Figura 1.5), con precipitaciones medias anuales que varían entre 1200 y 3000 mm (Informe de la Administración de Parques Nacionales). Actualmente cubre una estrecha franja de aproximadamente 120 km de largo y 40 km de ancho entre los 39° 21' y los 40° 35' de latitud Sur, ocupando un área estimada de 79.636 ha. La mayor parte de la distribución de esta especie (97 %) se encuentra comprendida en los Parques Nacionales Lanín y Nahuel Huapi (Sabatier *et al.* 2011).

El centro de mayor desarrollo de los bosques de Raulí en Argentina, tanto en términos de continuidad y densidad de área boscosa como en tamaño y vigor de sus árboles, se encuentra en la cuenca del Lago Lácar del Parque Nacional Lanín, donde el rango de precipitaciones medias anuales es de 1.800 a 2.800 mm (Sabatier *et al.* 2011). La región de Yuco se encuentra comprendida en este centro, y resulta de importancia porque está registrada en el INASE (Instituto Nacional de Semillas) como Área productora de semillas de *N. nervosa* (<http://www.inase.gov.ar>).

El INTA EEA Bariloche ha instalado ensayos de progenies y procedencias en distintos lugares del Norte de Patagonia. En estos ensayos se evalúan las características adaptativas y de crecimiento del Raulí (Gallo *et al.* 2000, Gallo *et al.* 2004), así como su supervivencia y su potencial productivo (Azpilicueta *et al.* 2010). Dado que esta especie requiere espacios relativamente abiertos para crecer, pero no tolera la exposición total, es necesario instalar dichos ensayos en sitios protegidos de la radiación solar para que las plántulas puedan desarrollarse apropiadamente. Para lograr esta protección, se han instalado los ensayos tanto bajo bosque nativo como bajo plantaciones de pino, de gran extensión en la zona. Algunos de estos ensayos se encuentran situados en el bosque nativo de la región de Yuco, mientras que otros se hallan bajo plantaciones de pinos en el área próxima de Meliquina (Figura 1.5). Los ensayos utilizados en este trabajo de Tesis para desarrollar los objetivos planteados corresponden a los instalados en el año 1999 en la Región de Yuco y en el año 2000 en la Estancia Santa Lucía, próxima al Lago Meliquina, donde existen plantaciones de *Pinus ponderosa* (Figura 1.5). La razón por la que se seleccionó este último sitio es que presenta la mayor proximidad al ensayo de progenies y procedencias de *N. nervosa* instalado en el bosque nativo de Yuco y seleccionado para llevar a cabo este trabajo.

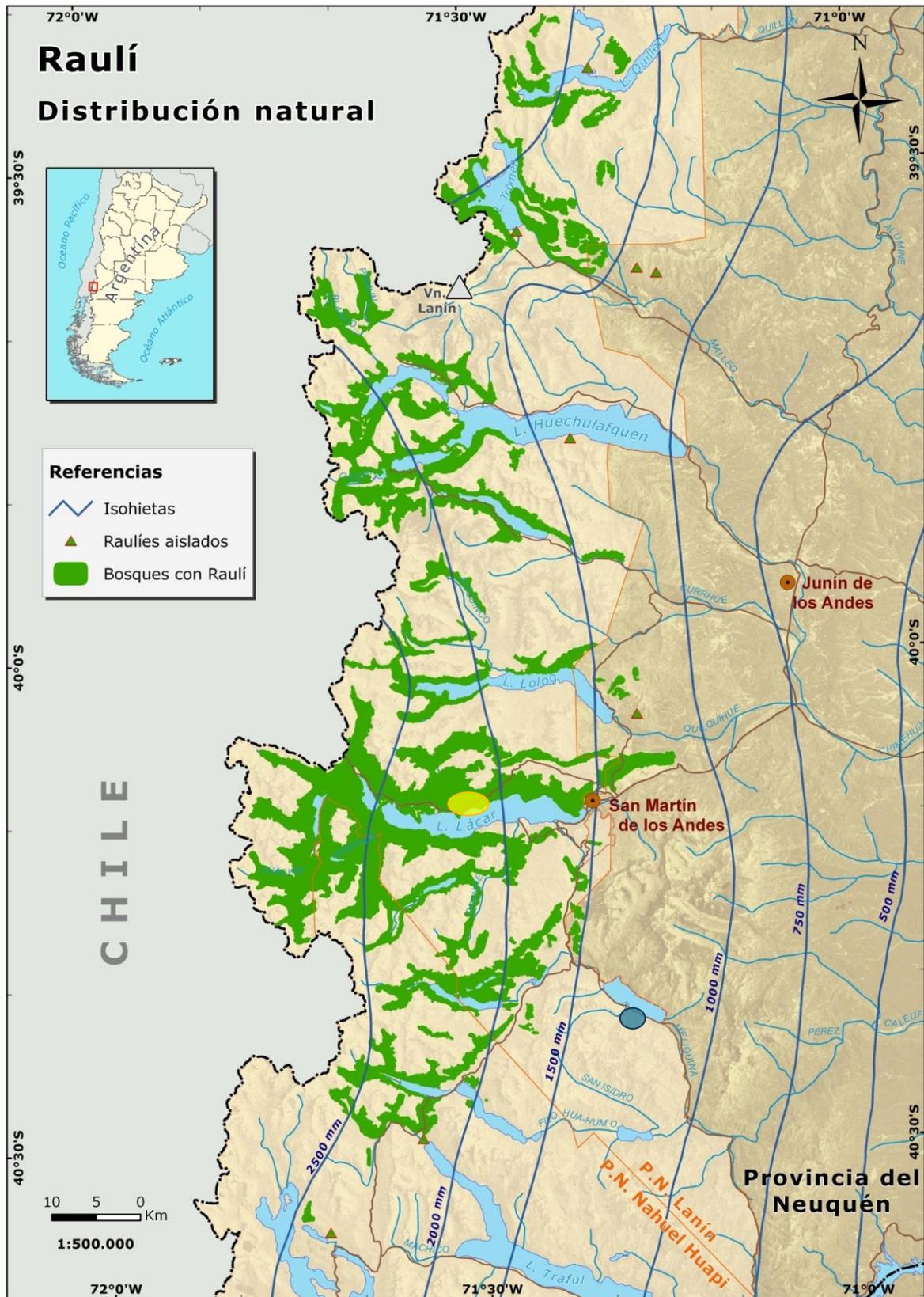
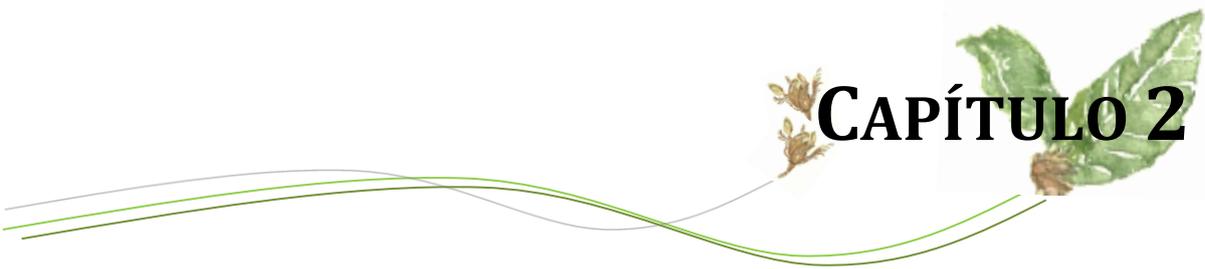


Figura 1.5.- Distribución natural del Raulí en Argentina (modificado Sabatier et al. 2011). Se señala en amarillo el sitio de muestreo situado en la región de Yuco y en azul el correspondiente a la plantación de pinos de Meliquina.



CAPÍTULO 2

LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS

ASOCIADOS A FRUTOS DE

NOTHOFAGUS NERVOSA

INTRODUCCIÓN

LA FILÓSFERA

El crecimiento de los microorganismos en la naturaleza depende del tipo y cantidad de recursos y de las condiciones ambientales en las que se desarrollen (Kowalchuk *et al.* 2010). En este sentido, las superficies de las plantas constituyen un hábitat de importancia para los microorganismos, brindando diferentes condiciones microclimáticas a comunidades microbianas también diversas (Andrews & Harris 2000, Kowalchuk *et al.* 2010). Entre las superficies vegetales a las que se encuentran asociados microorganismos, se encuentran las correspondientes a las estructuras aéreas. Éstas constituyen la filósfera, que se define como el ambiente asociado a las superficies y la parte interior de los órganos aéreos de las plantas, incluyendo flores, frutos, tallos, yemas y hojas (Timms-Wilson *et al.* 2006, Whipps *et al.* 2008). Uno de los aspectos más importantes de este ambiente es su gran extensión. Si tenemos en cuenta que existen alrededor de 200000 especies vegetales descritas en el planeta y que la superficie de sus hojas comprenden aproximadamente 10^9 km², la filósfera constituye la interfase biosfera-atmósfera más grande del planeta (Kowalchuk *et al.* 2010).

La filósfera es un ambiente heterogéneo y generalmente extremo debido al reducido acceso a nutrientes, a las marcadas fluctuaciones en la disponibilidad de agua, y a la exposición al viento, las precipitaciones y la radicación UV. Los microorganismos que habitan en la filósfera se consideran epífitos y poseen distintas estrategias que les permiten subsistir en ese ambiente (Andrews & Harris 2000, Lindow & Brandl 2003, Kowalchuk *et al.* 2010). Entre ellas se encuentra la habilidad de formar *biofilms*, que actúan como trampa de nutrientes, protegen a los microorganismos contra la desecación y los mantienen adheridos al sustrato. La pigmentación y los mecanismos de reparación del ADN son ejemplos típicos de tolerancia, ya que permiten a los microorganismos eludir el efecto dañino de la radiación UV (Kowalchuk *et al.* 2010).

Dado su elevado número y actividad metabólica diversa (obtienen energía a partir de diferentes fuentes de C, sintetizan diversas enzimas extracelulares, presentan distintas tasas de crecimiento), los microorganismos presentes en la filósfera no sólo influyen en la bioecología de las plantas sobre las que habitan, sino también sobre procesos globales importantes tales como los ciclos del C y del N (Andrews & Harris 2000, Lindow & Brandl 2003, Kowalchuk *et al.* 2010). Las interacciones microbianas que se dan en este ambiente influyen también sobre la aptitud de las poblaciones vegetales así como en la calidad y productividad de los cultivos agrícolas (Whipps *et al.* 2008), ya sea promoviendo el crecimiento vegetal (Glickmann *et al.* 1998, Brandl *et al.* 2001), incrementando la tolerancia

de las plantas a la desecación y/o participando en la defensa contra diferentes patógenos vegetales (Schena *et al.* 2002, Punja & Utkhede 2003, Kowalchuk *et al.* 2010).

Los habitantes más abundantes de la filósfera son las bacterias, que corresponden al grupo más estudiado. Las levaduras y hongos dimórficos son abundantes en este ambiente y constituyen el grupo fúngico dominante, mientras que los hongos filamentosos suelen ser transitorios y estar presentes principalmente en forma de esporas (Andrews & Harris 2000, Lindow & Brandl 2003, Whipps *et al.* 2008). Algunos estudios han descrito el papel potencial que las bacterias tendrían en la filósfera, tales como la síntesis y degradación de fitohormonas capaces de alterar la fisiología de la planta (ej. ácido-indol-acético o AIA) (Kowalchuk *et al.* 2010), y la protección contra heladas y patógenos vegetales (Lindow & Brandl 2003). La forma en que las levaduras y hongos dimórficos determinan o contribuyen a la salud y aptitud vegetal ha sido menos explorada. De acuerdo a Glushakova & Chernov (2007), los exudados vegetales son la fuente principal de nutrientes para las levaduras y hongos dimórficos epífitos, y por el consumo de los mismos estos organismos estimulan a su vez el metabolismo vegetal. Además, se ha demostrado que algunas levaduras y hongos dimórficos de la filósfera inhiben o limitan el crecimiento de ciertos patógenos, encontrándose entre ellas *Aureobasidium pullulans*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia anomala*, *P. guilliermondii* y *Sporobolomyces roseus*, las cuales han sido utilizadas como agentes de biocontrol y para controlar pérdidas postcosecha en varias especies vegetales de importancia comercial. Entre estas últimas se encuentran: cítricos (Droby *et al.* 1993), cereza, durazno, manzana, uva (McLaughlin *et al.* 1992, Janisiewicz *et al.* 1994, Chand-Goyal & Spotts 1996b, Pusey *et al.* 2009), frijoles y tomate (Elad *et al.* 1994, Elwakil *et al.* 2009), maíz (Fokkema *et al.* 1979) y pera (Chand-Goyal & Spotts 1996a). Algunas especies de levaduras y hongos dimórficos han sido también utilizadas para el control biológico de diferentes enfermedades asociadas a tallos, hojas y flores. Por ejemplo, Fokkema *et al.* (1979) hallaron que las levaduras presentes en las hojas de maíz presentan efecto antagonista contra los patógenos *Cochliobolus sativus* y *Septoria nodorum*. También ha sido demostrado que el hongo dimórfico *Tilletiopsis pallescens* reduce la infección del patógeno *Sphaerotheca fuliginea* en hojas de zapallo (Urquhart & Punja 1997) y que la levadura *Rhodotorula glutinis* es antagonista contra el patógeno *Botrytis cinerea* en plántulas de geranio (Buck 2004).

Como se mencionó anteriormente, la filósfera representa una fuente de microorganismos de importancia ecológica y biotecnológica, y por ello diversos programas de investigación se han basado en la caracterización de estos microorganismos epífitos. La mayor parte de éstos se han focalizado en las hojas, que constituyen las estructuras aéreas dominantes en términos de superficie (Andrews & Harris 2000, Lindow & Brandl 2003,

Sláviková *et al.* 2007, Pusey *et al.* 2009). La microbiología de yemas y flores también ha sido ampliamente estudiada, principalmente porque los microorganismos presentes en ellas pueden ser severamente afectados por diversos patógenos vegetales, teniendo entonces implicancias significativas sobre la producción (Andrews & Harris 2000, Pusey *et al.* 2009). Sin embargo, poco se conoce sobre las poblaciones microbianas asociadas a semillas y frutos no comerciales, a pesar de que estas estructuras también son susceptibles al deterioro causado por insectos y microorganismos (Marchelli & Gallo 1999, Hadanich *et al.* 2008).

Los frutos tipo aquenio de *N. nervosa* (Figura 2.1) forman parte de la filósfera de esta especie, por lo que es de esperar que posean una microflora asociada. Estos frutos, indehiscentes y con la semilla en su interior, son directamente utilizados para la siembra en vivero de esta especie forestal. Considerando que no se desinfectan en superficie antes de la siembra, es probable que la microflora presente en los mismos se encuentre luego en el sistema de cultivo, por lo menos en la etapa inicial de germinación y establecimiento de la plántula. Estos hechos resaltan la importancia de estudiar la diversidad de microorganismos presentes en los frutos indehiscentes de *N. nervosa* en el momento de la siembra, y plantean la necesidad de conocer si esos microorganismos pudieran resultar dañinos para los subsecuentes procesos de domesticación o ser antagonistas de patógenos y/o promotores del crecimiento vegetal.

DESCRIPCIÓN DE LOS FRUTOS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA*

Los frutos de *N. nervosa* son aquenios alados que se encuentran contenidos dentro de una cúpula formada por 4 valvas. Cada cúpula contiene 3 aquenios de 5-8 mm de largo, siendo los laterales trialados y el central bialado (Figura 2.1). La máxima diseminación de los frutos ocurre a finales del verano y principios del otoño, es decir durante Marzo y Abril. Los frutos caen de los árboles por acción combinada del viento y la gravedad (Donoso *et al.* 2006). Cada fruto contiene una única semilla, a la cual protege hasta su germinación porque éste no se abre al madurar (son indehiscentes)⁴.

Al igual que otras especies del género, *N. nervosa* posee una producción variable de frutos tanto entre años como entre procedencias. Este fenómeno de alternancia en la producción de un año respecto al siguiente se denomina vecería, y se halla muy marcado en esta especie. El porcentaje de frutos vanos o vacíos también es variable de año a año, pudiendo en algunos casos llegar a valores muy altos (Marchelli & Gallo 1999, Donoso *et al.* 2006), en ocasiones superiores al 90 % (Azpilicueta *et al.* 2010).

⁴ Este aspecto ha generado que frecuentemente estos frutos se denominen directamente “semilla” (Correa 1984, Donoso *et al.* 2006, Azpilicueta *et al.* 2010).

La producción irregular de semillas lleva implícita la necesidad de contar con un banco que provea el material necesario para la producción de plantines en aquellos años en los que la producción de semillas sea baja. Es aconsejable entonces realizar grandes cosechas los años de alta producción, que a su vez coinciden con los de alta viabilidad. Además, en estos años la diversidad genética también es significativamente mayor, ya que existe un número más elevado de individuos que actúan como progenitores (Marchelli & Gallo 1999). Poseer semillas de amplia diversidad genética asociada a distintos caracteres adaptativos, brindaría en el futuro una probabilidad mayor de contar con plantas que posean distintas capacidades de adaptación al medio, siendo esto fundamental bajo un escenario de cambio climático global (Donoso *et al.* 2006, Azpilicueta *et al.* 2010). Es importante mencionar que los frutos de *Nothofagus* pueden mantener su capacidad germinativa casi inalterada por 6-9 años, hecho que favorece la conservación de las semillas durante largos períodos de tiempo y que contribuye a compensar la vecería propia de estas plantas (Donoso *et al.* 2006, Azpilicueta *et al.* 2010). En el INTA EEA Bariloche, una vez colectados los frutos se conservan en bolsas de polietileno y en cámara de frío hasta su utilización. Surge entonces la necesidad de conocer la influencia de este proceso de conservación sobre los microorganismos asociados a los frutos que serán posteriormente utilizados en el cultivo de la especie.



Figura 2.1.- Morfología de los frutos de *Nothofagus nervosa*. **a)** Aspecto general, **b)** Detalle de frutos bialados (en el centro de la fotografía) y trialados (a los laterales de la misma).

OBJETIVO

Determinar la diversidad de levaduras y hongos dimórficos asociada a la superficie de los frutos de *N. nervosa* y evaluar cómo los procesos de conservación y ruptura de latencia fisiológica de la semilla, previos a la siembra, afectan estas comunidades microbianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

PROCESAMIENTO DE LOS FRUTOS

El manejo y procesamiento de los frutos abarcan aquellas actividades que se realizan desde que se colectan los mismos hasta su siembra (Martínez & Schinelli 2009), y se describen a continuación.

Los individuos a cosechar fueron elegidos de manera de incluir aquellos que presentaban aspecto deseable en términos de calidad forestal (ej. fuste recto, poca ramificación), evitando los árboles enfermos o mal formados (Martínez & Schinelli 2009, Azpilicueta *et al.* 2010). Los frutos utilizados en este trabajo fueron cosechados durante los meses de Marzo y Abril por medio de redes ubicadas a forma de “trampa” en el área de Yuco⁵, descrita en el Capítulo 1. Esta técnica consiste en colocar redes de aproximadamente 3 x 3 m (mallas multifilamento o mediasombra) bajo el dosel de los árboles previamente seleccionados y a una altura de 1,5 m del suelo (Gallo *et al.* 2000, Azpilicueta *et al.* 2010) (Figura 2.2). Se realizaron cosechas semanales, evitando de esta forma que los frutos se vuelen o se deterioren por acción de distintos agentes externos, tales como precipitaciones, aves, insectos, hongos y microorganismos patógenos (Martínez & Schinelli 2009, Azpilicueta *et al.* 2010).

Dado que en general los frutos llegaron húmedos al vivero, para secarlos se colocaron en bolsas de papel a temperatura ambiente por 3-5 días. Este proceso, además de eliminar la humedad exterior, contribuye a disminuir la humedad interior de la semilla, lo que es fundamental para prolongar su viabilidad en el tiempo. La limpieza de los frutos consistió en eliminar todas las impurezas acumuladas durante el proceso de recolección (hojas, fragmentos de ramas, frutos en mal estado, semillas de otras especies, insectos y tierra). Para ello, los frutos se pasaron por tamices de diferentes diámetros de malla, hasta el punto en que quedaron libres de impurezas. Una vez limpios se almacenaron en bolsas de polietileno y se conservaron en cámara en un ambiente seco, oscuro y a 4 °C (Martínez & Schinelli 2009).

Las semillas de Raulí, al igual que otras especies del género *Nothofagus*, presentan latencia fisiológica, por lo que requieren de un tratamiento pre-germinativo previo a la siembra. En este trabajo se rompió la dormancia colocando los frutos en bolsas permeables y sumergiendo las mismas en agua corriente fría durante 5 días. Transcurrido este tiempo se extrajeron los mismos y se secaron a temperatura ambiente. Este proceso es el que se sigue habitualmente en el vivero del INTA EEA Bariloche previo a la siembra.

⁵ Los frutos fueron colectados en el marco del proyecto “Domesticación de especies forestales nativas patagónicas” por el personal técnico del INTA EEA Bariloche.



Figura 2.2.- Redes se microfibra en el campo bajo diferentes individuos de *Nothofagus nervosa* actuando como trampa de frutos (Foto: Ing. Ftal. Leonardo Gallo, INTA EEA Bari loche).

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS

Para el aislamiento y posterior estudio de las levaduras asociadas a la superficie de los frutos de *N. nervosa*, se seleccionaron al azar 30 frutos del *pool* correspondiente a cada una de las siguientes categorías:

- a) Frescos (F):** Cosecha 2007, realizada 15 días antes de realizar el ensayo.
- b) Conservados (C):** Cosecha 2002, en la que los frutos fueron colectados y conservados a 4 °C durante 5 años.

Luego, 15 frutos de los previamente seleccionados para cada cosecha fueron elegidos al azar para someterlos al tratamiento pre-germinativo de lavado descrito anteriormente. El diseño de este ensayo se basó entonces en un total de 60 frutos, dos variables (conservación y lavado) y cuatro tratamientos (n = 15 para a cada uno de ellos): frutos frescos no lavados (FnL), frescos lavados (FL), conservados no lavados (CnL) y conservados lavados (CL).

Cada fruto fue colocado en un tubo plástico de 1,5 mL que contenía 1 mL de solución fisiológica (NaCl 0,9 % p/v) y 0,15 g de arena estéril. Los tubos se agitaron en *vortex* a máxima velocidad por 2 min y luego se centrifugaron por 30 s a 10000 g para precipitar los restos de arena y de frutos. Para cada una de las muestras se sembraron por agotamiento en superficie 100 µl de esta suspensión en placas de Petri con medio MYP

(Anexo II) adicionado con cloranfenicol 0,01 g % (antibiótico) (Yarrow 1998). Se incubaron las placas a 20 °C por 72 hs y luego a 4 °C por 48 hs, período durante el cual las colonias desarrollaron muchas de sus características morfológicas distintivas, principalmente color, textura y presencia de micelio. Tres colonias representativas de cada uno de los morfotipos de levaduras presentes en cada placa fueron repicadas en medio MYP hasta obtener cultivos puros. Todos los aislamientos fueron criopreservados a -80 °C en solución de glicerol 20 %.

Una vez puros, los aislamientos fueron agrupados según sus características macromorfológicas (color, forma de la colonia, textura, presencia de micelio o pseudomicelio) y su capacidad de producir pigmentos (carotenos o melanina) y micosporinas. La capacidad de producir pigmentos carotenoides y melaninas se evaluó visualmente y bajo luz blanca en todos los aislamientos luego de haber sido cultivados 3 días a 20 °C y 2 semanas a 4 °C. Se realizó una segunda evaluación a los 2 meses, en particular en aquellos casos que resultaran dudosos, tiempo en el que se produce una fuerte intensificación en los colores de las colonias (Muñoz 2010). La inducción, extracción y análisis de micosporinas se llevó a cabo en todos los aislamientos y de acuerdo a la técnica descrita por Moliné *et al.* (2011). Esta consistió en cultivar las cepas en placas de Petri con medio MMS (Anexo II) en forma de césped y en cámara (Semedic I-500PF) durante 4 días a 20 °C con fotoperíodo 12 hs luz visible/12 hs oscuridad. Luego, la biomasa obtenida se resuspendió en tubos plásticos de 1,5 mL conteniendo 1 mL de metanol 20 % v/v; éstos se homogenizaron en *vortex* y se incubaron durante 4 hs a 80 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 13000 g por 15 min (centrifuga Sigma 4K15). Para evaluar la presencia de micosporinas se midió la absorbancia del sobrenadante a 310 nm (espectrofotómetro Hewlett Packard P 8453-E) utilizando una cubeta de cuarzo. La existencia de un pico a esta longitud de onda evidencia la existencia de micosporinas en el extracto.

ANÁLISIS MOLECULARES Y FILOGENÉTICOS

Se realizaron extracciones de ADN genómico de todos los aislamientos. Para ello se sembraron las levaduras en medio MYP (Anexo II) y se incubaron por 72 hs a 20 °C. Se suspendió una ansada del cultivo en 100 µl de *buffer* de lisis (Anexo II) y se homogenizó en *vortex* durante 1 min. Los tubos fueron colocados a -80 °C durante 1 h y transferidos inmediatamente a un baño termostático a 100 °C durante 10 min (ruptura celular por *shock* térmico). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13000 g por 10 min y el sobrenadante conteniendo el ADN se transfirió a un tubo limpio (Fernández *et al.* 2012).

Para confirmar la homogeneidad de los grupos macromorfológicos formados anteriormente, se estudiaron las huellas moleculares (*fingerprinting*) de todos los

aislamientos de levaduras por medio de la técnica MSP-PCR, en la que se analizaron las regiones Mini/Microsatélites del ADN genómico. Este procedimiento fue llevado a cabo según Libkind *et al.* (2003) y utilizando el *primer* M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'). Se realizó la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa o *Polimerase Chain Reaction*) (Termociclador MultiGene, Labnet) en un volumen final de 25 μ L que contenía: 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,8 μ M primer, 1U Taq polimerasa (Invitrogen), 1X del *buffer* de reacción y 5 μ L de la dilución 1:100 μ L de ADN stock/agua MiliQ estéril (de García *et al.* 2007). Las condiciones de PCR fueron: un paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos de 45 s a 93 °C, 60 s a 55 °C y 60 s a 72 °C, y una extensión final durante 6 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1,5 % (p/v) durante 30-60 min dependiendo del tamaño del gel, teñidos con GelRed (Biotium) y observados en transiluminador con luz UV (DNR Minibis Pro).

Una vez confirmada la homogeneidad de los grupos formados por similitudes macromorfológicas y por los patrones de bandas obtenidos por MSP-PCR, 2-3 representantes de cada grupo fueron secuenciados. Para ello se amplificó la región D1/D2 con los *primers* NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L según las siguientes concentraciones: 0,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, 0,2 μ M de cada primer, 1U Taq polimerasa (Invitrogen), 1X *buffer* de reacción y 3,8 μ L de una dilución 1:100 1:100 μ L de ADN stock/agua MiliQ estéril. El programa utilizado para la amplificación de las muestras fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización de 95 °C por 2 min, 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 25 s a 54 °C y 20 s a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron purificados (Kit MoBio) y enviados a secuenciar con el primer NL4 a la Unidad de Genómica del INTA Castelar (Secuenciador ABI 3700) en Buenos Aires o a la empresa MACROGEN, Seúl, Corea. Las secuencias nucleotídicas fueron manualmente corregidas, alineadas y sujetas a análisis filogenéticos utilizando el programa MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software MEGA4 - Tamura *et al.* 2007), de acceso libre (<http://www.megasoftware.net>). Una vez corregidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank-NCBI para identificar el taxón al que correspondían (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

Se construyeron 2 árboles filogenéticos, uno correspondiente al Phylum Basidiomycota y el otro al Phylum Ascomycota, utilizando el algoritmo *Neighbor Joining* (NJ), valores de significancia estadística para 1000 repeticiones (*bootstrap*) y el modelo Kimura de 2 parámetros para estimar las distancias evolutivas ente las especies estudiadas (Kimura *et al.* 2004). En caso de contarse con varias secuencias de una misma especie, sólo 4 fueron

consideradas para construir el árbol, seleccionándose aquellas que a pesar de pertenecer a la misma especie, presentaran diferencias nucleotídicas entre ellas. Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron alineadas con los representantes más afines taxonómicamente de acuerdo a la información disponible en el NCBI y con las cepas tipo en caso de contarse con las mismas. Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en el NCBI y están actualmente disponibles para fines comparativos según los números de acceso HQ629551 a HQ629619 (Anexo III). La nomenclatura y clasificación de las especies identificadas corresponden a la citada en las bases de datos *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org) y *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). En este trabajo de Tesis se escribe el género de la especie completo la primera vez que se menciona y abreviado a partir de entonces. En caso de existir dos géneros que comiencen con la misma inicial se utilizará una segunda letra en la abreviación a fin de diferenciarlos correctamente (ej. *Coniozyma* = *C.* y *Cryptococcus* = *Cr.*).

ANÁLISIS DE COMUNIDADES

La diversidad beta se define como la variación de la composición de especies en el espacio y el tiempo (Anderson *et al.* 2006). Este análisis se utiliza para estudiar y comprender de qué manera los factores ambientales afectan la biodiversidad, siendo útil en el estudio de las comunidades microbianas (Green *et al.* 2004).

En este trabajo se seleccionó el índice de Jaccard modificado (J_{mod}) por Chao *et al.* (2005) para medir la diversidad beta de las comunidades microbianas en estudio. A diferencia del índice de Jaccard clásico, que se basa sólo en la presencia y ausencia de especies, esta modificación toma en cuenta la abundancia relativa de cada especie. Por esto último, resulta más apropiado para analizar la similitud entre muestras que contienen un elevado número de especies raras (Chao *et al.* 2005), como es el caso de este estudio. Este índice fue utilizado para evaluar si los procesos de conservación y lavado afectan las comunidades de levaduras y hongos dimórficos asociadas a los frutos de *N. nervosa*. Para tal fin se compararon: a) frutos frescos y conservados (F vs C), b) frutos frescos no lavados y lavados (FnL vs FL) y c) frutos conservados no lavados y lavados (CnL vs CL). Su fórmula de cálculo es la siguiente:

$$J_{mod} = \frac{U \times V}{(U + V - U \times V)}$$

Donde U es la abundancia relativa de las especies compartidas en la Comunidad 1 y V la abundancia relativa de las especies compartidas en la Comunidad 2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

A fin de analizar si las variables en estudio (conservación y lavado) eran independientes se utilizó una prueba de *Chi*-cuadrado. Para evaluar si estos tratamientos afectan significativamente la abundancia de levaduras en la superficie de los frutos se realizaron dos pruebas *t* de Student comparando: frescas vs conservadas (F-C) y no lavadas vs lavadas (nL-L).

RESULTADOS

DIVERSIDAD DE LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS EN SEMILLAS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA*⁶

A partir de los 60 frutos analizados se obtuvieron un total de 171 aislamientos correspondientes tanto a levaduras como a hongos dimórficos. El 94 % de los mismos fueron aislados de frutos frescos y el 6 % restante de los conservados (Tabla 2.1). Las levaduras como a hongos dimórficos estuvieron presentes en todos los frutos frescos y sólo en un 20 % de los conservados. El porcentaje de aislamientos correspondiente a frutos no lavados y lavados fue de 47 % y 53 %, respectivamente (Figura 2.3). Según el análisis de *Chi*-cuadrado realizado no existe asociación entre las variables conservación y lavado de semillas ($X^2 = 0,69$, $pc = 3,84$, $p < 0,05$). De acuerdo a los resultados de las pruebas *t* de Student, se puede afirmar que el proceso de conservación reduce significativamente el número de levaduras y hongos dimórficos presentes en los frutos ($p = 0,013$), mientras que el tratamiento de lavado no lo afectó significativamente ($p = 0,170$).

En base a los patrones de bandas de microsatélites obtenidos para los diferentes aislamientos de levaduras y hongos dimórficos, pudo confirmarse la homogeneidad de los grupos morfológicos conformados anteriormente. En la Figura 2.4 se muestra cómo los patrones de bandas correspondientes a la misma especie fueron sumamente similares entre sí pero difirieron de los pertenecientes a otras especies de levaduras y hongos dimórficos, permitiendo así seleccionar las muestras que fueron enviadas para su secuenciación (2 o 3 representantes de cada grupo).

Se hallaron un total de 17 especies de levaduras y hongos dimórficos, siendo 5 de ellas potenciales especies nuevas. La mayor parte de los aislamientos (78 %) y de las especies (61 %) pertenecieron al Phylum Ascomycota, y el resto de las mismas al Phylum Basidiomycota (Figura 2.5, Tabla 2.1). Todas las especies pertenecientes al Phylum Ascomycota son hongos dimórficos, de color oscuro (verdes, marrones, negros) debido al contenido de melanina y capaces de formar un micelio conspicuo. La mayor parte de las especies incluidas en el

⁶ Los resultados presentados en este Capítulo se hallan publicados y el artículo corresponde al de respaldo solicitado por la Comisión de Doctorado en Biología de la Universidad Nacional del Comahue necesario para presentar y defender la Tesis de Doctorado.

Phylum Basidiomycota no son pigmentadas ni producen micelio, a excepción de *Rhodotorula colostri*, una levadura cuyo elevado contenido de carotenos le brinda color rosado, y de *Trichosporon dulcitum* única especie de las identificadas dentro de este Phylum que desarrolló micelio. Se determinó que el 71 % del total de especies identificadas son capaces de sintetizar micosporinas, entre las que se encuentran las más abundantes (Tabla 2.1).

Tabla 2.1.- Taxa, número de aislamientos, presencia de micelio y capacidad de producir pigmentos y micosporinas de las cepas aisladas en cada tratamiento al que fueron sometidas las semillas de *Nothofagus nervosa*. **F** = Frutos Frescos; **C** = Conservados; **L** = Frutos lavados; **nL** = No lavados; **Total %** = Porcentaje de aislamientos por tratamiento y por especie respecto del número total de aislamientos obtenidos (171); **Mcl** = Micelio; **Pig** = Pigmentos; ^M = Melanina; ^C = Carotenos; **Mic** = Micosporinas.

Taxa de levaduras y Hongos dimórficos	F		C		Total (%)	Mcl	Pig	Mic
	nL	L	nL	L				
Ascomycota								
Chaetothyriales								
<i>Phaeomoniella zymoides</i>	1	-	-	-	1 (<1%)	+	+ ^M	+
<i>Phaeomoniella</i> sp.	1	-	-	-	1 (<1%)	+	+ ^M	+
Coniochaetales								
<i>Lecythophora mutabilis</i>	1	-	2	-	3 (2%)	+	+ ^M	-
Dothideales								
<i>Aureobasidium pullulans</i>	15	14	1	1	31 (18%)	+	+ ^M	+
<i>Coniozoma leucospermi</i>	-	1	-	-	1 (<1%)	+	+ ^M	+
<i>Dothichiza</i> sp. 1	26	21	-	-	47 (27%)	+	+ ^M	+
<i>Dothichiza</i> sp. 2	1	-	-	-	1 (<1%)	+	+ ^M	+
Taphrinales								
<i>Taphrina wiesneri</i>	-	1	-	-	1 (<1%)	+	+ ^M	+
<i>Incertae sedis</i>								
Hongo dimórfico ascomicético sp. 1	19	27	-	-	46 (27%)	+	+ ^M	+
Hongo dimórfico ascomicético sp. 2	-	-	-	1	1 (<1%)	+	+ ^M	-
Basidiomycota								
Filobasidiales								
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	-	2	-	-	2 (1%)	-	-	-
<i>Cryptococcus diffluens</i>	1	-	-	-	1 (<1%)	-	-	+
<i>Cryptococcus weringae</i>	1	-	-	-	1 (<1%)	-	-	+
Sporidiobolales								
<i>Rhodotorula colostri</i>	-	1	-	3	4 (2%)	-	+ ^C	-
<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	-	8	-	1	9 (5%)	-	-	-
Tremellales								
<i>Cryptococcus heveanensis</i>	11	8	-	1	20 (12%)	-	-	+
<i>Trichosporon dulcitum</i>	-	1	-	-	1 (<1%)	+	-	+
Aislamientos obtenidos por tratamiento	77	84	3	7				
	161		10		171			

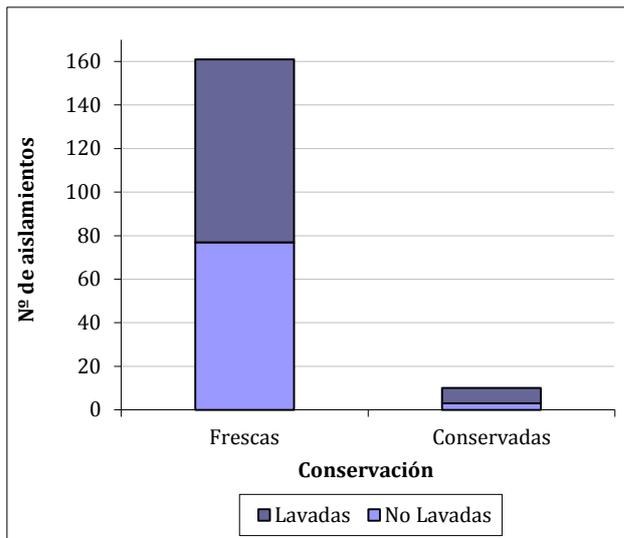


Figura 2.3.- Número de aislamientos de levaduras y hongos dimórficos obtenidos a partir de la superficie de los frutos de *Nothofagus nervosa* para cada tratamiento analizado en este ensayo (frescas y conservadas, lavadas y no lavadas).

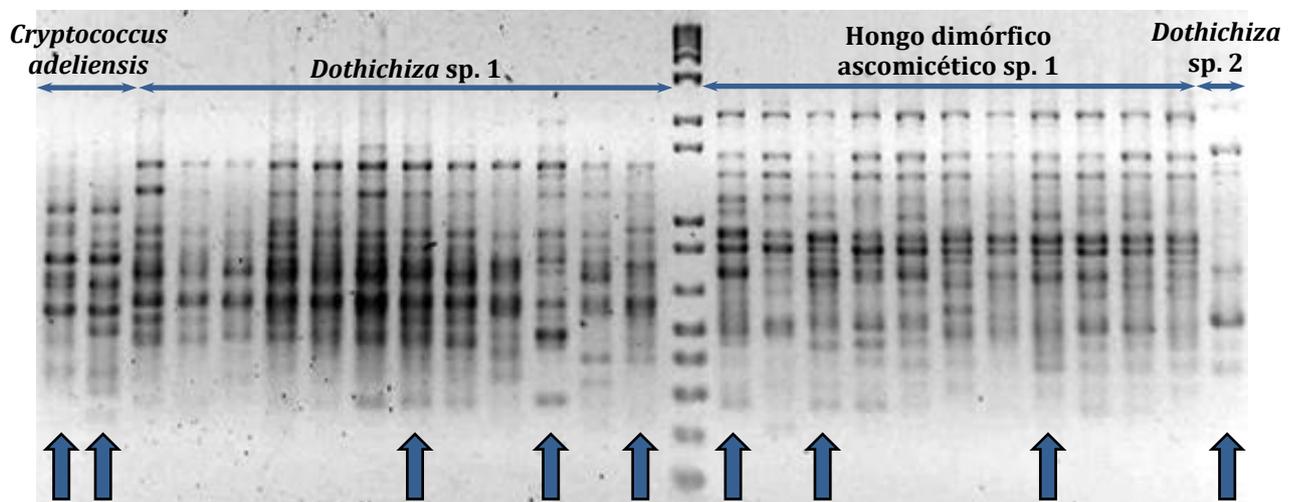


Figura 2.4.- Patrones de bandas de microsatélites obtenidos para algunas de las especies de levaduras y hongos dimórficos aisladas a partir de los frutos de *Nothofagus nervosa*. Se señalan con una flecha los patrones correspondientes a los aislamientos cuyo ADN fue secuenciado.

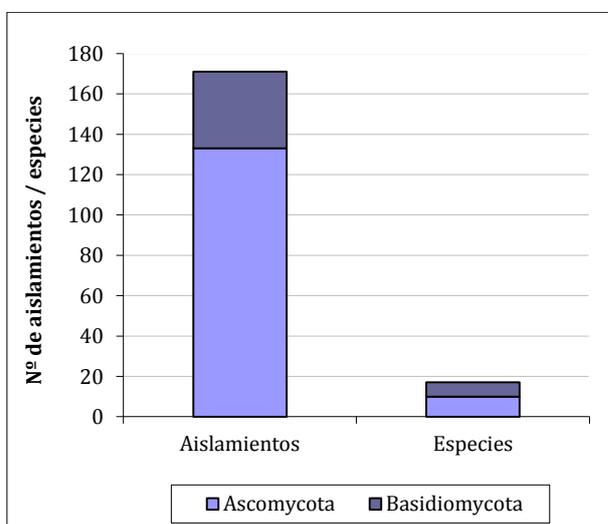


Figura 2.5.- Distribución de los aislamientos y de las especies de levaduras y hongos dimórficos obtenidos a partir de los frutos de *Nothofagus nervosa* respecto de los Phyla Basidiomycota y Ascomycota.

Las especies más abundantes sobre los frutos de *N. nervosa* fueron *Dothichiza* sp. 1, Hongo dimórfico ascomicético sp. 1, *A. pullulans* (Ascomycota) y *Cryptococcus heveanensis* (Basidiomycota), respectivamente (Tabla 2.1). En conjunto, estas 4 especies abarcaron el 84 % del total de aislamientos. *Aureobasidium pullulans* fue la única especie presente en todos los tratamientos, mientras que *Cr. heveanensis* fue hallado en tres de ellos. Ambas especies estuvieron asociadas mayormente a frutos frescos. Las especies nuevas *Dothichiza* sp. 1 y Hongo dimórfico ascomicético sp. 1 se obtuvieron sólo a partir de frutos frescos. Entre las especies menos abundantes, *Lecythophora mutabilis* se registró sólo en frutos no lavados, mientras que *R. colostri* y *R. fujisanensis* se recuperaron únicamente a partir de frutos lavados (Tabla 2.1). Las demás especies (59 % del total), se encontraron representadas por no más de 1 ó 2 aislamientos y en sólo uno de los tratamientos.

ANÁLISIS DE COMUNIDADES

Al comparar las comunidades de levaduras y hongos dimórficos asociadas a frutos frescos / conservados (F-C) y conservados no lavados / conservados lavados (CnL-CL), el índice de Jaccard modificado (J_{mod}) obtuvo valores bajos ($J_{mod} = 0,29$ y $J_{mod} = 0,11$ respectivamente), indicando que la composición de las comunidades fúngicas cambió significativamente luego del proceso de conservación en el primer caso y de lavado en el segundo. Por el contrario, este índice basado en la abundancia relativa de las especies indicó que las comunidades de levaduras y hongos dimórficos asociadas a los frutos frescos antes y después del procedimiento de lavado (FnL-FL) eran similares ($J_{mod} = 0,78$) (Tabla 2.2).

Tabla 2.2.- Análisis de comunidades de las levaduras y hongos dimórficos asociados a los frutos frescos y conservados con y sin ruptura de la dormancia. **F** = Frescos; **C** = Conservados; **nL** = No lavados; **L** = Lavados; **(nº)** = Indica el número de especies aisladas a partir de ese tratamiento.

ÍNDICES BETA	F (16) - C (6)	F	C
		nL(10) - L(10)	nL(2) - L(5)
Nº de especies compartidas	5	4	1
Nº de especies únicas	11 - 1	6 - 6	1 - 4
Frecuencia de especies compartidas	0,35 - 0,60	0,92 - 0,83	0,33 - 0,14
Índice de Jaccard modificado (J_{mod})	0,29	0,78	0,11

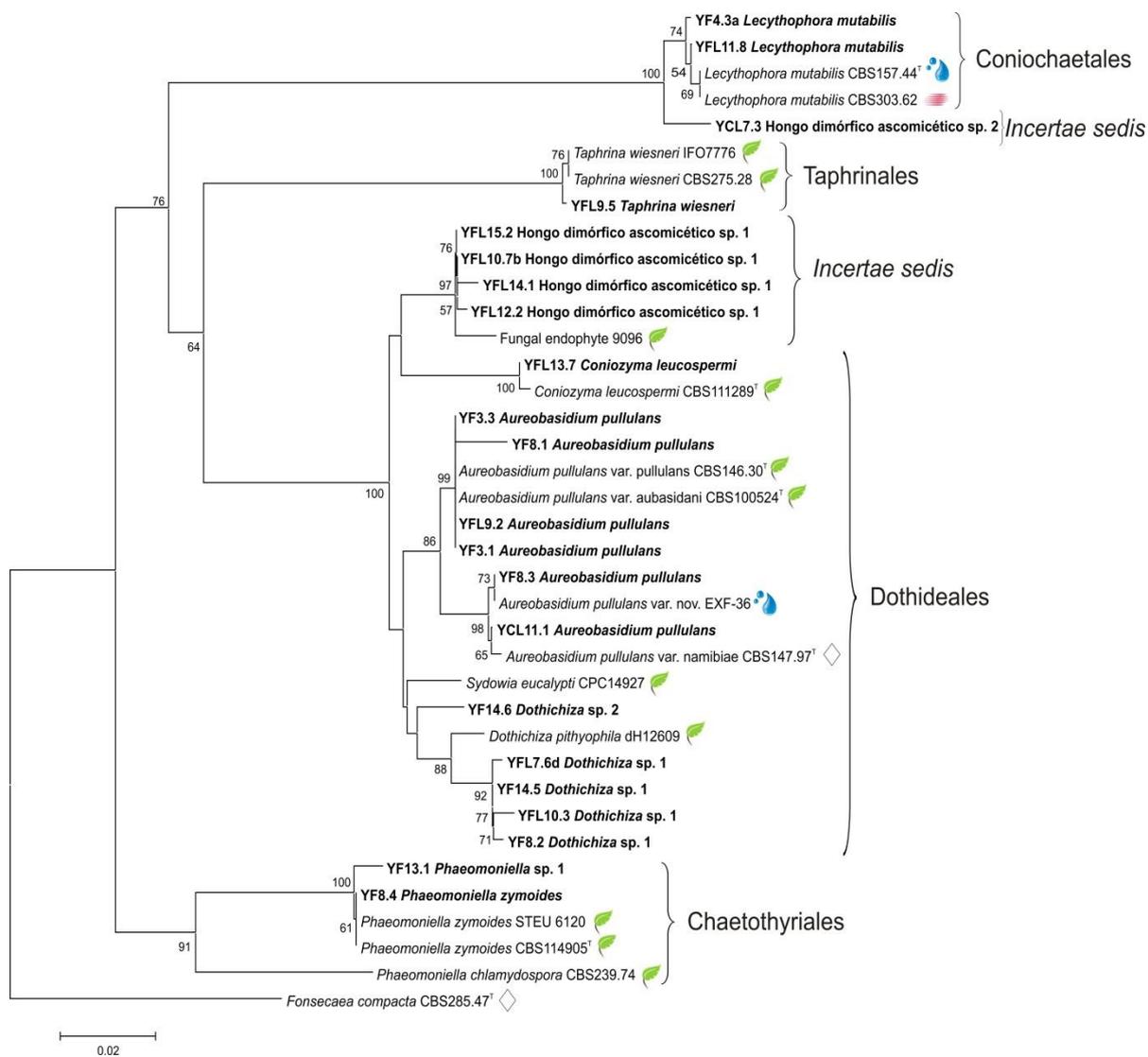
ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los árboles filogenéticos construidos presentaron diferentes clados, correspondientes a los órdenes en los que se encuentran incluidas las especies de levaduras y hongos dimórficos identificadas en este estudio (Figura 2.6). En estos árboles puede notarse que la

mayor parte de los representantes filogenéticamente más cercanos a los obtenidos en este trabajo fueron también aislados a partir de plantas o del suelo. En la Figura 2.6a se observa que la especie nueva denominada Hongo dimórfico ascomicético sp. 2 se incluye en el clado de *L. mutabilis*, pero posee 10 diferencias nucleotídicas con esta especie. Lo que ambas tienen en común es su incapacidad de producir micosporinas (Tabla 2.1). El Hongo dimórfico ascomicético sp. 1 presentó 8 diferencias con su representante más cercano (NCBI EF420013 Fungal Endophyte 9096), que a su vez corresponde a una especie no descrita hasta el momento. Las secuencias de *A. pullulans* se ubicaron en distintos subclados dentro de la misma rama del árbol, sugiriendo que entre los aislamientos obtenidos existen diferentes variedades de esta especie (Figura 2.5a). *Dothichiza* sp. 1 y *Dothichiza* sp. 2 presentaron 13 y 17 diferencias nucleotídicas respectivamente con la especie más próxima, que es *D. pithyophila*, y 21 diferencias entre sí. Por otro lado, se observa que *Phaeomoniella* sp. 1 se encuentra filogenéticamente separada de *P. zymoides*. En este último caso no se registraron diferencias nucleotídicas entre las secuencias correspondientes a cada especie, pero se observaron 14 *gaps* entre las mismas.

En el árbol filogenético correspondiente al Phylum Basidiomycota (Figura 2.6b) se observa que *Cr. heveanensis* se encuentra más relacionado filogenéticamente con *T. dulcitum* (Tremellales), que con el resto de las especies de *Cryptococcus* aisladas (Filobasidiales). Mientras que las 2 especies basidiomicéticas comprendidas en el Orden Tremellales fueron capaces de sintetizar micosporinas, entre las especies de *Cryptococcus* incluidas en el orden Filobasidiales 2 poseían esta característica (*Cr. adeliensis* y *Cr. weringae*) y una no (*Cr. adeliensis*). Por su parte, *R. colostri* y *R. fujisanensis* se encuentran incluidas en el mismo clado, siendo ambas incapaces de producir micosporinas (Tabla 2.1).

a



b

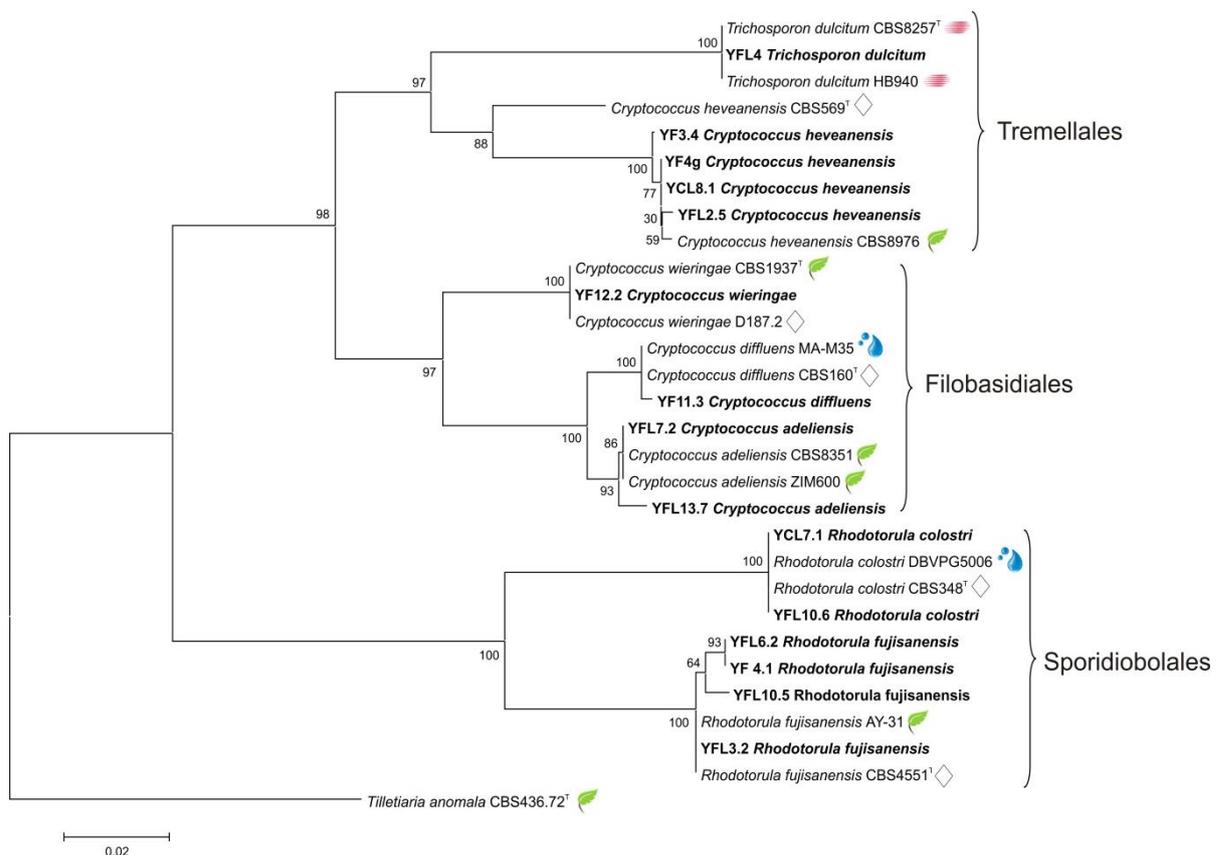


Figura 2.6.- Árboles filogenéticos construidos en base al algoritmo Neighbor Joining y al modelo Kimura de 2 parámetros para estimar las distancias evolutivas entre las secuencias del dominio D1/D2. Los números sobre las ramas corresponden a la frecuencia con la que la rama se ubicó de esa forma en 1000 repeticiones (*bootstrap*), los valores inferiores al 50 % no se muestran. Secuencias correspondientes a las especies *Fonsecaea compacta* y *Tilletiaria anomala* fueron utilizadas como raíz (*outgroup*) en el árbol perteneciente al Phylum **a)** Ascomycota y **b)** Basidiomycota, respectivamente. Los símbolos asociados a las secuencias indican el sustrato a partir del cual éstos fueron aislados. Las secuencias obtenidas en este trabajo se señalan en negrita y los detalles correspondientes a todas las cepas se encuentran en el Anexo III. *Referencias:* Cepas obtenidas a partir de **YF** = Frutos frescos sin lavar; **YFL** = Frutos frescos lavados; **YCL** = Frutos conservados lavados; 🌿 : Plantas; 🌳 = Suelo; 💧 = Ambientes acuáticos; ◇ = Otros sustratos; T = Cepa tipo.

DISCUSIÓN

DIVERSIDAD DE LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS

Existen distintos estudios en los que se ha descrito la diversidad de levaduras y hongos dimórficos asociados a la filósfera, y los resultados de los mismos difieren en cuanto a la existencia de dominancia de Ascomycetes o Basidiomycetes. Por ejemplo, algunos autores han observado que las levaduras pertenecientes a estos Phyla se encuentran en frecuencias

similares tanto sobre las hojas (Sláviková *et al.* 2007) como sobre la corteza (Bhadra *et al.* 2008) de diferentes especies vegetales. Por otro lado, Fonseca & Inácio (2006) han sugerido que una de las tendencias más significativas que surge del análisis comparativo de numerosos trabajos que describen las levaduras presentes en la filósfera de distintas especies, es la clara dominancia de los basidiomicetes. Por el contrario, Bhadra *et al.* (2008) y Middelhoven (1997), hallaron una marcada predominancia de ascomicetes sobre la corteza de diferentes árboles en un bosque de la India y en la filósfera de 24 especies vegetales que se desarrollan en el clima árido de las Islas Canarias de España (donde la precipitación anual es ~130 mm). Los resultados de este trabajo acuerdan con estos últimos estudios, ya que también se registró una clara dominancia de hongos ascomicéticos sobre los frutos de *N. nervosa*, tanto a nivel de aislamientos (78 %) como de especies (61 %). Cabe aclarar que estos frutos no son carnosos, ni poseen estomas ni estructuras que retengan agua (pelos o glándulas), por lo que presentan un porcentaje de humedad menor al de otros órganos de la planta. Algunos autores han descrito que los hongos del Phylum Ascomycota son más resistentes a distintas condiciones de estrés que los del Phylum Basidiomycota (Baar *et al.* 1999, Gorbushina & Broughton 2009). En este sentido, Middelhoven (1997) y Bhadra *et al.* (2008) han sugerido que los hongos ascomicéticos se encuentran mejor adaptados a la baja disponibilidad de agua y a la desecación que los basidiomicéticos. En conjunto, esta información explicaría la dominancia de los hongos pertenecientes al Phylum Ascomycota sobre los frutos de *N. nervosa*.

Como se observa en la Figura 2.6, la mayor parte de las levaduras y hongos dimórficos taxonómicamente más cercanos a los analizados en este trabajo también han sido hallados asociados a distintas plantas, mientras que *Lecytophora mutabilis* y *T. dulcitum* han sido aisladas a partir de suelo (Weber *et al.* 2002, Glushakova & Chernov 2004, Muñoz 2010, Anexo III). De acuerdo a Andrews & Harris (2000), es frecuente hallar en la filósfera levaduras que habitan más generalmente en el suelo o en la rizósfera de las plantas, ya que pueden acceder a ésta por acción del viento o de diferentes vectores, tales como pequeños mamíferos, aves e insectos. A su vez, estos resultados acuerdan con los citados por Bhadra *et al.* (2008), quienes aislaron 239 cepas de levaduras y hongos dimórficos a partir de la corteza de distintas especies arbóreas en India, y observaron que la mayoría de las mismas presentaban como taxones filogenéticamente afines otros hongos asociados a plantas y su entorno (frutos, extractos vegetales, jugos de frutas). En base a esta información puede sugerirse que la mayor parte de las cepas aisladas a partir de los frutos de *N. nervosa* corresponden a especies asociadas a éstos y su entorno, y no a contaminantes ambientales consecuencia de la manipulación de los mismos.

Algunas de las especies aisladas a partir de los frutos de *N. nervosa* han sido citadas previamente en otros ambientes de Patagonia. Entre ellas, el hongo dimórfico *A. pullulans* ha sido hallado en el filoplano de *N. pumilio* en la región del Cerro Otto, en las proximidades de la ciudad de San Carlos de Bariloche (Muñoz 2010). Esta especie ha sido descrita como ubicua en la superficie de las plantas (Fonseca & Inácio 2006, Janisiewicz *et al.* 2010). *Rhodotorula colostri*, *R. fujisanensis* y *T. dulciturum* han sido encontradas en el suelo de distintos bosques de *N. pumilio* y *N. antarctica* (Mestre *et al.* 2011). Asimismo, *R. colostri* y *Cr. adeliensis* han sido registradas en ambientes acuáticos de origen glacial en la región del Cerro Tronador, Parque Nacional Nahuel Huapi (de García *et al.* 2007).

Entre las 16 especies halladas sobre frutos frescos de *N. nervosa*, 4 fueron claramente dominantes a nivel de comunidad, abarcando el 84 % del total de aislamientos. Éstas fueron: *Dothichiza* sp. 1, Hongo dimórfico ascomicético sp. 1, *A. pullulans* y *Cr. heveanensis*. Las especies *R. fujisanensis* y *Cr. adeliensis* estuvieron representadas por 8 y 2 aislamientos respectivamente, mientras que se halló sólo un representante para las 9 especies restantes (*Dothichiza* sp. 2, *C. leucospermi*, *Cr. diffluens*, *Cr. weringae*, Hongo dimórfico ascomicético sp. 2, *Phaeomoniella* sp., *P. zymoides*, *T. wiesneri*, *Tr. dulciturum*). Por lo tanto, estas últimas pueden considerarse especies raras sobre los frutos de *N. nervosa*. Estos resultados acuerdan con otros estudios en los que se ha determinado que las comunidades microbianas filosféricas están generalmente dominadas por un escaso número de especies (Lindow & Brandl 2003, Glushakova & Chernov 2004, Fonseca & Inácio 2006, Bhadra *et al.* 2008, Whipps *et al.* 2008, Janisiewicz *et al.* 2010). Resulta difícil realizar este análisis entre las levaduras y hongos dimórficos hallados en frutos conservados dado que el número de aislamientos obtenidos a partir de los mismos fue reducido. Distintos autores afirman que la importancia de las especies raras radica en que aportan significativamente no sólo a la riqueza total de la filósfera, sino también a la diversidad general del ambiente donde la planta se encuentre (bosque, estepa, plantación, cultivo). Por ello, es necesario tener en cuenta esta información al momento de plantear estrategias de manejo y conservación de ecosistemas naturales cuyo fin sea evitar la pérdida de la diversidad asociada a los mismos (Lindow & Brandl 2003, Glushakova & Chernov 2004, Fonseca & Inácio 2006, Bhadra *et al.* 2008, Whipps *et al.* 2008, Janisiewicz *et al.* 2010). En conjunto, esta información sugiere que las diferentes especies vegetales poseen microorganismos especialmente adaptados a vivir en ellas, y sería de esperar que muchos de ellos posean capacidades metabólicas particulares de potencial aplicación biotecnológica, tales como la síntesis de fitohormonas y/o compuestos antimicrobianos, degradación de compuestos complejos (Kowalchuk *et al.* 2010) y llevar a cabo procesos fermentativos a bajas temperaturas (ej. Libkind *et al.* 2011).

EFFECTOS DE LA CONSERVACIÓN Y EL LAVADO SOBRE LA DIVERSIDAD FÚNGICA

Una vez que los microorganismos llegan a la filósfera, existen diferentes factores que determinarán que éstos puedan colonizar y subsistir en este ambiente, principalmente las características del sustrato y las condiciones ambientales (Whipps *et al.* 2008). Por ejemplo, el crecimiento de los microorganismos en la filósfera depende tanto de los nutrientes provistos por la planta como de aquellos aportados por fuentes externas (polen, nutrientes arrastrados por el viento o el agua, depósitos orgánicos de otros seres vivos) (Glushakova & Chernov 2007, Whipps *et al.* 2008). Si por algún motivo se redujera el aporte de nutrientes (cambios en las condiciones climáticas, cese de la floración o fructificación, etc.) y éstos fueran insuficientes para sostener las comunidades microbianas, la mayor parte de los microorganismos serían incapaces de subsistir por largos períodos de tiempo. La temperatura es otro de los factores fundamentales que regulan la diversidad y dinámica de las comunidades microbianas (Deak 2006). Se ha observado que la diversidad fúngica de la filósfera decrece durante el invierno, alcanzando su mínimo durante esta misma estación o al comienzo de la primavera, probablemente como consecuencia de la falta de tolerancia a las bajas temperaturas y la desecación, y/o a la disminución del aporte de nutrientes que ocurre durante esta estación (como consecuencia de la caída del follaje de ciertas especies, de la reducida cantidad de plantas que son capaces de florecer y fructificar en esta estación del año, de la disminución en la actividad biológica de numerosas especies de insectos y aves) (Buck *et al.* 1998, Glushakova & Chernov 2007). Durante el proceso de conservación de los frutos de Raulí, éstos son expuestos a bajas temperaturas por largos períodos de tiempo. Mientras se hallan en la cámara de frío, no existen aportes externos de agua, nutrientes o inóculo. Bajo estas condiciones, es posible que existan déficits de nutrientes y agua que influyan directamente sobre la abundancia y composición de las comunidades microbianas, tal como se observó en este estudio, en el que se demostró que los frutos conservados durante 5 años a 4 °C poseen menor cantidad y diversidad de levaduras y hongos dimórficos que los frescos (Tabla 1 y 2).

Dado que en la filósfera la disponibilidad de agua es temporal (asociada principalmente a lluvia, niebla o rocío), ésta constituye uno de los principales factores que influyen de forma significativa sobre las comunidades microbianas (Deak 2006). Por ejemplo, se ha descrito que cuando las frondes del helecho *Polypodium polypodioides* se exponen a la lluvia tras un período de desecación, las comunidades microbianas asociadas a las mismas presentan cambios tanto a nivel estructural como funcional (Jackson *et al.* 2006). De forma similar, en este estudio se observó que el tratamiento pre-germinativo de lavado (ruptura de dormancia) tendió a cambiar la composición de levaduras y hongos dimórficos presentes

sobre los frutos de Raulí. Entre los frutos frescos, se aislaron 10 especies de los frutos no lavados y 10 de los lavados, de las cuales sólo 4 fueron comunes a ambos tratamientos. A partir de los frutos conservados se obtuvieron sólo 2 especies de los no lavados y 5 después del lavado, habiendo sólo una en común (Tabla 1 y 2). En base al índice de Jaccard modificado, puede decirse que las comunidades microbianas asociadas a frutos frescos y conservados fueron significativamente distintas entre sí ($J_{mod} = 0,29$). La composición de especies también resultó diferente entre los frutos conservados no lavados y lavados ($J_{mod} = 0,11$), aunque debido a la baja cantidad de aislamientos obtenidos en estos tratamientos sería necesario realizar estudios posteriores para confirmar esta tendencia. A pesar de la distinta composición de especies observada para los frutos frescos lavados y no lavados (sólo 4 especies en común de las 10 descritas para cada tratamiento), el índice de Jaccard modificado indicó que las comunidades microbianas presentes sobre los mismos son similares ($J_{mod} = 0,78$). Esto se debe a que las especies más abundantes son las mismas para ambos tratamientos (*A. pullulans*, *Dothichiza* sp. 1, Hongo dimórfico ascomicético sp. 1 y *Cr. heveanensis*) (Tabla 1 y 2).

Una de las posibles explicaciones para el cambio en la composición de las comunidades microbianas luego del tratamiento de lavado, es que aquellas especies adaptadas a elevadas condiciones de humedad o bien aquellas que necesitan gran disponibilidad de agua pueden desarrollarse y persistir en la superficie de los frutos sujetos a este procedimiento (ej. *R. colostri* y *R. fujisanensis*, que fueron aisladas de frutos frescos y conservados luego de haber sido lavados), mientras que las levaduras y hongos dimórficos no tolerantes a estas condiciones son incapaces de subsistir (ej. *L. mutabilis*, hallada en ambos tipos de frutos antes del proceso de lavado y no después del mismo). Haber encontrado algunos de estos hongos luego del lavado y no previamente a éste, plantea la posibilidad de que este procedimiento remueva algunas especies competitivas, permitiendo a otras desarrollarse. Estos resultados sugieren que el proceso de lavado que se utiliza para romper la latencia fisiológica de la semilla altera la composición de las comunidades microbianas asociadas a los frutos, pero no la estructura general de las mismas, ya que las especies más abundantes tienden a permanecer en el sustrato y en proporciones similares.

Concluyendo, los resultados obtenidos en este estudio permiten afirmar que los distintos procesos a los que son sometidos los frutos antes de su siembra (conservación a 4 °C y el tratamiento de lavado necesario para romper la dormancia de las semillas), alteran las comunidades de levaduras y hongos dimórficos asociados a ellos. Esta información resulta de importancia para los procesos de domesticación y para plantear futuras estrategias de manejo de las plántulas a cultivar. Por ejemplo, si la microbiota asociada al fruto resultara

beneficiosa para la germinación o posterior desarrollo de las plántulas, sería conveniente no conservar los frutos a bajas temperaturas por largos períodos de tiempo, o realizar re-inoculaciones con los mismos en caso de no poder evitarse este paso.

ADAPTACIONES DE LAS LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS A LA FILÓSFERA

Los microorganismos que habitan en la filósfera presentan diferentes características estructurales o funcionales que les permiten desarrollarse en este ambiente. Entre estos atributos se encuentran: una elevada tasa de crecimiento, la habilidad de competir por nutrientes y de tolerar no sólo períodos de sequía, sino también cambios significativos en la temperatura, en las condiciones osmóticas y en la exposición a radiación UV. Entre las características adaptativas que poseen las levaduras epífitas se destacan la capacidad de adherirse al sustrato (por formación de micelio o cápsulas) y de presentar pigmentos (carotenos, melaninas) (Andrews & Harris 2000, Lindow & Brandl 2003, Kowalchuk *et al.* 2010). En este estudio, la mayor parte de las especies halladas en los frutos de *N. nervosa*, excepto las incluidas en los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula*, presentaron un micelio conspicuo, por lo que esta estructura representaría una estrategia de adherencia ampliamente distribuida en la comunidad de hongos asociada a este ambiente. Si bien los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula* carecen de micelio, las especies comprendidas en los mismos suelen formar cápsulas, que también juegan un rol de adhesión importante (Golubev 1991, Glushakova & Chernov 2004, Fonseca & Inácio 2006). Además, distintos trabajos han establecido que esta estructura incrementa la aptitud de los microorganismos y la supervivencia a distintas condiciones de estrés, entre ellas la desecación (Golubev 1991, Bhadra *et al.* 2008). Por lo tanto, las especies analizadas en este trabajo presentan al menos una de estas 2 estrategias de adhesión posibles (micelio y/o cápsulas) que les permiten subsistir en este ambiente y permanecer adheridas al sustrato aún después del tratamiento de lavado.

Otra característica de los microorganismos que habitan en la filósfera es su capacidad de resistir a elevados niveles de radiación UV, principalmente debido a 2 mecanismos: pigmentación y/o reparación del ADN (Kowalchuk *et al.* 2010). Debido a que la mayoría de las levaduras son susceptibles a la radiación UV, las especies pigmentadas suelen ser las más abundantes sobre las superficies vegetales por tener mayor resistencia a ésta, perteneciendo la mayor parte de estas especies a los géneros *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* (Fonseca & Inácio 2006). Las levaduras pertenecientes a estos géneros poseen pigmentos carotenoides, que les brindan color rojo, naranja o rosa, y que las protegen de forma indirecta contra la radiación UV uniéndose químicamente al oxígeno reactivo generado por la radiación (Young

1991). Si bien el 65 % de las especies analizadas en este trabajo son pigmentadas, sólo *Rhodotorula colostri* (de color rosa) pertenece a este grupo de levaduras productoras de pigmentos carotenoides. El resto de las ellas (53 %) son de color oscuro (negro, verde, marrón) debido a que el pigmento que sintetizan es melanina (Tabla 1). Este último brinda a las células que lo poseen propiedades que les permite sobrevivir bajo distintas condiciones de estrés, tales como temperaturas y condiciones osmóticas extremas, elevada radiación UV y prolongados períodos de desecación (Sterflinger 2006).

Las micosporinas son moléculas hidrosolubles que absorben la radiación UV a longitudes de onda ~310 nm (Bandaranayake 1998). Se han descrito numerosas especies de levaduras capaces de sintetizar y acumular metabolitos secundarios que absorben radiación UV, tales como la micosporina-glutaminol-glucósido (MGG). Esta molécula es importante para la fotoprotección contra la radiación UVB, ya que protege a las células contra el daño directo que ésta podría generar sobre el ADN (Moliné *et al.* 2011). La mayor parte (71 %) de las especies aisladas a partir de los frutos de *N. nervosa* producen micosporinas, sugiriendo esto que su síntesis constituye una estrategia de resistencia a la alta radiación solar que reciben en la filósfera de esta especie vegetal. Asimismo, la información obtenida en este trabajo acuerda con Libkind *et al.* (2005), quien sugiere que la micosporogénesis es una característica propia de algunos grupos filogenéticos (taxón-específica). Entre las especies analizadas, todas las cepas pertenecientes a los Órdenes Chaetothyriales, Dothideales y Tremellales sintetizan micosporinas, mientras que las comprendidas en los órdenes Coniochaetales y Sporidiobolales no producen este metabolito. El hecho de que se registrara la producción de micosporinas en 2 de las 3 especies de *Cryptococcus* identificadas en el Orden Filobasidiales puede explicarse debido a que este género es polifilético y muy heterogéneo, por lo que la capacidad de los microorganismos incluidos en él de producir micosporinas pondría ser también variable.

Se ha descrito que los carotenos, melaninas y micosporinas poseen también propiedades antioxidantes, pudiendo ser éste otro de los roles que estas moléculas cumplen en los microorganismos que las poseen. Los resultados obtenidos por Moliné *et al.* (2011) también sostienen esta hipótesis, ya que estos autores han demostrado la capacidad de los glucósidos derivados de micosporinas de unirse a las especies reactivas de oxígeno. En su ambiente natural, los frutos de *N. nervosa* pueden no estar directamente expuestos a la radiación solar por encontrarse debajo del follaje. Además, suelen atravesar prolongados períodos de desecación, siendo éste uno de los factores que causan estrés oxidativo (Alpert 2006). Por lo tanto, el hecho de que la mayor parte de las levaduras y hongos dimórficos

hallados en este ensayo resultaron ser pigmentados y/o capaces de producir micosporinas, también sustentaría el rol antioxidante de estas moléculas.

Los hallazgos presentados en este Capítulo concuerdan con Muñoz (2010), quien también halló levaduras y hongos dimórficos en el filoplano (superficie de las hojas) de *N. pumilio* en el Norte de Patagonia, habiendo 6 especies en común entre ambos estudios (*A. pullulans*, *C. leucospermi*, *Cr. adeliensis*, *Cr. diffluens*, *Cr. weringae*, *R. colostri*). De las 40 especies aisladas por este autor, 16 (40 %) pertenecen a especies nuevas, encontrándose varias de ellas en el Orden Dothideales, al igual que 2 de las 5 especies nuevas mencionadas en este trabajo, siendo una de ellas de las más abundantes (*Dothichiza* sp. 1). Además, la mayor parte (73 %) de las levaduras y hongos dimórficos obtenidos a partir del filoplano de *N. pumilio* también producen micelio, pigmentos y micosporinas. Los resultados de Muñoz (2010) indican que tanto los carotenos y melaninas como las micosporinas cumplen un rol fotoprotector esencial en las comunidades de levaduras asociadas a la filósfera de esta especie. De acuerdo a la información presentada hasta el momento, podría sugerirse que las comunidades fúngicas asociadas a diferentes fracciones de la filósfera de al menos estas 2 especies de *Nothofagus* en Patagonia presentan adaptaciones similares.

POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LAS LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS AISLADOS

Los microorganismos presentes en la filósfera constituyen importantes fuentes de compuestos de importancia biotecnológica (Bull *et al.* 1992), tales como xilanasas, celulasas, nitrogenasas, lipasas, amilasas, pectinasas, esterases, proteasas (Middelhoven 1997, Bhadra *et al.* 2008, de García *et al.* 2007) y distintos compuestos antifúngicos (Janisiewicz & Roitman 1988, Janisiewicz & Yourman 1991).

Si bien el potencial de las levaduras para ser utilizadas como biocontroladoras de patógenos vegetales es conocido desde hace mucho tiempo (Janisiewicz 1987), la mayor parte de las investigaciones y posteriores aplicaciones de agentes biológicos se han focalizado en las bacterias y hongos filamentosos (Schoeman *et al.* 1999). En la actualidad, la utilización de levaduras y hongos dimórficos para este fin se vislumbra como una nueva alternativa en esta área (El-Sayed & El-Nady 2008). Algunas de las características que hacen de estos microorganismos candidatos para el desarrollo de estrategias de biocontrol son: a) su capacidad de colonizar rápidamente la superficie en la que habitan y de permanecer en ella por largos períodos de tiempo a pesar de las variaciones ambientales, b) la producción de polisacáridos extracelulares (ej. cápsulas) que incrementan su aptitud y tolerancia a situaciones de estrés restringiendo a su vez la colonización de la superficie por parte de organismos patógenos, y c) que muchas de ellas no son afectadas negativamente por

pesticidas (Janisiewicz 1991). Se ha demostrado que estos hongos presentan gran potencial para combatir enfermedades foliares, especialmente aquellas causadas por Oomycetes y denominadas mildiú (Urquhart & Punja 1997, El-Mehalawy 2004), y para inhibir el crecimiento de patógenos en diversos frutos durante la postcosecha (McLaughlin *et al.* 1992, Droby *et al.* 1993, Elad *et al.* 1994, Janisiewicz *et al.* 1994, Chand-Goyal & Spotts 1996a,b). Entre las levaduras descritas como antagónicas contra distintos patógenos vegetales se encuentran algunas de las incluidas en los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* y *Trichosporon* (McLaughlin *et al.* 1992, Droby *et al.* 1993, Chand-Goyal & Spotts 1996a,b, Buck 2004, El-Mehalawy 2004, Medina *et al.* 2009, Pusey *et al.* 2009, Janisiewicz *et al.* 2010). Más aún, existen en la actualidad fórmulas comerciales para el control biológico de distintos patógenos que contienen levaduras como biocontroladoras (Reglinski *et al.* 2011), entre las que se encuentran: Bionext (*Candida oleophila*), Shemer (*Metschnikowia fructicola*) y Candifrut (*Candida sake*). *Aureobasidium pullulans* representa un caso particular, no sólo porque es un hongo dimórfico presente en la mayor parte de las superficies vegetales analizadas hasta el momento a nivel mundial, sino también porque es una de las especies que más se ha estudiado en este sentido y en la que se ha demostrado un importante antagonismo contra diversos patógenos (Schena *et al.* 2002, Janisiewicz *et al.* 2010, Reglinski *et al.* 2011). De hecho, este hongo ha sido utilizado como agente biocontrolador en la fabricación de distintos productos ecológicos y no dañinos para el medio ambiente, tales como Boniprotect® y Blossom-protect®, desarrollados en Alemania.

Una situación común a los invernaderos de distintos lugares del mundo es que las condiciones ambientales de su interior (temperatura, luz, humedad, fertilización), ajustadas para optimizar al máximo el crecimiento de las plantas, suelen ser sumamente favorables para el desarrollo de patógenos. Éstos pueden ingresar al sistema de vivero ya sea a través del aire, agua de riego, insectos e incluso con el calzado y herramientas. Muchos patógenos son introducidos también con las semillas utilizadas para el cultivo de la especie. Dado que el sustrato en el que se cultivan las plantas no posee la microbiota responsable de combatir naturalmente los patógenos, es frecuente que hongos tales como *Pythium* y *Rhizoctonia* se desarrollen en el sistema de cultivo, ocasionando serios daños tanto a las semillas como a las plántulas (Paulitz & Bélanger 2001).

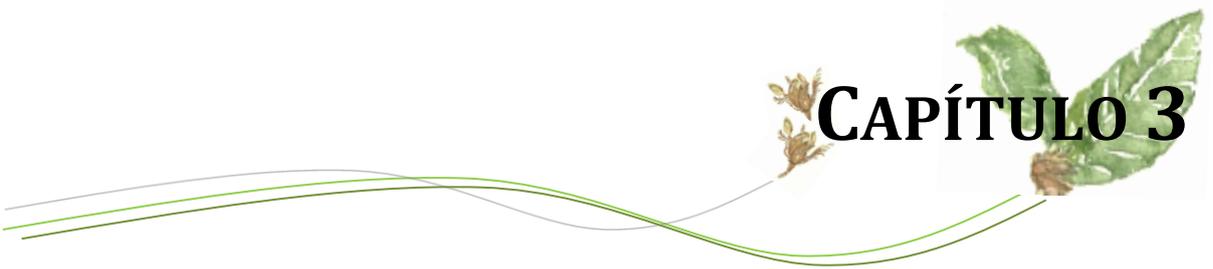
Está claro que el éxito de las estrategias de biocontrol depende del proceso de búsqueda y análisis utilizado para hallar los microorganismos adecuados para tal fin. Es decir, si se desea hallar microorganismos capaces de proteger los frutos de una determinada especie vegetal, se deberían buscar los mismos en la superficie del fruto de interés, ya que los agentes de biocontrol deben ocupar el mismo nicho ecológico (o similar) que el patógeno que

se desea controlar (Janisiewicz 1987, Paulitz & Bélanger 2001, Janisiewicz & Korsten 2002, Fravel 2005). En este mismo sentido, se considera que aislar e identificar las levaduras y hongos dimórficos asociados a la superficie de los frutos de *N. nervosa* constituye una estrategia adecuada para encontrar microorganismos que presenten efectos antagonistas frente a distintos fitopatógenos, incluso aquellos causantes del *damping-off* (Mao *et al.* 1997, El-Mehalawy *et al.* 2007, Elwakil *et al.* 2009). De hecho, algunos de los hongos aislados en este trabajo corresponden a géneros (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*) o incluso especies (*A. pullulans*, *R. colostri*) que han sido exitosamente utilizadas como agentes de biocontrol o bien como agentes promotores del crecimiento. De acuerdo a Wright *et al.* (2003) y Bennett & Whipps (2007), al inocular semillas de diferentes especies vegetales con determinados microorganismos, se incrementa el establecimiento, la aptitud y el crecimiento de las plantas, principalmente si éstos se establecen en la zona radical. Por lo tanto, las levaduras y hongos dimórficos aislados en este trabajo podrían tener aplicación directa en los sistemas de cultivo de *N. nervosa*. Resulta entonces necesario realizar estudios en los que se determine la capacidad de estos microorganismos de actuar como biocontroladores de patógenos en el vivero y/o como promotores de la germinación y/o el crecimiento durante los programas de domesticación de esta importante especie forestal.

CONCLUSIONES PARCIALES

En este Capítulo se describe la presencia de levaduras y hongos dimórficos en la superficie de los frutos de *N. nervosa* que son utilizados para su cultivo en vivero. Las especies aisladas presentan distintas estrategias de adaptación a la filósfera, un ambiente extremo en el que las poblaciones microbianas están expuestas al viento, la lluvia, elevada radiación UV y a grandes cambios de temperatura y humedad. La mayor parte de estos hongos forman micelio, mientras que el resto son capaces de formar cápsulas. En ambos casos, estas estructuras les permiten mantenerse adheridos al sustrato, incluso después del tratamiento pre-germinativo de lavado necesario para romper la latencia fisiológica de la semilla. Además, la mayor parte de las especies analizadas son pigmentadas y pueden sintetizar micosporinas. Tanto estas últimas como los distintos pigmentos (caroteno, melanina) brindarían al organismo protección contra la radiación UV y al estrés oxidativo.

Otro aspecto a resaltar en este Capítulo, es que tanto el proceso de conservación como el de ruptura de dormancia de la semilla alteran las comunidades microbianas asociadas a los frutos de *N. nervosa*. El primero reduce significativamente el número de levaduras y hongos dimórficos presentes en la superficie de los mismos, mientras que el tratamiento de lavado tiende a cambiar la composición de las comunidades microbianas.



CAPÍTULO 3

COMPORTAMIENTO MICORRÍCICO DE LAS PLÁNTULAS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA* CULTIVADAS EN VIVERO

INTRODUCCIÓN

PRODUCCIÓN DE PLANTINES

Uno de los pasos de mayor importancia durante la domesticación de especies forestales es la producción de los plantines que serán llevados a campo. Este proceso es complejo y requiere de diferentes etapas, que se detallan a continuación.

Una vez realizados los tratamientos pre-germinativos, la semilla⁷ se siembra generalmente entre los meses de Agosto y Octubre en terrinas (macetas) o tubetes (Figura 3.1), colocándose sobre la superficie del sustrato y luego cubriéndose con unos milímetros del mismo (Azpilicueta *et al.* 2010). Se utiliza un sustrato poroso, constituido por turba de *Sphagnum* y arena volcánica de granulometría media en proporción 1:1. Esta mezcla brinda una estructura balanceada de macro y microporos que permite evitar la compactación, retener la humedad, favorecer la aireación y un drenaje apropiado, facilitando así la emergencia de la raíz y el posterior desarrollo de la plántula. Este sustrato es físicamente ideal, y tiene reducida capacidad química de aportar nutrientes para el desarrollo de las plántulas. Esto permite al viverista controlar y aportar los nutrientes necesarios para cada etapa de desarrollo de la plántula en cantidades y proporciones acordes a cada especie (Schinelli & Martínez 2010). Las terrinas y tubetes en los que son cultivados los plantines son desinfectados previamente con hipoclorito de sodio comercial, mientras que el sustrato se desinfecta agregándole agua a 100 °C (A. Martínez *com. pers.*). Estos procesos reducen la carga microbiana del sistema, afectando particularmente a los microorganismos termosensibles, aunque muchos son capaces de permanecer en el mismo, encontrándose entre ellos posibles patógenos vegetales. Las macetas y tubetes se ubican en el invernáculo, un ambiente controlado donde la temperatura se encuentra entre 18-25 °C durante la mayor parte del día, y se reduce durante la noche (Figura 3.1). Bajo estas condiciones de cultivo se acelera y homogeniza el proceso germinativo y las semillas comienzan a germinar al cabo de 3 días (Schinelli & Martínez 2010).

Hasta el momento de la germinación el riego se realiza sólo con agua, y a partir de la misma se utiliza una técnica de fertirrigación, de reciente implementación en el cultivo de especies forestales nativas de la región Andino-patagónica. Ésta consiste en la producción de plantas en un sustrato estable tal como el descrito anteriormente donde los nutrientes son aplicados junto con el riego por microaspersión (fertirriego). Esta técnica permite una producción intensiva, obteniendo lotes de plantas de buena morfometría, con un alto grado

⁷ La semilla está contenida dentro del fruto tipo aquenio que tiene esta especie, tal como se detalló en el Capítulo 2.

de homogeneidad y en períodos notablemente menores que los necesarios con la producción tradicional, ya que se reduce el período en vivero de 2 años a 9-12 meses. Las plántulas cultivadas bajo esta técnica están sujetas a 3 etapas de crecimiento: Establecimiento, Crecimiento rápido y Rustificación. El manejo de las plantas durante estas etapas se realiza en base a la aplicación de distintas dosis de fertilizantes (dietas) y de diferente frecuencia y tiempo de aplicación (semanas de aplicación) (Enricci *et al.* 2001, Martínez *et al.* 2007, Azpilicueta *et al.* 2010, Schinelli & Martínez 2010) (Figura 3.2):



Figura 3.1.- Invernáculo del INTA EEA Bariloche. **a)** Vista general donde se muestra el sistema de riego en la parte superior y ubicación de macetas y tubetes; **b)** Terrinas (macetas) sembradas; **c)** Tubetes de 265 cm³ con plántulas de *Nothofagus nervosa*.

Etapa 1.- Establecimiento: comienza una vez que germina el total del lote de semillas y finaliza al aparecer el primer par de hojas verdaderas (las posteriores a los cotiledones). Puede abarcar los primeros 45 días a partir de la germinación. La solución nutritiva en esta etapa contiene elevada concentración de P (en proporción 4:1:1 P:N:K – Anexo IV), y el objetivo es promover el desarrollo radicular de la plántula y de esta forma asegurar el anclaje al sustrato y contribuir con la capacidad de absorción de agua y nutrientes.

Etapa 2.- Crecimiento rápido: transcurre desde el final de la etapa de Establecimiento y finaliza cuando la plántula alcanza el 80 % del crecimiento deseado en longitud del tallo (~30 cm en tubetes de 265 cm³). Esta etapa abarca aproximadamente 75 días durante los

cuales la plántula adquiere la mayor cantidad de biomasa aérea. En este caso se modifica la solución nutritiva elevando la concentración de N con respecto al P y al K, favoreciendo así el crecimiento en longitud. También se aplican Ca y micronutrientes, necesarios para el máximo crecimiento de la plántula.

Etapa 3.- Rustificación o Endurecimiento: esta última etapa es clave para obtener plántulas con mejores probabilidades de sobrevivencia en el campo. Comienza cuando termina la fase de Crecimiento rápido y finaliza cuando la planta está lista para ser transplantada al cantero o al campo, habiéndose logrado la altura deseada (~40 cm). Esta etapa consiste en generar condiciones ambientales de cultivo que promueven una mayor resistencia de las plantas a bajas temperaturas y falta de agua, a fin de lograr una mejor adaptación de las mismas a las condiciones naturales de campo. Para ello se reduce en forma gradual la frecuencia de riego y la protección contra el viento y la radiación solar (se comienza reduciendo la temperatura del invernáculo y manteniendo puertas y ventanas abiertas, y finalmente las plántulas son colocadas a la intemperie). La solución nutritiva se modifica elevando el K y reduciendo en gran medida el N y el P, lo que tiende a disminuir el crecimiento en altura y aumentar el diámetro de cuello y lignificación del tallo.

La etapa de Rustificación abarca los últimos 60 días del proceso de cultivo y es determinante en cuanto a la calidad de la plántula. Al final de la misma se obtienen plantas con buen potencial de crecimiento y resistencia a heladas, lo cual disminuye considerablemente el estrés por la manipulación y traslado hasta el lugar de plantación.

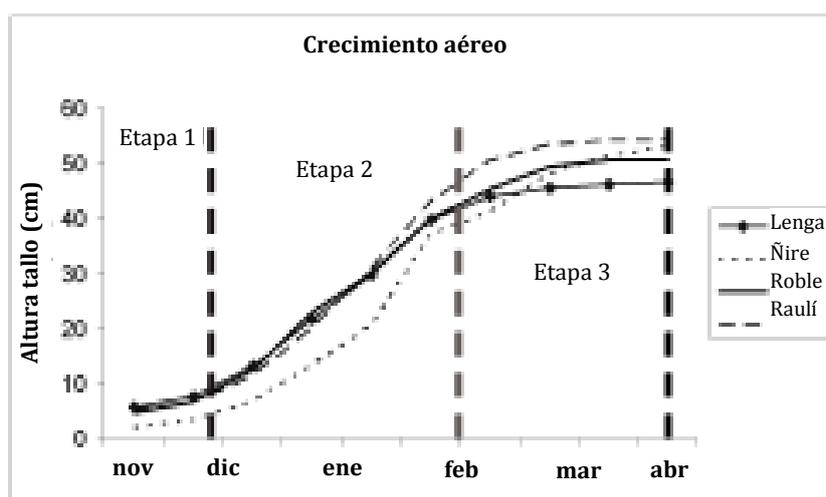


Figura 3.2.- Altura promedio registrada quincenalmente en plántulas de cuatro especies de *Nothofagus* cultivadas según la técnica de fertirrigación utilizada en el INTA EEA Bariloche. **Etapa 1** = Establecimiento; **Etapa 2** = Crecimiento rápido; **Etapa 3** = Rustificación (modificado de Schinelli & Martínez 2010).

En ocasiones, dependiendo del lugar disponible en el invernáculo y de la necesidad de llevar plantas a campo para instalar ensayos, las plántulas que han pasado por un período de crecimiento son colocadas en un lugar de transición o trasplantadas al cantero, donde continúan con la etapa de Rustificación

IMPORTANCIA DE LAS MICORRIZAS EN LA PRODUCCIÓN DE PLANTINES EN VIVEROS

El principal objetivo de un vivero forestal es lograr plantas de buena calidad capaces de establecerse y desarrollarse en el lugar donde serán implantadas. Esto dependerá del origen del material vegetal utilizado para su cultivo y del manejo durante la fase de producción en vivero. Los criterios para determinar la calidad solían limitarse a evaluar el estado sanitario de la planta así como el aspecto general y tamaño de la parte aérea. Sin embargo, en la actualidad también se evalúan las características del sistema radical, tales como tamaño y ramificación del mismo y su estado sanitario, ya que estos aspectos están directamente relacionados con la eficiencia de la planta en la absorción de agua y nutrientes (Quoreshi 2003, Pera & Parladé 2005).

Muchos árboles de importancia forestal, incluidos los del género *Nothofagus*, poseen ectomicorrizas (EcM) en sus raíces. Como se mencionó en la Introducción (Capítulo 1), esta simbiosis suele incrementar la aptitud general de la planta, ya que aumenta el transporte de agua y nutrientes, incluso de aquellos que se encuentran en baja concentración o que presentan movilidad reducida. También generan cambios en el tamaño, longevidad y forma del sistema radical y le brindan a la planta resistencia frente a factores de estrés y a distintos patógenos vegetales (Read 1999, Smith & Read 2008). Debido a estas características, las EcM son frecuentemente utilizadas en viveros forestales a fin de reducir la cantidad de fertilizantes y pesticidas químicos en la producción de las plántulas (Quoreshi 2003, Pera & Parladé 2005). Además, en el momento del trasplante los plantines sufren un período crítico de estrés, por lo que aquellos que poseen micorrizas se encuentran biológicamente mejor preparados para iniciar en forma inmediata la exploración y explotación del suelo, aumentando así sus posibilidades de sobrevivir y crecer en condiciones naturales en comparación con los no micorrizados (Quoreshi 2003, Pera & Parladé 2005, Oliveira *et al.* 2010). Las EcM constituyen entonces un factor a tener en cuenta tanto en la producción de plantines como en el momento de evaluar la calidad de los mismos, y su inoculación en viveros que cultivan distintas especies de importancia forestal resulta una práctica común en diferentes países del mundo (Quoreshi 2003, Pera & Parladé 2005). Son numerosos los trabajos que han descripto que la inoculación con EcM en distintas especies incrementa tanto

el crecimiento de la planta como su posterior desempeño en condiciones naturales (Khasa *et al.* 2001, Quoreshi *et al.* 2008, Sousa *et al.* 2012), destacándose aquellos en especies forestales tales como *Pinus* (Magaña 1999, Rincón *et al.* 2005, Rincón *et al.* 2007), *Quercus* (Oliveira *et al.* 2010), *Picea* (Quoreshi 2003) y *Larix* (Chakravarty & Chatarpaul 1990).

Barroetaveña *et al.* (2009) realizaron en el marco del Proyecto “Domesticación de especies forestales nativas patagónicas de aptitud comercial” un ensayo de inoculación de EcM en plantines de 3 especies de *Nothofagus* (*N. nervosa*, *N. obliqua* y *N. pumilio*). Éste fue llevado a cabo en el invernáculo de la Estación Agroforestal INTA Trevelin, Argentina y con la misma técnica de fertirrigación detallada en la Introducción de este Capítulo. Estos autores inocularon las plántulas con esporas de 2 especies de hongos ectomicorrícicos frecuentes en rodales de Lengua próximos a la localidad de Esquel (*Setchelliogaster fragilis* y *Austropaxillus statumm*) y que habían sido previamente descritas como aptas para ser utilizadas como inóculo (Bassani, tesis en preparación). Una vez finalizado el ensayo, no se observaron EcM formadas por los hongos inoculados, sino por otras 2 especies ectomicorrícicas: *Thelephora terrestris* y *Cenococcum geophilum*. Ambas especies son cosmopolitas y fueron previamente descritas en plántulas de diferentes especies vegetales cultivadas en viveros con fertirrigación (Quoreshi 2003, Pera & Parladé 2005, Trocha *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2010, Menkis & Vasaitis 2011, Sousa *et al.* 2012).

Es escasa la información sobre las etapas tempranas de micorrización en individuos de diferente especies del género *Nothofagus* desarrollados en ambientes naturales. Tedersoo *et al.* (2009) hallaron numerosas especies de hongos formadores de EcM en plántulas de *N. cunninghamii* en bosques de Australia, pero no estudiaron la ocurrencia de micorrizas arbusculares (MA) en sus raíces. Debido a que Bidartiondo *et al.* (2002) han citado la ocurrencia de un hongo MA en un ejemplar adulto de *N. dombeyi* y a que la presencia conjunta de ambos tipos de micorrizas (EcM y MA) ha sido descrita en plántulas de *Pinus* y *Eucalyptus* (Capítulo 1), existe la posibilidad de que en el estado de plántula los ejemplares de *Nothofagus* se encuentren también colonizados por MA.

Se desconoce el comportamiento micorrícico que presentan las plántulas del género *Nothofagus* durante el proceso de domesticación llevado a cabo en el vivero del INTA EEA Bariloche. Estudiar la ocurrencia y diversidad de esta simbiosis en las mismas y su relación respecto de las diferentes etapas de producción permitirá realizar recomendaciones de cultivo y poder plantear estrategias de inoculación y manejo.

OBJETIVO

Estudiar el comportamiento micorrícico de *N. nervosa* en el vivero y su relación con el manejo de las plántulas durante el cultivo de la especie bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYO DE VIVERO

Para estudiar el comportamiento de *N. nervosa* durante su permanencia en el vivero se realizó un ensayo de cultivo de 2 años bajo las mismas condiciones que las utilizadas en el INTA EEA Bariloche para la producción de plantines de esta especie (descrita en la Introducción de este Capítulo) y utilizando los mismos materiales. Durante el ensayo se analizaron las raíces de las plántulas a distintos tiempos para estudiar los tipos de micorrizas presentes y la diversidad de hongos formadores de las mismas.

El ensayo de vivero se inició en Octubre del año 2007. Las semillas utilizadas para la producción de los plantines correspondieron a las colectadas ese año en el área de estudio de este trabajo de Tesis (Región de Yuco, Parque Nacional Lanín, 950 m.s.n.m, 40° 14' S y 71° 49' O - Capítulo 1). Para romper la dormancia de las semillas, los frutos de *N. nervosa* fueron colocados en una malla permeable y sumergidos en un flujo de agua corriente durante 5 días. Una vez finalizado este tiempo se los secó sobre papel absorbente y a temperatura ambiente durante 1 h.

Para realizar el ensayo se utilizaron 12 bandejas de 28 tubetes cada una (336 tubetes en total). Se agregó a cada tubete el sustrato anteriormente mencionado (turba y arena volcánica en proporción 1:1) desinfectado por medio del agregado de agua a 100 °C. El día se 24 de Octubre del 2007 se sembraron 4 frutos en cada tubete, de forma de asegurar que en cada uno hubiera al menos una planta (una vez germinadas, se retiraron las plántulas excedentes). Las bandejas de tubetes se ubicaron en el invernáculo del vivero forestal del INTA EEA Bariloche, bajo condiciones controladas de temperatura, riego y aporte de nutrientes (descriptas anteriormente en la Introducción de este Capítulo). Las bandejas fueron periódicamente cambiadas de lugar a fin de homogeneizar las condiciones en las que se encontraban.

El análisis de las raíces se desarrolló siguiendo un esquema de muestreo de plántulas en diferentes tiempos sin reposición (cada plántula analizada se descartaba), como se describe a continuación. Durante el primer mes posterior a la germinación se analizaron las raíces de las plántulas cada 10 días (T_1 , T_2 , T_3), comenzando el 12 de Noviembre del 2007. A partir del mes de edad y hasta los 6 meses las observaciones fueron mensuales (T_4 , T_5 , T_6 , T_7 ,

T₈). Luego, se examinaron las raíces cada 6 meses hasta los 2 años de edad, es decir a los 12, 18 y 24 meses (T₉, T₁₀, T₁₁). Cuando las plántulas tuvieron 1 año (T₉), la mitad de ellas se trasplantó al cantero común del vivero forestal encontrándose éste a la intemperie y sin fertirrigación. Para ello, se extrajeron las plántulas del tubete y se ubicaron en orificios realizados en el suelo del cantero, el cual se encuentra rodeado de diferentes especies vegetales (*Pinus* spp., *Nothofagus* spp., *Populus* spp.) y cuya agua de riego proviene de un arroyo próximo al mismo. Por lo tanto, para los tiempos T₁₀ (18 meses) y T₁₁ (24 meses) se tienen 2 observaciones: una correspondiente a las plántulas que quedaron en el invernáculo y otra a aquellas que fueron trasplantadas al cantero. En este punto del ensayo se pretendió reproducir el manejo de vivero al que fueron sometidas las plantas de los ensayos de progenies y procedencias instalados en el campo en los años 1999 y 2000, que corresponden a los utilizados en los siguientes Capítulos (4 y 5) para desarrollar los objetivos planteados.

En cada uno de los tiempos de recolección de muestras se extrajeron 15 plántulas al azar del total disponible, que se conservaron en bolsas de polietileno individuales. En el laboratorio se fraccionó una porción de las raíces, se limpiaron las mismas cuidadosamente bajo microscopio estereoscópico (Olympus SZ30) y se fijaron en alcohol etílico 70 % para el estudio de MA. El resto del sistema radical fue conservado a 4 °C para el análisis de las EcM presentes en las raíces frescas.

MEDICIONES MORFOMÉTRICAS

En el laboratorio se tomaron las siguientes medidas de cada una de las plántulas en todos los tiempos de observación: longitud del tallo, diámetro del cuello de la raíz y del cuello del tallo. Para las plántulas de los Tiempos T₁ a T₉ (1 año), se registró además la longitud de la raíz y el peso total de la planta en fresco (Figura 3.3)⁸.

CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ECTOMORFOTIPOS

La ocurrencia de EcM se analizó en los sistemas radicales frescos, observando los mismos primero a ojo desnudo y luego bajo microscopio estereoscópico (Olympus SZ30). En todos los casos en los que se detectaron morfotipos ectomicorrícicos (= ectomorfitipos) se registraron las siguientes características: tipo de ramificación, aspecto y color del manto, presencia de hifas emanantes y rizomorfos y color de las mismas (Agerer 1987-2006). En base a ellas se formaron grupos de afinidad morfológica y se realizó una descripción de cada

⁸ No fue posible medir estas variables en las plantas de 18 (T₁₀) y 24 meses (T₁₁) porque la complejidad del sistema radical impidió extenderlo adecuadamente para realizar las mediciones y separar el sustrato de las raíces, lo cual modificaba el peso real de la plántula.

uno. Se complementó dicha descripción con características microscópicas de los ectomorfotipos, tales como color de las hifas que forman el manto, patrón del manto, presencia de cistidios o fíbulas (Agerer 1987-2006). Representantes de cada grupo fueron conservados en tubos plásticos de 1,5 mL a -20 °C para realizar posteriores análisis morfológicos y moleculares.

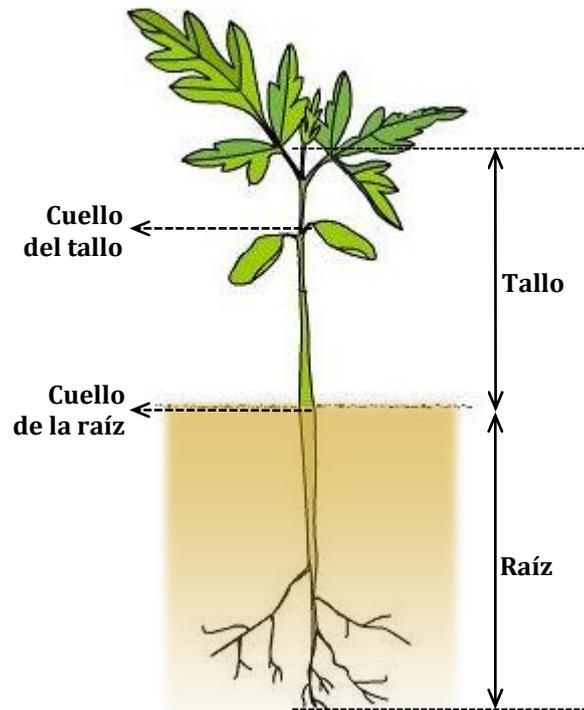


Figura 3.3.- Esquema de una plántula en el que se señalan los lugares donde se tomaron las medidas morfométricas de cada individuo analizado.

Se cuantificó el porcentaje de puntas colonizadas por EcM según el método de conteo descrito por Grand & Harvey (1982). Éste consiste en colocar fracciones radicales del individuo a analizar de forma aleatoria sobre una placa de Petri (ϕ 90 mm) con una grilla cuadrada de 1 x 1 cm en la base. Se observó la placa bajo microscopio estereoscópico y donde cada porción de raíz se superponía con una de las líneas verticales de la grilla se cuantificó el número de puntas colonizadas por el hongo (Figura 3.4). Luego, la placa se giraba 90° y volvían a cuantificarse el número de puntas con EcM que intersectaban las líneas verticales. Los ápices ectomicorrícicos se clasificaron en alguno de los grupos morfológicos previamente mencionados (se incluyeron en la categoría “Otros” aquellos ectomorfotipos que aparecieron infrecuentemente y no correspondían a los grupos conformados). El porcentaje total de colonización fue calculado a partir del número de puntas con EcM respecto del número total de puntas cuantificadas. Se cuantificaron un mínimo de 300 intersecciones por

muestra, excepto en aquellos individuos en los que el sistema radical no era lo suficientemente extenso para contar con este número, en cuyo caso se cuantificó la totalidad de las raíces (ej. plántulas correspondientes al T₁).

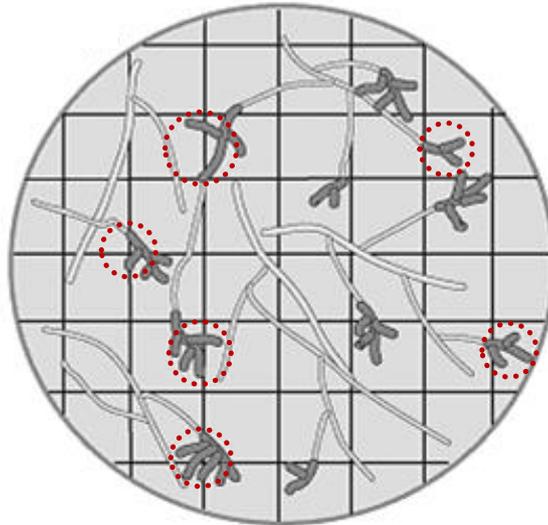


Figura 3.4.- Esquema que muestra la forma en la que se ubican las raíces en la placa de Petri sobre una grilla de 1 x 1 cm para la cuantificación de EcM (modificado de Brundrett *et al.* 1996). Se señalan con un círculo las porciones de raíz que intersectan con las líneas verticales, es decir las que son cuantificadas.

Para analizar la abundancia relativa de cada ectomorfotipo y su variación a lo largo del tiempo en las plántulas del ensayo, se cuantificó en cada individuo el número de ápices radicales correspondientes a cada ectomorfotipo, se dividió esta cantidad por el total de ápices colonizados y se expresó este valor en porcentaje (Gardes & Bruns 1996, Rincón *et al.* 2007), de forma tal que los valores obtenidos para los distintos ectomorfotipos en un mismo individuo sumaron 100 %:

$$\% \text{ ectomorfotipo A} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de ápices radicales ectomorfotipo A}}{\text{N}^\circ \text{ de ápices colonizados totales}} \times 100$$

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ECTOMICORRIZAS

Para la extracción de ADN genómico se utilizaron tanto ectomorfotipos frescos como conservados a -20 °C. La técnica utilizada para la extracción corresponde a la descrita por Bent & Taylor (2010) modificada, que consistió en: colocar 1-5 ápices radicales (se utilizó más de un ápice cuando el ectomorfotipo era ramificado y existía certeza de que estuvieran formados por el mismo hongo) en 38 µL buffer TE (Anexo II) con 12 µL de una solución de Proteinasa K (3,24 mg/mL TE). A cada tubo se le añadió un equivalente a 0,15 g de perlas de vidrio de 2 mm de diámetro y se agitó en el *vortex* a máxima velocidad por 2 min. Las

muestras fueron incubadas en baño termostático por 3 hs a 55 °C y luego por 1 h a 75 °C (durante este paso se inactiva la acción de la Proteinasa K). Transcurrido este tiempo, se extrajeron las muestras del baño, se centrifugaron a 14000 g por 15 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio. Para purificar las muestras, se agregó un volumen equivalente de cloroformo-isoamílico en proporción 24:1 v/v, se agitaron suavemente por inversión hasta observar una solución blancuzca y se centrifugaron por 15 min a 14000 g. La fase acuosa conteniendo el ADN fue transferida a un tubo estéril, se le agregó 1 volumen de isopropanol frío, se agitó por inversión y se centrifugó nuevamente a 14000 g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol 70 % v/v frío, se agitó por inversión y se centrifugó la muestra a 14000 g. Finalmente, se descartó el sobrenadante, se dejó evaporar el etanol residual colocando los tubos a temperatura ambiente durante 30 min, se resuspendió el ADN en 20 µL de agua MiliQ estéril y se conservaron las muestras a -20 °C.

Se amplificó mediante PCR la región ITS del ADN genómico (que será descrita en mayor detalle en el Capítulo 4) utilizando los *primers* ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAACTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Sigma). La reacción de PCR (Termociclador MultiGene, Labnet) fue realizada en 50 µL según las siguientes concentraciones: 6 mM MgCl₂, 0,32 mM dNTPs, 0,2 µM de cada primer, 0,06 mg/ml albúmina de suero bovino (BSA), 1U Taq polimerasa (Invitrogen), 1X *buffer* de reacción y 5 µL de ADN de dilución: 1:50, 1:100 o 1:200 v/v (ADN stock/agua estéril), dependiendo de la muestra. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 55 °C y 70 s a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1,5 % (p/v), se tiñeron con el colorante GelRed (Biotium) y se observaron en transiluminador con luz UV (DNR Minibis Pro). Los productos de PCR que presentaran una única banda fueron purificados (kit purificación BioNeer) y enviados a secuenciar con el primer ITS1F a la Unidad de Genómica del INTA Castelar (Secuenciador ABI 3700) o a la empresa MACROGEN, Seúl, Corea.

Se utilizó el programa MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software MEGA4 - Tamura *et al.* 2007), de acceso libre y gratuito (<http://www.megasoftware.net>), para corregir, alinear y realizar análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas obtenidas. Para identificar el taxón al que correspondían las secuencias, éstas fueron comparadas con las disponibles en la base de datos públicos GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). En caso de poseer numerosas secuencias correspondientes al mismo hongo ectomicorrícico, se utilizaron 4 de ellas para construir los

árboles filogenéticos (se seleccionaron las que presentaban mayor longitud o mejor calidad de secuencia). La nomenclatura y clasificación de las especies identificadas corresponden a la citada en la base de datos *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org) y *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>).

MICORRIZAS ARBUSCULARES

Conservación de las muestras y tinción del material

Como se mencionó anteriormente, el análisis del estatus micorrícico arbuscular de las plántulas coleccionadas en cada tiempo se realizó sobre una fracción de las mismas raíces que fueron utilizadas para el estudio de EcM. Para teñir las estructuras fúngicas de MA se utilizó la técnica descrita por Phillips & Hayman (1970) modificada, que consistió en:

- a) Una etapa de *clarificación*: las raíces fueron hervidas en KOH 10 % p/v (a 98 °C) durante 1-1,5 horas (dependiendo de la cantidad de pigmentos presentes en las mismas). Se cubrieron completamente las raíces con esta solución y se agitaron periódicamente con una aguja para asegurar el contacto con la misma. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el KOH y se lavaron las muestras con abundante agua corriente.
- b) Una segunda etapa de *decoloración*, en la que se completó la extracción del contenido celular y de compuestos fenólicos, finalizando así con el proceso de clarificación. Para ello se agregó a las muestras un decolorante que consistía en una solución alcalina de peróxido de hidrógeno 5 % v/v (H₂O₂ 30 V) y amoníaco 0,5 % v/v (NH₃). Cada muestra fue sumergida en esta solución hasta que las raíces estuvieran traslúcidas y alcanzaran color ámbar. El tiempo de decoloración fue variable (10 min - 1 h) dependiendo del tamaño, grosor y edad de las raíces. Luego, cada muestra fue lavada con agua corriente para remover el decolorante.
- c) En la tercera etapa, que consistió en la *acidificación* de la muestra (necesaria para que el colorante se adhiera a las hifas), las raíces fueron sumergidas en HCl diluido (1 % v/v) durante aproximadamente 2 min.
- d) La etapa final de *coloración* consistió en teñir las raíces con una solución de Trypan-Blue 0.05 % (Trypan-Blue 0,05 % p/v , glicerol 31 % v/v, ácido láctico 31 % v/v). En este caso se sumergieron las muestras en la solución hasta cubrirse completamente y se hirvieron (a 98 °C) durante 15 minutos, agitando regularmente. Se enjuagaron cuidadosamente con agua corriente para retirar el exceso de colorante. Las muestras teñidas fueron finalmente conservadas en la solución descrita anteriormente sin el agregado de Trypan-Blue.

Estimación del porcentaje de raíz colonizada

La observación de las raíces teñidas fue realizada a diferentes aumentos bajo un microscopio óptico (Olympus BX40). En caso de encontrarse estructuras correspondientes a MA, éstas fueron documentadas con una cámara *Sony ExwaveHAD* y el programa *Image-Pro Plus 4.1.0.0*. para Windows.

El porcentaje de raíz colonizada fue estimado en todos los individuos según el método de intersección de McGonigle *et al.* (1990) modificado. Éste consistió en realizar preparados semipermanentes de 10 porciones de raíces teñidas, de aproximadamente 1 cm de longitud cada una, montadas en ácido láctico y glicerina y de forma paralela sobre un portaobjetos. Se hicieron 4 preparados por muestra y en cada uno fueron observados con un aumento de 200X no menos de 100 campos. El porcentaje de raíz colonizada por MA se estimó relacionando el número de campos en los que se observan estructuras correspondientes a MA colonizando la raíz respecto del total de campos cuantificados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizaron análisis factoriales de una vía (ANOVA) para analizar estadísticamente las medidas morfométricas y los porcentajes de colonización ectomicorrícica de las plántulas hasta de un año de edad (factor: edad de la plántulas = tiempo de observación). Para estudiar estas mismas variables en plántulas de 18 y 24 meses se realizaron análisis factoriales de 2 vías, considerando los factores ubicación (2 niveles: invernáculo y cantero) y edad de las plántulas (2 niveles: T₁₀ = 18 meses y T₁₁ = 24 meses). Para evaluar la variación en la abundancia relativa de cada grupo de ectomorfortipos de afinidad morfológica en función del tiempo se realizó un ANOVA de una vía tanto para los ejemplares que permanecieron en el invernáculo como para aquellos que fueron trasplantados al cantero (factor: edad de la plántulas = tiempo de observación). Para los análisis *a posteriori* se utilizó la prueba de Tukey (Montgomery & Runger 1996). En ocasiones fue necesario transformar los datos para cumplir con los supuestos de normalidad, y para ello se utilizó la función exponencial cuadrática. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SigmaPlot 12.0.

RESULTADOS

CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS ANALIZADAS DURANTE EL ENSAYO DE VIVERO

En la Figura 3.5 se muestra el desarrollo de las plántulas en el vivero del INTA EEA Bariloche durante las 3 Etapas de crecimiento descritas anteriormente, y en la Figura 3.6 el

crecimiento en longitud y el aumento de peso de las mismas durante los primeros 6 meses del ensayo de vivero.



Figura 3.5.- Fotografías del vivero del INTA EEA Bariloche y de las plántulas de *Nothofagus nervosa* durante el ensayo de vivero. **a)** Invernáculo; **b)** Sistema de fertirriego; **c)** Cantero donde fueron trasplantadas las plántulas al año de edad; **d)** Tubetes con sustrato (turba:arena) donde fueron sembrados los frutos de *Nothofagus nervosa*; **e,f)** Plántulas con cotiledones y primer par de hojas verdaderas, respectivamente (final Etapa 1, Establecimiento); **g)** Plántulas que ya han desarrollado gran parte de su biomasa aérea durante la primera estación de precimiento (Etapa 2, Crecimiento rápido); **h e i)** Plántulas al comienzo y al final de la Etapa 3 (Rustificación), respectivamente.

Durante el primer mes de crecimiento (T_1 a T_3) las plántulas desarrollaron el sistema radical, los cotiledones y el primer par de hojas (Figura 3.5e,f), siendo la longitud media de la raíz (6,6 cm) mayor que la del tallo (1,56 cm). Al cabo del cuarto mes de edad (T_6) las plántulas triplicaron su tamaño, alcanzando una longitud total de 23,1 a 56,8 cm, con una media de 30,33 cm. Este aumento significativo ($p < 0,001$) respecto de la longitud media observada en el T_2 se vio reflejado en un marcado incremento de peso (Figura 3.5g,h y 3.6), siendo la diferencia estadísticamente significativa respecto del peso registrado para las plántulas del T_2 ($p < 0,001$). Entre el cuarto y sexto mes de edad (T_6 a T_8), se redujo la tasa de crecimiento en longitud, pero se registró un aumento del peso como consecuencia del incremento significativo en el diámetro ($p = 0,023$) y lignificación del tallo (también se registró un incremento en el diámetro de la raíz, pero la diferencia no fue significativa respecto del T_6) (Figura 3.5 y 3.7a). A partir del sexto mes, las plántulas continuaron su crecimiento, alcanzando en promedio 40,1 cm de longitud total y 4,7 g de masa fresca al año de edad.

Cuando las plántulas cumplieron un año de edad, la mitad de ellas fueron trasplantadas al cantero del vivero del INTA (Figura 3.5c). En la Figura 3.7b puede observarse que estos ejemplares presentaron un crecimiento significativamente menor que las que continuaron en el invernáculo, tanto a nivel de longitud del tallo ($p < 0,001$) como del diámetro de raíz ($p < 0,001$) y de tallo ($p = 0,002$) y para ambos tiempos de observación ($T_{10} = 18$ meses y $T_{11} = 24$ meses).

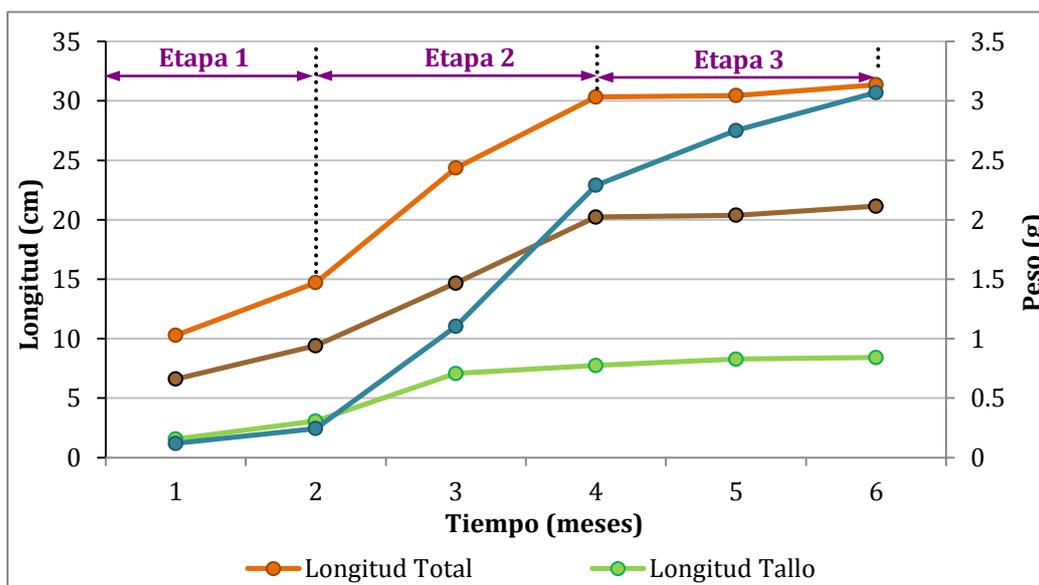


Figura 3.6.- Medidas morfológicas analizadas únicamente en plántulas de *Nothofagus nervosa* durante el primer período de crecimiento (invernáculo). Se indican en el gráfico las distintas Etapas de crecimiento.

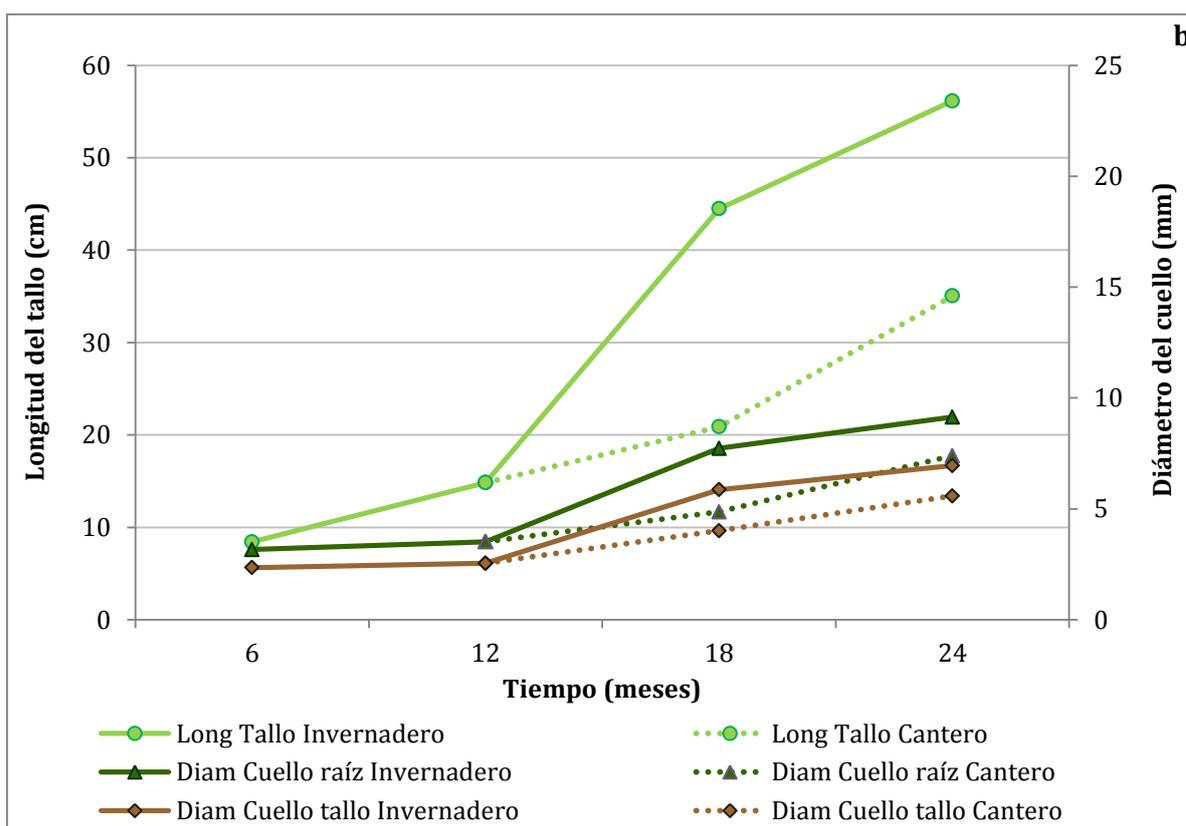
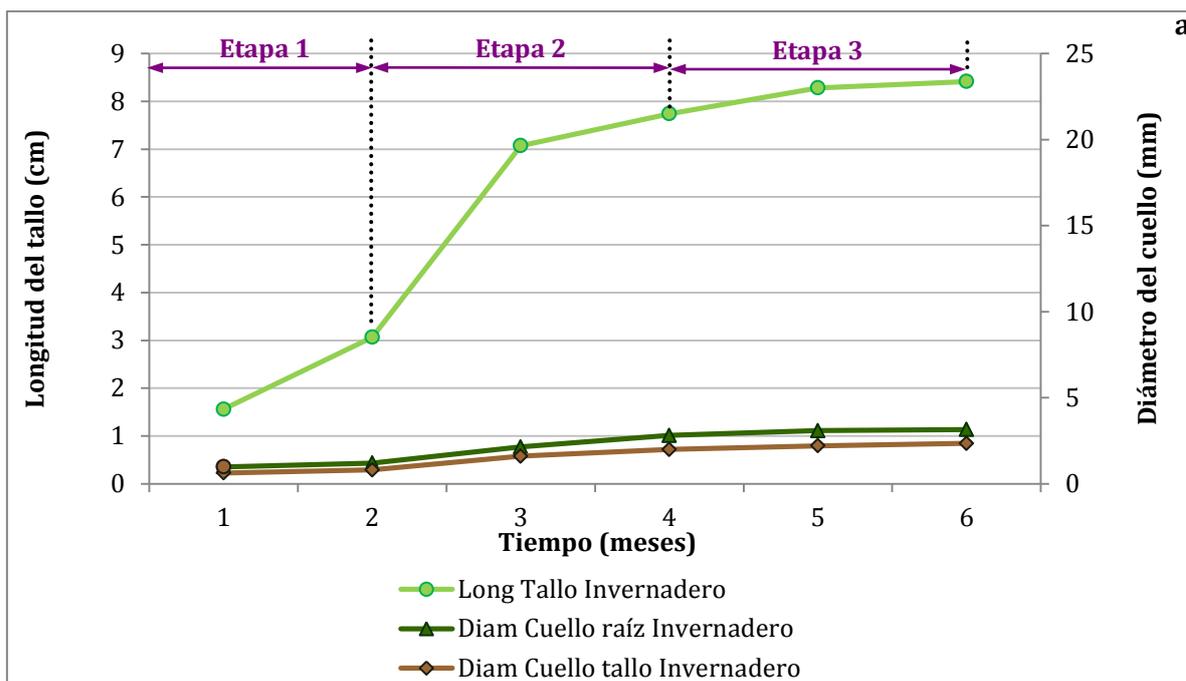


Figura 3.7.- Comparación de las medidas morfológicas registradas en todos los individuos analizados durante el ensayo de vivero en plántulas de 1 a 6 (a) y de 6 a 24 meses de edad (b). Se señalan en el gráfico (a) las distintas Etapas de crecimiento a las que están sujetas las plántulas durante la fertirrigación.

DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO MICORRÍCICO

Cuantificación y caracterización de ectomicorrizas

Las plántulas del ensayo de vivero carecieron de EcM durante los primeros 6 meses de crecimiento. Se registraron EcM en casi todos los ejemplares de 12 meses (T_9) de edad (a excepción de una plántula que correspondió a la más pequeña de las observadas en ese tiempo) y en la totalidad de las plántulas de 18 y 24 meses (T_{10} y T_{11} , invernáculo y cantero).

Los valores medios de colonización fueron superiores al 50 % en los 3 tiempos en los que se detectaron EcM (T_9 , T_{10} y T_{11}). Entre los ejemplares que permanecieron en el invernáculo se observó una disminución significativa del porcentaje de colonización en el T_{10} (18 meses) respecto del T_9 ($p = 0,003$) y luego un incremento estadísticamente significativo ($p = 0,026$) en el T_{11} (24 meses). Para las plántulas trasplantadas al cantero, los valores de colonización ectomicorrícica se incrementaron significativamente ($p < 0,001$) entre el T_{10} (18 meses) y el T_{11} (24 meses) (Figura 3.8).

Según el análisis factorial de 2 vías realizado, no existe interacción entre los factores considerados (ubicación y edad de las plántulas), siendo el porcentaje de EcM significativamente superior en el invernáculo en ambos tiempos ($p < 0,001$).

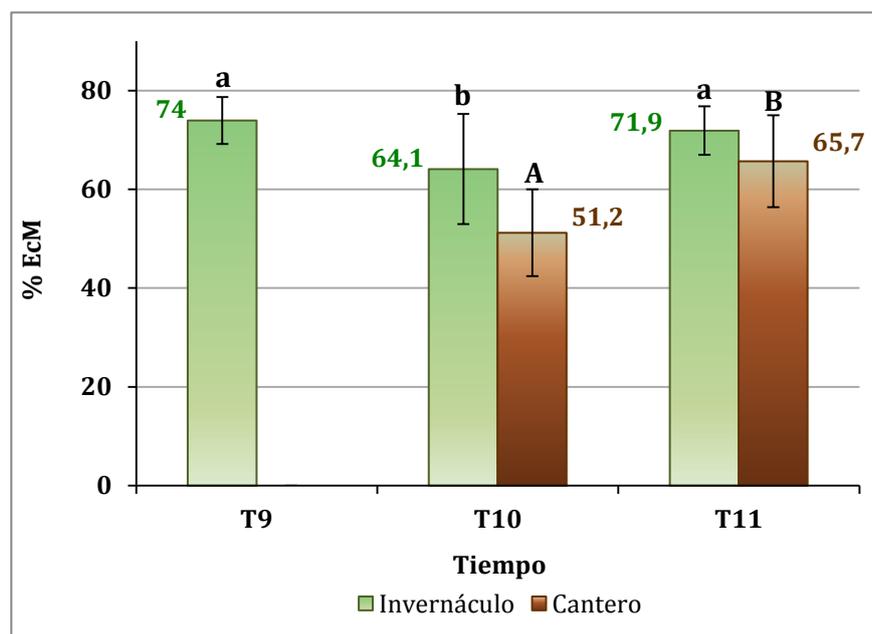


Figura 3.8- Gráfico en el que se señalan los valores medios de colonización ectomicorrícica registrados en plántulas de *Nothofagus nervosa* durante el ensayo de vivero. Se indican con distintas letras las diferencias estadísticamente significativas registradas para las plántulas de invernáculo (minúsculas) y de cantero (mayúsculas) (las barras de error indican la desviación estándar de las muestras analizadas).

Los ectomorfotipos observados en las plántulas del ensayo de vivero fueron los mismos tanto para las que permanecieron en el invernáculo como para aquellas que habían sido trasplantadas al cantero. Estos ectomorfotipos se agruparon en 4 grupos de afinidad morfológica de acuerdo a sus características macro y microscópicas (Figura 3.9):

Grupo 1: Ectomorfotipo de forma recta, simple (Figura 3.9a) o de ramificación monopodial pinnada (Figura 3.9b,c), de ápice ligeramente más angosto que la base. Su color es blanco a tiza-amarillento, el manto liso, con brillo nacarado y de aspecto semitraslúcido. Sin hifas emanantes o con hifas emanantes escasas, cortas y hialinas. Sin rizomorfos.

Grupo 2: Ectomorfotipo de color miel a canela y generalmente opaco que tiene un aspecto similar a los incluidos en el Grupo 1 (Figura 3.9d-f).

Grupo 3: Ectomorfotipos rectos, simples y en ocasiones el ápice más angosto que la base. Poseen un color negro “acarbonado”, de brillo ligeramente satinado a opacos. Hifas emanantes relativamente abundantes, también negras o marrón oscuras, gruesas y emergentes en todas las direcciones. Sin rizomorfos (Figura 3.9g-h).

Grupo 4: Ectomorfotipos rectos y simples de aspecto intermedio entre el Grupo 1 y el Grupo 3. Base de color blanco o tiza y regiones de color negro. Cuando poseen hifas emanantes son escasas y se hallan asociadas a la fracción oscura del ectomorfotipo (Figura 3.9i-j).

En cuanto a las características micromorfológicas observadas bajo microscopio óptico para los distintos grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica formados, se observó que los Grupos 1 y 2 presentaban características similares. Ambos presentaron un manto conspicuo rodeando a la raíz, formado por hifas hialinas, regularmente tabicadas y sin ornamentaciones. En algunas hifas se observaron fíbulas. El patrón del manto es de tipo pseudoparenquimatoso y no se observaron cistidios (Figura 3.10a-d). Los ectomorfotipos incluidos en el Grupo 3 se caracterizaron por presentar manto plectenquimatoso formado por hifas castañas oscuras, de paredes gruesas y regularmente tabicadas. Las hifas emanantes eran castañas, sin ornamentación, regularmente tabicadas y con ausencia de fíbulas. No se observaron cistidios (Figura 3.10e-i). Los ectomorfotipos del Grupo 4 presentaron mantos discontinuos cuyas hifas se ubicaban de forma más laxa que las observadas en los ectomorfotipos del Grupo 3, pero de características muy similares a éste, indicando que los ectomorfotipos incluidos en los Grupos 3 y 4 podrían corresponder a distintos estadios (ej. maduro e inmaduro) de un mismo ectomorfotipo (Figura 3.10j-l).

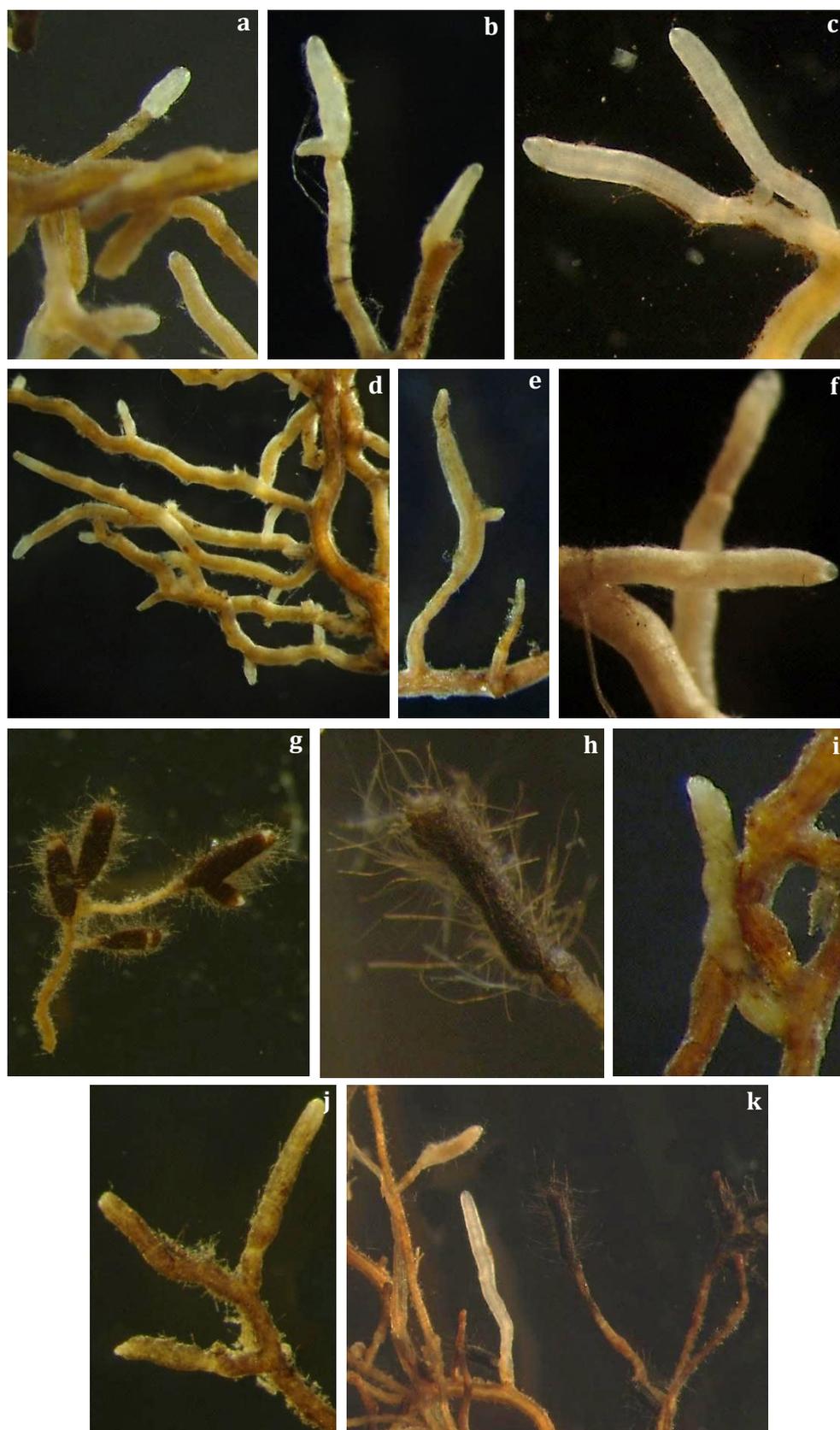


Figura 3.9.- Ectomorfotipos observados en ejemplares de vivero de *Nothofagus nervosa*. **a-c)** Ectomorfotipos blancos del Grupo 1; **d-f)** Ectomorfotipos miel - canela del Grupo 2; **g,h)** Ectomorfotipos negros del Grupo 3; **i,j)** Ectomorfotipo de aspecto intermedio entre los Grupos 1 y 3; **k)** Ectomorfotipos de los Grupos 1, 2 y 3 presentes simultáneamente en un mismo sistema radical.

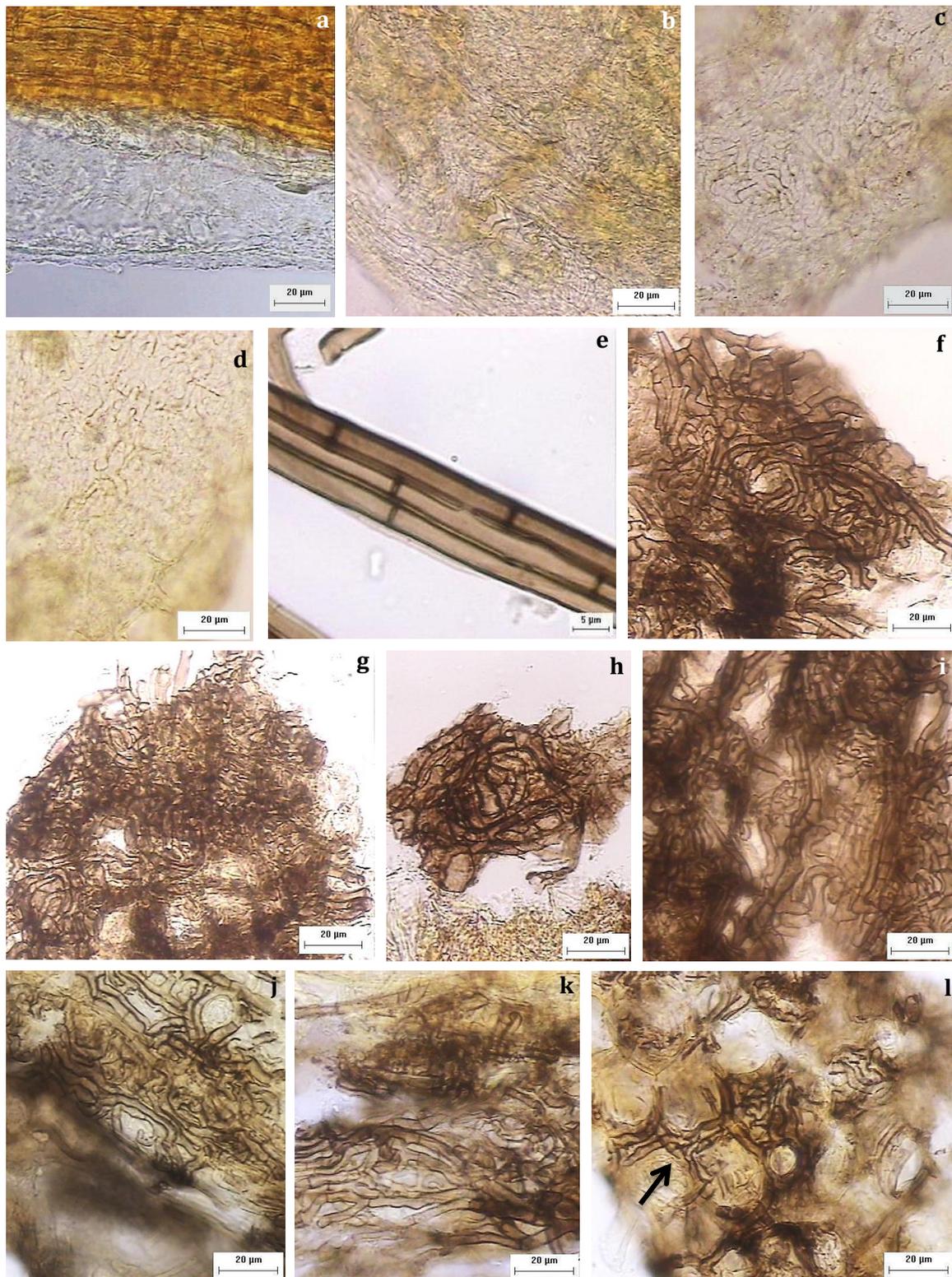


Figura 3.10.- Micromorfología de los ectomorfotipos asociados a plántulas de *Nothofagus nervosa* en el vivero. **a,b)** Manto de los ectomorfotipos del Grupo 1 y 2 respectivamente rodeando la raíz; **c,d)** Patrón superficial de los mantos de los Grupos 1 y 2, respectivamente; **e)** Hifas emanantes tabicadas de los ectomorfotipos del Grupo 3; **f-i)** Patrón del manto de los ectomorfotipos del Grupo 3 formados por hifas castañas ubicadas de forma variable; **j-k)** Manto de los ectomorfotipos del Grupo 4 formados por hifas castañas; **l)** Vista superficial de la red de Hartig del Grupo 4 (señalada con una flecha oscura).

Identificación molecular de hongos formadores de ectomicorrizas y árboles filogenéticos

En la Tabla 3.1 se muestran los taxones fúngicos asociados a las secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación del fragmento ITS de los ectomorfitipos anteriormente descritos. Las secuencias correspondientes a los ectomorfitipos de los Grupos morfológicos 1 y 2 de ejemplares de invernáculo y cantero de diferentes edades presentaron un máximo de 2 diferencias nucleotídicas entre sí, indicando que los mismos están formados por la misma especie fúngica. La especie filogenéticamente asociada a estos ectomorfitipos es *Tomentella ellisii* (HQ406823.1), un hongo perteneciente al Phylum Basidiomycota con el cual presentan un máximo de 2 diferencias nucleotídicas, dependiendo de la secuencia. Del mismo modo, las secuencias asociadas a Grupos morfológicos 3 y 4 obtenidas a partir de ectomorfitipos de plántulas de tubete y cantero para distintos tiempos, también alinean entre sí (Tabla 3.1), confirmando así la similitud observada en las características macro y micromorfológicas descritas para cada uno. En este caso, el taxón afín más cercano fue otro hongo ectomicorrícico, incluido en el Phylum Ascomycota y no descrito hasta el momento (*Uncultured EcM FR731633.1*), con el que presentaron 45 diferencias nucleotídicas. Las secuencias obtenidas para ectomorfitipos clasificados dentro del Grupo “Otros” pertenecieron únicamente a ejemplares de cantero de 2 años de edad, y fueron afines taxonómicamente a 4 especies fúngicas diferentes, 2 incluidas en el Phylum Basidiomycota (*Hebeloma cavipes* y *Rickenella* sp. 1) y las otras 2 en el Phylum Ascomycota (*Peziza* sp. 1 y *Peziza* sp. 2).

Los hongos identificados a partir de 3 ectomorfitipos de ejemplares de tubete y cantero (T214, T228, C227) corresponden a hongos no micorrícicos, siendo *Cryptococcus victoriae* una levadura y las especies *Neonectria radicola* y *Dendryphion nanum* patógenos vegetales frecuentes (Vaartnou 1974, Halleen *et al.* 2004, Zilberstein *et al.* 2007, Lene *et al.* 2011). Debido a que estos hongos se encontraron asociados a los ectomorfitipos pero claramente no constituían el mismo, se los consideró “contaminantes”.

En la Tabla 3.1 puede observarse que gran parte de los hongos micorrícicos secuenciados presentaron bajo porcentaje de homología con las secuencias disponibles en el GenBank, significando que pertenecen a especies no descritas hasta el momento. En los árboles construidos para ilustrar la posición filogenética de los hongos formadores de EcM en *N. nervosa*, se observa que éstos presentaron como taxones filogenéticamente afines otros hongos ectomicorrícicos (Figura 3.11).

Tabla 3.1.- Identificación molecular de los hongos asociados a ectomorfortipos de plántulas de *Nothofagus nervosa* de invernáculo y cantero durante el ensayo de vivero. **Grupo MT** = Grupo morfológico del ectomorfortipo; **(%)** = Porcentaje de homología de cada secuencia nucleotídica con el taxón filogenéticamente más cercano según la base de datos del GenBank NCBI; * = Se nombran con la categoría “Otros” aquellos ectomorfortipos que aparecieron infrecuentemente y que no correspondían a los grupos previamente conformados; ** = Este morfotipo presentaba una tonalidad grisácea ligeramente diferente a los demás. Se señalan en sombreado las especies fúngicas no micorrícicas.

UBICACIÓN EN EL VIVERO	NÚMERO MUESTRA	EDAD (MESES)	GRUPO MT*	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	ESPECIE ASOCIADA (%)
Invernáculo	1	12	2	<i>Tomentella ellisii</i>	<i>Tomentella ellisii</i> (99 %)
	2	12	1		
	3	18	2		
	4	18	1		
	5	24	2		
	6	24	1		
Cantero	7	18	1	EcM Ascomicética sp. 1	<i>Porosphaerella cordaphora</i> (85 %)
	8	18	2		
	9	18	1		
	10	24	2		
	11	24	1		
	12	24	1		
Invernáculo	13	12	3	EcM Ascomicética sp. 1	<i>Porosphaerella cordaphora</i> (85 %)
	14	18	3		
	15	24	4		
Cantero	16	24	3	EcM Ascomicética sp. 1	<i>Porosphaerella cordaphora</i> (85 %)
	17	24	3		
Cantero	18	24	Otro 1	<i>Peziza</i> sp. 1	<i>Peziza michelli</i> (82 %)
	19	24	Otro 1		
	20	24	Otro 1		
	21	24	Otro 1		
	22	24	Otro 1		
	23	24	Otro 2	<i>Peziza</i> sp. 2	<i>Peziza depressa</i> (91 %)
	24	24	Otro 2		
	25	24	Otro 3	<i>Rickenella</i> sp. 1	<i>Rickenella mellea</i> (88 %)
	26	24	Otro 4	<i>Hebeloma cavipes</i>	<i>Hebeloma cavipes</i> (99 %)
	27	24	Otro 4		
Invernáculo	28	24	4**	<i>Neonectria radiculicola</i>	<i>Neonectria radiculicola</i> (100 %)
	29	24	3	<i>Dendryphion nanum</i>	<i>Dendryphion nanum</i> (100 %)
Cantero	30	24	3	<i>Cryptococcus victoriae</i>	<i>Cryptococcus victoriae</i> (100%)

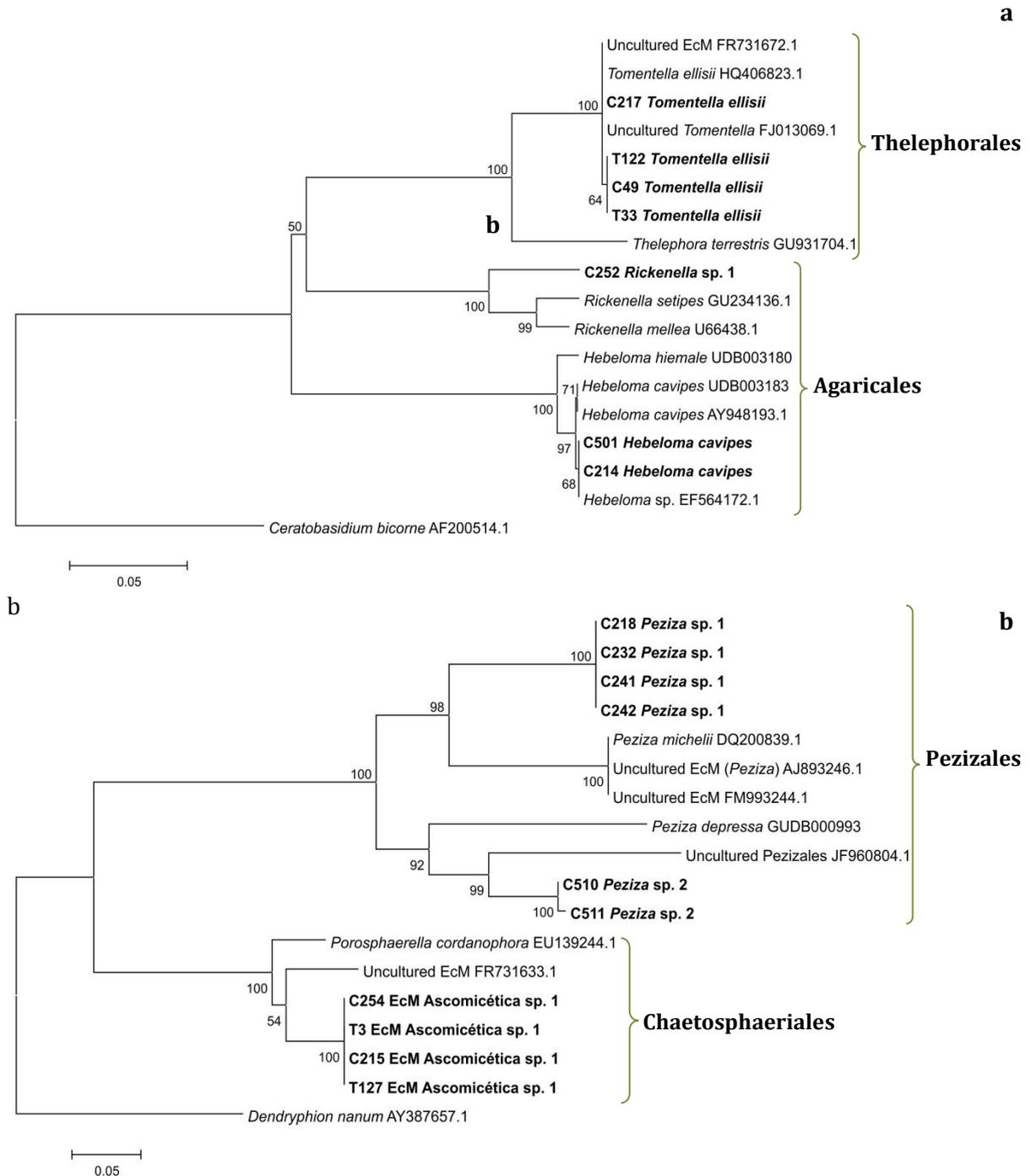


Figura 3.11.- Árboles filogenéticos construidos en base al algoritmo Neighbor Joining y al modelo Kimura de 2 parámetros para estimar las distancias evolutivas entre las secuencias de la región ITS correspondientes a los hongos formadores de ectomicorrizas. Los números sobre las ramas corresponden a la frecuencia con la que esa rama se ubicó en esa posición para 1000 repeticiones (bootstrap), los valores inferiores al 50 % no se muestran. Las secuencias correspondientes a las especies *Ceratobasidium bicorne* y *Dendryphion nanum* fueron utilizadas como raíz (outgroup) en los árboles pertenecientes a los Phyla **a)** Basidiomycota y **b)** Ascomycota, respectivamente. Las secuencias obtenidas en este trabajo se señalan en negrita (secuencias obtenidas a partir de plántulas de **T** = Tubete –invernáculo- y **C** = Cantero).

Abundancia relativa de cada ectomorfofoto

En el invernáculo, se observó que el ectomorfofoto más abundante correspondió al perteneciente al Grupo morfológico 1-2 (*Toментella ellisii*). Los valores de colonización del mismo fueron similares a lo largo del ensayo de vivero y significativamente mayores que los registrados para el Grupo 3-4 (EcM Ascomicética sp. 1) en todos los tiempos de observación (T₉ p < 0,001 -12 meses-, T₁₀ p < 0,001 -18 meses- y T₁₁ p < 0,001 -24 meses-). En las plántulas que permanecieron en el invernáculo no se registraron EcM pertenecientes a la categoría “Otros” hasta los 24 meses de edad.

Entre los ejemplares que fueron trasplantados al cantero, se observó un comportamiento similar. Los porcentajes de colonización de *Toментella ellisii* fueron similares a los 18 y 24 meses, pero significativamente mayores que los registrados para el hongo EcM Ascomicética sp. 1., tanto a los 18 como a los 24 meses de edad (T₁₀ p = 0,002, T₁₁ p = 0,003). A diferencia de las anteriores, en las plántulas que fueron trasplantadas a cantero se registró la presencia de ectomorfofotos del Grupo “Otros” a los 18 meses, siendo los valores de colonización bajos, pero mayores a los registrados en las plántulas de invernáculo (Tabla 3.2).

Tabla 3.2.- Valores medios de los porcentajes de colonización ectomicorrícica de los diferentes ectomorfofotos registrados en *Nothofagus nervosa* durante el ensayo de vivero.

GRUPOS AFINIDAD MORFOLÓGICA	INVERNÁCULO			CANTERO	
	12 meses	18 meses	24 meses	18 meses	24 meses
Grupo1y2	64,4 ± 14,1	70,9 ± 16,2	67,7 ± 13,1	59 ± 19,5	53,9 ± 13,9
Grupo3y4	30,6 ± 14,2	29,1 ± 16,1	29,9 ± 14,4	35,5 ± 17,8	37,3 ± 14
Otros	0	0	2,4 ± 2,2	5,5 ± 6,6	8,7 ± 4

Ocurrencia de micorrizas arbusculares

En ninguna de las 195 plántulas analizadas en este ensayo (15 ejemplares en cada una de las 11 observaciones realizadas en el invernáculo y en los 2 realizadas en el cantero), se detectaron estructuras características de MA.

DISCUSIÓN

ETAPAS DE CRECIMIENTO EN EL VIVERO Y SU RELACIÓN CON LAS ECTOMICORRIZAS

Se estudió el crecimiento de las plántulas de *N. nervosa* y de las micorrizas asociadas a las mismas en un ensayo de vivero realizado a lo largo de 2 años bajo las condiciones de producción utilizadas durante los procesos de domesticación de especies forestales nativas

en el vivero del INTA EEA Bariloche. Durante el primer año de crecimiento, las plántulas se cultivaron dentro del invernáculo en condiciones controladas de temperatura, riego y aporte de nutrientes. En ese momento, la mitad de ellas se trasplantaron al cantero para imitar las condiciones de las plantas de los ensayos del INTA instalados en el campo en los años 1999 y 2000, que corresponden a los utilizados en este trabajo de Tesis para estudiar las micorrizas en ambientes naturales (Capítulos 4 y 5).

Durante el primer mes de crecimiento, las plántulas formaron el primer par de hojas verdadero y principalmente el sistema de anclaje al sustrato (raíces). Este período correspondió entonces a la Etapa 1 de crecimiento (Establecimiento). A los 4 meses de edad, las plántulas habían desarrollado la mayor parte de biomasa aérea correspondiente a la primera estación de crecimiento (primer año), por lo que se encontraban finalizando la Etapa 2 (Crecimiento rápido). Durante los siguientes 2 meses, se redujo la tasa de crecimiento en longitud, pero se registró un aumento significativo del peso de la plántula y del diámetro y lignificación de su tallo, lo cual se debió a que se encontraban en la Etapa 3 (Rustificación). Por lo tanto, las plántulas de *N. nervosa* creciendo en el invernáculo siguieron el patrón descrito por Schinelli & Martínez (2010), respetando las 3 etapas de crecimiento establecidas. Al término del ensayo, resultó evidente que aquellas plántulas que permanecieron en el invernáculo presentaron un mayor crecimiento que las trasplantadas al cantero. Posiblemente, este fenómeno se deba al estrés del trasplante y al cambio en las condiciones ambientales, ya que estas plántulas se encontraban a la intemperie y sin aporte externo de nutrientes (fertirrigación), disminuyendo entonces la disponibilidad y absorción de los mismos.

En este trabajo se observó que la simbiosis ectomicorrícica se establece en los sistemas radicales de plántulas de *N. nervosa* cultivadas en vivero, de forma natural (sin inoculación intencional) y entre los 6 meses y el año de edad, una vez finalizada la etapa de Rustificación, cuando se reduce significativamente el aporte de nutrientes (principalmente de N y P) y la frecuencia de riego. Esta tendencia acuerda con lo descrito por Martínez *et al.* (2007), quienes afirman que la introducción de un período de letargo (2 meses con baja fertilización) estimula significativamente la micorrización en las plantas de *P. ponderosa* inoculadas con *Rhizopogon roseolus*. En el ensayo realizado por Barroetaveña *et al.* (2009), se observa que las plántulas de *N. nervosa* de 6 meses de edad cultivadas en condiciones de vivero similares a las de este trabajo presentaron EcM, apenas terminada la etapa de Rustificación. Sin embargo, los porcentajes de colonización registrados por estos autores fueron sumamente bajos (2,8 a 5,9 %), pudiendo indicar que recién en ese momento se

establecía la simbiosis. Es probable que la micorrización en las plántulas de Raulf analizadas en este estudio se haya establecido próxima a la observación realizada a los 6 meses, y que el porcentaje de ápices ectomicorrícicos se haya incrementado progresivamente hasta el año de edad, momento en el que se detectó una elevada colonización (superior al 65 %). Son necesarios estudios con tiempos intermedios para confirmar el momento preciso en el que se establece la simbiosis.

Ha sido descrito por diferentes autores que la elevada concentración de fertilizantes utilizada en el cultivo en vivero inhibe o al menos reduce la colonización ectomicorrícica, dado que suele resultar tóxica para el hongo (Quoreshi 2003) o bien porque las plantas desarrolladas bajo estas condiciones aparentemente no necesitan de una asociación simbiótica para la captación de agua y nutrientes ya que los tienen en alta disponibilidad (Chakravarty & Chatarpaul 1990, Smith & Read 2008). Por ejemplo, Rincón *et al.* (2007) encontraron diferencias significativas en los porcentajes de colonización fúngica de plántulas de *Pinus* inoculadas con diferentes hongos ectomicorrícicos dependiendo del método de fertilización utilizado, siendo algunas especies fúngicas afectadas más negativamente por los fertilizantes que otras. Asimismo, Martínez *et al.* (2007) evaluaron la colonización micorrícica de plantas de *P. ponderosa* inoculadas con *R. roseolus* (un hongo ectomicorrícico frecuente en plantas de la familia Pinaceae) sometidas a 3 niveles de fertilización, y hallaron que el porcentaje de EcM parece aumentar a medida que disminuye la cantidad de fertilizantes (aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa). Estos autores concluyen que la micorrización es inhibida incluso utilizando el 50 % de las dosis de fertilizante empleadas generalmente en los viveros comerciales del lugar de estudio. Esta misma tendencia ha sido reportada por otros autores y en distintas especies, tales como *P. contorta*, *Picea glauca* y *Picea mariana* (Khasa *et al.* 2001, Smith & Read 2008). Este fenómeno explicaría los resultados obtenidos en este estudio para *N. nervosa* y los registrados por Barroetaveña *et al.* (2009) en la misma especie vegetal, según los cuales los hongos ectomicorrícicos forman esta simbiosis en el sistema radical de las plántulas al término de la Rustificación (Etapa 3), cuando se reduce el fertirriego.

Si consideramos que las plántulas de un año trasplantadas al cantero poseían porcentajes de colonización similares a los registrados para ese tiempo de observación en tubete (T₉), puede decirse que a los 18 meses ambos tratamientos presentaron una disminución en el porcentaje de raíces colonizadas por EcM, pudiendo deberse esta diferencia a distintos factores según la ubicación de la plántula. En el caso de las que permanecieron en el invernáculo, la observación a los 18 meses de edad se realizó luego de la

fertirrigación correspondiente a la Etapa de Crecimiento rápido aplicada al nuevo lote de plántulas (mientras que las utilizadas en este ensayo ya habían pasado por esta Etapa el año anterior), por lo que existe la posibilidad de que la elevada cantidad de fertilizantes a la que fueron sometidas nuevamente las plantas haya reducido o inhibido la colonización de los nuevos ápices radicales. Por otro lado, la disminución en la colonización ectomicorrícica en los ejemplares de Raúlí luego del trasplante coincide con los resultados obtenidos por Quoreshi (2003), quienes inocularon plántulas de *Picea mariana* con el hongo ectomicorrícico *Laccaria bicolor* y evaluaron el porcentaje de EcM según distintas dietas de fertilizantes antes y 18 semanas luego del trasplante. Estos autores observaron que para los 4 tratamientos de fertilizantes analizados, el porcentaje de colonización se redujo tras el trasplante en un 3 % a 45 %, dependiendo del tratamiento recibido y del lugar de implantación. En plantas leñosas, aproximadamente el 20 % de los productos carbonados sintetizados durante la fotosíntesis son transferidos al hongo simbiote (Hobbie & Hobbie 2006). En condiciones normales y como consecuencia de la simbiosis, la planta suele incrementar la tasa fotosintética para poder abastecer los requerimientos energéticos de ambos organismos. Sin embargo, bajo situaciones de estrés es posible que este costo energético sea demasiado elevado, generándose entonces una reducción en la tasa de crecimiento vegetal. Dado que la planta tiene la capacidad de redireccionar el flujo de C hacia los tejidos que más lo necesiten, frente a una disminución en la tasa de crecimiento utilizará el C disponible en subsistir, resultando en un menor aporte al hongo y por lo tanto una reducción en la colonización fúngica de las raíces (Martin *et al.* 1987, Smith & Read 2008, Buscot *et al.* 2000). Esta situación podría corresponder a la observada en las plántulas instaladas en el cantero, las que pasaron de encontrarse en un ambiente controlado, resguardado de los factores climáticos y con alta disponibilidad de nutrientes a estar en la intemperie, en condiciones naturales y sin aporte de fertilizantes. En este caso existe también la posibilidad de que el menor crecimiento de la planta esté relacionado con factores intrínsecas de la misma como respuesta a estar expuesta a los factores climáticos (radiación, heladas, viento, amplia variación de temperatura).

Otra explicación posible para la reducción en el porcentaje de micorrización observado al año y medio de edad y que aplica para ambos grupos de plantas (invernáculo y cantero), es que el análisis de las raíces se realizó en Abril, es decir en otoño, cuando la radiación solar y longitud de los días es menor y *N. nervosa* pierde sus hojas. Estos factores (menor radiación, días cortos) reducen la tasa de fotosíntesis (Martin *et al.* 1987), en especial la pérdida del follaje (Markkola *et al.* 2004, Pestaña *et al.* 2011), y por lo tanto la cantidad de C que la planta hospedadora invierte en la simbiosis, disminuyendo así la colonización

ectomicorrícica. En cualquier caso, al finalizar el efecto del factor que influenciaba negativamente la simbiosis, el porcentaje de EcM de las plántulas volvió a incrementarse a los dos años de edad.

En ningún momento del ensayo se observaron MA en los sistemas radicales de las plántulas analizadas. Este hecho coincide con lo citado por numerosos autores que han descrito a las especies del género *Nothofagus* como ectomicorrícicas y sin colonizaciones mixtas (Singer & Moser 1965, Singer 1971, Godoy *et al.* 1994, Flores *et al.* 1997, Godoy & Palfner 1997, Fontenla *et al.* 1998, Diehl 2006, Tedersoo *et al.* 2009, Mestre 2012).

POSIBLES FUENTES DE INÓCULO

La formación natural de EcM (sin inoculación intencional) en plantas de vivero es un fenómeno que ha sido descrito en la región (Barroetaveña *et al.* 2009) y en distintos lugares del mundo (Dahlberg & Stenstrom 1991, Cram *et al.* 1999, El Karkouri *et al.* 2005). Un interrogante común que surge a partir de este hecho es el origen del inóculo micorrícico. Barroetaveña *et al.* (2009) propusieron que, dado que el invernáculo donde desarrollaron el ensayo es abierto, la entrada de esporas pertenecientes a hongos ectomicorrícicos conducidas por el viento es una vía posible. Además, debido a que el agua utilizada para el riego de las plántulas es tomada de un arroyo que atraviesa un bosque de *Nothofagus*, es posible que ésta acarree propágulos. Por otro lado, El Karkouri *et al.* (2005) detectaron la presencia de 4 especies de hongos del orden Boletales que desarrollan EcM naturalmente en plántulas de *Pinus* bajo condiciones artificiales de vivero. Estos autores sugieren que el inóculo puede tener 2 fuentes posibles: un bosque natural de *Pinus* próximo o bien que existan propágulos de resistencia (micelio, esporas, rizomorfos, fragmentos de raíces micorrizadas) que permanecen en el invernáculo de una temporada a la próxima (de hecho hallaron una especie que había sido detectada en el mismo invernáculo 8 años antes del ensayo). Estos propágulos podrían encontrarse en los tubetes o en las herramientas utilizadas para la siembra y repique de las plántulas.

En el ensayo llevado a cabo en este estudio, también existen diferentes posibles fuentes de inóculo. Por ejemplo, sería factible que el inóculo micorrícico se hallara en la turba utilizada para el cultivo de las plántulas, ya que ésta es extraída de Tierra del Fuego, lugar donde existen bosques de *Nothofagus* y por lo tanto especies fúngicas asociadas a estos árboles. En el vivero del INTA EEA Bariloche, la turba es desinfectada (no esterilizada) antes de su uso (A. Martínez, *com. pers.*), pudiendo entonces quedar en ella hongos resistentes a este procedimiento capaces de formar micorrizas en el Raulí durante su cultivo en vivero. De

igual forma que lo descrito por Barroetaveña *et al.* (2009), sería probable también que el inóculo fúngico llegara a los tubetes por acción del viento, o bien a través de las herramientas utilizadas para la siembra y repique de las plántulas. Dado el pequeño tamaño de las esporas, éstas podrían ingresar al invernáculo de forma accidental con el calzado o la ropa, incluso con las semillas utilizadas para el cultivo de *N. nervosa*. Otra posible fuente de inóculo sería el agua de riego, aunque resultaría poco probable ya que el agua utilizada en el invernáculo para tal fin es extraída del Lago Nahuel Huapi (A. Martínez, *com. pers.*) y la posibilidad de que la misma acarree propágulos viables es sumamente reducida. Finalmente, debe analizarse la posibilidad de que las micorrizas observadas hayan sido formadas por hongos propios del invernáculo, es decir por aquellos que se encuentran asociados los elementos y herramientas de cultivo o al sistema de riego. Tal como describió El Karkouri *et al.* (2005), los propágulos podrían encontrarse en los tubetes (los cuales son limpiados y desinfectados, pero no esterilizados –A. Martínez, *com. pers.*), en el sistema de riego o en la misma infraestructura. En el caso de las plántulas trasplantadas al cantero, la fuente de inóculo micorrízico es el mismo suelo, que posee comunidades naturales de hongos, muchos de los cuales deben ser capaces de formar este tipo de simbiosis en *N. nervosa*.

DIVERSIDAD Y ABUNDANCIA DE ECTOMICORRIZAS EN EL VIVERO

A partir del estudio morfológico y molecular de los ectomorfortipos hallados en *N. nervosa*, pudo determinarse que existen 2 especies fúngicas dominantes. Una pertenece al Phylum Basidiomycota y es afín a la especie *T. ellisii* (Figura 3.10), mientras que la segunda está incluida en el Phylum Ascomycota y los taxones filogenéticos más próximos a la misma correspondieron a hongos micorrízicos no descritos hasta el momento, indicando que posiblemente sea una especie nueva. Dada su capacidad de colonizar tanto los ejemplares de Raúlí que permanecen en el invernáculo como aquellos que fueron llevados al cantero, y de persistir en el tiempo con valores de colonización relativamente altos, es evidente que ambas especies están adaptadas a las condiciones de vivero. Se han descrito otras especies de EcM capaces de desarrollarse apropiadamente bajo las condiciones artificiales de cultivo en vivero (principalmente bajo altas concentraciones de fertilizantes), tales como *T. terrestres*, *C. geophilum* y distintas especies comprendidas en los géneros *Laccaria*, *Hebeloma*, *Rhizopogon* y *Suillus* (Chakravarty & Chatarpaul 1990, Khasa *et al.* 2001, El Karkouri *et al.* 2005, Barroetaveña *et al.* 2009, Menkis & Vasaitis 2011).

Como se mencionó anteriormente, distintos autores han sugerido que las condiciones de vivero (fertirrigación, control mecánico y químico de malezas, sistemas radicales

contenidos en tubetes, sustrato muy diferente al suelo) afectan negativamente el desarrollo de muchos hongos micorrícicos y el establecimiento de la simbiosis, favoreciendo entonces la colonización por parte de algunas pocas especies tolerantes a estas condiciones (El Karkouri *et al.* 2005, Rincón *et al.* 2007, Barroetaveña *et al.* 2009, Menkis & Vasaitis 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo acuerdan con estos estudios, ya que se hallaron sólo 2 especies de hongos formadores de EcM colonizando las plántulas de *N. nervosa* en el vivero del INTA EEA Bariloche, siendo *Tomentella ellisii* significativamente más abundante que la EcM *Ascomicética* sp. 1 en los distintos tiempos de observación y tanto en el invernáculo como en el cantero. Asimismo, Barroetaveña *et al.* (2009) observaron una tendencia similar entre las 2 especies fúngicas que colonizaron las raíces de las plántulas de *N. nervosa*, *N. obliqua* y *N. pumilio* cultivadas en el invernáculo de la Estación Agroforestal INTA Trevelin. Estos autores hallaron que la especie *T. terrestris* era más abundante que *C. geophilum*. Del mismo modo, Menkis & Vassaitis (2011) describen en su estudio sobre EcM asociadas a plántulas de *P. sylvestris* cultivadas en vivero, 9 morfotipos de los cuales sólo 3 son abundantes, siendo las especies que los forman *T. terrestris* (39.7 %), *Hebeloma* sp. (17.8 %) y *S. luteus* (6.1 %). Estos autores atribuyen la baja diversidad de ectomorfofitos a la predominancia de *T. terrestris*, que ha sido considerada como excelente competidora bajo las condiciones de vivero.

Luego de ser trasplantadas al cantero, se observan en las plántulas de *N. nervosa* ectomorfofitos no descriptos previamente y en baja frecuencia (Tabla 3.2). Esto indica que al encontrarse en el suelo, expuestas a un inóculo natural, las plantas establecen relaciones simbióticas con hongos diferentes a los que colonizaron sus raíces en el invernáculo. En las plántulas de 2 años de edad se identificaron 4 especies ectomicorrícicas ausentes en el invernáculo, 2 basidiomicéticas pertenecientes al orden Agaricales (*Rickenella* sp. 1 y *Hebeloma cavipes*) y 2 ascomicéticas incluidas en el orden Pezizales (*Peziza* sp. 1 y *Peziza* sp. 2). Estos resultados acuerdan con otros autores, quienes han observado que las EcM adaptadas a las condiciones de vivero suelen permanecer en el sistema radical de las plantas durante un tiempo posterior al trasplante, pero son gradualmente reemplazadas por micorrizas nativas propias del lugar donde se ha establecido la plántula y mejor adaptadas a las nuevas condiciones a las que está sujeta la misma (Dahlberg & Stenstrom 1991, Quoreishi 2003). Por ejemplo, el hongo *T. terrestris* ha sido descripto como una especie cosmopolita y sumamente frecuente en sistemas de vivero, pero poco competitiva en ambientes naturales, siendo desplazada fácilmente por otros hongos ectomicorrícicos (Colpaert 1999, Khasa *et al.* 2001, Menkis & Vasaitis 2011). Es decir que al cambiar las condiciones ambientales se alteran

las comunidades micorrícicas asociadas a las plantas y comienza así una sucesión de especies que estará determinada por los factores bióticos y abióticos donde será establecida la misma (Mikola 1989, Bowen 1994, Markkola *et al.* 2004, Rincón *et al.* 2007, Pestaña *et al.* 2011).

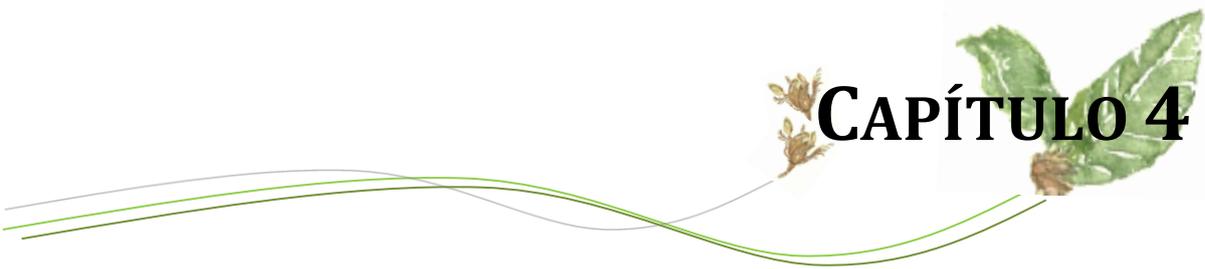
Entre las especies fúngicas identificadas en este estudio, se hallaron 3 que no se encuentran relacionadas con la formación de EcM. La presencia de estos hongos asociados al ectomorfo tipo podría explicar que en los geles correspondientes a los productos de PCR obtenidos para diferentes muestras fuera frecuente observar más de una banda, lo cual coincide con lo descrito por otros autores (El Karkouri *et al.* 2005): una banda podría corresponder al hongo que forma la EcM y la otra a algún tipo de hongo asociado al ectomorfo tipo (endófito, saprobio, patógeno). Entre estas especies no micorrícicas se encuentra *Cryptococcus victoriae*, una levadura que ha sido registrada como abundante en las aguas del Lago Nahuel Huapi (Brandão *et al.* 2011), y es probable que se haya incorporado al sistema de cultivo a través del riego. No es la primera vez que esta levadura es citada en asociación al sistema radical de especies vegetales. Vaz *et al.* (2011) menciona que aislaron esta especie en diferentes sustratos de la Antártida (guano de pingüino, suelo, sedimentos y agua), pero en especial de la rizósfera de la gramínea *Deschampsia antarctica*. Por otra parte, distintas especies incluidas en los géneros *Neonectria* y *Dendryphion* han sido documentadas como patógenas en distintas especies de plantas, tales como *Vitis* spp. (Halleen *et al.* 2006) y *Persea americana* (Lenc *et al.* 2011). Entre las especies patógenas de estos géneros se encuentran *N. radicola* (Halleen *et al.* 2004, Zilberstein *et al.* 2007) y *D. nanum* (Vaartnou 1974, Lenc *et al.* 2011). Menkis & Vasaitis (2011) afirman que en los sistemas de vivero existen distintos hongos que suelen no causar síntomas visibles en las plántulas. Por ejemplo, estos autores aislaron numerosas cepas del hongo patógeno *N. macrodidyma* a partir de ápices radicales de *Pinus* colonizados por EcM y de aspecto saludable.

CONCLUSIONES PARCIALES

En este Capítulo se describió el comportamiento micorrícico de *N. nervosa* durante su cultivo en vivero. Se observó que los ejemplares de un año de edad estaban colonizados por EcM formadas por las especies *Tomentella ellisii* y EcM Ascomicética sp. 1, siendo la primera la más abundante. Dado que no se realizó una inoculación previa, el inóculo micorrícico estaría asociado al sistema de cultivo (en tubetes, herramientas, riego) o al aporte externo accidental (esporas que ingresan al invernáculo con el viento, el calzado o el suelo). Las EcM formadas por estos hongos permanecen en las raíces de las plántulas durante los 2 años de cultivo, tanto en el invernáculo como en el cantero.

En los ejemplares de *N. nervosa* de 2 años de edad trasplantados al cantero se registraron tanto las EcM que se habían establecido en su sistema radical en el invernáculo, como especies de hongos ectomicorrícicos nuevas (*Hebeloma cavipes*, *Peziza* sp. 1, *Peziza* sp. 2 y *Rickenella* sp. 1). El desarrollo de estas EcM está probablemente asociado a la presencia del inóculo adecuado en el suelo del vivero del INTA EEA Bariloche. En ningún caso se registraron MA. En base a estos resultados puede decirse que las plántulas de Raulí que son llevadas a campo posiblemente presenten EcM en sus sistemas radicales, las cuales permanecen en él al menos durante la primera etapa de establecimiento de la plántula.

La información presentada en este Capítulo es de relevancia para el cultivo de *N. nervosa* en la región. Ampliar los aspectos descriptos en esta sección de la Tesis (origen del inóculo, momento en el que se establece la simbiosis, beneficios que otorgan las EcM a las plántulas, entre ellos) permitirá plantear pautas de manejo que incluyan las micorrizas como parte integral del desarrollo de las plantas durante los procesos de domesticación de ésta y otras especies nativas de importancia forestal en Patagonia.



CAPÍTULO 4

MICORRIZAS EN INDIVIDUOS DE *NOTHOFAGUS* *NERVOSA* PERTENECIENTES A BOSQUE NATIVO Y PROVENIENTES DEL PROCESO DE DOMESTICACIÓN

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DE IDENTIFICAR Y DESCRIBIR LAS MICORRIZAS EN AMBIENTES NATURALES

Dada su capacidad de incrementar la aptitud y productividad vegetal (Capítulo 1), los hongos micorrícicos han sido el objetivo de distintos programas de investigación en los que se pretende utilizar estos organismos para recuperar áreas degradadas o para incrementar la productividad de especies de interés comercial. Estas prácticas se han construido en base al conocimiento empírico, y debido a ello se sabe desde hace tiempo que es necesario avanzar en la descripción de la bioecología y de la diversidad taxonómica y funcional de estos hongos simbioses (Brundrett *et al.* 1996). Conocer el taxón al que pertenece un hongo es importante porque brinda información sobre su eco-biología y permite acceder a la información disponible para esa especie fúngica y/o para taxones afines (ej. capacidad para sintetizar enzimas, solubilizar fosfatos, actuar como patógeno o promotor de crecimiento, formar micorrizas o actuar como descomponedores). De esta forma, la caracterización taxonómica de los organismos presentes en un ambiente particular representa el marco adecuado en el cual basar posteriores investigaciones ecológicas y aplicadas.

Las ectomicorrizas (EcM) se encuentran aproximadamente en el 10 % de las plantas vasculares. Este tipo de micorrizas se asocian principalmente en especies arbóreas, aunque también pueden hallarse en algunos arbustos y herbáceas (ej. especies de los géneros *Dryas*, *Helianthemum*, *Polygonum*, *Kobresia* y *Campomanesia*) (Moreira & Siqueira 2002, Wang & Qiu 2006, Smith & Read 2008). A nivel global, la superficie ocupada por estas especies arbóreas y la importancia económica de las mismas como recursos forestales y madereros hacen de esta simbiosis una de las más importantes conocidas. Entre las familias de plantas que comprenden especies generalmente colonizadas por EcM y que poseen gran relevancia en la industria maderera, se encuentran la familia Pinaceae (95 % de las especies forman EcM), que son el principal componente de los bosques boreales del hemisferio Norte, y Nothofagaceae, especies dominantes o co-dominantes en los bosques templado-fríos del hemisferio Sur. En la actualidad se estima que existen aproximadamente 5000-6000 especies de hongos capaces de formar EcM, perteneciendo la mayor parte de ellas a los Phylum Basidiomycota y Ascomycota (Moreira & Siqueira 2002, Smith & Read 2008, Tedersoo *et al.* 2010).

Como se menciona en el Capítulo 1, las especies comprendidas en el género *Nothofagus* presentan colonización ectomicorrícica elevada en todos los casos estudiados hasta el momento, generalmente superior al 70 %. Sin embargo, son escasos los trabajos que han descrito la diversidad de las comunidades de hongos ectomicorrícicos asociados a estas especies en ambientes naturales. En Australia, Tedersoo *et al.* (2010) estudiaron las

comunidades de EcM asociadas a *N. cunninghamii* y compararon la diversidad de hongos ectomicorrícicos entre las raíces de plántulas desarrolladas sobre madera y el sistema radical de adultos de la misma especie. Estos autores observaron que las comunidades de hongos formadores de EcM eran diferentes entre las raíces desarrolladas sobre madera y aquellas formadas en el suelo del bosque, tanto a nivel de especies como de linaje filogenético (ej. taxones fúngicos tales como *Cortinarius* y el complejo *Russula-Lactarius* generalmente no colonizaban las raíces de las plántulas desarrolladas sobre madera). En Patagonia, Nouhra *et al.* (2012) describieron la diversidad de esporocarpos hipógeos de hongos formadores de EcM en bosques de *N. dombeyi* y *N. pumilio*. Esos autores hallaron un total de 27 especies de hongos pertenecientes a los Phyla Basidiomycota, Ascomycota y Glomeomycota, incluyendo el primero 9 géneros y los siguientes 2 y 1, respectivamente. Se desconoce hasta el momento la diversidad taxonómica y funcional de las EcM presentes en las raíces de *N. nervosa* y la capacidad de esta especie de desarrollar micorrizas arbusculares (MA) en alguna de sus etapas de desarrollo (plántula, joven, adulto).

TIPOS EXPLORATORIOS DE ECTOMICORRIZAS

Como se mencionó en la Introducción (Capítulo 1), una raíz colonizada por EcM se caracteriza por presentar tres componentes fúngicos estructurales: un manto que cubre el exterior de los ápices radicales; un sistema de hifas intrarradicales que se desarrollan entre las células epidérmicas y corticales denominada Red de Hartig y que constituye la interfase entre el hongo y la planta, donde ocurre el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses; y un sistema de hifas que se prolongan desde la superficie del ectomorfito hacia el sustrato, denominado micelio extrarradical (hifas emanantes y rizomorfos) (Peterson *et al.* 2004, Smith & Read 2008). El manto por sí solo tiene un área de contacto limitada con el sustrato, mientras que las hifas emanantes y rizomorfos incrementan significativamente el volumen de sustrato explorado y explotado por el hongo (Read 1992, Smith & Read 2008). Por ejemplo, se ha observado que los rizomorfos de las EcM formadas por el hongo *Pisolithus tinctorius* pueden interconectar plántulas de *Pinus* a ~42 cm de distancia (Schramm 1966). La importancia del micelio extrarradical en el transporte de nutrientes y agua ha sido documentada por diferentes autores (Kammerbauer *et al.* 1989, Smith & Read 2008), incluso se ha sugerido que la adquisición y transporte de estos elementos es llevada a cabo principalmente por estas estructuras (Unestam & Sun 1995, Raidl 1997, Smith & Read 2008).

Por lo tanto, la presencia, distribución y diferenciación del micelio extrarradical está relacionada con la diversidad funcional de las EcM y puede ser utilizada para distinguir las en grupos con diferentes estrategias de exploración y explotación del sustrato. En base a ello,

Agerer (2001) ha sugerido una clasificación de EcM según Tipos exploratorios. Ésta nos permite clasificar los ectomorfitos presentes en una muestra según las características macromorfológicas de los ectomorfitos y nos brinda información sobre los posibles patrones funcionales de exploración del sustrato y explotación de nutrientes. Los Tipos exploratorios descritos por este autor se detallan a continuación y se esquematizan en la Figura 4.1:

Tipo 1: *Exploración por contacto.*- En este grupo se encuentran aquellas EcM que presentan mantos lisos, sin estructuras extrarradicales o con escasas hifas emanantes, tales como algunas formadas por hongos de los géneros *Lactarius*, *Russula* y *Tomentella*. Generalmente, estos ectomorfitos se encuentran en íntimo contacto con la fuente de nutrientes, tales como hojas y madera en descomposición (Brand 1991b).

Tipo 2: *Exploración a corta distancia.*- Estas EcM se caracterizan por presentar abundantes hifas emanantes en la mayor parte de su superficie, pero no forman rizomorfos. La mayor parte de las EcM formadas por hongos del Phylum Ascomycota presentan esta estrategia, encontrándose entre ellas las asociadas a los géneros *Genea* y *Tuber*. El miembro más conocido de este grupo es *Cenococcum geophilum*. Entre los basidiomicetes, este Tipo exploratorio ha sido observado en micorrizas formadas por hongos incluidos en los géneros *Descolea*, *Hebeloma*, *Inocybe* y *Tomentella*.

Tipo 3: *Exploración a distancia moderada.*- Las EcM presentes en este grupo forman rizomorfos de diferentes tipos, e incluyen algunas de las formadas por hongos de los géneros *Cortinarius*, *Hysterangium*, *Lactarius*, *Thaxtrogaster* y *Tricholoma*, entre otros.

Tipo 4: *Exploración a larga distancia.*- Las EcM de este grupo suelen presentar ramificación monopodial, coraloide o tuberculada y mantos lisos, con pocos rizomorfos pero robustos y diferenciados. Muchos hongos ectomicorrícicos de importancia económica y ecológica se encuentran en esta categoría, entre ellos: *Boletus*, *Paxillus*, *Pisothus*, *Rhizopogon* y *Suillus*.

Tipo 5: *Exploración "Pick a back".*- Generalmente asociado a hongos de la familia Gomphidiaceae (Phylum Basidiomycota, Orden Boletales). Estos hongos pueden formar estructuras típicas de EcM y en ocasiones ectendomicorrizas y haustorios en el hospedador. Este Tipo exploratorio difiere de los demás en que los hongos que lo forman son capaces de desarrollarse dentro de los rizomorfos y mantos de otras EcM.

La estrategia de absorción de nutrientes parece ser diferente entre los Tipos exploratorios de EcM. Por ejemplo, se ha demostrado que especies de *Russula* y *Lactarius*, que generalmente forman ectomorfitos Tipo 1 (exploración por contacto), poseen la habilidad de producir enzimas extracelulares (ej. fenoloxidasas) y de degradar lignina. Por el contrario,

la mayor parte de los miembros del orden Boletales, que no poseen esta capacidad, desarrollan ectomorfotipos Tipo 4 (exploración a larga distancia), sugiriendo que una mayor exploración y explotación del sustrato compensa la incapacidad de sintetizar enzimas extracelulares que contribuyan a la degradación de sustancias complejas (Agerer 2001, Smith & Read 2008).

Se ha demostrado que el efecto de las EcM sobre el incremento de la aptitud vegetal y de la adquisición de nutrientes difiere entre especies de hongos e incluso entre cepas de una misma especie (Burgess *et al.* 1993, Dell *et al.* 1994). Es evidente que la cantidad y diferenciación del micelio extrarradical contribuyen a esta variabilidad y constituyen factores que influyen en el desarrollo y rendimiento de la especie arbórea (Thomson *et al.* 1994, Agerer 2001). Por este motivo, es importante tener en cuenta esta información durante los programas de domesticación de especies forestales en las que se desee implementar la aplicación de EcM.

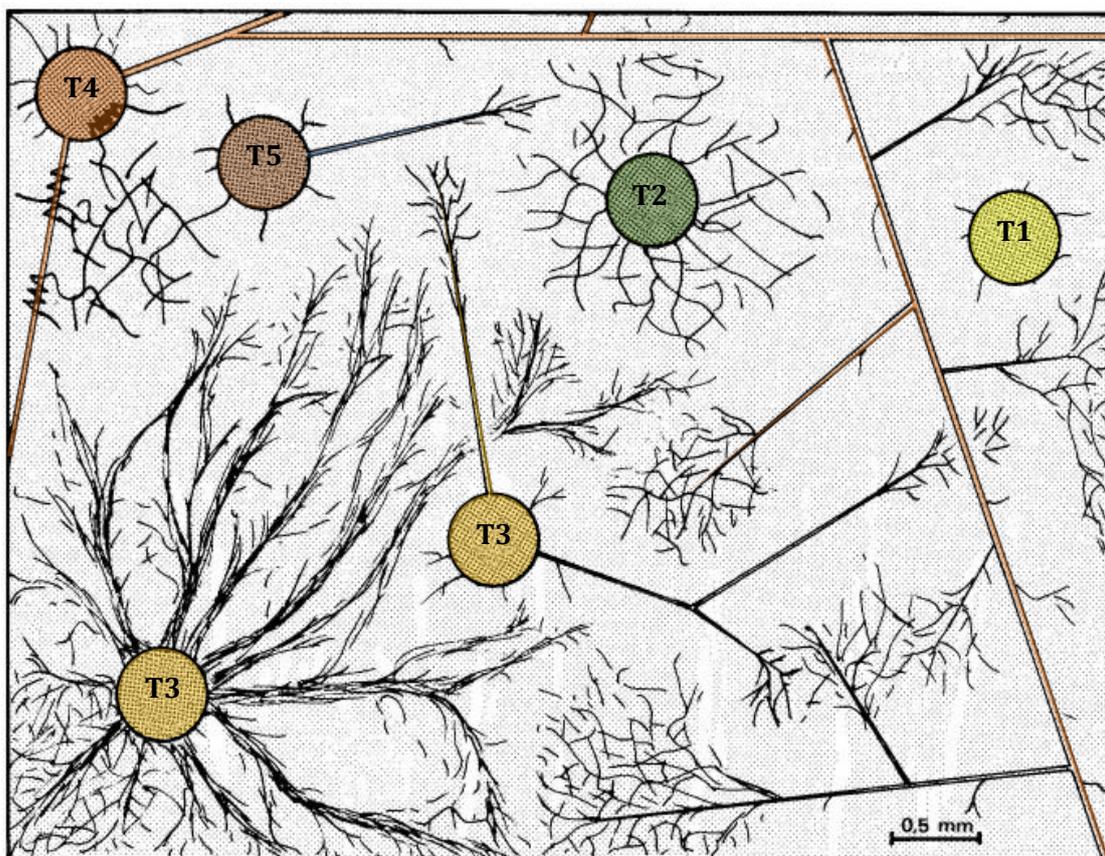


Figura 4.1.- Esquema de los diferentes Tipos exploratorios de ectomicorrizas. Los círculos representan cortes transversales de ápices radicales colonizados por EcM de algunos de los siguientes tipos exploratorios: **T1)** Exploración de contacto; **T2)** Exploración de corta distancia; **T3)** Exploración de media distancia; **T4)** Exploración de larga distancia; **T5)** Exploración tipo "Pick a back" (modificado de Agerer 2001).

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ECTOMICORRIZAS

La caracterización e identificación de los hongos formadores de EcM es uno de los pasos más importantes para poder describir la diversidad y comprender el funcionamiento de esta simbiosis en ecosistemas naturales (Brand 1992, Smith & Read 2008). Tradicionalmente, la identificación de EcM se realizaba en base a las características macro y micromorfológicas de los ectomorfortipos y de los hongos que los forman, encontrándose entre ellas el tipo y forma de ramificación del ectomorfortipo, la presencia de fíbulas y/o de anastomosis entre las hifas y la presencia y la forma de cistidios en el manto, grosor de las hifas, de sus paredes y tabiques (Agerer 1998-2006). Entre las características más importantes a tener en cuenta para tal fin se hallan la morfoanatomía del manto y del micelio extrarradical, que suelen ser similares a nivel del género fúngico que forme el ectomorfortipo (Smith & Read 2008). Existen dos tipos de mantos principales descritos por Agerer (1998-2006): plectenquimatoso o pseudoparenquimatoso. Los primeros corresponden a aquellos en los que las hifas que lo conforman pueden diferenciarse individualmente, mientras que en los pseudoparenquimatosos esto no es posible debido a que las hifas han incrementado su diámetro considerablemente o bien desarrollaron células de forma regular o irregular dando lugar a un patrón similar al de un parénquima. La importancia de considerar la presencia, el tipo y la forma del micelio extrarradical para la clasificación de las EcM radica en que estas estructuras son fácilmente visibles al microscopio estereoscópico y en que están relacionadas con la estrategia de exploración del sustrato (Agerer 2001), tal como se describió anteriormente. Sin embargo, la aproximación taxonómica basada en caracteres morfoanatómicos presenta algunas dificultades (Iotti & Zambonelli 2006). Una de ellas es que en ocasiones las diferencias entre dos ectomorfortipos correspondientes a la misma especie pueden ser tan marcadas como las observadas entre ectomorfortipos formados por especies fúngicas distintas (De la Bastide *et al.* 1995). Además, el estudio tradicional de ectomorfortipos basado en su morfoanatomía es una labor que requiere gran cantidad de tiempo y resulta poco eficiente cuando se pretende examinar gran número de muestras, impidiendo poder realizar estudios de comunidades a gran escala (Horton & Bruns 2001, Gomes *et al.* 2002, Martin 2007, Tedersoo *et al.* 2010).

Si bien la identificación de hongos ectomicorrícicos también se realiza frecuentemente en base a los cuerpos fructíferos asociados a la especie en estudio (ej. Nouhra *et al.* 2011), el desarrollo de estas estructuras está fuertemente influenciado por distintos factores ambientales, y ha sido demostrado que no existe una relación directa entre el número o las especies de hongos que forman cuerpos fructíferos y la riqueza o diversidad de EcM en las raíces. De hecho, algunos autores han observado que la mayor parte de las

especies fúngicas que fructifican abundantemente no se encuentran entre las más frecuentes en el sistema radical de la especie en estudio, y a su vez las especies formadoras de ectomorfotipos más abundantes no están bien representadas por los cuerpos fructíferos que se hallan en el suelo (hipógeos) o sobre la superficie (epígeos) (Horton & Bruns 2001, Gomes *et al.* 2002, Tedersoo *et al.* 2010).

Se han desarrollado distintos métodos de biología molecular que permiten identificar de forma fiable y rápida los hongos ectomicorrícicos, y esto ha revolucionado el estudio de la diversidad y ecología de EcM. En términos generales, la caracterización molecular de ápices colonizados por EcM se basa en amplificar el ADN fúngico y obtener la secuencia nucleotídica del hongo que lo forma. También es frecuente utilizar técnicas de polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) que permitan analizar la similitud entre los hongos que forman los ectomorfotipos y así reducir el número de secuencias necesarias para describir la comunidad ectomicorrícica en estudio (Horton & Bruns 2001, Gomes *et al.* 2002, Martin 2007, Tedersoo *et al.* 2010, Mestre 2012). El fragmento utilizado más frecuentemente en estos estudios es el ITS (*Internal Transcribed Spacer* o espaciador interno transcrito, en español), región intergénica que se encuentra entre los genes ribosomales de la subunidad menor (SSU) y mayor (LSU) y que contiene dos regiones no-codificadoras separadas por el gen 5.8S (Figura 4.2). Esta región resulta adecuada para el estudio taxonómico de EcM porque suele ser variable entre distintas especies fúngicas, pero en general se encuentra muy conservada intraespecíficamente (Gardes & Bruns 1993, Horton & Bruns 2001, Gomes *et al.* 2002). En los hongos, este fragmento suele poseer entre 650 y 900 pares de bases (pb) y es amplificado con los *primers* universales ITS1 e ITS4 (White *et al.* 1990), o con los *primers* ITS1F (específico para hongos) e ITS4B (específico para basidiomicetes). Dado que con el par de *primers* ITS1-ITS4 es posible amplificar también del ADN de la planta y que el primer ITS4B restringe en gran medida la amplificación de hongos ascomicéticos que podrían ser ectomicorrícicos, suele ser conveniente utilizar el par ITS1F-ITS4 (Gardes & Bruns 1993).

Según diferentes autores, la forma más conveniente de analizar las comunidades de hongos formadores de EcM en ambientes naturales es utilizar una combinación de técnicas que consista en realizar clasificación morfoanatómica de los ectomorfotipos (basada por ejemplo en características macromorfológicas y tipos exploratorio -Agerer 2001-) y finalmente secuenciar ejemplares de cada uno de los grupos conformados. De esta forma es posible analizar un gran volumen de muestras en menor tiempo y con un elevado grado de fiabilidad (Horton & Bruns 2001, Gomes *et al.* 2002, Martin 2007, Tedersoo *et al.* 2010).

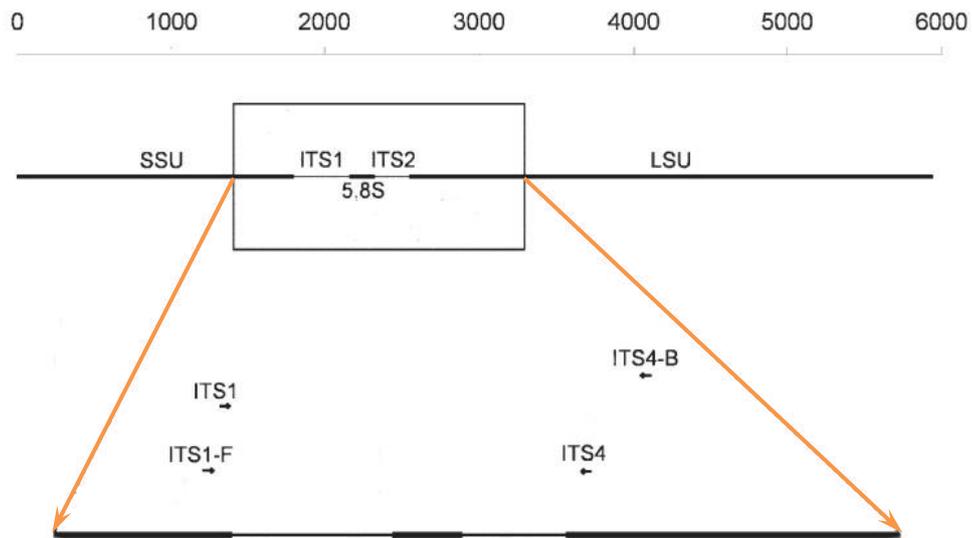


Figura 4.2.- Diagrama de la región ITS y ubicación de los primers generalmente utilizados para estudiar la diversidad de EcM.

OBJETIVO

Describir el comportamiento micorrícico de *N. nervosa* e identificar los hongos ectomicorrícicos asociados a individuos nativos y a ejemplares cultivados en vivero y llevados a campo bajo dos escenarios diferentes: bosque nativo y plantación de pinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREOS

Se estudiaron las EcM asociadas a *N. nervosa* en dos estaciones del año. Los muestreos se realizaron en otoño y primavera de 2008 en un bosque nativo mixto de *N. nervosa*, *N. obliqua* y *N. dombeyi* de la región de Yuco y en una plantación de *Pinus* ubicada en Meliquina (Capítulo 1). En cada muestreo se tomaron muestras de los sistemas radicales y el suelo asociado de 5 árboles de *N. nervosa* pertenecientes a cada una de las siguientes categorías de edad: plántulas nativas (Pln – ejemplares de no más de 50 cm de alto de aproximadamente 2-5 años de edad), jóvenes nativos (Jvn - de altura equivalente a los comprendidos en los ensayos de procedencias y de aproximadamente 10-15 años), adultos nativos (Adn – individuos que presentan las características de árboles maduros tales como corteza estriada y altura superior a 10 m) y jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados bajo bosque nativo (JvDom-n – 11 años de edad) y en la plantación de coníferas exóticas (JvDom-e – 10 años de edad) (25 individuos en total). Los ejemplares muestreados se encontraban a una distancia superior a 25 m. A lo largo de este trabajo de Tesis se utilizará

esta clasificación por categorías de edad y la nomenclatura correspondiente (Pln, Jvn, Adn, JvDom-n, JvDom-e) para referirse a las mismas.

Para tomar las muestras se retiró la capa superficial de hojarasca y se extrajeron con una sacabocado los primeros 30 cm de suelo. Se muestrearon 3 sacabocados por individuo equidistantes entre sí y a una distancia del tronco no mayor de 50 cm en los adultos y de 30 cm en los jóvenes (submuestras). En el caso de las plántulas, los sistemas radicales fueron extraídos en forma completa (Figura 4.3). Las submuestras fueron colocadas en bolsas de plástico individuales, transportadas al laboratorio y conservadas a 4 °C hasta su procesamiento. En caso de ser necesaria mayor cantidad de material para análisis moleculares se realizaron *a posteriori* muestreos complementarios en las mismas estaciones.



Figura 4.3.- Muestreo de raíces de *Nothofagus nervosa*. **a)** Sacabocado utilizado para tomar las submuestras correspondientes a individuos jóvenes y adultos; **b)** Extracción completa de la plántula.

DESCRIPCIÓN DE LAS COMUNIDADES DE ECTOMICORRIZAS

Cuantificación, clasificación y caracterización de ectomorfortipos

Para la cuantificación y análisis de EcM en *N. nervosa* se utilizaron las raíces frescas contenidas en cada una de las submuestras, que fueron analizadas por separado. Para obtener las raíces se tamizó cada submuestra con una malla de 5 mm para separarlas del suelo circundante y se lavaron las mismas con abundante agua corriente.

Para detectar la presencia de ectomorfortipos en los ápices se observaron cuidadosamente las raíces, primero a ojo desnudo y luego bajo microscopio estereoscópico

(Olympus SZ30). En caso de observarse EcM la metodología utilizada fue la misma que la descrita en el Capítulo 3, y se resume a continuación:

- a) Bajo microscopio estereoscópico se reconocieron los distintos ectomorfotipos presentes en las raíces de *N. nervosa* y se caracterizaron morfológicamente según el tipo de ramificación, aspecto y color del manto, presencia de hifas emanantes y rizomorfos y color de las mismas (Agerer 1998-2006). En base a estas características se formaron grupos de afinidad morfológica. Se realizó una descripción de cada grupo de afinidad morfológica, se fotografiaron los ectomorfotipos tal como sugiere (Agerer 1998-2006) y se conservaron representantes de los grupos registrados en los distintos individuos para cada categoría de edad en tubos plásticos de 1,5 mL a -20 °C para posteriores análisis morfológicos y/o moleculares.
- b) Se determinó el Tipo exploratorio al que pertenecía cada uno de los grupos de afinidad morfológica definidos anteriormente en base a la presencia, el tipo y abundancia del micelio extrarradical, tal como sugiere Agerer (2001).
- c) Para cuantificar el porcentaje de colonización total (número de puntas colonizadas por hongo ectomicorrícicos respecto del total de puntas cuantificadas) se utilizó el método de grilla descrito por Grand & Harvey (1982). Brevemente, este consistió en colocar las fracciones de las raíces de forma aleatoria sobre una placa de Petri y una grilla cuadrículada de 1 x 1 cm en la base. En el lugar donde cada porción de la raíz se superponía con una de las líneas verticales de la grilla, se cuantificó el número de puntas colonizadas por el hongo. Luego, la placa se giraba 90° y volvían a cuantificarse el número de puntas con EcM que intersectaban las líneas verticales (Brundrett *et al.* 1996). El porcentaje de colonización fue calculado a partir del número de puntas con EcM respecto del número total de puntas cuantificadas. Se cuantificaron al menos 250 intersecciones en cada submuestra. En las plántulas y en aquellos individuos para los cuales se obtuvo una menor cantidad de raíces se cuantificaron las puntas colonizadas por hongos ectomicorrícicos en la totalidad de la muestra.
- d) Luego de girar la placa de Petri se realizó una cuantificación específica para cada grupo de afinidad morfológica, que consistió en registrar el número de puntas correspondientes a cada grupo de ectomorfotipos. Esta información fue utilizada para calcular la abundancia relativa de cada grupo de ectomorfotipos. Se incluyó en la categoría "Otros" aquellos ápices ectomicorrícicos que aparecieron poco frecuentemente o no pudieron ser incluidos en los grupos morfológicos previamente conformados.
- e) Para los ectomorfotipos más abundantes o ampliamente distribuidos, se complementó la descripción macromorfológica con una caracterización micromorfológica. Se consideraron

como abundantes los grupos que presentaron una frecuencia relativa igual o superior al 5 % en alguna de las dos estaciones (otoño o primavera), y como ampliamente distribuidos aquellos que estuvieron presentes en más del 50 % de los ejemplares. Para el análisis microscópico, se utilizaron ectomorfotipos frescos. Se hicieron preparados permanentes colocando los ectomorfotipos enteros y cortes de los mismos realizados a mano alzada sobre un portaobjetos en una solución de Poli-vinil alcohol (PVA). Una vez colocado el cubreobjetos se aplastaron ligeramente los ectomorfotipos y las fracciones de los mismos y se observaron al microscopio óptico con aumento de 400 y 1000x. Se registró y fotografió el tipo de manto y el color de las hifas que lo formaban, la presencia, color y morfología de hifas emanantes y rizomorfos, y la presencia de cistidios y fíbulas (Agerer 1998-2006). Para caracterizar microscópicamente los grupos de afinidad morfológica se procuró utilizar ectomorfotipos correspondientes a diferentes categorías de edad.

Identificación molecular de ectomicorrizas

Se planteó obtener al menos 2 secuencias para cada grupo de ectomorfotipos de afinidad morfológica. Para identificar los hongos formadores de EcM se probaron diferentes protocolos de extracción, amplificación y purificación. La metodología que se utilizó se resume a continuación y corresponde a la detallada en el Capítulo 3:

- a) *Extracción de ADN genómico*: Se utilizaron ápices frescos y conservados en tubos plásticos de 1,5 mL a -20 °C y la técnica descrita por Bent & Taylor (2010) modificada. Ésta consistió en añadir 38 µL de buffer TE (Anexo II) y 12 µL de una solución de Proteinasa K de 3,24 mg/mL TE (50 µL finales) a los tubos conteniendo 1-5 ectomorfotipos (se utilizó más de un ápice cuando el ectomorfotipo era ramificado y existía certeza de que estuvieran formados por el mismo hongo). Luego se agitaron las muestras en *vortex* a máxima velocidad por 2 min e incubaron en baño termostático por 3 hs a 55 °C y luego por 1 h a 75 °C. Se purificó el ADN extraído con cloroformo-isoamílico en proporción 24:1 y luego con etanol 70 %. Se resuspendió el *pellet* en 20 µL de agua MiliQ estéril.
- b) *Amplificación y secuenciación*: Se amplificó la región ITS utilizando los *primers* ITS1F e ITS4 (Sigma). La reacción de PCR (Multigene, Labnet) fue realizada en 50 µL según las siguientes concentraciones: 6 mM MgCl₂, 0,32 mM dNTPs, 0,2 µM de cada primer, 0,06 mg/ml albúmina de suero bovino (BSA), 1U Taq polimerasa (Invitrogen), 1X *buffer* de reacción y 5 µL de ADN de dilución: 1:50, 1:100 o 1:200 v/v (ADN stock/agua estéril), dependiendo de la muestra. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 55 °C y 70 s a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis

en geles de agarosa 1,4 % (p/v), teñidos con GelRed (Biotium) y observados en transiluminador con luz UV (DNR Minibis Pro). Los productos de PCR que presentaran una única banda fueron purificados (kit purificación Bioneer) y enviados a secuenciar con el *primer* ITS1F por la Unidad de Genómica del INTA Castelar (Secuenciador ABI 3700) y la empresa MACROGEN, Seúl, Corea.

- c) *Análisis filogenéticos*: Se utilizó el programa MEGA4 (<http://www.megasoftware.net>) para corregir, alinear y realizar análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas obtenidas. Para identificar el taxón al que correspondían las secuencias, éstas fueron comparadas con las disponibles en la base de datos públicos GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Los árboles filogénicos se realizaron en base al algoritmo Neighbor Joining y al modelo Kimura de 2 parámetros.

A diferencia de la metodología descrita en el Capítulo 3, para obtener las secuencias de hongos ectomicorrícicos en este Capítulo también se utilizó la técnica desarrollada por la Dra. Felicia Gherguel en el Department of Systematic Botany & Mycology, de la Universidad de Marburg en Alemania (no publicada), donde se llevó a cabo esta experiencia. Esta consistió en amplificar el ADN del hongo simbionte con un kit denominado Phire Plant Direct PCR Kit (BioLabs). Éste está diseñado para llevar a cabo la reacción de PCR directamente a partir del material vegetal, sin necesidad de realizar una extracción de ADN previa. Para ello se utilizó una pequeña fracción del ectomorfofoto (~ 1 mm²) o una dilución del mismo, según correspondiera. En este último caso se colocaba la fracción del ectomorfofoto en un tubo plástico de 1,5 mL, se agregaba una bolilla de metal de 5 mm, se agitaba el mismo en *vortex* a velocidad máxima durante 1 min y luego se agregaba al tubo 25 µL del buffer contenido en el Kit. En caso de ser necesario se realizaron posteriores diluciones a partir de la anteriormente mencionada (1:20, 1:50, 1:100, 1:200).

En primer lugar, se amplificó la región ITS utilizando los *primers* ITS1F e ITS4 (Sigma). A partir del producto de PCR obtenido se realizó una dilución 1:100 y se corrió una segunda PCR con los *primers* ITS1F e ITS2 (Sigma) (PCR anidadas o *nested PCR*). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 50 µL según las siguientes concentraciones: 0,5 µM de cada *primer*, 1 X Phire® Plant PCR Buffer (el cual contenía el MgCl₂ y los dNTPs), 1U de la Phire Hot Start DNA Polymerase y la fracción de ectomorfofoto de ~ 1 mm² o 5 µL de la dilución realizada a partir del mismo, dependiendo de la muestra. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de 98 °C por 5 min, 40 ciclos de 5 s a 98 °C, 45 s a 50 °C y 20 s a 72 °C, y una extensión final de 1 min a 72 °C. Los visualizados en geles de agarosa 1.4 % (p/v). Los productos de PCR que presentaran una única banda fueron purificados y enviados a secuenciar con el *primer* ITS1F.

Análisis de comunidades

Para llevar a cabo estos análisis se asumió que cada grupo de ectomorfotipos de afinidad morfológica correspondía a una especie diferente.

Riqueza

Se definió la riqueza de EcM como el número de grupos de ectomorfotipos presentes en los ejemplares analizados de *N. nervosa* y se analizó la misma a distintos niveles:

- a) *Entre ambientes*: Se observaron las diferencias en el número de EcM presentes en las raíces de los ejemplares de *N. nervosa* en el bosque nativo y en la plantación de pinos.
- b) *Entre categorías de edad teniendo en cuenta la riqueza promedio de cada una de ellas*: Se registró el número de grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica hallados para cada ejemplar de *N. nervosa* y se compararon estos valores entre las distintas categorías de edad (Pln, Jvn, Adn y JvDom-n) para cada una de las estaciones. Esta comparación fue realizada sólo entre los individuos de Raulí analizados en el bosque nativo.
- c) *Entre categorías de edad según la riqueza total de cada una de ellas*: Se comparó el número total de grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica registrados para cada categoría de edad (es decir la suma de los distintos grupos observados en los 5 individuos de cada una de ellas) para cada estación.
- d) *Entre estaciones*: Para cada ambiente se comparó el número de grupos de ectomorfotipos registrados en otoño y primavera.

Abundancia relativa

La abundancia relativa de cada grupo de ectomorfotipos de afinidad morfológica se calculó según se describe en el Capítulo 3 y se resume a continuación: se registró el número de ápices radicales correspondientes a cada ectomorfotipo, se dividió esta cantidad por el total de ápices colonizados y se expresó el valor en porcentaje. En este Capítulo se utilizó este valor para definir qué grupos de ectomorfotipos fueron los más abundantes en cada ambiente y estación. De igual forma, se calculó la abundancia relativa de los Tipos exploratorios hallados dividiendo la cantidad de ápices ectomicorrícicos correspondientes a cada Tipo exploratorio respecto del total de puntas colonizadas y expresando el valor en porcentaje. El cálculo de la abundancia relativa se realizó en cada estación por separado (otoño y primavera), por lo que los valores correspondientes a los distintos grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica y a los diferentes Tipos exploratorios sumaban 100 % en cada una.

Diversidad

La diversidad de EcM en *N. nervosa* también se analizó a diferentes niveles:

- a) *Entre categorías de edad en el bosque:* Pln, Jvn, Adn y JvDom-n, para cada estación.
- b) *Entre las tres categorías de jóvenes:* Jvn, JvDom-n y JvDom-e, en cada estación.
- c) *Entre estaciones:* Se tomaron en cuenta todos los individuos de *N. nervosa* analizados en cada estación para los dos diferentes ambientes (bosque y plantación de pinos).

Para calcular la diversidad en cada caso se utilizaron los índices de Shannon (H') y Simpson (D)⁹. Las fórmulas correspondientes a cada uno de ellos son las siguientes:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \cdot \log_2 p_i$$

Donde S es el número de especies (riqueza) y p_i la proporción de individuos de la especie i respecto del total de individuos (abundancia relativa).

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i \cdot (n_i - 1)}{N \cdot (N - 1)}$$

Donde n es el número de ejemplares por especie, S el número de especies y N el total de organismos presentes.

Similitud

También se evaluó la similitud de la composición de EcM entre las distintas categorías de edad analizadas en el bosque y para cada estación. Para ello se utilizaron los índices de similitud Jaccard clásico (J) y modificado (J_{mod}) (que varían entre 1 cuando las comunidades son iguales y 0 cuando no comparten ninguna especie), siendo sus fórmulas de cálculo:

$$J = \frac{A}{A+B+C}$$

Donde A es el número de especies compartidas, B el número de especies en la Comunidad 1 y C el número de especies en la Comunidad 2.

$$J_{mod} = \frac{U \cdot V}{(U+V-U \cdot V)}$$

Donde U es la abundancia relativa de las especies compartidas en la Comunidad 1 y V la abundancia relativa de las especies compartidas en la Comunidad 2.

Los índices de diversidad y similitud fueron calculados con el programa EstimateS 8.2, de acceso libre y gratuito (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>).

⁹ Se utilizaron dos índices dado que cada uno de ellos evalúa diferentes cosas. El índice de Shannon es una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad. Esto es, si una comunidad de S especies existe una claramente dominante y $S-1$ especies raras), el grado de incertidumbre será más bajo que si las S especies fueran igualmente abundantes (Shannon & Weaver 1949). El índice de Simpson representa la probabilidad de que 2 individuos seleccionados al azar dentro de un hábitat pertenezcan a la misma especie (Simpson 1949). El índice de Shannon es más sensible a la ocurrencia de especies raras que el de Simpson.

MICORRIZAS ARBUSCULARES

Se examinó la presencia de MA en las raíces de todos los individuos de *N. nervosa* analizados en cada una de las categorías de edad. Este análisis se realizó en las mismas raíces que las utilizadas para el estudio de EcM y de la misma forma que la descrita en el Capítulo 3, que se resume a continuación:

- a) Las raíces se limpiaron cuidadosamente bajo microscopio estereoscópico (Olympus SZ30) y se fijaron en alcohol etílico 70 %.
- b) La tinción de las raíces se llevó a cabo siguiendo las etapas de clarificación, decoloración, acidificación, tinción y conservación (Phillips & Hayman (1970)).
- c) El porcentaje de raíz colonizada fue estimado en todos los individuos según el método de intersección de McGonigle *et al.* (1990) modificado. Se realizaron 4 preparados por muestra y en cada uno fueron observados con un aumento de 200X no menos de 100 campos. Se cuantificó el número de campos en los que se observan estructuras micorrícicas colonizando la raíz respecto del total.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para analizar los porcentajes de colonización ectomicorrícica y la riqueza y diversidad de EcM en el bosque se utilizaron análisis factoriales de dos vías (ANOVA), donde se consideraron los factores categoría de edad (4 niveles: Pln, Jvn, Adn y JvDom-n) y estación (2 niveles: otoño y primavera). También se realizó un ANOVA de dos vías para evaluar la diferencia entre los porcentajes de colonización y los valores de riqueza y diversidad registrados en los ejemplares de *N. nervosa* implantados bajo pino respecto de los observados en los jóvenes nativos y provenientes de procesos de domesticación e implantados en el bosque (factor categoría de joven con 3 niveles: Jvn, JvDom-n y JvDom-e; factor estación con dos niveles: otoño y primavera). En aquellos casos en los que las diferencias eran significativas se utilizó una Prueba de Tukey como análisis *a posteriori*.

Se realizaron 2 pruebas de *Chi*-cuadrado para evaluar si existía dependencia entre distintos pares de variables consideradas en el bosque nativo: a) entre el número de grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica y las categorías de edad de las plantas de *N. nervosa* (Pln, Jvn, Adn y JvDom-n), y b) entre el número de grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica y las estaciones analizadas (otoño y primavera). Para analizar la relación entre estas variables se llevó a cabo un Análisis Factorial de Correspondencias Múltiples (AFCM). En este último se consideraron la totalidad de los individuos analizados y las siguientes variables cualitativas activas: categoría de edad (4 modalidades: Pln, Jvn, Adn y

JvDom-n), estación del año (2 modalidades: otoño y primavera) y ocurrencia de los distintos grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica (2 modalidades: presencia y ausencia).

RESULTADOS

ECTOMICORRIZAS ASOCIADAS A *NOTHOFAGUS NERVOSA* EN EL BOSQUE NATIVO Y EN LA PLANTACIÓN DE PINOS

Porcentajes de colonización total y grupos de ectomorfotipos conformados

Se analizaron un total de 50 individuos de *N. nervosa*, 25 en cada estación. Se registraron EcM en todos ellos, siendo en muchas ocasiones visibles a simple vista. El número de ápices radicales promedio cuantificado por individuo fue de ~200 en las plántulas (Pln), ~800 en los ejemplares jóvenes (Jvn y JvDom-n) y adultos (Adn) del bosque y ~400 en los jóvenes implantados bajo pino (JvDom-e).

En el bosque, los valores de colonización total registrados fueron elevados, superando el 90 % en todos los individuos (Figura 4.4a). En base al ANOVA de dos vías realizado se determinó que los ejemplares adultos presentaron un porcentaje de colonización significativamente superior al de las plántulas ($p < 0,001$), al de los jóvenes nativos ($p < 0,001$) y al de los jóvenes provenientes de procesos de domesticación ($p = 0,003$). Los porcentajes correspondientes a cada categoría de jóvenes fueron significativamente superiores al de las plántulas ($p_{Jvn} = 0,005$, $p_{JvDom-n} < 0,001$), pero semejantes entre sí. Los valores registrados en otoño fueron significativamente superiores a los obtenidos en primavera ($p < 0,001$).

Los porcentajes de colonización ectomicorrícica registrados en los jóvenes instalados bajo la plantación de pinos (JvDom-e) fueron mayores en otoño ($p < 0,001$). Al comparar estos valores con los obtenidos para los jóvenes analizados en el bosque nativo (Jvn y JvDom-n), se determinó que estos últimos eran superiores tanto en otoño ($p_{Jvn} < 0,001$, $p_{JvDom-n} < 0,001$) como en primavera ($p_{Jvn} < 0,001$, $p_{JvDom-n} < 0,001$) (Figura 4.4b).

En las raíces de los ejemplares de *N. nervosa* estudiados se observaron diferentes grupos de ectomorfotipos. En la Tabla 4.1 y Tabla 4.2 se muestran los distintos grupos conformados en base a características macromorfológicas en el bosque nativo y en la plantación de pinos, respectivamente. En el bosque se registraron 27 grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica: 14 de ellos correspondieron al Tipo exploratorio 1 (52 %), 7 al Tipo 2 (26 %) y 6 al Tipo 3 (22 %), siendo el tipo de exploración por Contacto, a Corta distancia y a Distancia moderada, respectivamente. En la plantación de pinos se hallaron 4 grupos de ectomorfotipos: 3 (75 %) del Tipo exploratorio 1 y el restante del Tipo 2 (25 %). Los ectomorfotipos hallados en la plantación de pinos fueron diferentes a los

registrados en el bosque. Como se indica en las Tablas 4.1 y 4.2, algunos ectomorfotipos se encontraron asociados a todas las categorías de edad en ambas estaciones, y otros se observaron en escasos individuos y/o durante sólo una estación. Se analizarán estas asociaciones en la próxima sección (*Análisis de poblaciones de ectomicorrizas*), luego de haber presentado los resultados sobre los análisis moleculares realizados.

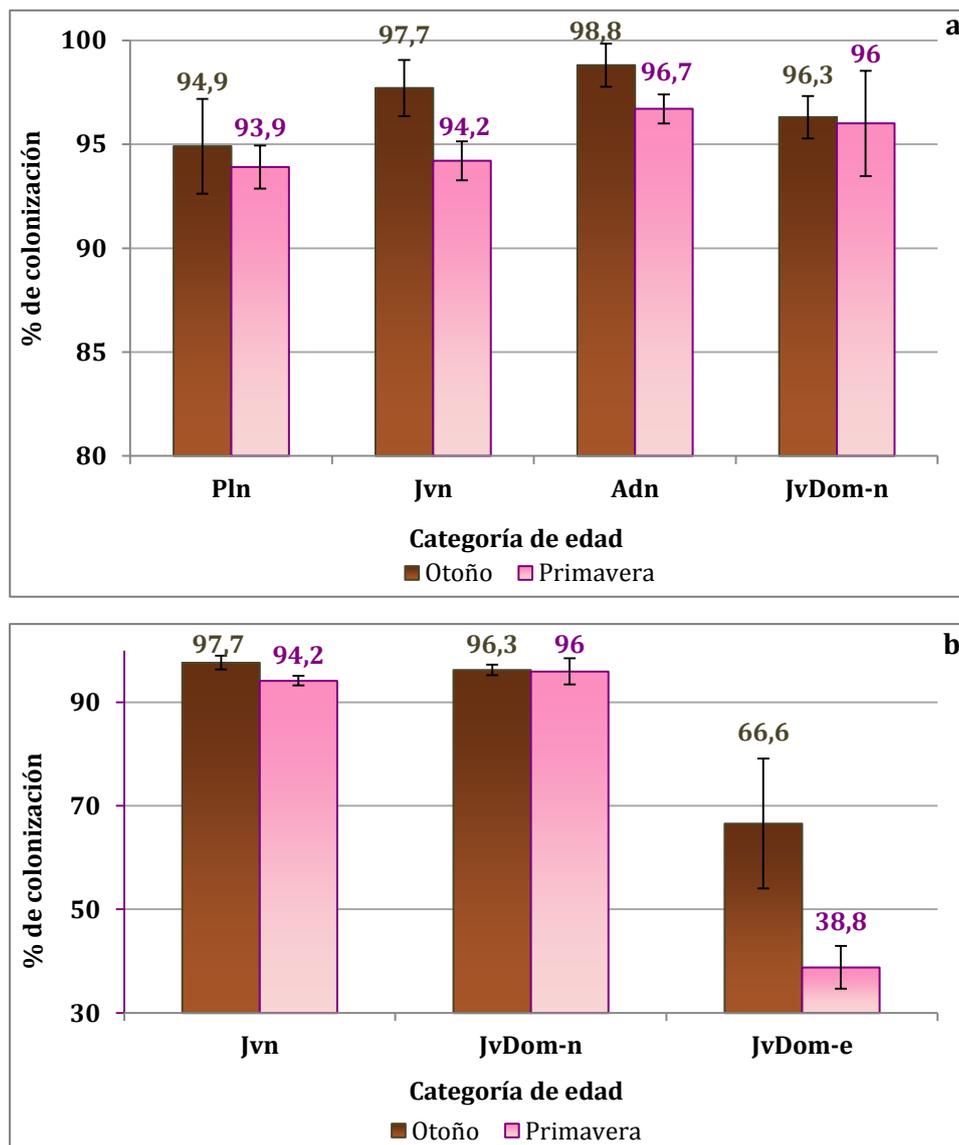


Figura 4.4.- Porcentajes medios de colonización ectomicorrícica de *Nothofagus nervosa* en otoño y primavera. Se indican los valores registrados para las categorías de edad pertenecientes a: **a)** Bosque nativo (**Pln** = Plántula; **Jvn** = Joven; **Adn** = Adulto; **JvDom-n** = Jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados bajo bosque nativo) y **b)** Las 3 categorías de jóvenes estudiadas (**Jvn** = Joven nativo; Jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados bajo bosque nativo = **JvDom-n** = y bajo pino = **JvDom-e**) (las barras de error indican la desviación estándar de las muestras analizadas).

Tabla 4.1.- Características macromorfológicas, Tipo exploratorio y ocurrencia de los diferentes grupos de ectomorfortipos registrados en el bosque nativo en las distintas categorías de edad y estaciones. **MT** = Nombre del ectomorfortipos; **Tipo Exp** = Tipo exploratorio (Tipo 1: Contacto, Tipo 2: Distancia corta, Tipo 3: Distancia moderada); **Nº de Individuos** = Número de individuos de *N. nervosa* de los 5 analizados en cada categoría de edad y estación en los que se registró la ocurrencia de cada ectomorfortipo; **Pln** = Plántula nativa; **Jvn** = Joven nativo; **Adn** = Adulto nativo; **JvDom-n** = Joven cultivado e implantado bajo bosque nativo; **O** = Otoño; **P** = Primavera.

GRUPO MT	RAMIFICACIÓN	MANTO		HIFAS EMANANTES		RIZOMORFOS		TIPO EXP	Nº DE INDIVIDUOS							
		Textura	Color	Frecuencia	Color	Frecuencia	Color		Pln		Jvn		Adn		JvDom-n	
									O	P	O	P	O	P	O	P
EcM1-n	Irregular pinnada	Lanudo	Rojo claro a intenso	Abundantes	Rojo	No se observaron		Tipo 2	0	0	2	1	2	2	3	1
EcM2-n	Irregular pinnada	Lanudo	Castaño	Abundantes	Castañas	Moderada	Castañas	Tipo 3	0	0	3	2	4	1	5	2
EcM3-n	Irregular pinnada	Lanudo	Naranja	Abundantes	Naranja	Moderada	Naranja	Tipo 3	0	1	1	2	1	1	2	0
EcM4-n	Irregular pinnada	Algodonoso	Marrón claro	Abundantes	Miel	No se observaron		Tipo 2	0	0	0	0	1	0	1	0
EcM5-n	Simple	Granulado	Negro, brillo carbonoso	Escasas a abundantes	Negras	No se observaron		Tipo 2	2	4	4	5	4	3	5	3
EcM6-n	Monopodial pinnada	Liso a ligeramente granuloso	Negro, brillo metalizado	Presentes o ausentes	Castañas	No se observaron		Tipo 2	3	1	3	4	4	5	4	5
EcM7-n	Monopodial pinnada	Fibroso	Castaño	Abundantes, dirigidas hacia el extremo	Castañas claras	No se observaron		Tipo 2	1	2	3	2	4	2	5	4
EcM8-n	Monopodial piramidal a Coraloide	Liso a rugoso	Negro amarronado	Escasas	Caramelo	No se observaron		Tipo 1	1	0	2	2	0	2	2	2
EcM9-n	Monopodial pinnada	Lanudo	Negro amarronado	Abundantes	Castañas	No se observaron		Tipo 2	0	2	0	1	1	3	2	3
EcM10-n	Irregular pinnada	Ligeramente algodonoso	Miel / Blanco	Escasas	Blancas	Abundantes	Blancos	Tipo 3	1	4	3	4	4	2	4	4
EcM11-n	Irregular pinnada	Ligeramente algodonoso	Amarillo	Escasas	Amarillas claras	Abundantes	Amarillas doradas	Tipo 3	0	1	1	1	1	0	1	0
EcM12-n	Simples a monopodial pinnada	Liso, semi-traslúcido	Blanco	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	3	0	1	0	1	0	0	1

EcM13-n	Monopodial pinnada o piramidal	Liso	Blanco a amarillo claro	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	1	0	0	0	1	0	0	0
EcM14-n	Simples a monopodial pinnada	Liso	Miel a amarillo claro	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	0	0	2	0	1	1	1	0
EcM15-n	Monopodial pinnada	Liso	Caramelo, traslúcido	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	0	1	2	3	3	3	3	5
EcM16-n	Monopodial pinnada	Liso	Marrón oscuro a grisáceo	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	1	3	5	5	5	5	5	5
EcM17-n	Coraloide	Liso	Marrón oscuros	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	0	1	1	1	0	0	3	2
EcM18-n	Simples a monopodial pinnado	Liso	Miel claro a acanalado	Escasas	Miel claras	No se observaron		Tipo 1	3	1	3	2	5	4	4	5
EcM19-n	Monopodial pinnado	Liso	Miel	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	0	1	2	0	3	0	3	4
EcM20-n	Irregular pinnada	Algodonoso	Canela	Abundantes	Miel claras	No se observaron		Tipo 2	0	0	2	0	0	0	2	0
EcM21-n	Simples a monopodial pinnados	Liso	Violeta extremo distal blanco/crema	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	3	2	4	0	3	1	1	1
EcM22-n	Monopodial pinnado	Liso	Marrón oscuro brillo acerado	No presentan o son escasas		No se observaron		Tipo 1	0	0	2	5	0	4	2	1
EcM23-n	Monopodial pinnado	Liso	Marrón claro, brillo acerado	No presentan o son escasas	Blancas si presentes	No se observaron		Tipo 1	0	1	0	5	1	2	2	5
EcM24-n	Monopodial pinnado	Liso	Marrón rojizo	No presentan o son escasas		No se observaron		Tipo 1	0	0	3	0	1	0	1	2
EcM25-n	Irregular pinnada	Lanudo	Crema	Escasas	Crema	Abundantes	Crema	Tipo 3	0	0	2	0	0	1	3	1
EcM26-n	Irregular pinnada	Lanudo	Tiza y fondo oscuro	Escasas	Crema	Abundantes	Crema	Tipo 3	0	0	0	0	0	0	4	0
EcM27-n	Monopodial pinnado	Liso	Amarillo verdoso	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	0	1	0	2	2	1	2	3

Tabla 4.2.- Características macromorfológicas, Tipo exploratorio y ocurrencia de los diferentes grupos de ectomorfitipos en los ejemplares de *Nothofagus nervosa* cultivados en vivero e implantados bajo la plantación de pinos. **MT** = Nombre del grupo de ectomorfitipos; **Tipo Exp** = Tipo exploratorio (Tipo 1: Contacto, Tipo 2: Distancia corta); **JvDom-e** = Joven proveniente del vivero e implantado bajo pino; * = Número de individuos de los 5 analizados en los que se registró cada ectomorfitipo; **O** = Otoño; **P** = Primavera.

GRUPO MT	RAMIFICACIÓN	MANTO		HIFAS EMANANTES		RIZOMORFOS		TIPO EXP	JvDOM-E*	
		Textura	Color	Frecuencia	Color	Frecuencia	Color		O	P
EcM28-e	Simple a monopodial pinnado	Liso	Marrón a grisáceos	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	4	5
EcM29-e	Simple	Liso (a veces discontinuo)	Negro	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	3	1
EcM30-e	Simple a Monopodial pinnado	Liso	Miel claros	No se observaron		No se observaron		Tipo 1	5	5
EcM31-e	Irregular pinnado	Lanudo / algodonoso	Miel traslúcido	Abundantes	Crema	No se observaron		Tipo 2	5	5

Identificación molecular de los hongos formadores de ectomicorrizas

Se obtuvo al menos una secuencia para la mayor parte de los grupos de ectomorfortipos conformados. De un total de 31 grupos (27 descritos en el bosque y 4 en la plantación de pinos), se identificó el hongo formador de la EcM en 25 de ellos (81 %). La mayoría de estos hongos presentaron un bajo porcentaje de homología con las secuencias disponibles en el GenBank (Tabla 4.3). Entre las muestras secuenciadas se encontraron distintos hongos no relacionados con la simbiosis ectomicorrícica, tales como saprobios de suelo (ej. *Trichoderma* sp.), patógenos vegetales (ej. *Neonectria* sp.) y levaduras (ej. *Candida* sp., *Cryptococcus* sp.).

Se identificaron 26 especies formadoras de EcM. El 81 % de las especies están incluidas en cinco Órdenes del Phylum Basidiomycota y el resto (19 %) en el Phylum Ascomycota (Figura 4.5, Tabla 4.3). La mayor parte de las especies fúngicas formadoras de EcM en *N. nervosa* estuvieron comprendidas en el orden Agaricales (54 % del total de especies). El resto de las mismas se incluyen en los órdenes Cantharellales (8 %), Russulales (4 %), Sebacinales (8 %), Thelephorales (8 %) y Helotiales (8 %). Un grupo de especies ascomicéticas (10 %) pertenecieron a hongos de afinidad incierta a los que no se ha podido asignar un orden (*Insertae sedis*). Las especies fúngicas formadoras de EcM en el bosque nativo fueron diferentes a las de la plantación de pinos (Figura 4.5, Tabla 4.3).

Tal como se observa en los árboles construidos para ilustrar la posición filogenética de los hongos formadores de EcM en *N. nervosa* (Figura 4.5), en aquellos casos en los que se obtuvo más de una secuencia por grupo de ectomorfortipos de afinidad morfológica se observaron dos situaciones: a) secuencias que alineaban en un 100 %, significando que correspondían a la misma especie fúngica, tales como: *Cortinarius* sp. 2, Hymenogastraceae 1 y *Tomentella* sp. 1, y b) para algunos grupos de ectomorfortipos las secuencias presentaban diferencias entre sí, existiendo la posibilidad de que pertenezcan a diferentes hongos, entre ellas: *Cortinarius* sp. 1, *Cortinarius* sp. 3 y *Tricholoma* sp. 2. En el caso de las EcM formadas por el hongo *Cortinarius* sp. 5, es posible que se hayan incluido dentro del mismo grupo morfológico ectomorfortipos similares, pero formados por diferentes hongos de gran afinidad taxonómica (*Cortinarius* sp. 5a y *Cortinarius* sp. 5b). Es importante resaltar que no se halló una misma especie fúngica para diferentes grupos de ectomorfortipos.

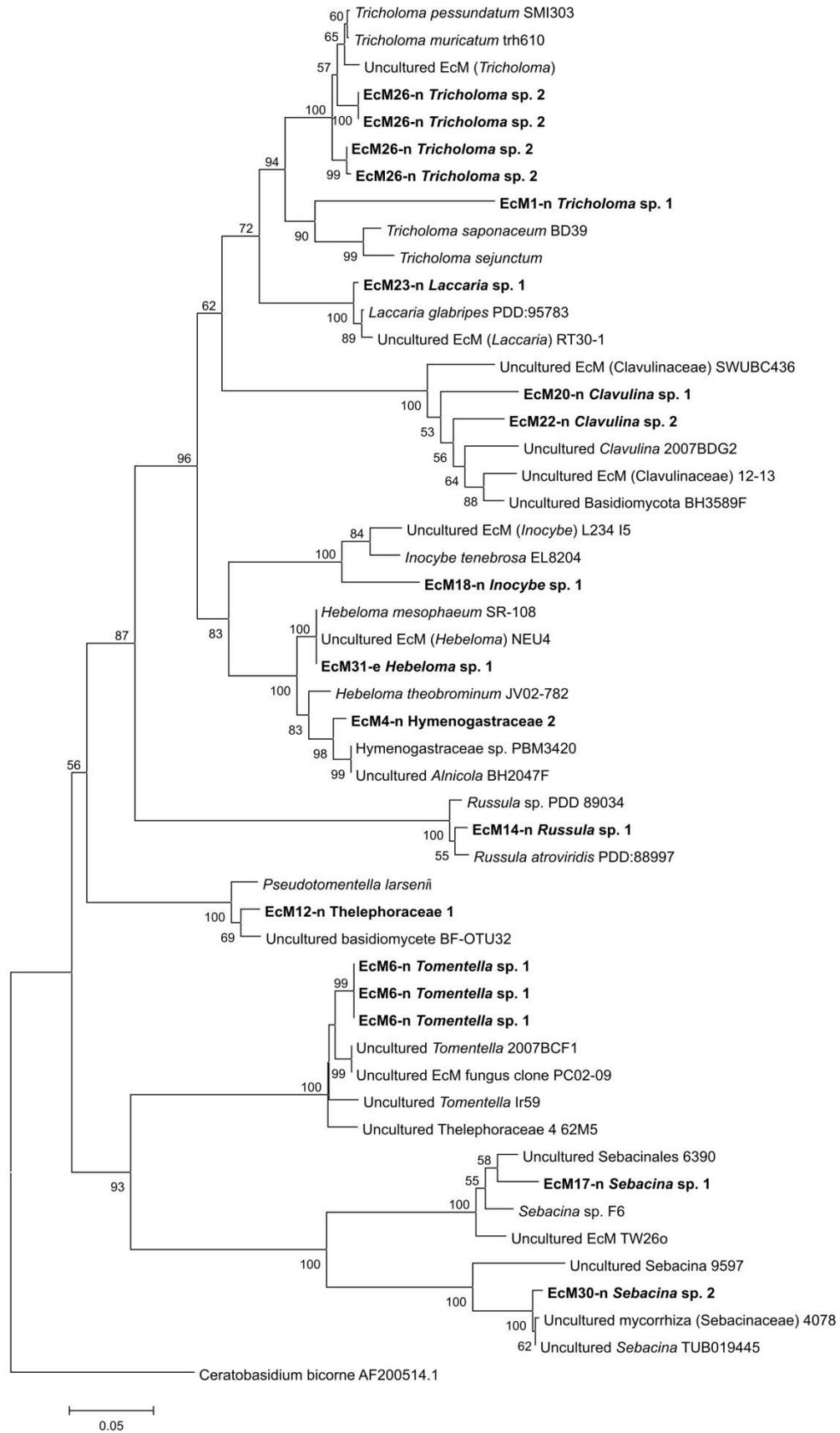
En los árboles filogenéticos también se observa que los hongos analizados presentaron taxones filogenéticamente afines: otros hongos ectomicorrícicos u hongos pertenecientes a órdenes en los que se incluyen numerosas especies ectomicorrícicas (ej. Agaricales, Helotiales, Sebacinales) (Figura 4.5).

Tabla 4.3.- Taxones fúngicos asociados a los grupos de ectomorfitipos conformados, pares de bases alineadas, porcentaje de homología y nombre con el que se denominará al grupo en base a estos resultados. **MT** = Nombre del grupo de ectomorfitipos; **Nº Seq** = Número de secuencias obtenidas para cada grupo de morfotipos; **A** = Phylum Ascomycota; **B** = Phylum Basidiomycota; **% Id** = Homología con taxón más afín filogenéticamente; ^a = El porcentaje de homología en este grupo varió según la secuencia considerada; * = Secuencia de buena calidad pero corta; ** = Secuencias que permitieron aproximar un taxón pero que no serán utilizadas en los árboles filogenéticos debido a su calidad regular.

PHYLUM	ORDEN	MT	Nº SEQ	TAXÓN FÚNGICO ASOCIADO EN GENBANK	% ID	NOMBRE ASIGNADO	
Basidiomycota	Agaricales	EcM1-n	1	<i>Tricholoma saponaceum</i>	90 %	<i>Tricholoma</i> sp. 1	
				<i>Tricholoma sejunctum</i>	89 %		
		EcM2-n	2	<i>Cortinarius alienatus</i>	95-97 % ^a	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	Cortinarius sp. 1
		EcM3-n*	2	Hymenogastraceae sp.	96 %	<i>Alnicola</i> sp.	Hymenogastraceae 1
					96 %		
		EcM4-n	1	Hymenogastraceae sp.	96 %	<i>Alnicola</i> sp.	Hymenogastraceae 2
					95 %		
		EcM10-n	7	<i>Cortinarius cycneus</i>	97 %	<i>Cortinarius viscoviridis</i>	Cortinarius sp. 2
					96 %		
		EcM11-n	4	<i>Cortinarius variosimilis</i>	96-97 % ^a	Uncultured EcM (<i>Cortinarius</i>)	Cortinarius sp. 3
					96-97 % ^a		
		EcM13-n**	1	<i>Descolea antarctica</i>	83 %		<i>Descolea</i> sp. 1
		EcM18-n	1	Uncultured EcM (<i>Inocybe</i>)	87 %	<i>Inocybe tenebrosa</i>	<i>Inocybe</i> sp. 1
	87 %						
EcM23-n	1	<i>Laccaria glabripes</i>	97 %	Uncultured EcM (<i>Laccaria</i>)	<i>Laccaria</i> sp. 1		
			97 %				
EcM25-n	1	<i>Cortinarius stephanopus</i>	97 %	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	Cortinarius sp. 4		
			97 %				
EcM26-n	4	<i>Tricholoma pessundatum</i>	94-95 % ^a	<i>Tricholoma muricatum</i>	<i>Tricholoma</i> sp. 2		
			94-95 % ^a				
EcM27-n	2	a) <i>Cortinarius carbonellus</i>	96 %	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	<i>Cortinarius</i> sp. 5a		
			96 %				
		b) <i>Cortinarius cycneus</i>	96 %				
		<i>Cortinarius napivelatus</i>	95 %		<i>Cortinarius</i> sp. 5b		

	Agaricales	EcM31-e	1	<i>Hebeloma mesophaeum</i> Uncultured EcM fungus (<i>Hebeloma</i>)	99 % 99 %	<i>Hebeloma</i> sp. 1	
	Cantharellales	EcM20-n	1	Uncultured EcM (Clavulinaceae) Uncultured <i>Clavulina</i>	88% 84%	<i>Clavulina</i> sp. 1	
		EcM22-n	1	Uncultured Basidiomycota Uncultured EcM (Clavulinaceae)	91 % 88 %	<i>Clavulina</i> sp. 2	
	Russulales	EcM14-n	1	Uncultured Russulaceae <i>Russula atroviridis</i>	100 % 95 %	<i>Russula</i> sp. 1	
	Sebacinales	EcM17-n	1	Uncultured EcM fungus <i>Sebacina</i> sp.	96 % 92 %	<i>Sebacina</i> sp. 1	
		EcM30-e	1	Uncultured <i>Sebacina</i> Uncultured mycorrhiza (Sebacinaceae)	100 % 98 %	<i>Sebacina</i> sp. 2	
	Thelephorales	EcM6-n	4	Uncultured <i>Tomentella</i> Uncultured Thelephoraceae	95 % 94 %	<i>Tomentella</i> sp. 1	
		EcM12-n	1	Uncultured basidiomycete <i>Pseudotomentella larsenii</i>	94 % 93 %	Thelephoraceae 1	
	Ascomycota	Helotiales	EcM7-n	1	Uncultured EcM Uncultured <i>Hyaloscyphaceae</i>	100 % 99 %	Hyaloscyphaceae 1
			EcM19-n	1	Uncultured EcM (<i>Helotiales</i>) Uncultured <i>Helotiales</i>	96 % 95 %	Helotiales 1
		<i>Insertae sedis</i>	EcM5-n	1	Uncultured EcM (<i>Dothideomycetes</i>) <i>Cenococcum geophilum</i>	99 % 98 %	<i>Cenococcum</i> sp. 1
			EcM24-n	1	Uncultured <i>Trichocladium</i> Uncultured EcM fungus	97 % 97 %	<i>EcM ascomicética</i> sp. 1
			EcM28-e**	1	Uncultured EcM Uncultured EcM (<i>Leotiomyces</i>)	97 % 95 %	<i>Leotiomyces</i> sp. 1

a



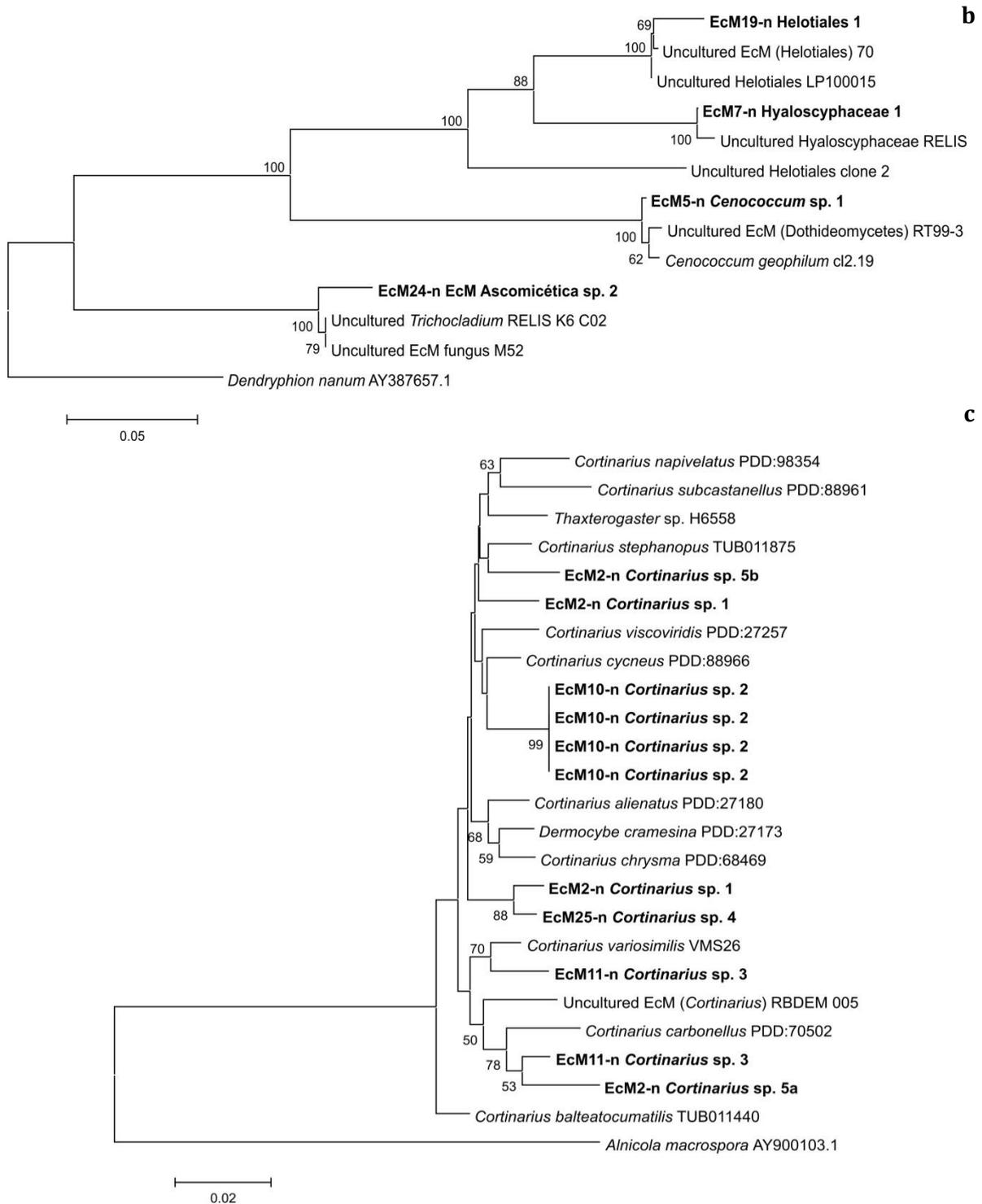


Figura 4.5.- Árboles filogenéticos construidos en base al algoritmo Neighbor Joining y al modelo Kimura de 2 parámetros para estimar las distancias evolutivas entre las secuencias de la región ITS. Los números sobre las ramas corresponden a la frecuencia con la que esa rama se ubicó de tal forma en 1000 repeticiones (*bootstrap*), los valores inferiores al 50 % no se muestran. Secuencias correspondientes a las especies *Ceratobasidium bicornis*, *Dendryphion nanum* y *Alnicola macrospora* fueron utilizadas como raíces (*outgroup*) de los siguientes árboles: **a)** Phylum Basidiomycota; **b)** Phylum Ascomycota; y **c)** género *Cortinarius*, respectivamente.

ANÁLISIS DE POBLACIONES DE ECTOMICORRIZAS

Riqueza

Del total de puntas de *N. nervosa* cuantificadas en el bosque, se clasificaron en los grupos de ectomorfortipos de afinidad descriptos anteriormente 13788 ápices ectomicorrícicos, perteneciendo 4614 de ellos a los jóvenes provenientes de los procesos de domesticación e implantados en este ambiente. El número de puntas clasificadas en los individuos implantados bajo pino fue 1113. En los análisis de riqueza realizados a distintos niveles se observó que:

- a) *Entre ambientes:* En el bosque se hallaron 27 grupos de ectomorfortipos diferentes (87 % del total de grupos observados), 24 de ellos estuvieron asociados a Jóvenes nativos y 26 a Jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados en bosque. Para los jóvenes implantados bajo pino se conformaron sólo 4 grupos (13 % del total). Por lo tanto, asumiendo que cada grupo de ectomorfortipos corresponde a por lo menos una especie fúngica, la riqueza de EcM asociada a los ejemplares jóvenes del bosque nativo es superior a la registrada en los jóvenes ubicados en la plantación. No se observaron especies fúngicas en común entre estos dos ambientes.
- b) *Entre categorías de edad teniendo en cuenta la riqueza promedio de cada una de ellas (Bosque):* Los jóvenes nativos (Jvn), los adultos (Adn) y los jóvenes provenientes de los procesos de domesticación (JvDom-n) presentaron en promedio 10, 9 y 13 grupos de ectomorfortipos en sus raíces, respectivamente. La riqueza ectomicorrícica en estas categorías de edad fue significativamente mayor que la de las plántulas (Pln), en las que se hallaron en promedio 6 grupos de ectomorfortipos por individuo ($p_{Jvn} = 0,008$, $p_{Adn} = 0,034$, $p_{JvDom-n} < 0,001$) (Tabla 4.1). La riqueza de EcM asociada a los jóvenes provenientes de los procesos de domesticación resultó significativamente más elevada que la observada en jóvenes nativos ($p = 0,041$) y adultos ($p = 0,008$). Para ninguna de las categorías de edad se registró un cambio significativo en la riqueza de EcM entre otoño y primavera.
- c) *Entre categorías de edad según la riqueza total de cada una de ellas (Bosque):* En este caso se repitió la tendencia descripta en el inciso anterior (Tabla 4.4), presentando los jóvenes provenientes de los procesos de domesticación el mayor número de grupos de ectomorfortipos asociados, los jóvenes nativos y adultos valores intermedios y las plántulas los valores más bajos, tanto en otoño como en primavera. La riqueza de grupos de ectomorfortipos de cada categoría de edad tendió a ser mayor en otoño, a excepción de las plántulas, en las que la mayor riqueza se registró en primavera (Tabla 4.4).

Tabla 4.4.- Número de grupos de ectomorfotipos observados en cada categoría de edad analizada en el bosque para cada estación estudiada. **Pln** = Plántula; **Jvn** = Joven; **Adn** = Adulto; **JvDom-n** = Joven cultivado e implantado bajo bosque nativo.

	PLN	JVN	ADN	JVDOM-N
Otoño	10	21	21	25
Primavera	15	17	18	20

d) *Entre estaciones:* En el bosque, se registraron 27 grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica en otoño y 23 en primavera. Es decir que en la primera estación se hallaron 4 ectomorfotipos que no fueron observados en primavera. Éstos correspondieron a aquellos formados por los hongos Hymenogastraceae 2 (EcM4-n), *Descolea* sp. 1 (EcM13-n), *Clavulina* sp. 1 (EcM20-n) y *Tricholoma* sp. 2 (EcM26-n). Estos resultados indican que la riqueza de EcM fue mayor en esta estación (Tabla 4.1). La riqueza de EcM en los ejemplares de *N. nervosa* implantados bajo pino no varió entre las estaciones, ya que se detectaron los mismos grupos de ectomorfotipos en cada estación.

Abundancia relativa

Al calcularse la abundancia relativa de los grupos de ectomorfotipos registrados en el bosque, se observó que existían marcadas diferencias entre los mismos (Figura 4.6a). Teniendo en cuenta que en este trabajo se definieron como abundantes aquellos grupos que igualaban o superaban el 5 % del total de puntas analizadas en alguna de las estaciones de muestreo, de los 27 grupos conformados, 6 fueron considerados abundantes en otoño y 6 en primavera, siendo 3 de ellos comunes a ambas estaciones. En el bosque nativo se hallaron un total de 9 grupos de ectomorfotipos abundantes, mientras que el resto de las EcM pertenecieron a grupos minoritarios (Figura 4.6a). El grupo de ectomorfotipos de afinidad morfológica formados por el hongo EcM16-n fue el más abundante en ambas estaciones, principalmente en primavera, pero a pesar de múltiples esfuerzos no fue posible identificar molecularmente el hongo simbiote. Las otras especies ectomicorrícicas abundantes comunes a ambas estaciones fueron *Cenococcum* sp. 1 (EcM4-n) y *Cortinarius* sp. 2 (EcM10-n). Las EcM más abundantes en otoño fueron las identificadas como *Cortinarius* sp. 1 (EcM2-n), *Inocybe* sp. 1 (EcM18-n) y *Tricholoma* sp. 1 (EcM1-n), mientras que en primavera fueron *Clavulina* sp. 2 (EcM22-n), *Laccaria* sp. 1 (EcM23-n) y *Tomentella* sp. 2 (EcM5-n). En los individuos jóvenes de *N. nervosa* implantados bajo pino (JvDom-e), 3 de los 4 ectomorfotipos descriptos resultaron abundantes (Figura 4.6b), y la abundancia relativa de cada grupo fue diferente para cada estación. En otoño, los valores correspondientes a los grupos EcM30-e y EcM31-e fueron los más elevados, seguidos por el EcM28-e. En primavera, el grupo de

ectomorfortipos más abundante fue el EcM31-e, seguido por el EcM28-e y luego por el EcM30-e. En ambas estaciones la menor abundancia relativa correspondió al EcM29-e (Figura 4.6b). La abundancia relativa correspondiente al Tipo exploratorio 1 fue mayor que la registrada para los Tipos 2 y 3 respectivamente, tanto en el bosque nativo como en la plantación de pinos y en ambas estaciones (Tabla 4.5).

Tabla 4.5.- Abundancia relativa de los distintos Tipos exploratorios de EcM registradas en el bosque nativo y en la plantación de pinos. **Tipo 1** = Contacto; **Tipo 2** = Exploración a corta distancia; **Tipo 3** = Exploración de distancia moderada (para cada ambiente por estación los valores correspondientes a los distintos Tipos exploratorios suman 100 %).

	BOSQUE NATIVO			PLANTACIÓN PINOS	
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 1	Tipo 2
Otoño	46,6	28,1	25,3	58,9	41,1
Primavera	60,7	25,6	13,7	52,7	47,3

Diversidad

La diversidad de grupos de ectomorfortipos de afinidad morfológica registrada en *N. nervosa* también fue analizada a diferentes niveles:

- a) *Entre categorías de edad en el bosque:* Se observó en ambas estaciones que los valores de diversidad tendieron a ser mayores en los jóvenes provenientes de procesos de domesticación (JvDom-n), disminuyendo en los jóvenes nativos (Jvn) y los adultos (Adn) y siendo menor en las plántulas (Pln). Según el índice de Simpson, en el otoño las diferencias fueron significativas entre los jóvenes provenientes de procesos de domesticación y los adultos ($p = 0,039$) y entre los primeros y las plántulas ($p < 0,001$). El índice de Shannon marcó diferencias significativas entre los jóvenes provenientes de procesos de domesticación y las plántulas en otoño ($p < 0,001$) y primavera ($p = 0,034$) (Tabla 4.6).
- b) *Entre las tres categorías de jóvenes:* Al comparar la diversidad de EcM entre los Raulíes jóvenes creciendo en el bosque y en la plantación, ambos índices indicaron que tanto los jóvenes nativos (Jvn) como los provenientes de procesos de domesticación e implantados en el bosque (JvDom-n) presentaron valores de diversidad significativamente mayores que los jóvenes de la plantación de pinos, tanto en otoño como en primavera ($p < 0,001$ para ambos índices y categorías de jóvenes y en cada estación) (Tabla 4.6).
- c) *Entre estaciones:* Al calcular los valores de diversidad de EcM para cada estación, ambos índices mostraron que en el bosque la diversidad de EcM es mayor en otoño ($H' = 2,88$, $D = 13,45$) que en primavera ($H' = 2,49$, $D = 6,85$). Si bien en los jóvenes implantados bajo pino

se observó una tendencia similar, la diferencia entre los índices obtenidos para otoño ($H' = 1,04, D = 2,67$) y primavera ($H' = 1,01, D = 2,27$) fue menor.

Tabla 4.6.- Valores medios de los índices de diversidad de Shannon y de Simpson correspondientes a las categorías de edad en cada ambiente y estación. **Pln** = Plántula; **Jvn** = Joven; **Adn** = Adulto; **JvDom-n** = Joven cultivado e implantado bajo bosque nativo; **JvDom-e** = Jóvenes implantados en la plantación de coníferas exóticas; **O** = Otoño; **P** = Primavera.

AMBIENTE	CATEGORÍA DE EDAD	SHANNON (D)		AMBIENTE	CATEGORÍA DE EDAD	SIMPSON (H')	
		O	P			O	P
Bosque nativo	Pln	1,29	1,40	Bosque nativo	Pln	3,10	3,65
	Jvn	1,88	1,70		Jvn	5,50	4,42
	Adn	1,79	1,68		Adn	5,14	4,60
	JvDom-n	2,21	1,92		JvDom-n	7,67	4,86
Plantación	JvDom-e	0,76	0,67	Plantación	JvDom-e	2,02	1,77

Similitud

Los índices de similitud de Jaccard (J) y Jaccard modificado (J_{mod}) mostraron que las plántulas presentaron en todos los casos los valores menores de similitud respecto de las otras categorías de edad consideradas. Por otro lado, los valores correspondientes al índice de Jaccard modificado (J_{mod}) fueron siempre mayores a los del índice de Jaccard clásico (J), indicando que al tener en cuenta la frecuencia con la que aparece cada grupo de ectomorfotipos, la similitud aumenta. Esto se debe a que las EcM más abundantes son las mismas para las categorías que se están comparando. Ambos índices indicaron que la similitud de las poblaciones de EcM descriptas en otoño y primavera fue elevada (Tabla 4.7). Dado que no se hallaron especies ectomicorrícicas compartidas entre el bosque nativo y la plantación de pinos, la similitud entre estos ambientes fue nula.

Tabla 4.7.- Índices de similitud calculados para las distintas categorías de edad en el bosque nativo para ambas estaciones. Se muestran en negrita los valores correspondiente al Índice de Jaccard clásico (J) y en cursiva los pertenecientes al Índice de Jaccard modificado (J_{mod}). **Pln** = Plántula nativa; **Jvn** = Joven nativo; **Adn** = Adulto nativo; **JvDom-n** = Joven cultivado e implantado bajo bosque nativo.

	OTOÑO				PRIMAVERA			
	Pln	Jvn	Adn	JvDom-n	Pln	Jvn	Adn	JvDom-n
Pln		0,473	0,544	0,455		0,715	0,611	0,802
Jvn	0,409		0,771	0,878	0,684		0,863	0,857
Adn	0,409	0,615		0,784	0,571	0,75		0,905
JvDom-n	0,296	0,769	0,704		0,591	0,682	0,727	
Similitud entre estaciones				$J = 0,852$	$J_{mod} = 0,931$			

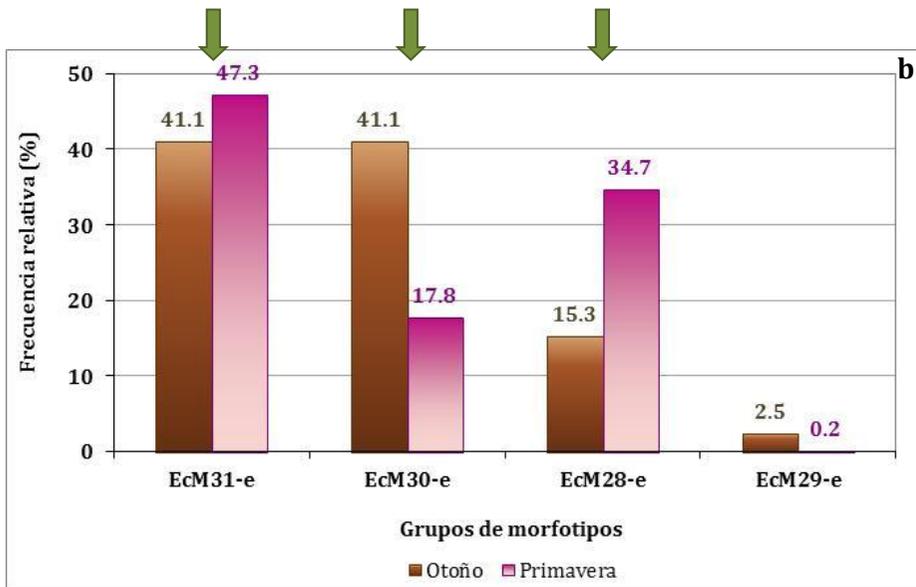
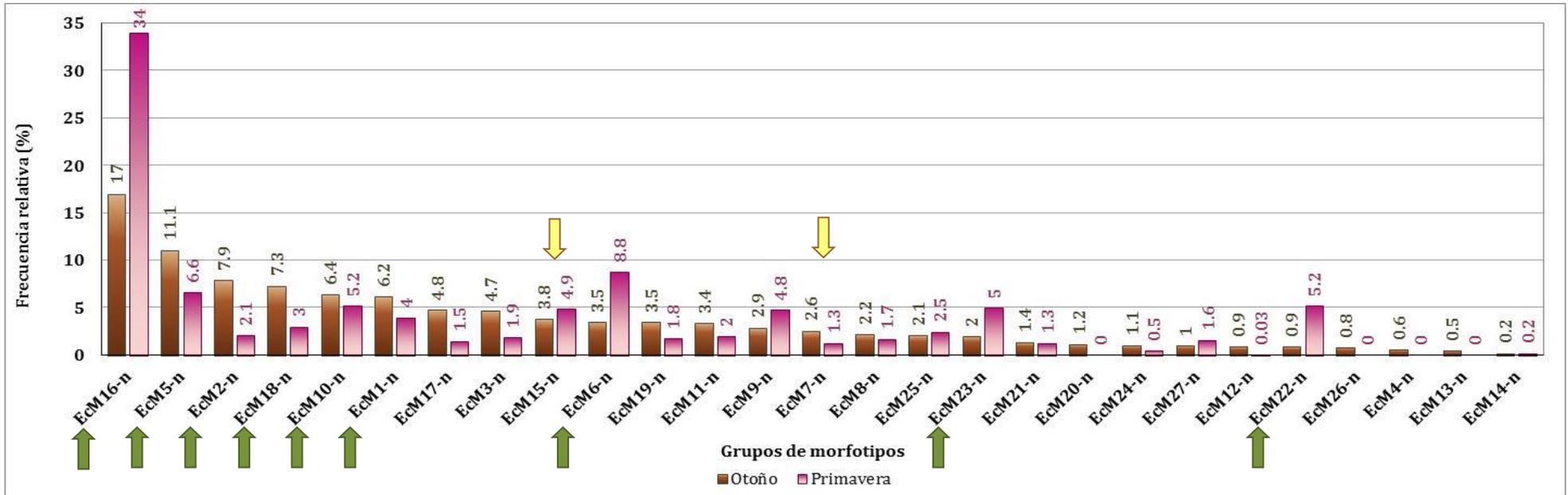


Figura 4.6.- Abundancia relativa de cada grupo de ectomorfitipos de afinidad morfológica descrito en *Nothofagus nervosa* en cada estación y ambiente. **a)** Ectomorfitipos pertenecientes al bosque nativo; **b)** Ectomorfitipos registrados en la plantación de pinos. Se señalan con una flecha de color oscuro los ectomorfitipos considerados abundantes (frecuencia relativa igual o superior al 5 %) y con una flecha de color claro los ampliamente distribuidos (presentes en más del 50 % de los individuos). Para cada estación los valores correspondientes a los distintos grupos de ectomorfitipos registrados suman 100 %.

Relación entre las ectomicorrizas, las categorías de edad y las estaciones

Los análisis de *Chi-cuadrado* realizados indicaron que la distribución de las EcM en el bosque están significativamente relacionadas con las categorías de edad consideradas ($p < 0,001$) y con la estación del año ($p < 0,001$). Para evaluar las relaciones entre estas variables se realizó un AFCM, cuyo resultado se muestra en la Figura 4.7. El plano factorial seleccionado para analizar la relación entre estas variables fue el formado por los ejes 1 y 2, ya que fue el que mayor información brindaba y en el que mejor representados se encontraron tanto los individuos como las variables a estudiar. En este plano factorial se distinguen 4 grupos. En el Grupo I se asocian el otoño y los grupos de ectomorfitipos denominados EcM4-n, EcM12-n, EcM13-n, EcM14-n, EcM20-n, EcM21-n y EcM24-n, significando que su ocurrencia es mayor durante esta estación. También en el Grupo I se incluye la modalidad EcM23-n(-), ya que este grupo de ectomorfitipos tuvo baja representatividad durante esta estación. En el Grupo II se observa que existe asociación entre la primavera y los siguientes grupos de ectomorfitipos de afinidad morfológica: EcM9-n, EcM22-n, EcM23-n, EcM27-n, y que durante esta estación es reducida la representatividad del grupo EcM12-n. En el Grupo III se asocian los ejemplares jóvenes provenientes de procesos de domesticación (JvDom-n) y los grupos de ectomorfitipos de afinidad morfológica hallados principalmente en ejemplares de esta categoría de edad: EcM2-n, EcM17-n, EcM19-n, EcM25-n, EcM26-n. Lo que se observa en el caso del Grupo IV es que las plántulas de *N. nervosa* (Pln) se caracterizaron por estar asociadas a la ausencia (EcM1-n, EcM2-n, EcM22-n) o menor representatividad (EcM7-n, EcM15-n, EcM16-n) de distintos grupos de ectomorfitipos (Figura 4.7, Tabla 4.1).

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ECTOMORFOTIPOS MÁS ABUNDANTES

Luego de definirse los grupos de ectomorfitipos más abundantes (*Cenococcum* sp. 1, *Clavulina* sp. 2, *Cortinarius* sp. 1, *Cortinarius* sp. 2, EcM16-n, *Inocybe* sp. 1, *Laccaria* sp. 1, *Tomentella* sp. 2, *Tricholoma* sp. 1) y los de amplia distribución (EcM15-n, Hyaloscyphaceae 1), se realizaron las descripciones micromorfológicas de los mismos. Dado que las secuencias obtenidas para las EcM formadas por el hongo Hymenogastraceae 1 (EcM3-n) fueron muy cortas (~200 pb), dificultando su identificación molecular, se decidió también describir micromorfológicamente a este ectomorfitipo para realizar una caracterización más completa. Las descripciones se presentan a continuación, clasificadas según el Tipo exploratorio al que pertenecen. Se incluye en la caracterización la información presentada en las Tablas 4.1, 4.2 (ocurrencia de ectomorfitipos por edad, estación y ambiente) y 4.3 (identificación molecular), en la Figura 4.6 (abundancia relativa) y en la Figura 4.7 (Análisis Factorial de Correspondencias Múltiples - AFCM).

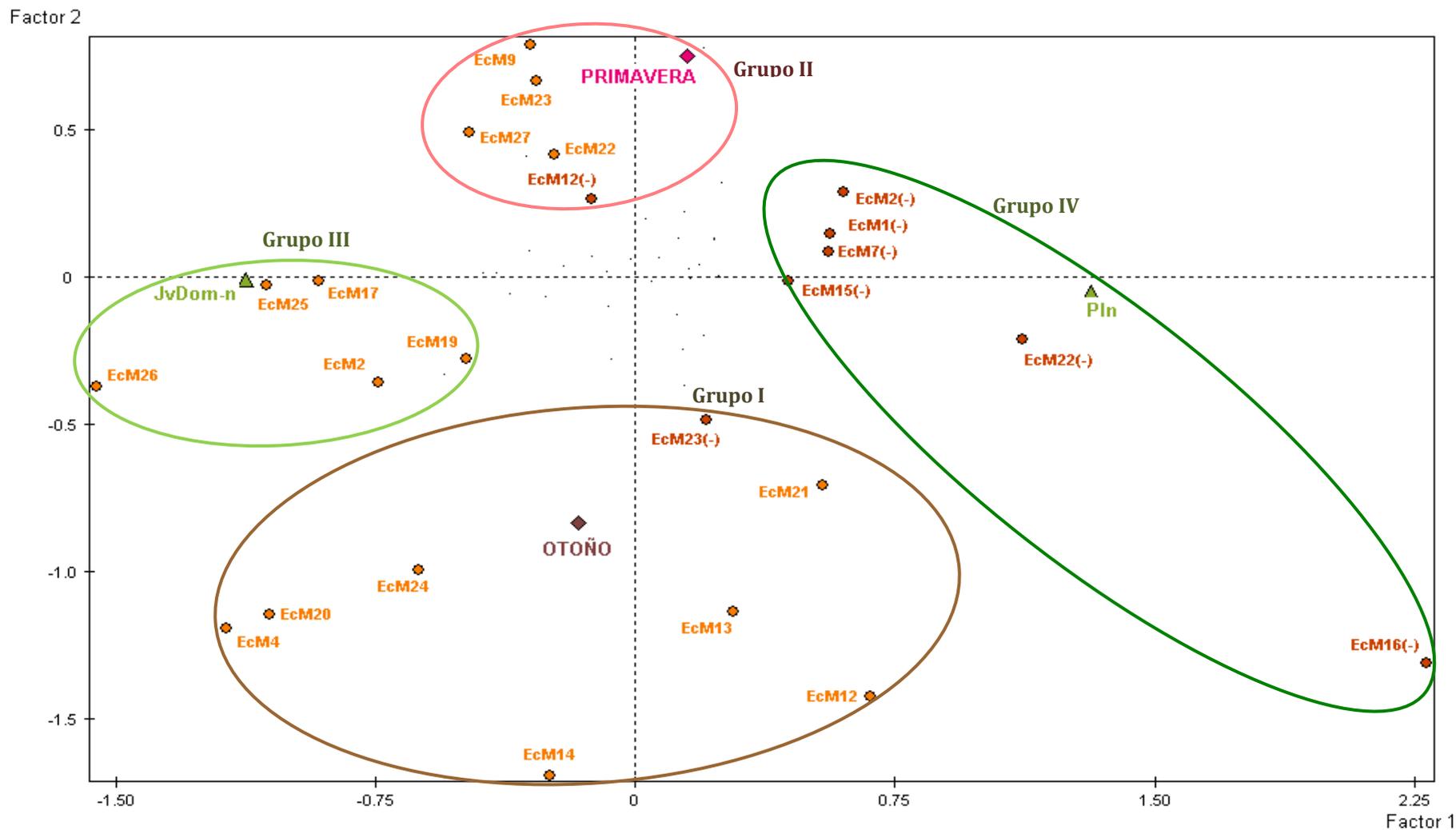


Figura 4.7.- Primer plano factorial del AFCM realizado considerando como variables activas los grupos de ectomorfitos, las categorías de edad y las estaciones (se muestran sólo los puntos que estuvieron bien representados). **JvDom-n** = Jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados en el bosque; **Pln** = Plántulas; **(-)** = Ausencia / menor representatividad, dependiendo del ectomorfito (ver Tabla 4.1).

Tipo Exploratorio 1: Contacto

Clavulina sp. 2 (EcM23-n)

Ectomorfo tipo marrón oscuro grisáceo de superficie lisa y con brillo acerado. Presentó ramificación monopodial pinnada, con puntas rectas o ligeramente onduladas y extremo distal redondeado. No se observaron hifas emanantes ni rizomorfos. El manto es pseudoparenquimatoso compuesto por células redondeadas hialinas. No se observaron cistidios (Figura 4.8).

Este morfotipo se observó en el 37 % de los individuos del bosque nativo, incluyendo jóvenes (Jvn y JvDom-n) y adultos (Adn) (no fue registrado en las plántulas). La ocurrencia de esta EcM se detectó en ambas estaciones, siendo más abundante en primavera.

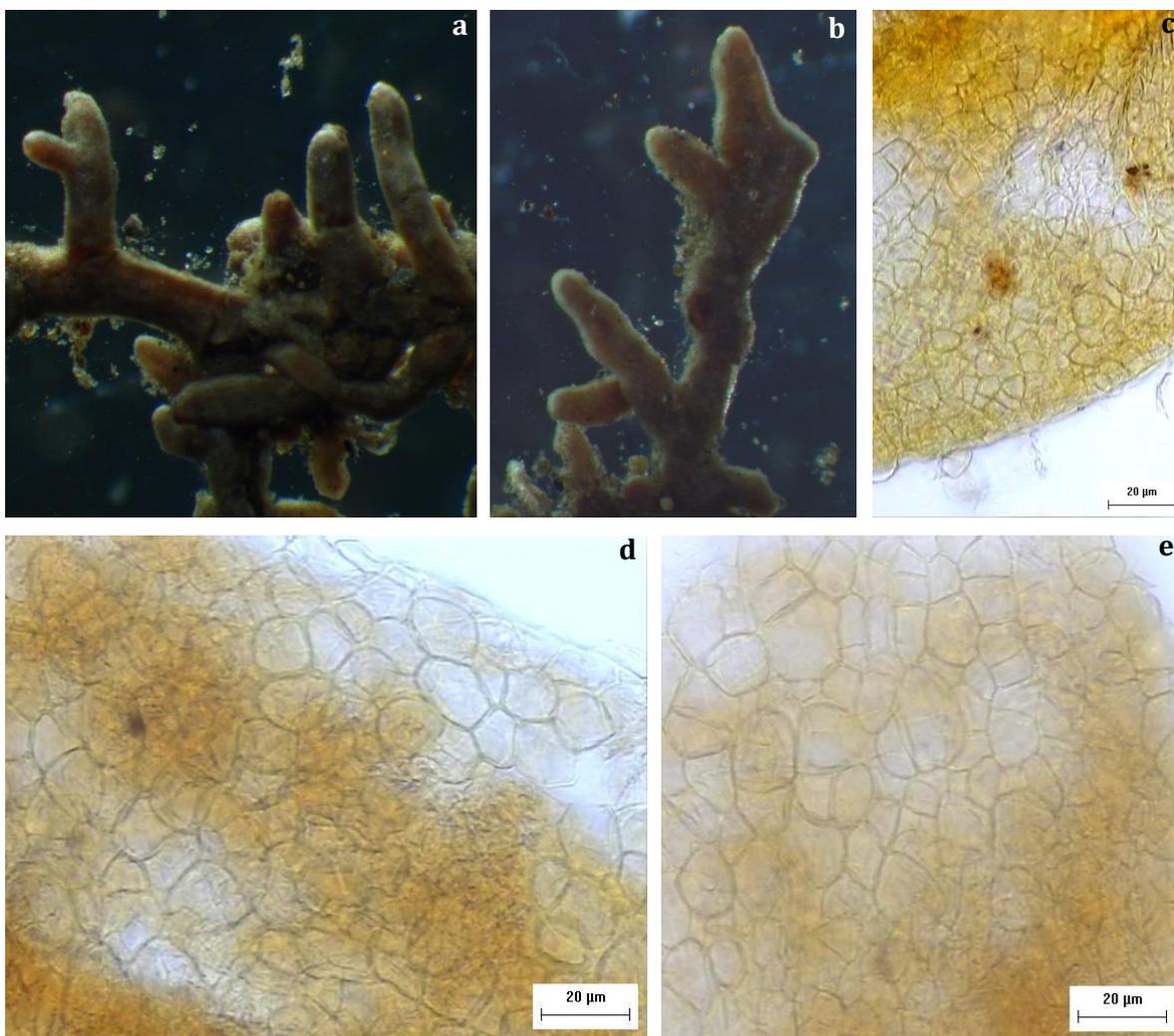


Figura 4.8.- Ectomorfo tipo formado por el hongo *Clavulina sp. 2* en *Nothofagus nervosa*. **a,b)** Aspecto general de la EcM y detalle de la misma, respectivamente; **c)** Aspecto general del manto cubriendo el ápice radical; **c y d)** Detalle del manto pseudoparenquimatoso observado en esta EcM.

EcM15-n

Ectomorfo tipo marrón caramelo, de superficie lisa y ramificación monopodial pinnada. Las puntas son rectas o ligeramente onduladas. No presentó hifas emanantes ni rizomorfos. El manto es muy delgado y translúcido, formado por hifas color ámbar. El patrón del mismo no se diferenció claramente, aunque se asemeja al tipo plectenquimatoso ya que pueden distinguirse algunas hifas. No se observaron cistidios (Figura 4.9).

Si bien esta EcM presentó frecuencia relativa ligeramente inferior al 5 %, tuvo amplia distribución entre los ejemplares de las distintas categorías de edad analizadas (53 % del total de los individuos analizados en el bosque). Fue registrado en ambas estaciones, siendo más abundante en primavera.

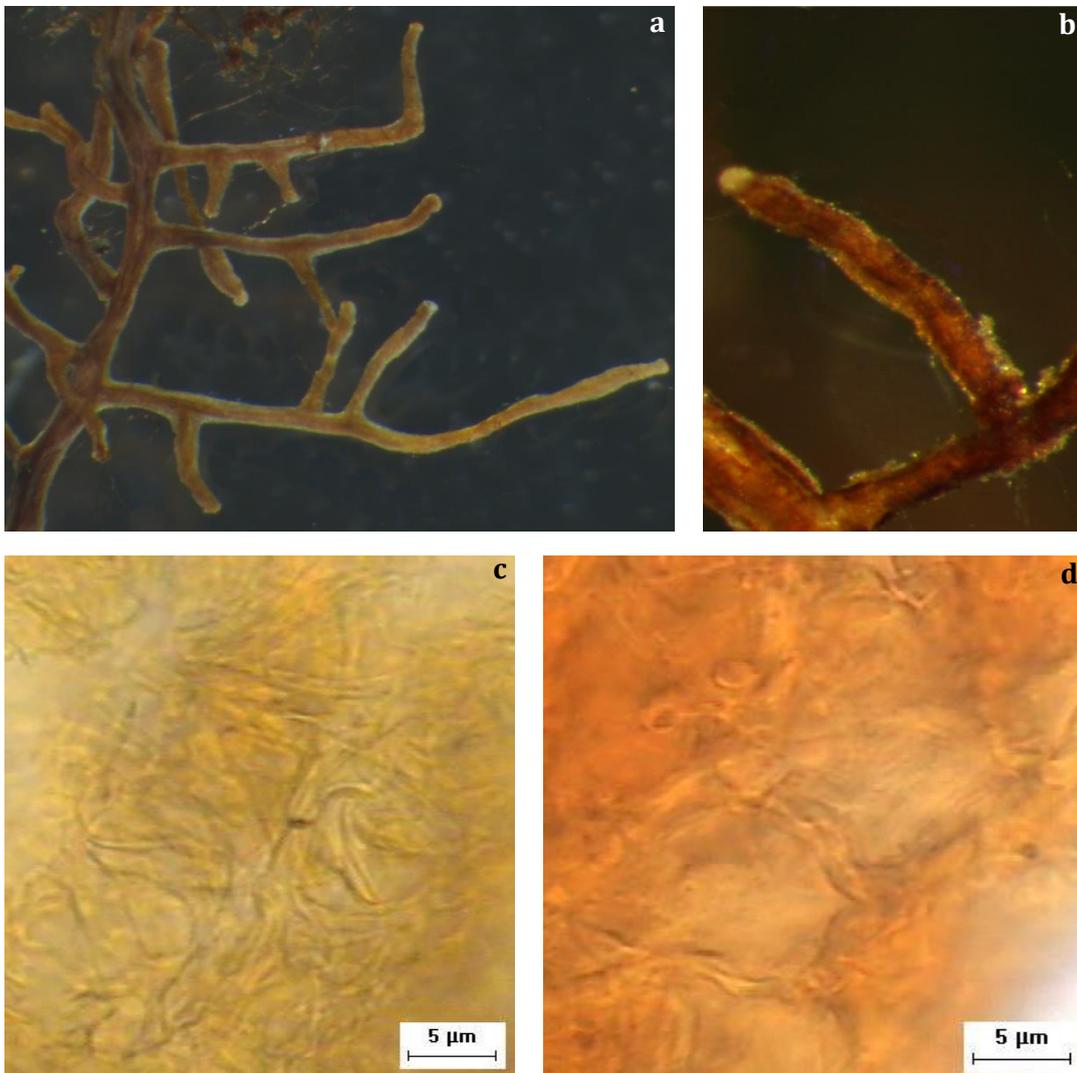


Figura 4.9.- Características macro y micromorfológicas correspondientes al ectomorfo tipo denominado *EcM15-n*. **a,b)** Aspecto general del ectomorfo tipo y detalle del mismo, respectivamente; **c)** Aspecto general del manto poco definido; **d)** Red de Hartig presente entre las primeras capas de células corticales.

EcM16-n

Ectomorfo tipo marrón oscuro, de superficie lisa y ramificación monopodial pinnada. Las puntas son tortuosas y de ápice ligeramente más angosto que la base. Hifas emanantes y rizomorfos ausentes. El manto está formado por hifas hialinas y es de tipo pseudoparenquimatoso. No se observaron cistidios (Figura 4.10).

Esta EcM fue hallada en la totalidad de los jóvenes (Jvn y JvDom-n) y adultos (Adn), y en el 50 % de las plántulas analizadas. Este ectomorfo fue de los más ampliamente distribuidos, ya que se encontró presente en el 89 % del total de ejemplares estudiados en el bosque. Fue registrado en ambas estaciones, siendo más frecuentemente en primavera.

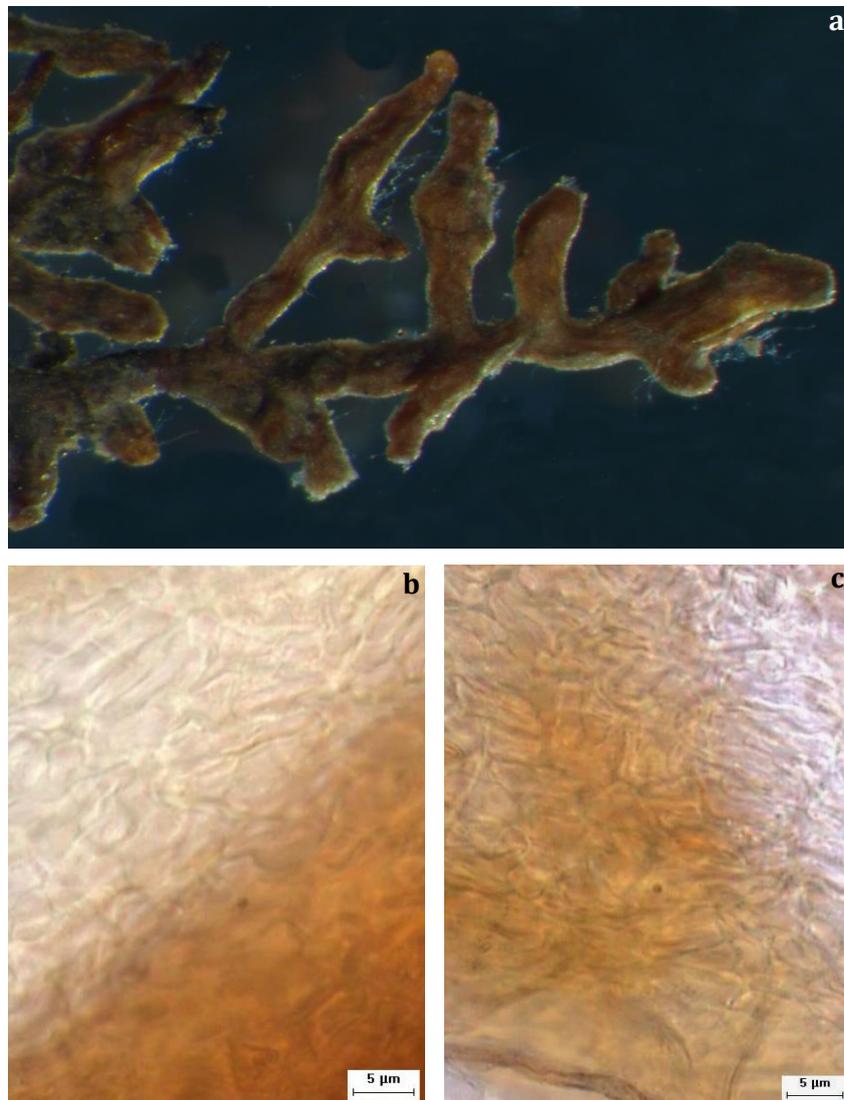


Figura 4.10.- Características macro y micromorfológicas correspondientes al ectomorfo denominado *EcM16-n*. **a)** Aspecto general del ectomorfo; **b** y **c)** Aspecto general del manto pseudoparenquimatoso hialino y sin cistidios.

Inocybe sp. 1 (EcM18-n)

Ectomorfo tipo marrón claro a veces color canela, de superficie lisa, ramificación monopodial pinnada y puntas rectas a levemente tortuosas. Hifas emanantes ausentes o escasas. Si presentaba hifas emanantes eran blancas y delgadas. No se observaron rizomorfos. El manto es pseudoparenquimatoso, formado por hifas hialinas, y se caracterizó por presentar cistidios capitados (Figura 4.11).

Esta EcM se halló en todas las categorías de edad (71 % de los individuos del bosque nativo) y en ambas estaciones, siendo más abundante en otoño.

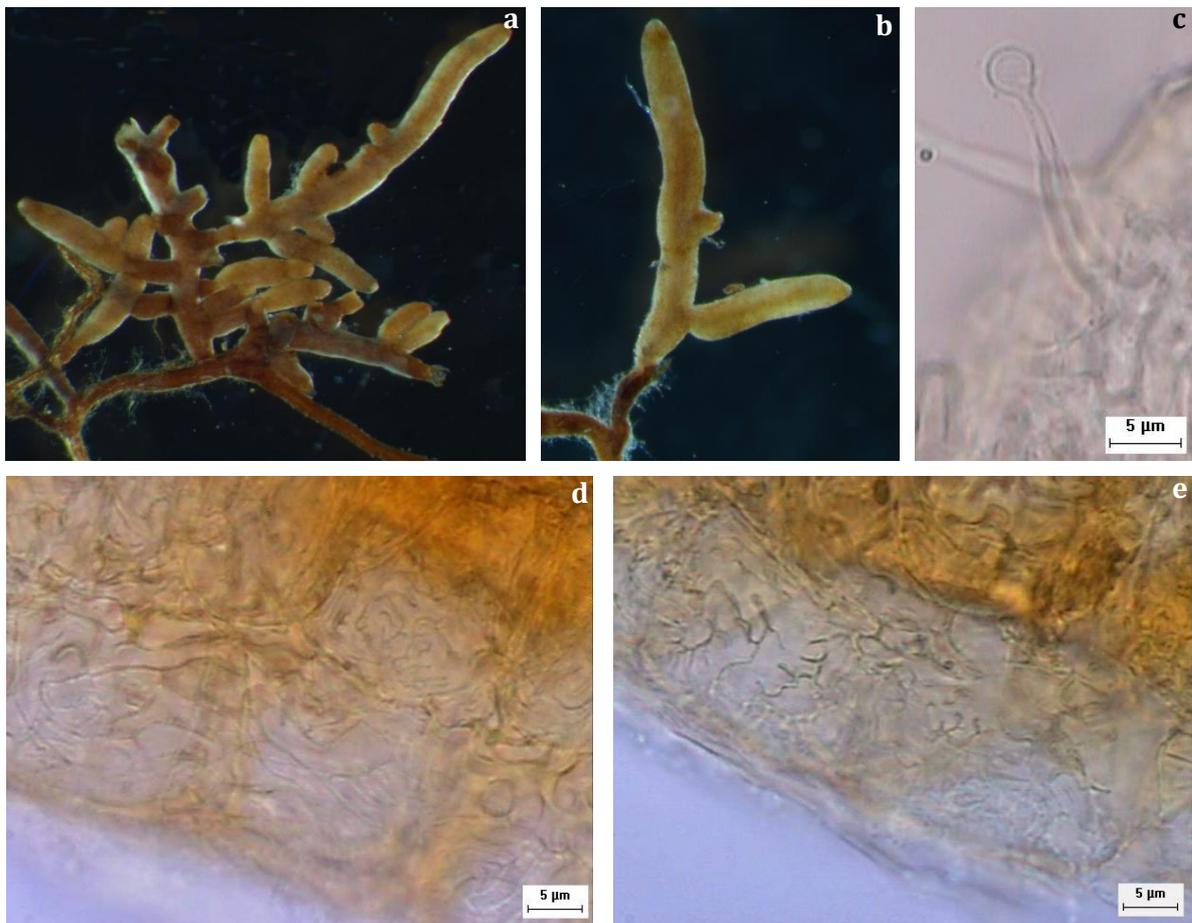


Figura 4.11.- Ectomorfo tipos formados por el hongo *Inocybe sp. 1*. **a)** Grupos de ectomorfo tipos asociados a las raíces de *Nothofagus nervosa*; **b)** Detalle de las puntas correspondientes a esta EcM; **c)** Cistidio capitado de formación lateral sobre una hifa presente en la superficie del manto; **d)** y **e)** Detalle del manto pseudoparenquimatoso en el que se observa el mismo de forma más laxa y compacta respectivamente.

Laccaria sp. 1 (EcM22-n)

Esta EcM es de color marrón claro, superficie lisa y brillo acerado. Su ramificación es monopodial pinnada y sus puntas rectas y de extremo distal redondeado. Hifas emanantes ausentes o escasas, si presentes delgadas y de color blanco. No se observaron rizomorfos. El manto es plectenquimatoso y está formado por hifas hialinas tabicadas. No se observaron cistidios (Figura 4.12).

El 42 % de los individuos de *N. nervosa* estudiados en el bosque nativo presentaron esta EcM, encontrándose éstos comprendidos en las cuatro categorías de edad consideradas. Este ectomorfofoto también fue más abundante en primavera que en otoño.

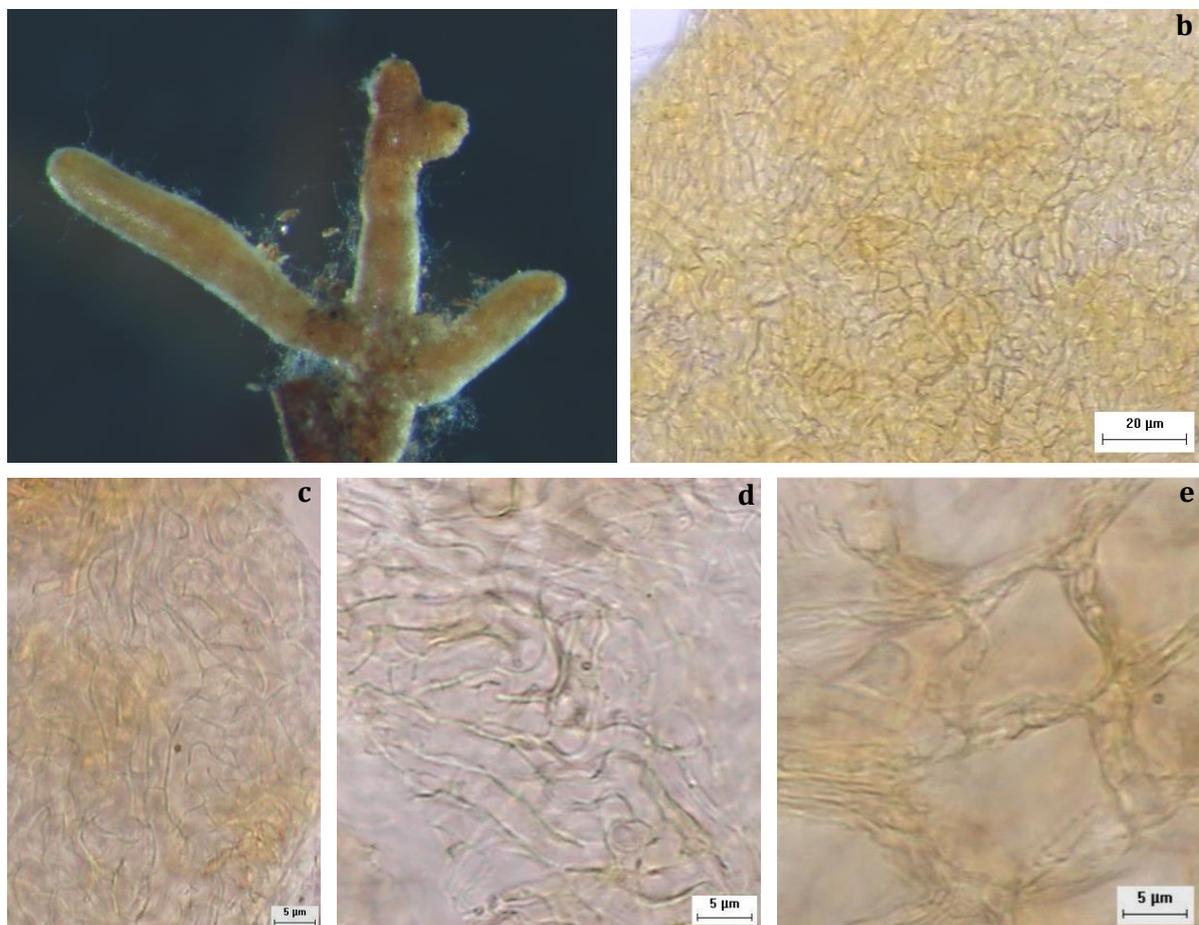


Figura 4.12.- Características anato-morfológicas del ectomorfofoto formado por el hongo *Laccaria sp. 1*. **a)** Aspecto general de la EcM mostrando su brillo acerado y las escasas hifas emanantes; **b)** Aspecto general del manto; **c)** y **d)** Detalle del manto plectenquimatoso; **e)** Red de Hartig formada por esta especie fúngica en *Nothofagus nervosa*.

Leotiomyces sp. 1 (EcM28-e)

Ectomorfortipo marrón oscuro, poco conspicuo, de superficie lisa, puntas simples o de ramificación monopodial pinnada. Las puntas son ligeramente tortuosas y el ápice del ectomorfortipo más angosto que la base. Hifas emanantes y rizomorfos ausentes. El manto está formado por hifas hialinas y el patrón del mismo no se diferenció claramente, aunque se asemeja a los de tipo pseudoparenquimatoso. No se observaron cistidios (Figura 4.13).

Esta EcM fue hallada en el 90 % de los individuos estudiados en la plantación de pinos y en ambas estaciones, siendo más abundante en primavera.

Sebacina sp. 2 (EcM30-e)

Ectomorfortipo marrón claro (miel) semitraslúcido, de superficie lisa, simple o con ramificación monopodial pinnada, y puntas rectas. Hifas emanantes y rizomorfos ausentes. El manto es de tipo plectenquimatoso, está constituido por hifas hialinas y se caracterizó por presentar cistidios capitados (Figura 4.14).

Esta EcM se halló en todos los ejemplares analizados en la plantación de pinos. Se observó en ambas estaciones, pero más frecuentemente en otoño.

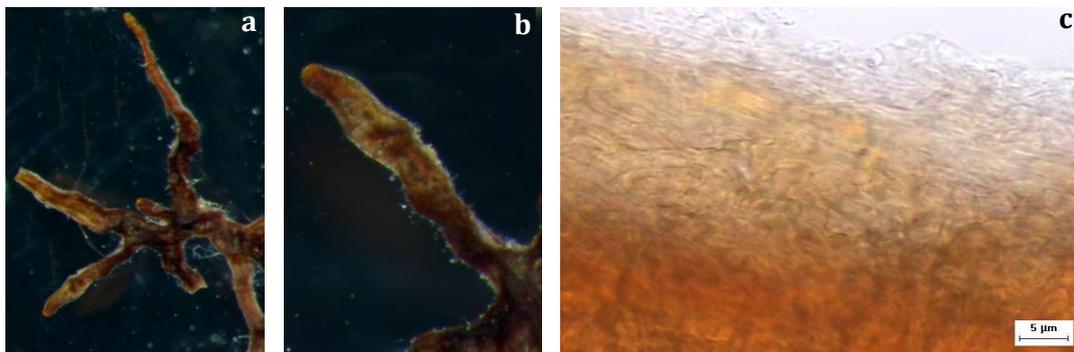


Figura 4.13.- Características del ectomorfortipo formado por el hongo Leotiomyces sp. 1. **a)** Aspecto general de la EcM; **b)** Detalle de punta tortuosa; **c)** Detalle del manto (pseudoparenquimatoso).

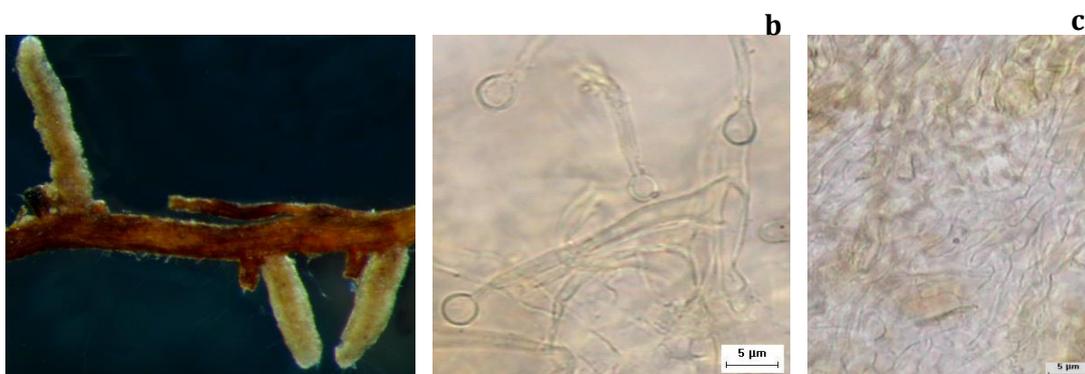


Figura 4.14.- Ectomorfortipos formado por el hongo Sebacina sp. 2. **a)** Aspecto general del morfotipo; **b)** Cistidios capitados presentes en el manto; **c)** Detalle del manto plectenquimatoso.

Tipo Exploratorio 2: Corta distancia

Cenococcum sp. 1 (EcM5-n)

Ectomorfotipo de puntas rectas y simples, color negro acarbonado y superficie rugosa. Se caracterizó por presentar hifas emanantes negras, gruesas, tortuosas y rígidas, generalmente abundantes. Las hifas emanantes poseían paredes engrosadas y tabiques, sin fíbulas. No se observaron rizomorfos ni esclerocios. El manto es plectenquimatoso de patrón estrellado, formado por hifas castañas también de paredes engrosadas. No se observaron cistidios asociados al mismo (Figura 4.15).

Este ectomorfotipo se observó en la mayoría de los ejemplares de *N. nervosa* estudiados en el boque (79 %), en las distintas categorías analizadas y en ambas estaciones.

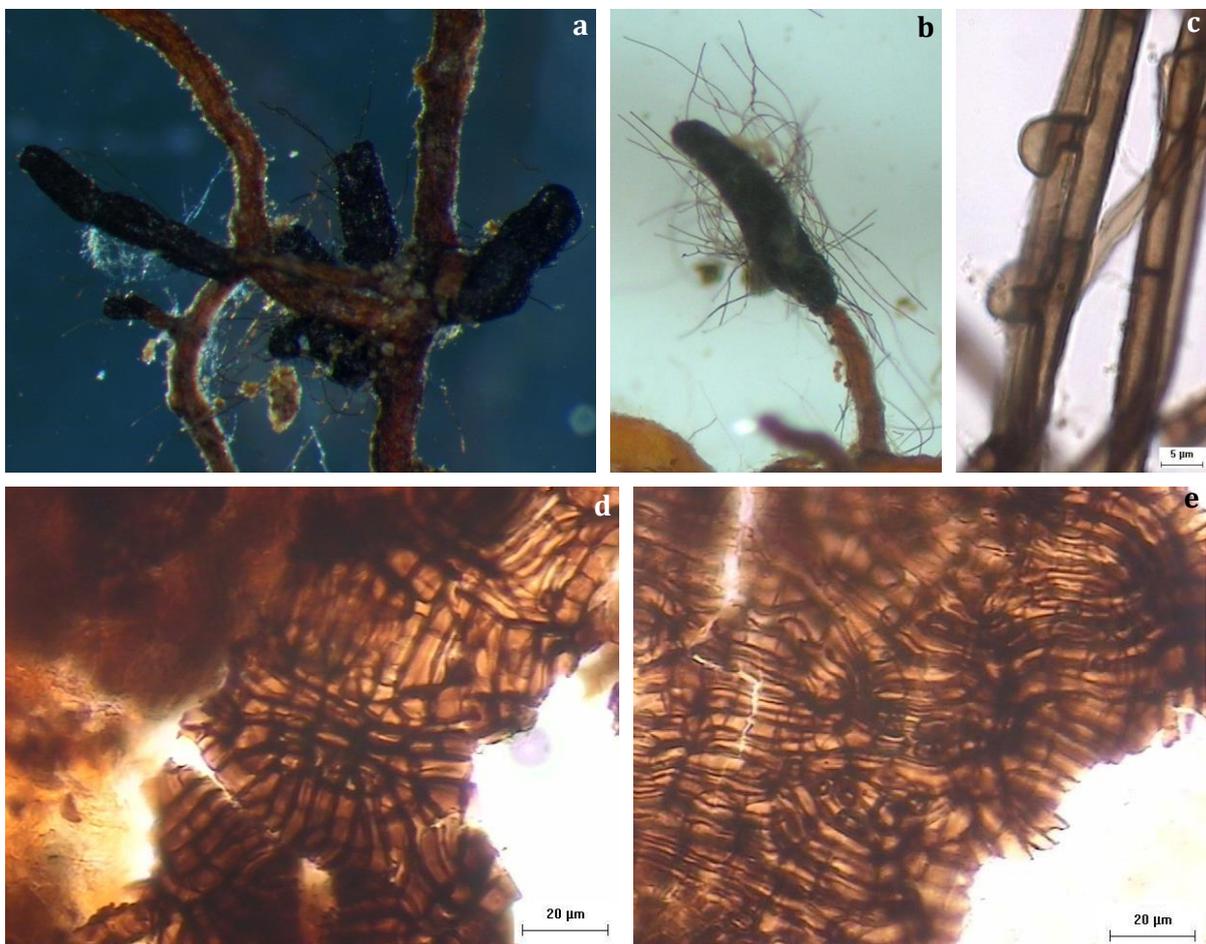


Figura 4.15.- Ectomicorriza formada por el hongo *Cenococcum* sp. 1 en *Nothofagus nervosa*. **a y b)** Aspecto general de las puntas características de esta EcM, en especial las hifas emanantes negras, gruesas, rígidas y tortuosas **c)** Hifas emanantes tabicadas sin fíbulas y anastomosándose; **d y e)** Detalle del manto plectenquimatoso de patrón estrellado formado por hifas castañas de paredes gruesas.

Hebeloma sp. 1 (EcM31-e)

Ectomicorriza de color miel claro, lanuda a ligeramente algodonosa. Presentó ramificación irregularmente pinnada y puntas levemente onduladas. Las hifas emanantes eran delgadas y de color blanco, con fíbulas. El manto es plectenquimatoso, formado por hifas hialinas y sin cistidios (Figura 4.16).

Esta EcM tuvo amplia distribución en los ejemplares de *N. nervosa* observados en la plantación de pinos (90 % de los individuos) y fue hallada en ambas estaciones.

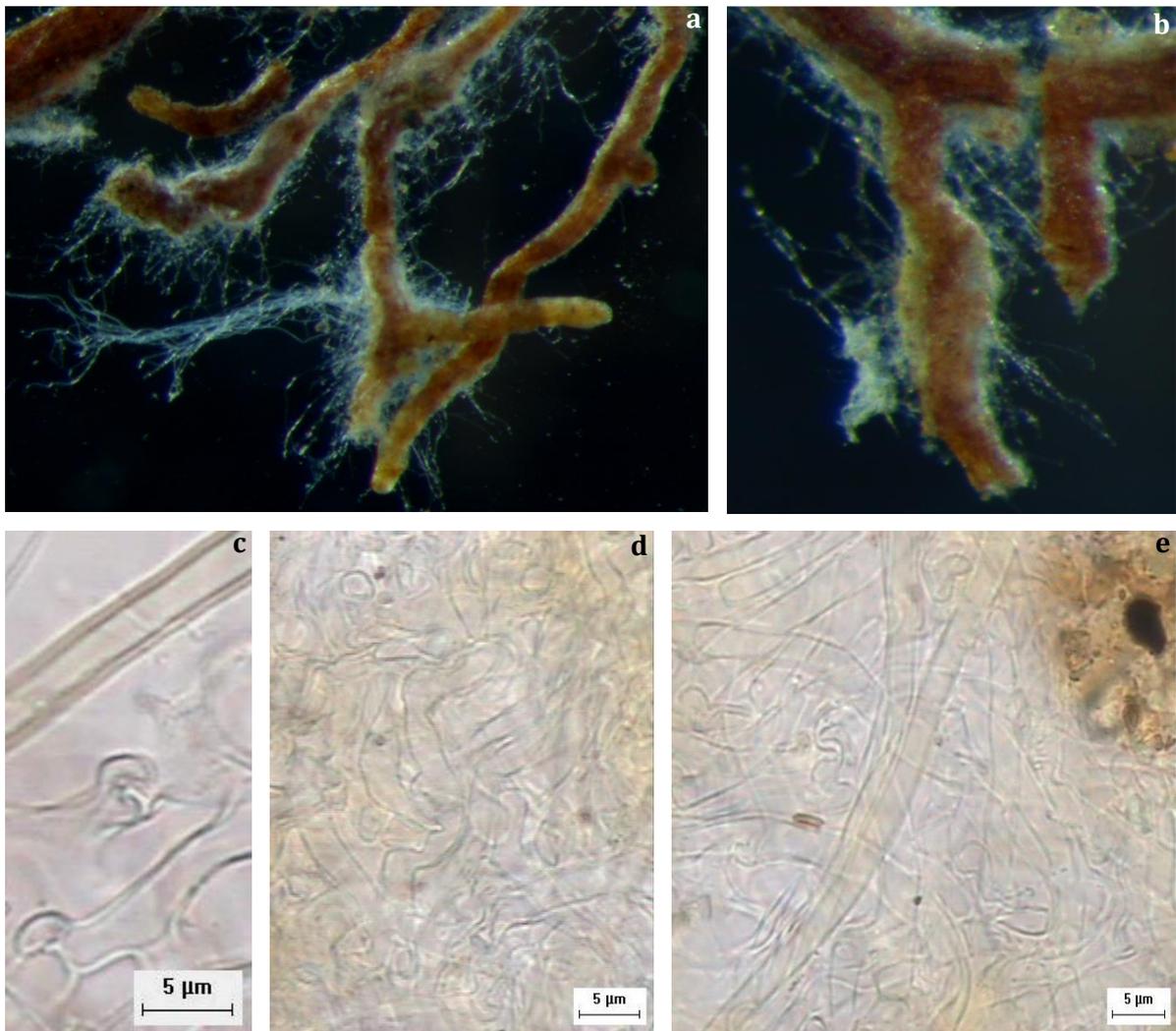


Figura 4.16.- Características del ectomorfo tipo formado por *Hebeloma sp. 1*. **a y b)** Aspecto general del ectomorfo tipo con abundantes hifas emanantes y detalle de una punta, respetivamente; **c)** Hifas emanantes tabicadas con fíbulas; **d y e)** Detalle del manto plectenquimatoso formado por hifas hialinas.

Hyaloscyphaceae 1 (EcM7-n)

Esta EcM de color marrón oscuro, superficie fibrosa y ramificación monopodial pinnada se caracterizó por presentar puntas rectas con abundantes hifas emanantes rígidas, color caramelo y dirigidas hacia el extremo distal del morfotipo. Las hifas emanantes no poseían las paredes engrosadas ni fíbulas, y podían ser lisas u ornamentadas. No se observaron rizomorfos. El manto es pseudoparenquimatoso, compuesto por células angulares de color castaño. No se observaron cistidios (Figura 4.17).

Si bien la frecuencia relativa de este morfotipo fue inferior al 2.6 % en ambas estaciones, presentó una amplia distribución entre los ejemplares analizados en bosque (61 % del total) incluyendo árboles de todas las categorías de edad.

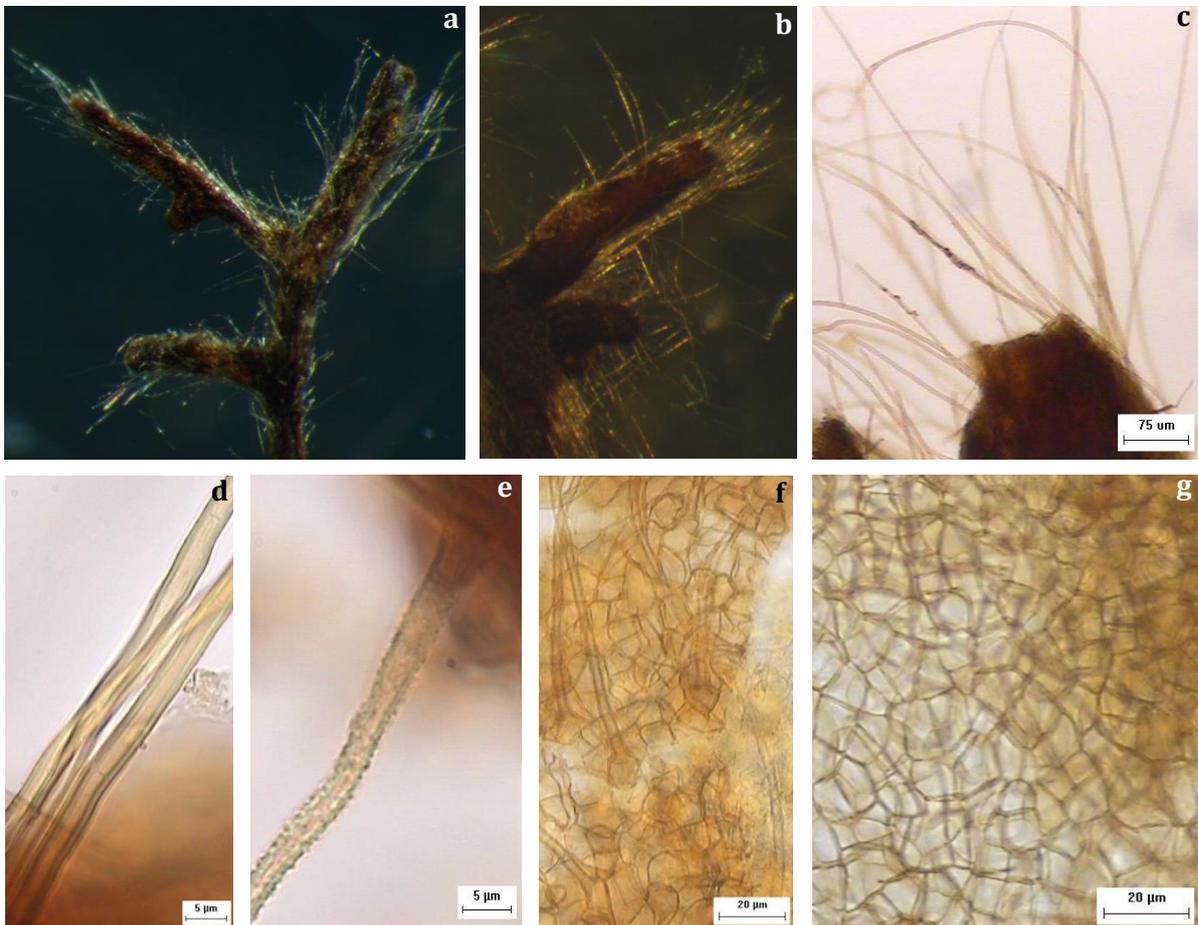


Figura 4.17.- Ectomorfo tipo formado por el hongo *Hyaloscyphaceae 1*. **a y b)** Aspecto general y detalle de las puntas colonizadas por este hongo, respectivamente; **c)** Detalle de las hifas emanantes rígidas dirigidas hacia el extremo distal del ectomorfo tipo; **d y e)** Hifas emanantes tabicadas y sin fíbulas de superficie lisa y ornamentada, respectivamente; **f)** Hifas emanantes originándose en las células del manto; **g)** Detalle del manto pseudoparenquimatoso formado por células angulares de color castaño.

Toментella sp. 1 (EcM6-n)

Este ectomorfo tipo de color negro y brillo metalizado presentó una superficie lisa o ligeramente granulada y ramificación monopodial pinnada. Las puntas son rectas y de extremo distal redondeado. Hifas emanantes ausentes y si estaban presentes se hallaban distribuidas en la mayor parte del morfotipo, eran de color blanco, delgadas y con fíbulas. No se observaron rizomorfos. El manto de esta EcM es pseudoparenquimatoso formado por células angulares de color castaño. No se registraron cistidios (Figura 4.18).

Ectomicorriza de amplia distribución en los ejemplares de *N. nervosa* analizados en el bosque nativo. Fue observada en todas las categorías de edad, abarcado el 76 % de los individuos. Se registró en ambas estaciones, siendo más abundante en primavera.

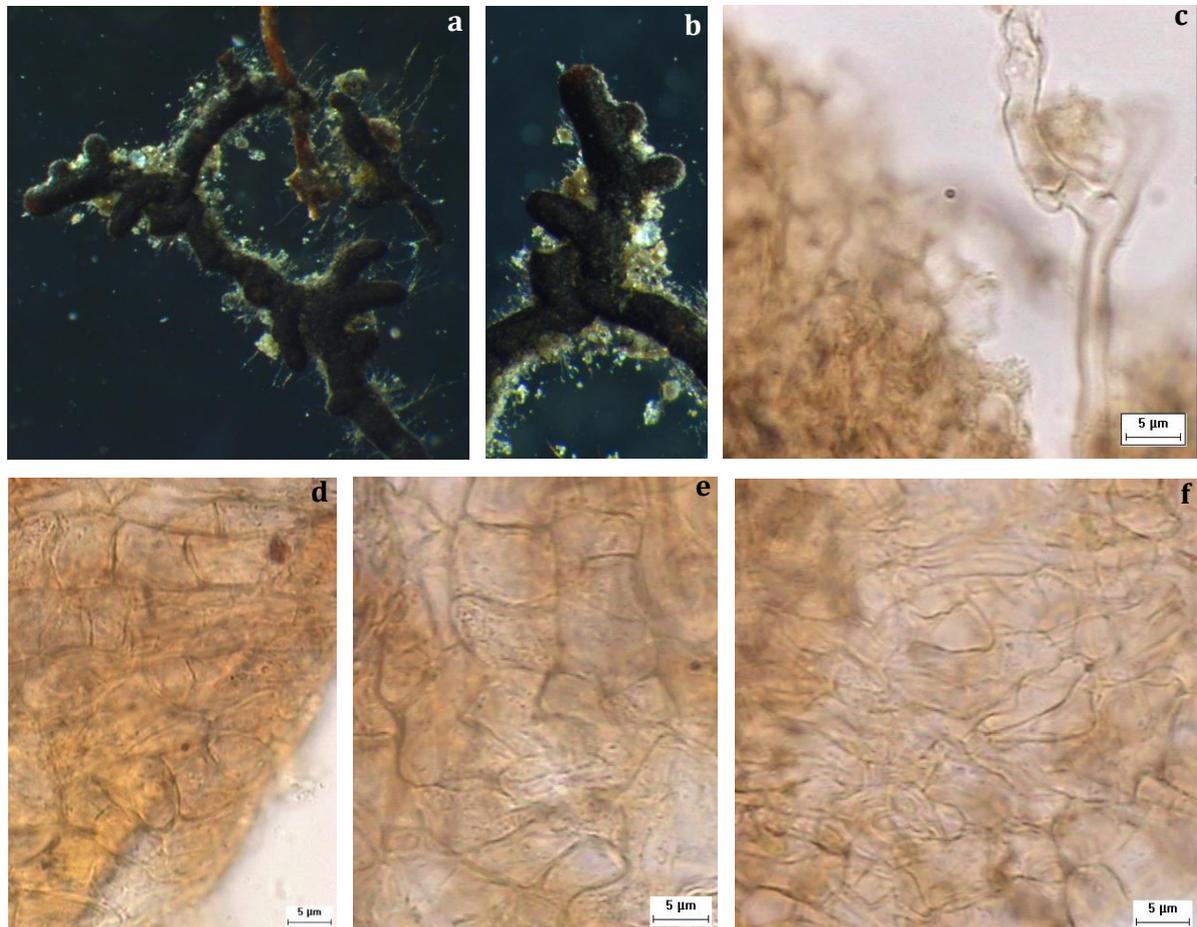


Figura 4.18.- Características anato-morfológicas del ectomorfo tipo correspondiente a *Toментella* sp. 1.

a) Aspecto general de la EcM; **b)** Detalle de algunas puntas del ectomorfo tipo agregando partículas de suelo; **c)** Hifa con fíbula sobresaliendo del manto; **d)** Aspecto del manto pseudoparenquimatoso rodeando el ápice radical; **e y f)** Detalle del patrón del manto.

Tricholoma sp. 1 (EcM1-n)

Ectomorfo tipo lanudo de puntas ramificación irregular pinnada, de puntas onduladas castaño a rojo oscuro. Presentó abundantes hifas emanantes delgadas y de color rojo, a veces más claras (rosa). Las hifas emanantes poseían fíbulas y superficie lisa u ornamentada. No se observaron rizomorfos. El manto plectenquimatoso estaba formado por hifas castaño-rojizas y presentó un patrón poco definido. No se observaron cistidios asociados al mismo.

Este morfotipo se observó en el 29 % de los individuos de *N. nervosa* analizados en el bosque nativo. No se halló en las plántulas. Se registró en ambas estaciones, pero fue más abundante en otoño (Tabla 4.1, Figura 4.19).

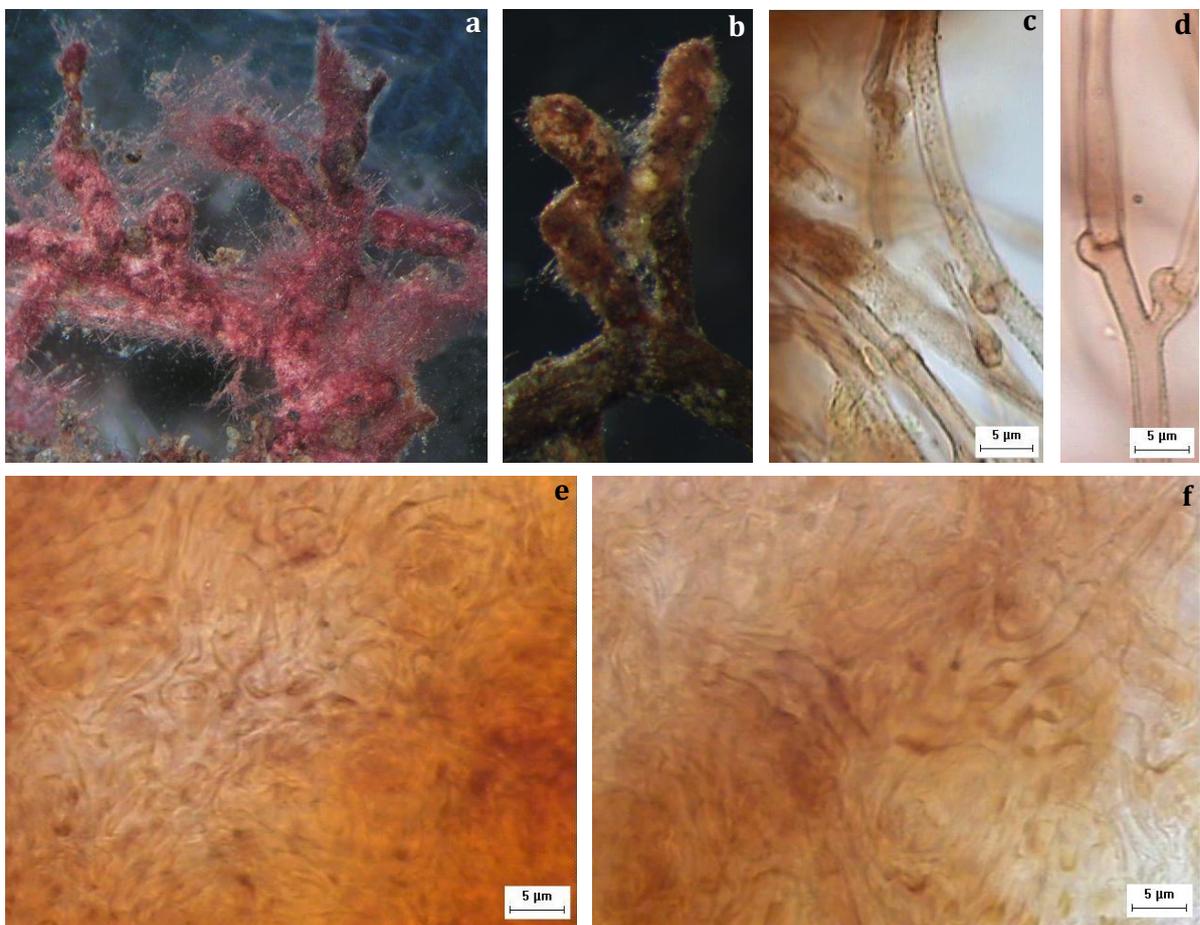


Figura 4.19.- Ectomicorriza formada por el hongo *Tricholoma sp. 1*. **a)** Aspecto general del ectomorfo tipo con abundantes hifas emanantes rojas a su alrededor; **b)** Puntas onduladas de extremo distal redondeado (a las que se les retiraron las hifas emanantes para poder observarlas detalladamente); **c y d)** Hifas emanantes de superficie lisa y ornamentadas con fíbulas; **d)** Aspecto del manto poco definido; **e)** Detalle del patrón del manto plectenquimatoso en donde pueden distinguirse hifas individuales.

Tipo Exploratorio 3: Distancia moderada

Cortinarius sp. 1 (EcM2-n)

Ectomicorriza de color castaño, lanuda y de ramificación irregular pinnada. Puntas onduladas. Presentó hifas emanantes abundantes, color castaño, tabicadas, con fíbulas y en ocasiones ornamentadas. Los rizomorfos son también de color castaño y de abundancia moderada. El manto es pseudoparenquimatoso, formado por hifas castañas y sin cistidios (Figura 4.20).

La ocurrencia de este ectomorfo tipo se detectó en el 45 % de los ejemplares de *N. nervosa* analizados en el bosque nativo. No se observó en plántulas, pero si en las restantes categorías de edad, siendo más frecuente en los jóvenes provenientes de los procesos de domesticación. Su abundancia fue mayor en primavera que en otoño.

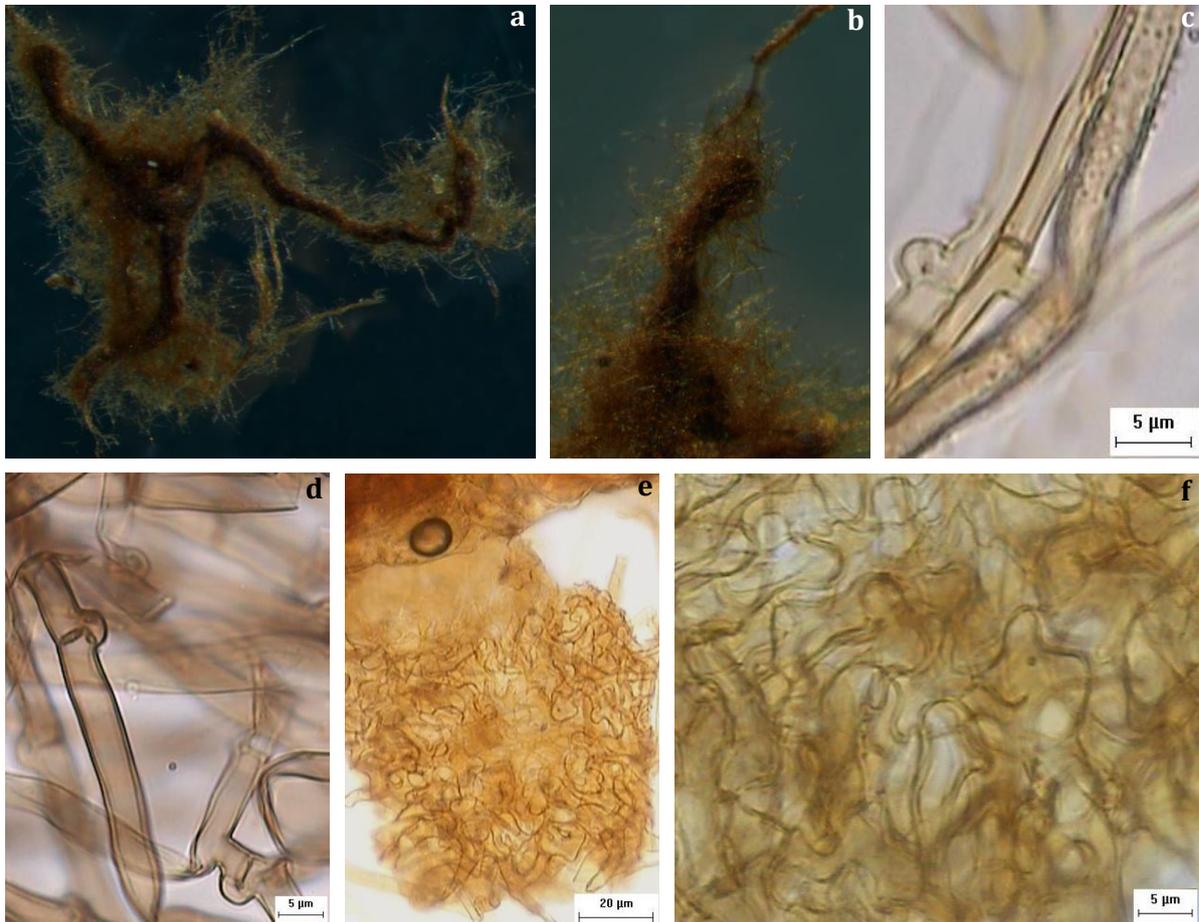


Figura 4.20.- Características morfológicas y anatómicas de la EcM formada por el hongo *Cortinarius* sp. 1. **a)** Aspecto general del ectomorfo tipo, con abundantes hifas emanantes y rizomorfos; **b)** Detalle de las puntas colonizadas y del rizomorfo asociado a la misma; **c)** Detalle de las hifas emanantes con fíbulas, siendo algunas de ellas de superficie lisa y otras ornamentadas; **d)** Detalle de fíbulas; **e)** Aspecto general del manto pseudoparenquimatoso formado por hifas castañas; **f)** Detalle del patrón del manto.

Cortinarius sp. 2 (EcM10-n)

Este ectomorfo tipo es de color miel claro y/o blanco, ligeramente algodonoso. Es irregularmente pinnado y de puntas levemente onduladas. Presentó hifas emanantes delgadas y de color blanco, con fíbulas y en ocasiones ornamentadas. Esta EcM posee rizomorfos relativamente abundantes y de color blanco, su inserción en el manto es puntual. El manto es plectenquimatoso, formado por hifas hialinas y sin cistidios (Figura 4.21).

Esta EcM tuvo amplia distribución en los individuos de *N. nervosa* del bosque nativo, hallándose en 68 % de los mismos y en todas las categorías de edad en ambas estaciones.

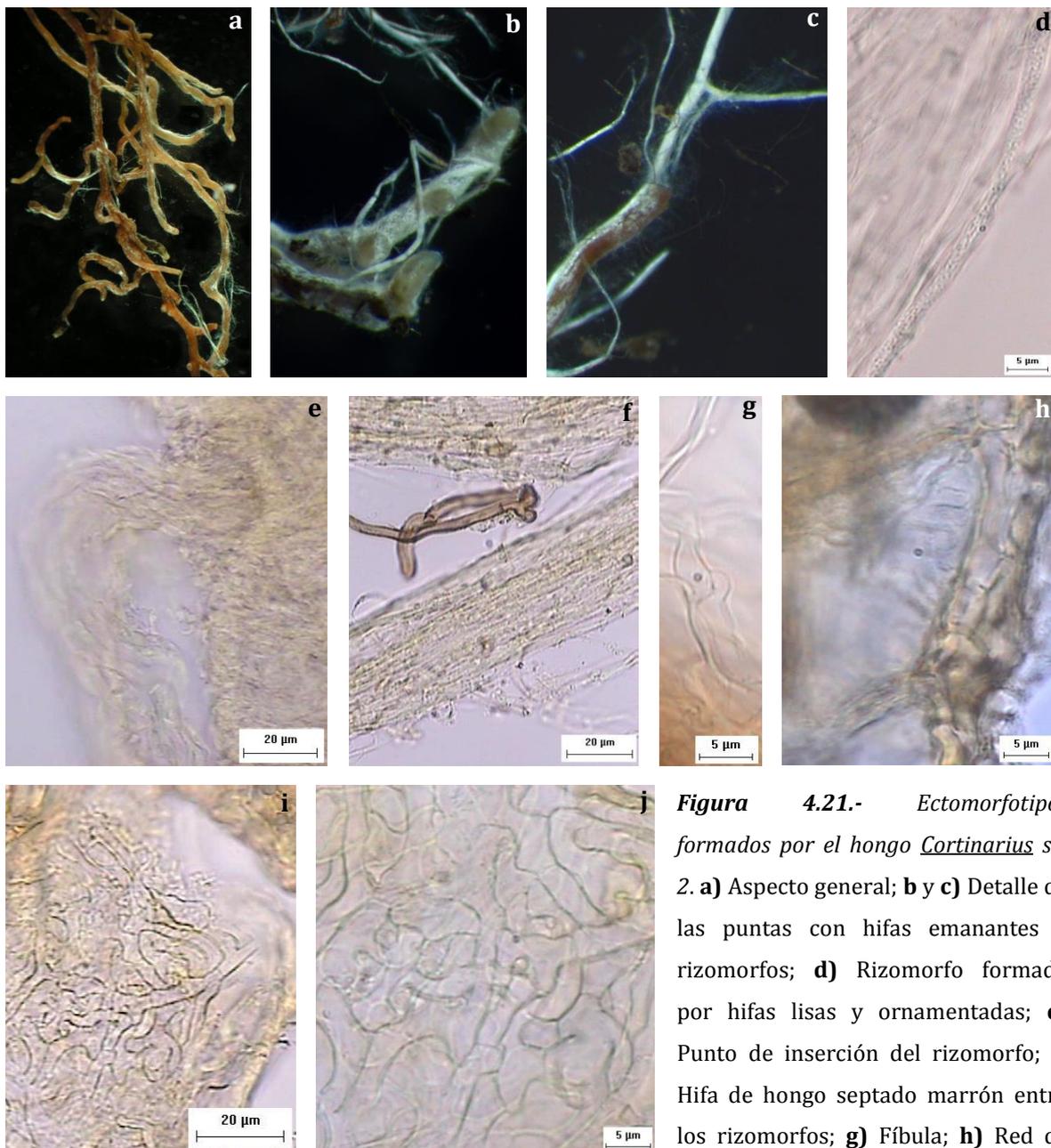


Figura 4.21.- Ectomorfo tipos formados por el hongo *Cortinarius sp. 2*. a) Aspecto general; b y c) Detalle de las puntas con hifas emanantes y rizomorfos; d) Rizomorfo formado por hifas lisas y ornamentadas; e) Punto de inserción del rizomorfo; f) Hifa de hongo septado marrón entre los rizomorfos; g) Fíbula; h) Red de Hartig; i y j) Manto plectenquimatoso.

Hymenogastraceae 1 (EcM3-n)

Ectomorfortipo de color naranja, lanudo y de ramificación irregular pinnada. Se caracterizó por poseer abundantes hifas emanantes y rizomorfos, también de color naranja. Las hifas emanantes presentaron fíbulas. El manto es pseudoparenquimatoso, formado por hifas color naranja y sin cistidios (Figura 4.22).

Este morfotipo fue hallado en el 21 % de los ejemplares analizados en el bosque, incluyendo plantas de las 4 categorías de edad (Pln, Jvn, JvDom-n, Adn). Cuando estaba presente generalmente se encontraba en alta frecuencia. Aunque se observó en ambas estaciones, fue más abundante en otoño.

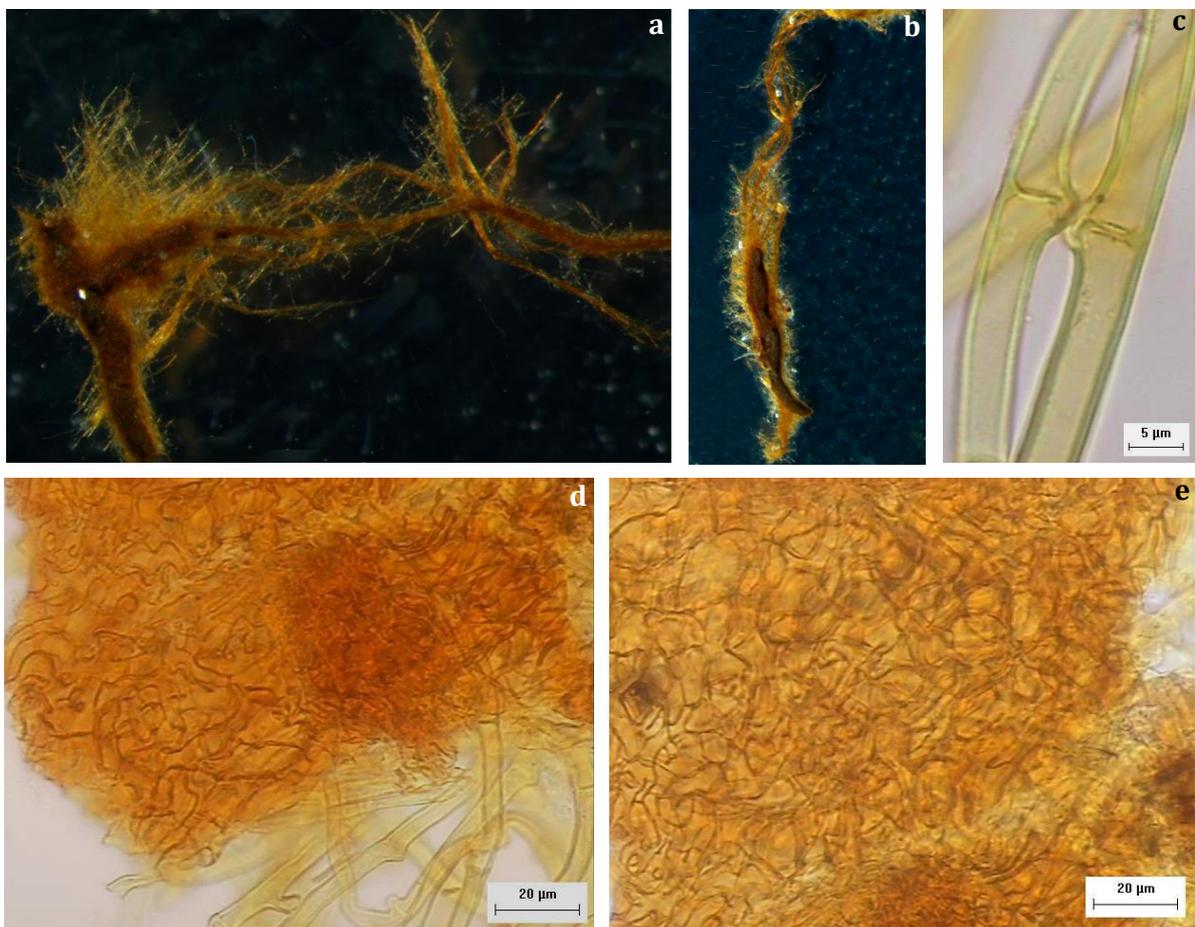


Figura 4.22.- Características del ectomorfortipo formada por el hongo *Hymenogastraceae 1*. **a)** Aspecto general del ectomorfortipo, con abundantes hifas emanantes y rizomorfos; **b)** Detalle de las punta colonizadas y del rizomorfo asociado; **c)** Detalle de las hifas emanantes de superficie lisa y con fíbulas; **e)** Aspecto general del manto pseudoparenquimatoso e hifas emanantes; **f)** Detalle del patrón del manto.

ANÁLISIS DE MICORRIZAS ARBUSCULARES

En los ejemplares de *N. nervosa* analizados, se observaron por fuera de las raíces hifas cenocíticas y vesículas, que corresponderían a estructuras fúngicas comparables a las desarrolladas por micorrizas arbusculares (MA) (Figura 4.23).

El 53 % de las plántulas (Pln), el 61 % de los jóvenes nativos (Jvn), el 62 % de los adultos (Adn) y el 72 % de los jóvenes del ensayo instalado en el bosque nativo (JvDom-n) presentaron hifas intrarradicales, tanto en otoño como en primavera. Los valores de colonización fueron inferiores al 1 % y no se registraron los rulos ni los arbuscúlos generalmente desarrollados por MA. En ocasiones se observaban estructuras similares a vesículas, pero éstas no se encontraban asociadas a hifas. Por lo tanto, se consideró que estas estructuras no corresponderían al desarrollo de MA funcionales, y que posiblemente estaban relacionadas con otros hongos o con colonizaciones micorrízico arbusculares no exitosas.

Por otro lado, se detectaron en las raíces de *N. nervosa* otro tipo de hongos endófitos, denominados hongos septados marrones. Como se muestra en la figura Figura 4.24, estos hongos se caracterizaron por presentar hifas intrarradicales regularmente septadas, estructuras cerebriformes asociadas a las mismas y esclerocios intracelulares.

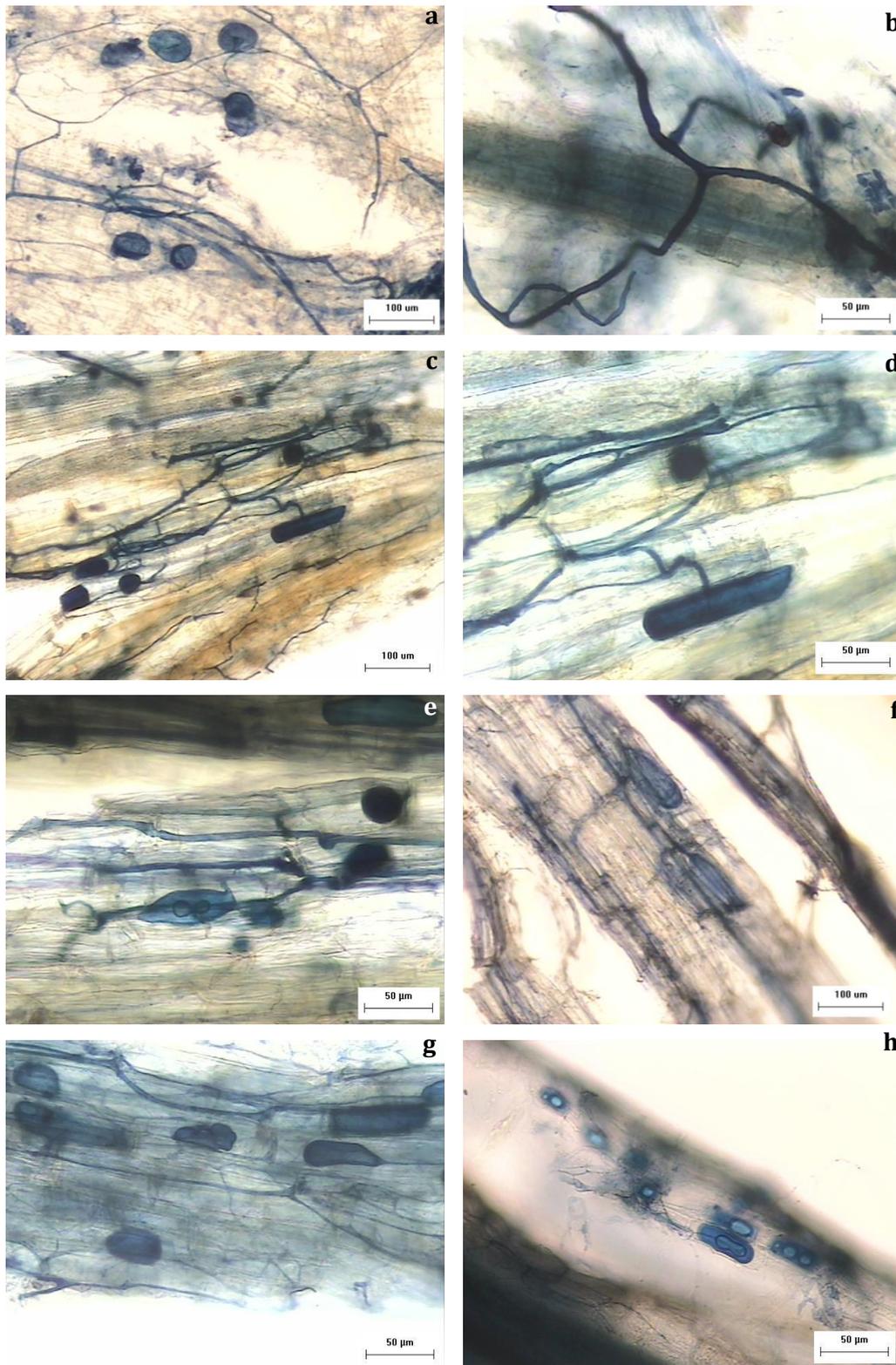


Figura 4.23- Estructuras fúngicas similares a las desarrolladas por micorrizas arbusculares en *Nothofagus nervosa*. **a y b)** Hifas y vesículas sobre la superficie de la raíz; **c-g)** Colonización fúngica intraradical en la que pueden observarse hifas y vesículas asociadas a las mismas; Detalle de las puntas colonizadas y del rizomorfo asociado; **c)** Detalle de las hifas emanantes de superficie lisa y con *fibulas*; **h)** Estructuras similares a vesículas con cuerpos lipídicos pero que no están asociadas a hifas.

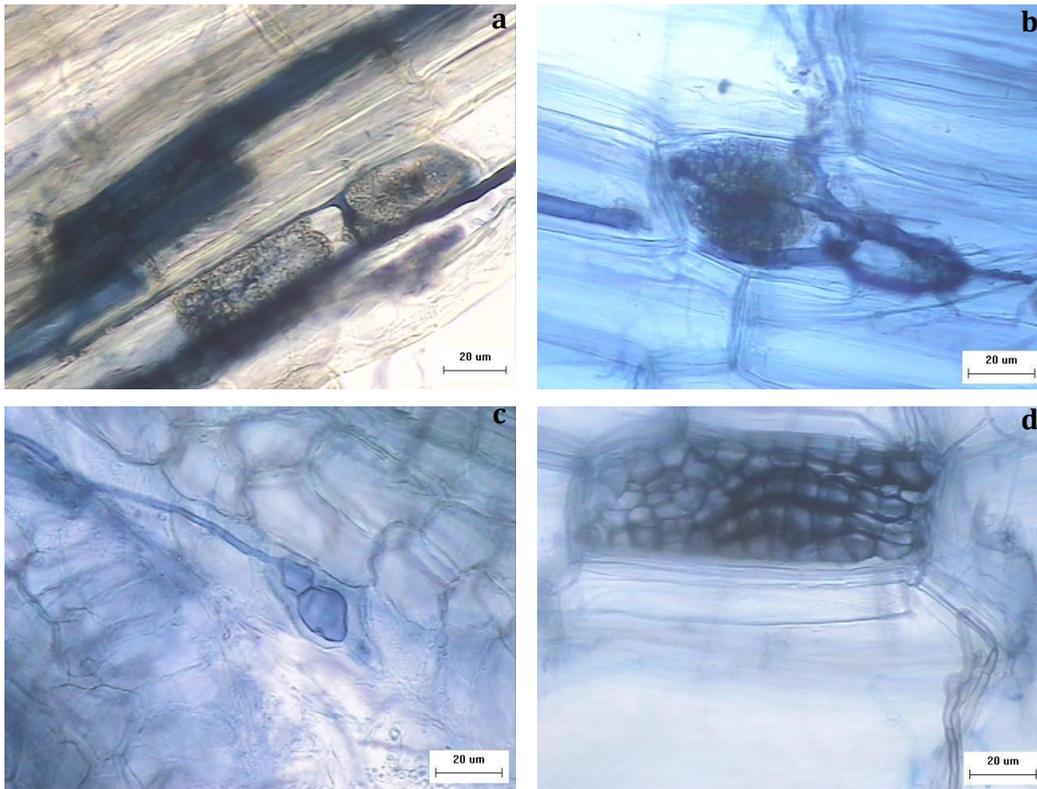


Figura 4.24- Hongos septados marrones presentes en las raíces de *Nothofagus nervosa*. **a y b)** Estructuras cerebriformes asociadas a hifas intracelulares; **c)** Hifa tabicada comenzando a formar un esclerocio intracelular; **d)** Esclerocio de hongo septado marrón ocupando la totalidad del volumen celular.

DISCUSIÓN

PORCENTAJES DE COLONIZACIÓN MICORRÍCICA

En este Capítulo se evaluaron los porcentajes de colonización ectomicorrícica en ejemplares de *N. nervosa* de distintas edades y tanto nativos como provenientes de procesos de domesticación. Se analizaron un total de 50 individuos de *N. nervosa* (25 en cada estación) y todos ellos presentaron EcM. El número de ápices radicales cuantificados en las plántulas (~200) y en los jóvenes implantados bajo pino (JvDom-e) (~400) fue inferior al analizado en las demás categorías de edad (~800). En las plántulas este hecho se debe al menor tamaño del sistema radical respecto de los ejemplares jóvenes y adultos, mientras que en los jóvenes de *N. nervosa* analizados en la plantación de pinos esta diferencia se debe a la menor cantidad de raíces extraídas por muestra (en ocasiones los sacabocados no contenían raíces), sugiriendo que en este ambiente los jóvenes presentan un menor desarrollo del sistema radical.

Entre los individuos del bosque, los porcentajes de colonización fueron elevados (> 90 %) para todas las categorías de edad consideradas (Pln, Jvn, Adn y JvDom-n). Estos valores son comparables al 89 % registrado para *N. pumilio* en distintos bosques comprendidos en el Parque Nacional Nahuel Huapi (Longo *et al.* 2011), pero superiores a los descriptos por Diehl (2006) y Diehl *et al.* (2008) en distintas especies de *Nothofagus* (*N. antarctica*, *N. dombeyi*, *N. nervosa*, *N. obliqua* y *N. pumilio*). Estos últimos autores registraron que el porcentaje de EcM en estas especies oscila entre 72 % y 79 %, siendo el correspondiente a *N. nervosa* 74 %. El hecho de que hayan llevado a cabo su estudio en verano podría explicar esta diferencia en los valores de colonización respecto de los de este trabajo de Tesis. Porcentajes de EcM superiores al 90 % también han sido registrados en otras especies forestales, tales como *Picea sitchensis* (Palfner *et al.* 2005) y *Quercus rubra* (Gebhardt *et al.* 2007). Por otro lado, los porcentajes de EcM correspondientes a los jóvenes instalados en la plantación de pinos (JvDom-e), fueron significativamente menores que los observados en los jóvenes analizados en el bosque nativo (Jvn y JvDom-n), tanto en otoño como en primavera. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que se ha determinado que la colonización micorrícica se encuentra directamente influenciada por distintos tipos de disturbios (Allen 1988, Gebhardt *et al.* 2007, Longo *et al.* 2011), entre los que se encuentra el establecimiento de plantaciones monoespecíficas de especies exóticas. En Patagonia, Longo *et al.* (2011) estudiaron la influencia de incendios forestales sobre las comunidades de EcM de *N. pumilio*, y hallaron que el porcentaje de colonización es significativamente superior en los bosques que no han sido afectados por este disturbio. Como se discutirá más adelante en este Capítulo y en el Capítulo 5, esta disminución en la colonización ectomicorrícica está probablemente relacionada con las diferentes propiedades físico-químicas y las diferencias en la composición de las comunidades fúngicas del suelo de la plantación de pinos respecto de las observadas en el bosque nativo.

Entre los ejemplares estudiados en el bosque, se detectaron los mayores valores de colonización en los adultos y los más bajos en las plántulas, presentando ambas categorías de jóvenes (Jvn y JvDom-n) valores intermedios. Una tendencia similar fue observada en la especie *Quercus liaotungensis*, en la que los porcentajes de colonización fueron de 84-89 % en plántulas, 90-91 % en jóvenes y 93 % en adultos, aunque las diferencias entre las distintas categorías de edad no fue significativa (Wang *et al.* 2011). Gebhardt *et al.* (2007) determinaron que el porcentaje de colonización ectomicorrícica en ejemplares jóvenes de *Q. rubra* (5 años de edad) era significativamente menor que el de los adultos (de 21, 33, 43 y 46 años de edad) y Palfner *et al.* (2005) hallaron que las plántulas de *Picea sitchensis* presentaban menores valores de colonización que los árboles de mayor edad. Esta variación

en la ocurrencia de EcM entre plantas de diferente edad podría estar relacionada con el tamaño del sistema radical, que es considerablemente menor en las plántulas, de forma que sistemas radicales de menor extensión están en contacto con menor cantidad y/o diversidad de propágulos micorrícicos. Esta diferencia entre edades también podría estar relacionada con el tiempo que la planta haya estado expuesta al inóculo micorrícico, siendo posible que a mayor tiempo de exposición al inóculo las plantas posean porcentajes de colonización más elevados. Para poder describir y explicar en mayor detalle este fenómeno son necesarios posteriores análisis.

En este trabajo se determinó que tanto en el bosque nativo como en la plantación de pinos los valores de colonización de EcM fueron más elevados en otoño, siendo mayor la diferencia en este último ambiente. Estos resultados acuerdan con distintos trabajos en los que se han señalado diferencias estacionales en los valores de colonización micorrícica, encontrándose entre ellos el llevado a cabo por Longo *et al.* (2011), quienes hallaron que *N. pumilio* suele presentar porcentajes de colonización ectomicorrícica más elevados en otoño que en primavera. Asimismo, Fontenla *et al.* (1998, 2001) observaron en bosques de *Austrocedrus chilensis* de la región Andino-patagónica que los valores de colonización de micorrizas arbusculares (MA) fueron mayores en otoño e invierno que en primavera y verano. Por el contrario, Becerra *et al.* (2005) observaron en el Noroeste de Argentina que la colonización micorrícico-arbuscular de *Alnus acuminata* era mayor en primavera que en otoño. De igual forma, Diehl & Fontenla (2010) señalaron en *Araucaria araucana* una mayor colonización de MA en primavera respecto del otoño. En base a esta información puede decirse que los valores de colonización micorrícica pueden seguir patrones de estacionalidad, pero las tendencias son diferentes dependiendo de la especie y del ambiente en que se lleve a cabo el estudio. Uno de los factores que podría estar relacionado con este fenómeno es la dinámica de crecimiento de las raíces de la especie hospedadora, siendo posible que durante la época en la que el sistema radical se encuentra sumamente activo y se forman raíces nuevas la planta presente mayores porcentajes de colonización.

En cuanto a la ocurrencia de MA en *N. nervosa*, se consideró a esta especie no hospedadora debido al bajo porcentaje (< 1%) de estructuras fúngicas características de este tipo de simbiosis y a la ausencia de arbusculos. Estos resultados acuerdan con los descriptos en el Capítulo 3 de este trabajo de Tesis (ausencia de MA en plántulas de esta especie cultivadas en vivero) y con trabajos previos en los que se indica que las especies arbóreas estudiadas hasta el momento en los bosques Andino-patagónicos presentan un único tipo de micorrizas: EcM en especies del género *Nothofagus* (Singer & Moser 1965, Singer 1971, Godoy *et al.* 1994, Godoy & Palfner 1997, Fontenla *et al.* 1998, Diehl 2006, Tedersoo *et al.*

2009, Longo *et al.* 2011) y MA en *A. chilensis* y *A. araucana* (Fontenla *et al.* 1998, Diehl *et al.* 2008, Diehl & Fontenla 2010). Esta tendencia también coincide con la descrita para la mayor parte de las especies arbóreas de América del Norte y Europa (Wang & Qiu 2006, Smith & Read 2008), pero difiere de la observada en algunos ejemplares de especies forestales comprendidas en los géneros *Pinus*, *Tsuga* y *Pseudotsuga* (Wang & Qiu 2006), *Quercus* (Dickiel *et al.* 2001) y *Eucalyptus* (Lapeyrie & Chilvers 1985, Boudarga *et al.* 1990, Adjoud *et al.*, 1996, Adjoud-Sadadou & Halli-Hargas 2000), que presentan tanto EcM como MA. Las escasas estructuras fúngicas similares a las desarrolladas por MA detectadas en las raíces de *N. nervosa* podrían deberse a colonizaciones no exitosas por parte de estos hongos (Smith & Read 2008) o bien a la presencia de otras especies fúngicas capaces de formarlas, lo que ha sido previamente descrito en otras plantas (Brundrett 2002), incluyendo 10 especies de pteridophytas no hospedadoras analizadas en un bosque valdiviano comprendido en el Parque Nacional Nahuel Huapi (Fernández *et al.* 2010). La presencia de hongos septados marrones tales como los observados en este trabajo se ha descrito en las raíces de distintas especies vegetales de Patagonia (Diehl 2006, Fernández *et al.* 2008, 2010, Bruzone 2010). Estos hongos son capaces de desarrollarse en diversos hábitats (ej. tropicales, templados, esteparios, costeros) y en un amplio rango de hospedadores (ej. angiospermas, gimnospermas, pteridofitas). Es común hallarlos en especies no hospedadoras así como en aquellas típicamente micorrícicas (Jumpponen & Trappe 1998, Jumpponen 2001, Peterson *et al.* 2004).

Como se mencionó en el Capítulo 1, los bosques Andino-patagónicos están desarrollados sobre Andisoles, que se caracterizan por una baja disponibilidad de P para las plantas (Mazzarino & Gobbi 2005). A pesar de ello, las especies arbóreas que se desarrollan en los mismos no presentan estrategias de conservación para el P. En base a ello, Diehl (2006) y Diehl *et al.* (2008) plantearon que las micorrizas constituyen uno de los mecanismos de facilitación en la absorción de nutrientes en estos bosques, principalmente de P. Los altos porcentajes de EcM hallados en este estudio así como los reportados por otros trabajos (Singer & Moser 1965, Singer 1971, Godoy *et al.* 1994, Godoy & Palfner 1997, Fontenla *et al.* 1998) sustentan esta afirmación y remarcan la importancia de esta simbiosis en la dinámica de nutrientes y la necesidad de tenerla en cuenta durante los programas de domesticación de especies forestales nativas.

HONGOS FORMADORES DE ECTOMICORRIZAS EN *NOTHOFAGUS NERVOSA*

Como se mencionó anteriormente, identificar los hongos formadores de EcM de *N. nervosa* requirió evaluar diferentes protocolos de extracción, purificación y amplificación de

ADN, por lo que comprendió un proceso laborioso y extenso. La dificultad de amplificar el ADN de estos hongos ha sido también descrita por Mestre (2012), quien analizó los hongos formadores de EcM en *N. antarctica* y *N. pumilio*. Estos inconvenientes impidieron que en el tiempo de desarrollo de esta Tesis pudieran obtenerse más de una secuencia para algunos de los grupos de ectomorfotipos, como se había planteado. Sin embargo, los resultados obtenidos permitieron realizar interesantes análisis sobre la diversidad y composición de las comunidades ectomicorrícicas asociadas a *N. nervosa*, las cuales serán discutidas a continuación y a lo largo de esta sección del Capítulo.

En todos los ejemplares de *N. nervosa* estudiados se reconocieron más de un grupo de ectomorfotipos. Se definieron un total de 31 grupos, 27 de ellos en el bosque y 4 en la plantación de pinos, y se identificaron los hongos formadores de EcM en 25 de ellos (81 %). Se observó, al comparar las secuencias obtenidas con las disponibles en el GenBank, que la mayoría de ellas presentaron un bajo porcentaje de homología con las de esta base de datos (Tabla 4.3). Esta observación acuerda con lo observado por otros autores que han estudiado las comunidades de EcM en diferentes regiones del mundo (Jonsson *et al.* 2002, Smith *et al.* 2007, Tedersoo *et al.* 2007, Tedersoo *et al.* 2009b, Wang *et al.* 2011), pero especialmente con Mestre (2012) y Tedersoo *et al.* (2009a), quienes analizaron las EcM asociadas a diferentes especies de *Nothofagus* y también hallaron baja homología entre muchas de sus secuencias y las disponibles en las bases de datos públicas (Genbank, UNITE). Entre las principales razones de la baja homología observada entre las secuencias obtenidas a partir distintos hongos ambientales y especies fúngicas conocidas se encuentra el hecho de que correspondan a especies nuevas no descritas hasta el momento, o bien a especies que no forman cuerpos fructíferos o conidióforos, que son las estructuras en las que se basa la taxonomía y descripción tradicional de los hongos y que permiten asignarles un nombre (Ryberg *et al.* 2009). Además, a pesar de que la región ITS corresponde a una de las más utilizadas para la identificación molecular de hongos, se estima que las secuencias disponibles correspondientes a especies descritas (cuerpos fructíferos) es menor al 1 % del número total de especies estimadas para el Reino Fungi (Nilsson *et al.* 2005). Por lo tanto, existen muchas secuencias ambientales que no pueden ser ligadas a especies de identidad taxonómica conocida (Horton *et al.* 2005, Bastias *et al.* 2006, Kjølner 2006, Ryberg *et al.* 2009). De acuerdo a la revisión realizada por Ryberg *et al.* (2009), en Sudamérica el número de secuencias de hongos disponibles para la región ITS es significativamente menor que en otros lugares del mundo (Norteamérica, Europa del Este, China, Japón), dificultando así la identificación molecular de estos organismos y la realización de estudios bioecológicos y biogeográficos en un marco taxonómico adecuado.

Se identificaron 26 hongos formadores de EcM, perteneciendo la mayor parte de ellos al Phylum Basidiomycota (81 %) y el resto al Phylum Ascomycota (19 %). Esta tendencia coincide con la descrita por distintos autores que señalan que la mayor parte de las EcM están formadas por hongos pertenecientes al Phylum Basidiomycota (Horton & Bruns 2001, Peterson *et al.* 2004, Smith & Read 2008, Wang *et al.* 2011). También acuerda con los trabajos llevados a cabo por Tedersoo *et al.* (2010) en *N. cunninghamii* y Mestre (2012) en *N. antarctica* y *N. pumilio*, quienes determinaron que la mayor parte de las EcM asociadas a estas especies (88 % y 63%, respectivamente) están formadas por hongos basidiomicéticos. Tal como describen estos autores, en este trabajo se observó que los hongos formadores de EcM comprendidos en el orden Agaricales fueron dominantes tanto a nivel de especies (54 %) como de abundancia relativa (Figura 4.6, Tabla 4.3), siendo el género *Cortinarius* el más ampliamente representado (Tabla 4.3).

Las secuencias de los hongos obtenidas a partir de los ectomorfortipos de *N. nervosa* se asociaron a especies y/o géneros fúngicos generalmente ectomicorrícicos (incluidos en la lista de hongos formadores de EcM publicada por Rinaldi *et al.* 2008). La mayor parte de los taxones fúngicos hallados en este trabajo han sido previamente citados en bosques de *Nothofagus*. Por ejemplo, Singer (1971) ha descrito que algunas especies comprendidas en los géneros *Inocybe* y *Cortinarius* son micorrícicas obligadas en estos bosques, ya que requieren del establecimiento de la simbiosis para la formación de sus cuerpos fructíferos. *Descolea antarctica* es una especie ectomicorrícica que coloniza las raíces de *N. dombeyi* (Alberdi *et al.* 2007), *N. nervosa* (Palfner 1998) y *N. obliqua* (Valenzuela *et al.* 2008). Por otro lado, Mestre (2012) halló EcM formadas por hongos incluidos en los géneros *Cenococcum*, *Cortinarius*, *Descolea* e *Inocybe* en ejemplares de Lenga y Ñire, mientras que Tedersoo *et al.* (2010) describieron numerosos hongos asociados a EcM de *N. cunninghamii* pertenecientes a los géneros *Clavulina*, *Cortinarius*, *Descolea*, *Hebeloma*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Russula*, *Sebacina* y *Tomentella*, entre otros. Ninguna de las EcM halladas en los ejemplares de *N. nervosa* analizados en el bosque o en la plantación coincidieron con las descritas previamente en las plántulas cultivadas en el vivero del INTA y descriptas en el Capítulo 3 (EcM Ascomicética sp. 1, *Hebeloma cavipes*, *Peziza* sp. 1, *Peziza* sp. 2, *Rickenella* sp. 1, *Tomentella ellisii*). En base a esta información puede decirse que las especies del género *Nothofagus* establecen simbiosis ectomicorrícicas principalmente con hongos del Phylum Basidiomycota, y que la ocurrencia de los distintos ectomorfortipos en sus raíces es muy diversa.

En general, en aquellos grupos de ectomorfortipos que presentaron más de una secuencia, se determinó que éstas pertenecían a la misma especie fúngica (ej. *Cortinarius* sp. 2, Hymenogastraceae 1, *Tomentella* sp. 1). Sin embargo, para algunos grupos se observaron

las siguientes situaciones: I) secuencias que presentaban diferencias nucleotídicas entre sí pero cuyos taxones e incluso las secuencias más filogenéticamente afines eran las mismas (*Cortinarius* sp. 1, *Cortinarius* sp. 3, *Tricholoma* sp. 2), y II) secuencias que pertenecían a distintas especies fúngicas (*Cortinarius* sp. 5a y *Cortinarius* sp. 5b)¹⁰. En cuanto al primer caso (I), es posible que las diferencias nucleotídicas observadas entre los distintos ejemplares considerados dentro de un mismo grupo sean consecuencia de la variación genética intraespecífica del hongo simbiote, lo cual ha sido descrito en algunos hongos formadores de EcM. Por ejemplo, Karén *et al.* (1997) hallaron polimorfismos intraespecíficos en la región ITS de 7 especies formadoras de EcM, siendo 4 de ellas *Cortinarius*. Estos polimorfismos correspondían a mutaciones de longitud y oscilaban entre 5 y 15 pb. Asimismo, Smith *et al.* (2007) hallaron variabilidad genética en el fragmento ITS en 27 especies de hongos ectomicorrícicos (el 40 % del total analizado). Estas diferencias variaban entre 1-47 pb dependiendo del hongo y de la estructura fúngica analizada (esporocarpo, ápice radical ectomicorrícico, esclerocio). Si bien las razones de este fenómeno no han sido claramente enunciadas hasta el momento, se ha sugerido que la variación en la región ITS es mayor en aquellos grupos taxonómicos que han experimentado una reciente radiación evolutiva o que presentan una elevada diversidad de especies, tal como se observa en el género *Cortinarius* (Karén *et al.* 1997, Smith *et al.* 2007). Con respecto a la segunda situación (II), existe la posibilidad de que se hayan incluido en un mismo grupo de afinidad ectomorfofotipos de aspecto macro y microscópico similar pero formados por diferentes hongos (*Cortinarius* sp. 5a y *Cortinarius* sp. 5b). Como se mencionó en la Introducción de este Capítulo, es posible que hongos taxonómicamente afines formen ectomorfofotipos de características muy similares, haciendo dificultosa su diferenciación morfológica. El hecho de que este tipo de dificultades hayan ocurrido principalmente con ejemplares del género *Cortinarius* se debe probablemente a la enorme diversidad y complejidad de esta taxón, y resalta la necesidad de estudiarlos más detalladamente (Karén *et al.* 1997).

Resulta interesante mencionar que entre las muestras secuenciadas se encontraron distintos hongos no relacionados con la simbiosis ectomicorrícica, tales como saprobios de suelo (ej. *Trichoderma* sp.), patógenos vegetales (ej. *Neonectria* sp.) y levaduras (ej. *Candida* sp., *Cryptococcus* sp.). Estos resultados acuerdan con los enunciados en el Capítulo 3 y con otros estudios en los que ha descrito la presencia de hongos no ectomicorrícicos en íntima

¹⁰ Cabe aclarar que se denominaron estas dos especies fúngicas como *Cortinarius* sp. 5a y *Cortinarius* sp. 5b en lugar de *Cortinarius* sp. 5 y *Cortinarius* sp. 6 para destacar el hecho de que durante la cuantificación y caracterización de EcM se consideró a las mismas como pertenecientes al mismo grupo de ectomorfofotipos (EcM27-n).

asociación con los ectomorfortipos analizados (El Karkouri *et al.* 2005, Landeweert *et al.* 2005, Menkis & Vasaitis 2011, Mestre 2012).

DINÁMICA DE COMUNIDADES DE ECTOMICORRIZAS

En el bosque se hallaron 27 grupos de ectomorfortipos, 24 de ellos estuvieron asociados a Jóvenes nativos y 26 a Jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados en el bosque, mientras que en los jóvenes implantados bajo pino se observaron sólo 4 grupos de ectomorfortipos. Estos ambientes no presentaron EcM en común, aunque en ambos dominaron las especies ectomicorrícicas pertenecientes al Phylum Basidiomycota. Entre las principales causas de esta alteración en las comunidades ectomicorrícicas se encuentra el cambio en las características físico-químicas del suelo (detalladas en Capítulo 5), ya que bajo la plantación de pinos los valores de pH, la granulometría, el contenido de diferentes nutrientes (principalmente el C y N) y la actividad microbiana del suelo son menores que en bosques nativos, reduciéndose entonces las tasas de descomposición y mineralización de la materia orgánica (Ross 1996, Guo & Gifford 2002, Satti *et al.* 2003, Bastias *et al.* 2007, Burton *et al.* 2007a,b, Richards *et al.* 2007, Rivas *et al.* 2009). Estos aspectos serán discutidos en mayor detalle en el Capítulo 5. De acuerdo a distintos autores, otro factor que afecta la composición de las comunidades microbianas del suelo, entre las que se encuentran las micorrizas, son las EcM asociadas a la especie forestal que se implante. Por ejemplo, Bastias *et al.* (2007) estudiaron la composición fúngica del suelo en un bosque nativo de *Eucalyptus* spp. y en una plantación de *P. elliotii* adyacente al mismo. Estos autores hallaron que el establecimiento de esta última alteró las comunidades de hongos del suelo, y atribuyen parte del fenómeno al cambio en las EcM asociadas a la especie vegetal dominante. Por otro lado, Dunstan *et al.* (1998) y Chapela *et al.* (2001) demostraron que la riqueza de especies de hongos formadores de EcM en plantaciones monoespecíficas de *Pinus* es considerablemente menor que la descrita para el género en lugares del mundo donde éste es autóctono. Por lo tanto, resulta evidente que una especie que es implantada fuera de su área natural de distribución genera cambios en la composición de las comunidades de EcM presentes tanto en el suelo donde será establecida como en sus propias raíces. Estos cambios varían de acuerdo al clima, tipo de suelo, vegetación e intensidad de las prácticas de manejo (Lugo & Brown 1993, Guo & Gifford 2002). En este estudio se observó que el establecimiento de una plantación de coníferas exóticas altera las comunidades de EcM presentes en las raíces del Raulí, disminuyendo significativamente los porcentajes de colonización, la riqueza y diversidad de las mismas.

La riqueza de ectomorfotipos registrada en los individuos del bosque fue comparable a la registrada por Longo *et al.* (2011) en *N. pumilio*, quienes hallaron 23 grupos de ectomorfotipos. Por otro lado, los valores de riqueza obtenidos en este trabajo fueron superiores a los observados anteriormente por Diehl (2006), que describió 8 grupos de ectomorfotipos en *N. nervosa*, 9 en *N. obliqua* y 10 en *N. pumilio* y *N. dombeyi*. También resultó más elevada que la descrita en los ejemplares de vivero cultivados en el INTA durante los procesos de domesticación de esta especie (Capítulo 3), en los que se describieron 2 grupos de ectomorfotipos de afinidad morfológica. En base a esta información puede sugerirse que al estar expuesta a un inóculo micorrízico apropiado y sin fertirriego esta especie es capaz de desarrollar EcM con un amplio rango de hongos. Una observación común a los Raulés estudiados en el vivero y en el bosque nativo es que existió una o unos pocos (9) grupos de ectomorfotipos dominantes (mayor abundancia relativa) respectivamente, mientras que el resto correspondían a grupos minoritarios. Este hecho es consistente con lo reportado por Mestre (2012) en *N. antartica* y *N. pumilio* y por diversos autores en distintos lugares del mundo (Horton & Bruns 2001, Smith *et al.* 2002, Izzo *et al.* 2005, Saari *et al.* 2005, Martin 2007, Wang & Guo 2010, Wang *et al.* 2011).

Con respecto a los Tipos exploratorios de las EcM presentes en las raíces de *N. nervosa*, se observó que tanto en el bosque como en la plantación predominaron las EcM del Tipo 1 (Contacto), seguidas por las de Tipo 2 (Corta distancia) y, en el bosque, las de Tipo 3 (Distancia moderada), tanto a nivel del número de especies comprendido en cada grupo como de la abundancia relativa de cada uno de ellos (Tabla 4.5). Mestre (2012) también registró estos tres Tipos exploratorios en Lengua y Ñire. Esta información señala que las diferentes especies de *Nothofagus* se asocian a diversas EcM con características diferentes, probablemente relacionadas con una absorción diferencial de nutrientes y agua. Es necesario profundizar los estudios en estos aspectos funcionales de las EcM ya que aportarían información de relevancia en el momento de seleccionar aquellas que pudieran utilizarse como inóculo durante los procesos de domesticación de la especie forestal.

En base a los distintos análisis realizados, pudo determinarse que existen ciertas tendencias en la riqueza y diversidad de grupos de ectomorfotipos respecto de la edad de las plantas y de la estación del año en que se las estudie, ya que algunos ectomorfotipos se encontraron en todas las categorías de edad en ambas estaciones, mientras que otros se observaron asociados a alguna de ellas y/o durante sólo una estación. En cuanto al efecto de la edad sobre las comunidades de EcM, se determinó que las plántulas presentaban menor riqueza y diversidad de EcM que el resto de las categorías de edad estudiadas en el bosque. De hecho, en el AFCM realizado se observa que el grupo en el que se incluye esta categoría de

edad (Figura 4.7, Grupo IV) se caracterizó por carecer de algunos ectomorfotipos (EcM1-n, EcM2-n, EcM22-n) y por presentar una menor proporción de otros (EcM7-n, EcM15-n, EcM16-n) (Tabla 4.1). La baja riqueza y diversidad de EcM en las plántulas respecto de las demás categorías de edad se ve reflejada también en los índices de Jaccard clásico (J) y modificado (J_{mod}), ya que las plántulas presentaron los menores valores de similitud al compararlas con los demás grupos de plantas (Jvn, Adn, JvDom.n). Esta tendencia coincide parcialmente con la descrita en trabajos realizados en distintas especies vegetales. Twieg *et al.* (2007) estudiaron las comunidades de hongos ectomicorrícicos asociadas a *Pseudotsuga menziesii* y *Betula papyrifera* en base a 4 categorías de edad: 5, 26, 65 y 100 años. Estos autores hallaron que en *P. menziesii* la diversidad de hongos formadores de EcM era significativamente menor en las plantas de 5 años y se incrementaba con la edad de los árboles siendo similar en los ejemplares de 65 y 100 años, mientras que no detectaron diferencias entre las categorías de edad de *B. papyrifera*. Palfner *et al.* (2005) estudiaron la diversidad de EcM en *Picea sitchensis* según las categorías: < 1 año, 6, 12, 30 y 40 años, y determinaron que la riqueza de hongos formadores de EcM se incrementaba a lo largo de esta cronosecuencia, siendo mayor en los adultos de 40 años. De igual forma Rao *et al.* (1997) y Gebhardt *et al.* (2007) demostraron en *Pinus kesiya* y *Quercus rubra* respectivamente que la riqueza y diversidad de EcM se incrementa con la edad de planta. Una de las posibles explicaciones para esta tendencia es que cuando la planta crece se desarrolla el dosel de la misma, incrementándose la superficie foliar y consecuentemente la cantidad de C que la planta asimila, que transporta a las raíces y que “invierte” en la simbiosis (Twieg *et al.* 2007). Otra explicación posible es que a medida que la planta se desarrolla las raíces también son más abundantes y se distribuyen de forma más regular debajo del dosel, pudiendo asociarse entonces a mayor diversidad de hongos edáficos (Kranabetter *et al.* 2005), influyendo así positivamente en la diversidad de EcM en las raíces (Twieg *et al.* 2007). En este trabajo, los ectomorfotipos observados en las raíces de las plántulas fueron también hallados en ejemplares de las demás categorías de edad. Esta similitud entre las EcM asociadas a individuos de diferente edad ha sido previamente descrita en otras especies forestales, tales como *P. sylvestris* (Jonsson *et al.* 2002) y *Q. liaotungensis* (Wang *et al.* 2011). Este fenómeno podría ser consecuencia de que las plantas de distinta edad están expuestas a un mismo inóculo micorrícico, o bien a que las EcM presentes en los jóvenes y adultos circundantes a las plántulas actúan como fuente de inóculo. De hecho, ha sido sugerido que las plántulas podrían adquirir C y N a partir de los adultos al establecer conexiones hifales entre sí (Simard *et al.* 1997, He *et al.* 2006, Wang *et al.* 2011). Cabe destacar que la riqueza y diversidad de EcM asociada a los jóvenes provenientes de los procesos de domesticación fue más elevada

que la observada en los jóvenes nativos y adultos, y que se hallaron algunas EcM asociadas principalmente a esta categoría de edad (4.EcM2-n, EcM17-n, EcM19-n, EcM25-n, EcM26-n – Figura 4.10). Esto podría deberse a que la parcela en la que se encuentra el ensayo presenta cierto manejo respecto del bosque nativo. Por ejemplo, se encuentra rodeado por un alambrado que impide la entrada de distintos animales que podrían influir en las comunidades fúngicas, como los jabalíes. Además, se retiran de las parcelas las ramas de gran tamaño y los troncos caídos que interfieren con el desarrollo de las plantas, lo que también podría afectar las comunidades fúngicas del suelo y de las ectomicorrícicas en particular. Es necesario llevar a cabo posteriores estudios que nos permitan hallar la razón de una mayor diversidad de EcM en estos ejemplares de Raulí.

En este trabajo se observó que la riqueza, diversidad y composición de EcM están asociadas a determinados patrones de estacionalidad. En términos generales, la riqueza y diversidad de EcM tendió a ser mayor en el otoño, tanto en el bosque como en la plantación de pinos. Además, en el bosque se observó que algunas EcM se hallaban únicamente en el otoño o bien que presentaban mayor ocurrencia durante esta estación (EcM4-n, EcM12-n, EcM13-n, EcM14-n, EcM20-n, EcM21-n y EcM24-n), mientras que otras se encontraron mejor representadas en primavera (Figura 4.7). En la plantación de pinos, la abundancia relativa de cada grupo de ectomorfitipos cambió según la estación. Si bien algunos autores no han detectado diferencias en la riqueza o diversidad de EcM entre distintas estaciones del año (Smith *et al.* 2007, Wang *et al.* 2011), existen distintos estudios que demuestran patrones de estacionalidad tal como se describe en este estudio. Por ejemplo, Walker *et al.* (2008) compararon la distribución de EcM en los sistemas radicales de *Quercus* spp. en otoño y verano, y notaron cambios significativos en la composición y dominancia de los hongos ectomicorrícicos, de forma que la riqueza de *Cortinari* y Russulaceae disminuían en el verano, mientras que la de *Tricholoma* y Thelephoraceae aumentaba durante esta estación. En Brasil, Giachini *et al.* (2004) estudiaron la diversidad de esporocarpos formados por hongos ectomicorrícicos bajo *Pinus taeda* y *Eucalyptus dunnii*, y hallaron que la diversidad era mayor en otoño respecto de las otras tres estaciones del año. En un trabajo reciente, Jumpponen *et al.* (2010) utilizaron la técnica de pirosecuenciación para explorar la dinámica de las comunidades fúngicas asociadas a las EcM de *Quercus* spp. Estos autores determinaron que la riqueza y diversidad fúngica disminuía a lo largo del período de crecimiento de las especies (primavera). En Patagonia, Longo *et al.* (2011) observaron que la diversidad de EcM en *N. antarctica* y *N. pumilio* fue mayor en primavera, mientras que Nouhra *et al.* (2012) observaron que la riqueza de esporocarpos de hongos ectomicorrícicos hipógeos en bosque de *N. dombeyi* y *N. pumilio* tendió a ser mayor en otoño (aunque las diferencias no fueron

significativas) y que la biomasa fúngica en esta estación fue significativamente mayor a la registrada en primavera. En base a esta información, resulta evidente que existen patrones estacionales y que la variación de los mismos no es homogénea ni presenta una tendencia general, por lo que las causas de la misma también serán variables según la especie y ambiente que se estudie. Debido a las características ambientales del área de estudio considerada en este trabajo, puede sugerirse que la mayor riqueza y diversidad de hongos ectomicorrícicos en otoño estaría asociada a las abundantes lluvias de esa estación, en la que las temperaturas no alcanzan aún los valores mínimos. La mayor diversidad y cantidad de cuerpos fructíferos observadas en otoño tanto en este bosque de *N. nervosa* (*observación personal*) como en los bosques de *N. dombeyi* y *N. pumilio* estudiados por Nouhra *et al.* (2012) sustentarían esta hipótesis.

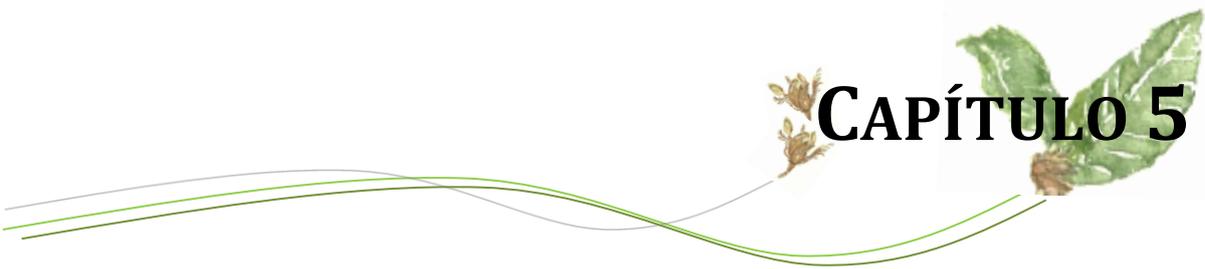
CONCLUSIONES PARCIALES

En base a los resultados presentados en este Capítulo, puede afirmarse que las comunidades de hongos formadores de EcM asociadas a *N. nervosa* en el bosque nativo son diferentes a las observadas en ejemplares de la misma especie implantados bajo una plantación de pinos. Un menor porcentaje de colonización, riqueza y diversidad fúngica en este último ambiente indicaría que si bien las plantas son capaces de establecerse y crecer, las condiciones para que esta especie desarrolle EcM con diferentes hongos simbiontes no parecen ser las óptimas, lo que a largo plazo podría resultar en una baja productividad de la plantación forestal.

En el bosque nativo se observó que la dinámica de las comunidades de EcM es compleja y responde a distintos factores bióticos y abióticos. Se detectaron diferencias en los valores de colonización, riqueza y diversidad de EcM respecto de la edad de las plantas analizadas y de la estación del año en la que se estudiaron, aunque deben estudiarse más detalladamente las causas de las mismas. Cabe destacar que los jóvenes provenientes de los procesos de domesticación e implantados en el bosque presentaron mayor riqueza y diversidad ectomicorrícica que el resto de las categorías de edad consideradas en este Capítulo. Este hecho resulta novedoso y requiere ser estudiado en mayor detalle debido a que podría aportar información relevante para los procesos de domesticación de la especie.

La información presentada en este estudio junto a otros trabajos llevados a cabo en la región Andino-patagónica permiten afirmar que las diferentes especies de *Nothofagus* presentan estrategias comunes de adaptación al ambiente donde se desarrollan. La formación de EcM y los elevados valores de colonización corresponden a una de ellas, y sustentan la importancia del rol de esta simbiosis en la adquisición de nutrientes, principalmente de P. La

presencia de diversas especies fúngicas que dan lugar a ectomorfortipos de distintas características también es un factor común a las especies comprendidas en este género, y podría indicar la necesidad de las mismas de formar relaciones simbióticas con EcM que les brinden distintos beneficios (ej. acceder a variadas fuentes de nutrientes, explorar mayor cantidad de sustrato y protección contra patógenos vegetales, entre otros).



CAPÍTULO 5

**COMUNIDADES FÚNGICAS ASOCIADAS
AL SUELO Y LOS ECTOMORFOTIPOS
DE *NOTHOFAGUS NERVOSA***

INTRODUCCIÓN

EL AMBIENTE DINÁMICO DEL SUELO Y SUS INTERACCIONES

El suelo es una matriz natural compleja compuesta por sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases. La distribución diferencial de estos elementos da lugar a distintas interfaces biogeoquímicas (Ding 2011). La existencia de estas interfaces junto a diferentes factores bióticos y abióticos (temperatura, pH, potencial redox), afectan la distribución y composición de las comunidades edáficas (Moreira & Siquiera 2006, Smalla & Van Elsas 2010, Ding 2011). El suelo constituye entonces uno de los ambientes más heterogéneo, complejo y dinámico conocido, en el que se encuentran distintos micrositios que brindan gran diversidad de nichos posibles de ser habitados por distintos seres vivos, entre los que se encuentran los microorganismos (Moreira & Siquiera 2006, Smalla & Van Elsas 2010). Estos últimos no se distribuyen al azar sino que siguen patrones espaciales de agregación, a diferentes escalas (desde mm a km) y de forma dinámica (Ettema & Wardle 2002, Nogales 2005). Estudiar estos aspectos de la microbiología del suelo brindaría la posibilidad de utilizar los organismos edáficos para la producción de especies vegetales de interés, a fin de promover la sustentabilidad de sistemas agrícolas y forestales (Moreira & Siquiera 2006).

Los microorganismos se encuentran tanto sobre la superficie de las partículas del suelo como en los espacios porosos (Figura 5.1), ocupando aproximadamente el 0,5 % de estos últimos. Son los principales conductores de los ciclos biogeoquímicos y de los procesos de biotransformación y estructuración del suelo. Entre ellos, las bacterias son las más numerosas ($\sim 10^{14}$ UFC/m²), mientras que los hongos (levaduras, hongos filamentosos y dimórficos) poseen la mayor biomasa (~ 100 g/m²) (Moreira & Siquiera 2006). Entre los hongos del suelo, se encuentran aquellos capaces de formar ectomicorrizas (EcM). Se ha demostrado en bosques boreales dominados por árboles del género *Pinus* que el micelio extrarradical de las EcM corresponde aproximadamente al 32 % de la biomasa microbiana total (Hogberg & Hogberg 2002). Asimismo, diferentes autores han estimado que la biomasa de EcM asociada a diferentes especies arbóreas varía entre 25–107,8 g/m² en bosques de *Picea abies*, entre 30,2–132 g/m² en bosques de *Pinus sylvestris*¹¹ (Dahlberg *et al.* 1997, Helmisaari *et al.* 2009) y entre 113–185 g/m² en bosques de *Abies amabilis* (Vogt *et al.* 1982).

¹¹ Dado que en este Capítulo se mencionan los géneros *Picea* y *Pinus*, se utilizará la abreviatura *Pi*. Para el primero y *P.* para el último.

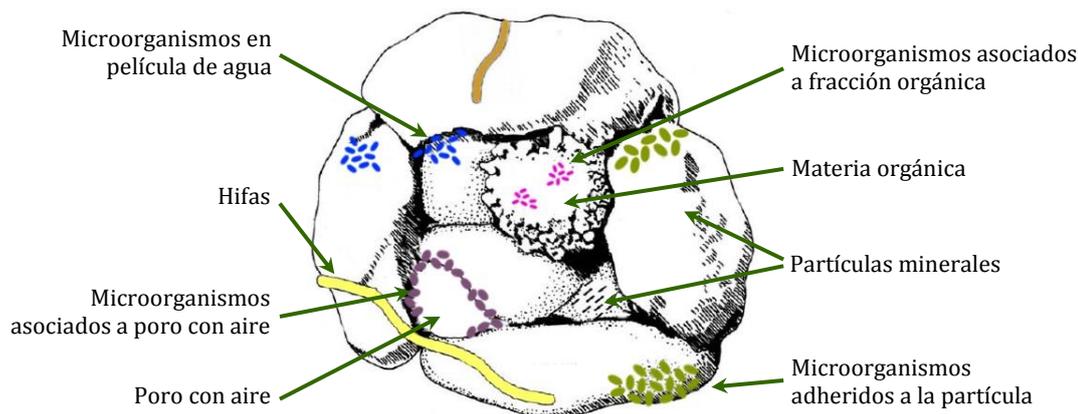


Figura 5.1.- Esquema de la distribución de los componentes del suelo y de los microorganismos asociados a los mismos.

Entre las características más importantes e interesantes del suelo se encuentran las complejas y diversas interacciones existentes entre los microorganismos que lo habitan (Moreira & Siquiera 2006). Entre estas interacciones se encuentran las micorrizas, que establecen distintos tipos de asociaciones no sólo con las plantas que colonizan sino también con las comunidades microbianas circundantes. En condiciones naturales, las micorrizas están rodeadas por comunidades bacterianas y fúngicas complejas que interactúan con el sistema micorriza-planta a niveles físicos, metabólicos y funcionales. Es por ello que en la actualidad debería considerarse a las raíces micorrícicas y a las comunidades microbianas asociadas como “complejos micorrícicos multitróficos” (Frey-Klett *et al.* 2005, Frey-Klett & Garbaye 2005) (Figura 5.2). A pesar de que estos complejos micorrícicos influyen en la productividad de las comunidades vegetales y en los ciclos de nutrientes, la estructura y funcionalidad de los mismos ha sido escasamente estudiada (Frey-Klett & Garbaye 2005). Existen trabajos que describen la interacción entre micorrizas y bacterias u hongos filamentosos presentes en el suelo (Andrade *et al.* 1997, Filion *et al.* 1999, Soderberg *et al.* 2002, Johansson *et al.* 2004), siendo sumamente escasos aquellos que analizan la relación entre estas simbiosis y las levaduras del suelo (Fitter & Garbaye 1994, García-Romera *et al.* 1998, Fracchia *et al.* 2000). Entre ellos se destaca el trabajo de Renker *et al.* (2004), quienes reportan la existencia de gran diversidad de levaduras asociadas a raíces colonizadas por micorrizas arbusculares (MA) y a las esporas de estas últimas, y los de otros autores quienes afirman que algunas especies de levaduras incrementan la colonización de MA y la resistencia de la planta a patógenos radicales (Singh *et al.* 1991, Chand-Goyal & Spotts 1996b, Vassilev *et al.* 2001, Fracchia *et al.* 2003, El-Tarabily 2004, Medina *et al.* 2004, Sampedro *et al.* 2004). En relación a las EcM, se ha demostrado que existen diversos microorganismos que interactúan con ellas de forma antagónica o sinérgica (Garbaye 1994) (Figura 5.2). De esta forma, es

posible que una determinada especie microbiana pueda afectar el establecimiento y crecimiento de las plantas favoreciendo el desarrollo de determinadas EcM y/o limitando la ocurrencia de otros microorganismos (Zacchi *et al.* 2003). Algunos trabajos han descrito la interacción entre EcM y las denominadas “bacterias facilitadoras de la micorrización” (“*Mycorrhiza Helper Bacteria*”) (Founoune *et al.* 2002, Duponnois & Plenchette 2003, Bonfante & Anca 2009). Entre los estudios que contemplan la interacción entre EcM y levaduras edáficas se encuentra el realizado por Garbaye & Bowen (1989), quienes hallaron una levadura en el manto de las EcM presentes en las raíces de *P. radiata* capaz de promover el desarrollo de la micorriza. Por otro lado, Zacchi *et al.* (2003) hallaron distintas especies de levaduras asociadas a cuerpos fructíferos de *Tuber* y a ápices ectomicorrícicos colonizados por este hongo, y estudiaron la capacidad de las mismas de sintetizar diferentes enzimas extracelulares (celulasas, quitinasas, proteasas). Recientemente, Mestre (2012) ha descrito en la región Andino-patagónica la diversidad de levaduras asociadas al suelo, la rizósfera y la ectomicorrizósfera de distintos bosques de *N. antarctica* y *N. pumilio*, encontrándose entre ellas algunas capaces de producir compuestos auxínicos y sideróforos y de solubilizar fosfatos. Se desconocen hasta el momento las especies de levaduras asociadas a las EcM de *N. nervosa* y el efecto que podrían tener las mismas sobre la colonización micorrícica y la aptitud general de la planta.

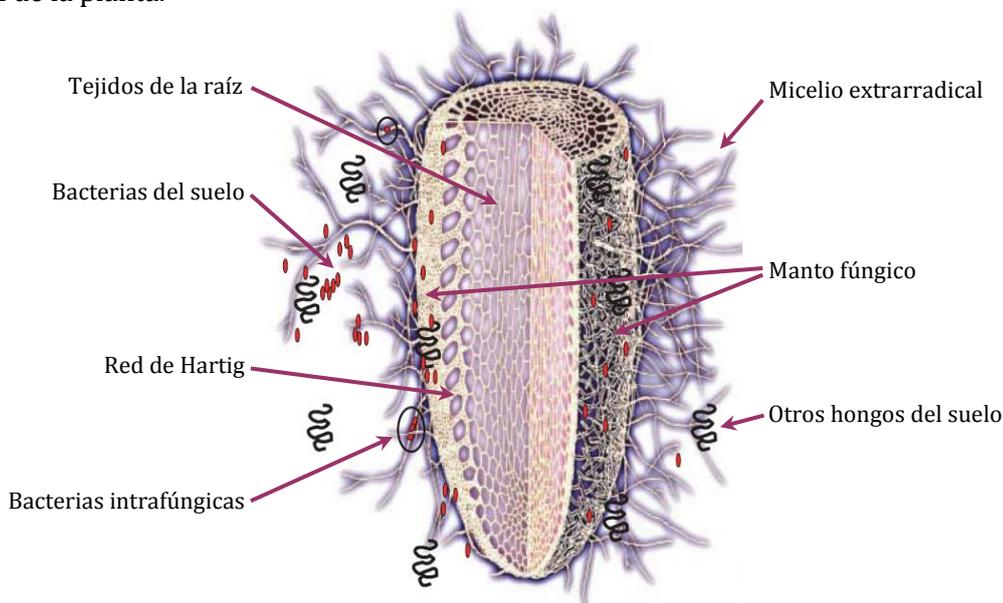


Figura 5.2.- Esquema del “complejo micorrícico multitrofo” en el caso de las EcM (modificado de Frey-Klett & Garbaye 2005).

LA RIZÓSFERA, LA ECTOMICORRIZÓSFERA Y EL ECTOMICORRIZOPLANO

Como se mencionó anteriormente, las poblaciones microbianas interactúan entre sí y con las plantas circundantes, siendo principalmente en la rizósfera donde se establecen estas

relaciones entre los microorganismos del suelo y la planta. La rizósfera se define como la delgada porción de suelo (de apenas unos milímetros) que rodea las raíces de las plantas y que se encuentra bajo la influencia directa de éstas. Se caracteriza por presentar cualidades físico-químicas diferentes y mayor actividad biológica respecto del suelo que la rodea, debido a que las raíces liberan distintos exudados (azúcares, ácidos orgánicos y compuestos volátiles) que favorecen el desarrollo microbiano (Linderman 1988, Grayston *et al.* 1997, Barea *et al.* 2002, Botha 2006). Por otro lado se encuentra el rizoplano, que corresponde a la epidermis radicular y a las partículas de suelo y microorganismos fuertemente adheridos a la misma (Sylvia *et al.* 2005, Singer & Munns 2006).

La presencia de micorrizas influye en la fisiología vegetal y en la composición de los exudados radicales, constituyendo entonces otro factor que modifica el ambiente que rodea a las raíces. Estos cambios afectan, tanto cualitativa como cuantitativamente, a las poblaciones microbianas presentes en la rizósfera (Linderman 1988, Grayston *et al.* 1997, Barea *et al.* 2002, Calvaruso *et al.* 2007). Por ello, algunos autores han definido una nueva fracción llamada micorrizósfera, que representa la región directamente influenciada por las raíces micorrizadas (Figura 5.3) (Garbaye 1991, Liasu & Shoshanya 2007). En el caso de las raíces colonizadas por EcM, esta fracción se denomina ectomicorrizósfera. De igual forma, la superficie de los ectomorfotipos y las partículas y microorganismos adheridos a la misma es denominada ectomicorrizoplano (Arocena *et al.* 1998). Linderman (1988) afirma que existen diferentes formas, tanto beneficiosas como perjudiciales, en las que los microorganismos rizosféricos o micorrizosféricos influyen sobre las interacciones micorrícicas e indirectamente sobre el crecimiento y desarrollo de la planta hospedadora. Por ello, se considera que tanto la rizósfera como la micorrizósfera y el micorrizoplano representan un punto clave para el estudio de las interacciones planta-microorganismo (Kowalchuk *et al.* 2010).

Un mejor entendimiento de los fenómenos que ocurren en la rizósfera permitiría utilizar y manipular los microorganismos presentes en ella para mejorar el crecimiento y la producción vegetal (Linderman 1988, Lucy *et al.* 2004), dos aspectos fundamentales para la sustentabilidad de ecosistemas naturales, agrosistemas y sistemas forestales (Barea *et al.* 2002). Además, dado que la microbiota asociada a las micorrizas está adaptada a convivir con el hongo simbionte, el manto de las EcM constituiría un lugar apropiado para buscar microorganismos capaces de estimular esta asociación y de cumplir con las funciones mencionadas (Garbaye & Bowen 1989).

Debido a las marcadas diferencias físico-químicas entre las superficies de las fracciones aérea (filósfera) y subterránea de las plantas (rizósfera, micorrizósfera), la

microbiota asociada a cada una de ellas suele ser diferente (Lindow & Brandl 2003). Por ejemplo, en la filósfera dominan las bacterias y levaduras pigmentadas, que rara vez son halladas en la rizósfera (Lindow & Brandl 2003, Fonseca & Inácio 2006). Por otro lado, existen diferentes microorganismos asociados a las raíces que no se hayan en la filósfera, tales como *Rhizobium* y *Azospirillum* (Lindow & Brandl 2003). Resulta interesante entonces estudiar si las levaduras asociadas a las EcM de *N. nervosa* presentan algún tipo de relación (morfológica, taxonómica) con las descritas en la superficie de sus frutos (Capítulo 2).

En conjunto, estos hechos hacen que resulte interesante la descripción de las levaduras asociadas a las EcM de una especie maderera de importancia forestal como el Raulí, ya que esta información permitiría en el futuro estudiar el potencial rol de estos microorganismos en las estrategias de facilitación de la implantación y subsistencia de las plantas post-tratamiento de viverización.

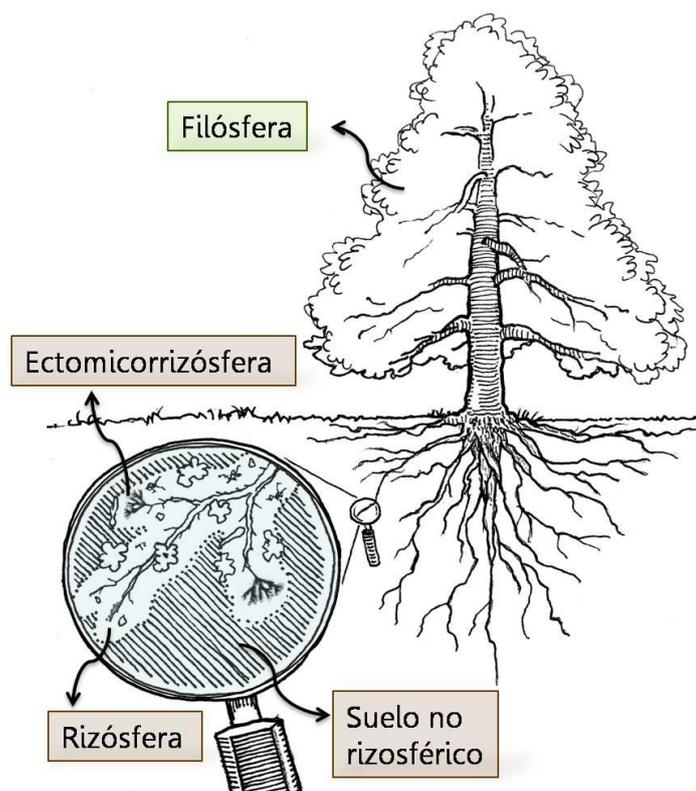


Figura 5.3- Esquema en el que se señalan las diferentes fracciones de suelo asociadas a las raíces de las plantas y su relación respecto de la filósfera (Capítulo 2) (modificado de Fernández *et al.* 2009).

INFLUENCIA DEL GENOTIPO DE LA PLANTA SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

Los distintos genotipos de una especie suelen estar asociados a diferentes tasas de crecimiento, a distinta composición química de hojas, raíces y/o exudados, y/o a variaciones en algunos procesos ontogenéticos y fisiológicos (tasa de fotosíntesis, regulación hídrica,

resistencia a estrés). Por lo tanto, la variabilidad genética de cada individuo puede influir directamente sobre las distintas especies asociadas al mismo, incluyendo plantas, insectos, animales y microorganismos (Whitham *et al.* 2006, Bossdorf *et al.* 2009). Tal es así que Shuster *et al.* (2006) han definido el término “efecto genético indirecto interespecífico” (*Interspecific Indirect Genetic Effects* - IIGEs), en el que la influencia ambiental sobre el fenotipo de una o un conjunto de especies se debe a la expresión de los genes de otra especie, de forma que existen diferentes comunidades de organismos asociadas a plantas con distintos genotipos. En la revisión realizada por Whitham *et al.* (2006) se describen distintos ejemplos y se discuten las implicancias de este tipo de efectos genéticos indirectos sobre los ecosistemas y las relaciones evolutivas de los organismos que componen el mismo. Otros trabajos señalan que determinados genotipos vegetales se asocian a diferentes comunidades de artrópodos (Bailey *et al.* 2006, Crutsinger *et al.* 2006, Barbour *et al.* 2009). Por otro lado, Iason *et al.* (2005) observaron que la variabilidad genética de la especie *P. sylvestris* está relacionada con la síntesis de monoterpenos, los que a su vez regulan la riqueza de especies vegetales presente debajo del árbol (Iason *et al.* 2005). De igual forma, ha sido documentado que la variabilidad genética de una especie vegetal tiene un impacto significativo en la composición y dinámica de las comunidades microbianas del suelo (Schweitzer *et al.* 2008, Karst *et al.* 2009, Madritch & Lindroth 2011). Por ejemplo, Schweitzer *et al.* (2008) determinaron que el genotipo de diferentes individuos de *Populus angustifolia* influye en la biomasa y estructura de las comunidades microbianas presentes en el suelo bajo los mismos. Incluso algunas especies vegetales de interés comercial modificadas genéticamente alteran la biota edáfica (Donegan *et al.* 1999, Griffiths *et al.* 2000). En este sentido, se determinó que plantas de papa genéticamente modificadas cambian el perfil fisiológico de las comunidades microbianas de la rizósfera (O’callaghan & Glare 2001), y que las plantas de canola modificadas para tener mayor resistencia al glifosato alteran la composición de los microorganismos en zona radical (Siciliano & Germida 1999). También se ha descrito que existe relación entre los genotipos de *P. contorta* (Karst *et al.* 2009) y *P. sylvestris* (Leski *et al.* 2010) y los porcentajes de colonización y diversidad de las EcM presentes en el sistema radical de cada especie.

En conjunto, esta información sugiere que la composición genética de las comunidades vegetales puede tener un impacto directo tanto a nivel del individuo como de las comunidades de organismos asociadas al mismo, por lo que está fuertemente ligada a distintos procesos ecosistémicos, tales como la productividad, el flujo de energía y los ciclos de nutrientes (Rhoades 1997, Smith *et al.* 1999, Treseder & Vitousek 2001, Schweitzer *et al.* 2004, Bailey *et al.* 2006, Madritch *et al.* 2006, 2009, Whitham *et al.* 2006, Schweitzer *et al.*

2011). Además, es posible que existan comunidades únicas asociadas a los genotipos individuales de distintas especies vegetales, lo que estaría directamente relacionado con la biodiversidad de ambientes naturales y modificados (Schweitzer *et al.* 2011). Resulta importante considerar esta información en planes de conservación y manejo de bosques naturales a fin de preservar la diversidad genética y biológica de los mismos (Whitham *et al.* 2006).

TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS AL ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Tradicionalmente, el análisis de comunidades microbianas de ambientes naturales se ha basado en técnicas de cultivo, en las que se utilizan diferentes medios y condiciones para recuperar el mayor número de especies posible. Sin embargo, se estima que con las técnicas de cultivo disponibles en la actualidad sólo el 0,1-1 % de los microorganismos son capaces de desarrollarse, incluyendo los presentes en el suelo. Este hecho limita la posibilidad de identificar la mayor parte de las especies presentes en el ambiente, lo que a su vez reduce la posibilidad de estudiar en forma integral el rol de las comunidades microbianas en los ecosistemas (Muyzer & Smalla 1998, Muyzer 1999, Hill *et al.* 2000).

En los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas que revolucionaron el estudio de las comunidades microbianas de ambientes naturales (Muyzer 1999, Hill *et al.* 2000). La extracción directa de ADN a partir de una muestra ambiental junto con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) permitieron el desarrollo de técnicas moleculares que nos brindan nuevos conocimientos sobre la diversidad genético-funcional de los microorganismos presentes en el ambiente (Muyzer 1999, Hill *et al.* 2000, Anderson & Cairney 2004). En base a la utilización de estas técnicas en estudios de microbiología de suelos, se ha determinado que las comunidades microbianas edáficas son más diversas y complejas de lo que se pensaba (Hill *et al.* 2000, Anderson & Cairney 2004). La mayor parte de los trabajos en los que se estudió la ecología microbiana del suelo están focalizados en bacterias, por lo que las comunidades fúngicas permanecen relativamente poco estudiadas respecto de estos microorganismos (Anderson & Cairney 2004).

Existen diferentes técnicas moleculares que suelen aplicarse al estudio de ecología microbiana del suelo (clonación, hibridación). Entre las más utilizadas se encuentran aquellas que permiten establecer patrones de “huellas moleculares” de las comunidades (*fingerprinting*). Este tipo de técnicas proveen un perfil característico de la comunidad en base a la separación física de las secuencias de ADN correspondientes a las diferentes especies presentes en la muestra. Estas técnicas nos brindan información sobre la riqueza y diversidad microbiana en el ambiente en estudio y la posibilidad de monitorear el

comportamiento de las comunidades a lo largo del tiempo. En general, estas técnicas consisten en extraer el ADN total de la muestra, amplificar una región del mismo y luego analizar los productos de PCR con el método de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) o con Gradiente de Temperatura (TGGE - *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer & Smalla 1998, Muyzer 1999), siendo esta última la técnica que fue utilizada para desarrollar el objetivo planteado en este Capítulo.

La técnica de TGGE permite separar productos de PCR que presenten la misma longitud pero que difieran en secuencia. El fundamento de la misma se basa en el comportamiento de desnaturalización de la doble cadena de ADN, el cual está determinado por la secuencia de nucleótidos de cada una de las especies presentes en la muestra. De esta forma, a medida que las moléculas de ADN avanzan en el gel sometido a un gradiente continuo de temperatura, se mantienen como moléculas helicoidales hasta alcanzar el punto térmico de desnaturalización. En ese momento, la molécula de ADN comienza a desnaturalizarse, se abren las cadenas y como consecuencia deja de migrar en el gel. Por lo tanto, las moléculas de ADN que presenten diferentes secuencias nucleotídicas (ej. distintos contenido de C+G) se desnaturalizarán en distintos puntos del gel (Muyzer & Smalla 1998, Muyzer 1999, Hill *et al.* 2000, Escalante 2007). Con la técnica de TGGE pueden detectarse hasta 50 % de las diferencias nucleotídicas en secuencias de hasta de 500pb. Este valor se incrementa aproximadamente al 100 % si se agrega una secuencia corta y rica en GC (llamada *CGclamp*) en uno de los extremos del fragmento de ADN (este fragmento es agregado al extremo 5' de uno de los *primers*) (Muyzer & Smalla 1998). Otra forma de mejorar los resultados obtenidos por esta técnica es correr en el gel fragmentos cortos de ADN (<500 bp), lo que generalmente resulta en una mejor resolución de las bandas del perfil (Anderson & Cairney 2004). El resultado obtenido con esta técnica es un perfil en el que el número de bandas corresponde al número de miembros dominantes en la comunidad microbiana (Muyzer & Smalla 1998) (Figura 5.4). Si se realizaron los pasos necesarios para optimizar la definición de los perfiles (agregado de *CGclamp* y amplificación de fragmentos cortos), puede considerarse que cada banda corresponde a una especie distinta y que la intensidad de la misma es un reflejo de la abundancia de cada especie en la comunidad (Hill *et al.* 2000, Escalante 2007). Así, el número de bandas de cada perfil puede considerarse una medida de la riqueza de la muestra (Muyzer 1999, Nubel *et al.* 1999). En la actualidad, el TGGE es una herramienta molecular de amplio uso en la microbiología ambiental, ya que es una técnica confiable, reproducible, rápida y de costo reducido que permite analizar numerosas muestras en forma simultánea (Muyzer 1999). Estas características llevaron a que sea una de las

técnicas más utilizadas (junto con el DGGE) para analizar y describir las complejas comunidades del suelo (Anderson & Cairney 2004).

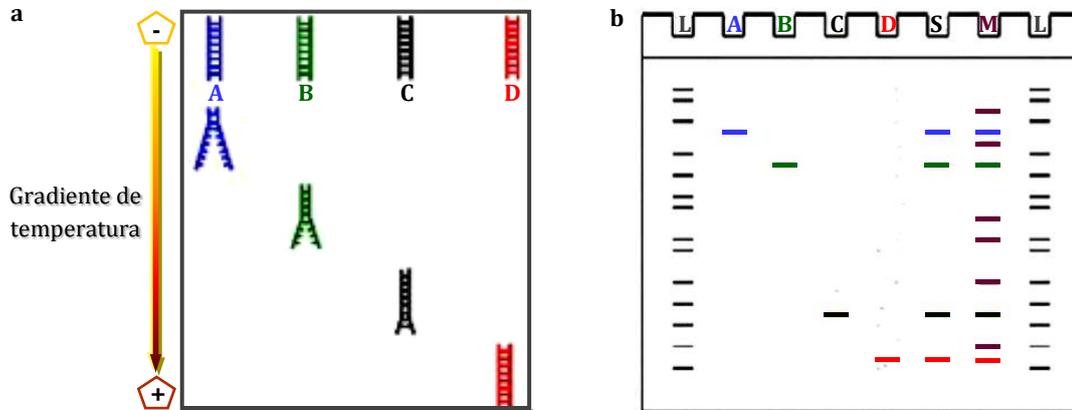


Figura 5.4- Esquema en el que se muestra la migración diferencial de distintas moléculas de ADN en un gel sometido a un gradiente de temperatura continuo. **a)** Migración de las secuencias nucleotídicas de los microorganismos A, B, C y D donde se observa que aquellas moléculas que presentan puntos de desnaturalización más elevados migran más lejos; **b)** Patrón de bandas obtenido para cada microorganismo (A, B, C y D), para la suma de los mismos (S) y para una muestra ambiental en la que éstos se hallan presentes (M). A ambos lados se encuentra el marcador de peso molecular (L - Ladder).

Si bien las técnicas moleculares permiten explorar las comunidades microbianas con un detalle que no es posible a través de los métodos de cultivo, el hecho de aislar, identificar y poder mantener en cultivo los microorganismos nos brinda la posibilidad de estudiarlos en detalle y de utilizarlos para realizar tareas experimentales, otorgándonos información sobre su evolución, ecología, fisiología, interacciones con otros organismos y sobre su potencial aplicación biotecnológica (Escalante 2007). Por lo tanto, para analizar y describir las comunidades microbianas es recomendable utilizar sinérgicamente técnicas dependientes e independientes de cultivo, dado que la información que nos brindan es complementaria (Hill *et al.* 2000, Nichols 2007). Por ello, en este Capítulo se planteó abordar el estudio de las comunidades fúngicas asociadas al sistema radical de ejemplares jóvenes de *N. nervosa* nativos y cultivados a partir de semillas provenientes de poblaciones con distinto grado de diversidad genética aplicando técnicas moleculares y métodos tradicionales de aislamiento y cultivo.

OBJETIVO

Describir las comunidades fúngicas asociadas a los ectomorfitos y al suelo circundante a las raíces de ejemplares jóvenes de *N. nervosa* en distintos ambientes (bosque nativo y plantación de pinos) y en relación a la diversidad genética de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este Capítulo se trabajó sólo con individuos jóvenes, ya que es la única categoría en la que podrían realizarse comparaciones entre ejemplares nativos y cultivados e implantados en los dos ambientes de estudio: el bosque nativo y la plantación de pinos. Se abordó el estudio de las comunidades fúngicas asociadas a *N. nervosa* desde dos perspectivas diferentes. En primer lugar, se cuantificaron, aislaron e identificaron las levaduras asociadas a los ectomorfitipos más abundantes en los ejemplares jóvenes nativos (Jvn) y en los jóvenes de la misma procedencia (Yuco) cultivados en vivero e instalados en ensayos bajo bosque (JvDom-n) y bajo la plantación de pinos (JvDom-e). Por otro lado, se utilizaron análisis de TGGE para evaluar la riqueza de los hongos asociados al suelo circundante a las raíces de ejemplares jóvenes de distinta procedencia y diversidad genética implantados en el bosque (JvDom-n) y en la plantación (JvDom-e).

COLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Como se mencionó en la Introducción (Capítulo 1), el INTA EEA Bariloche ha instalado diferentes ensayos de progenies y procedencias tanto bajo bosque nativo como bajo plantaciones de exóticas (pinos). Las poblaciones a partir de las cuales se coleccionaron las semillas (procedencias) utilizadas para cultivar las plántulas de estos ensayos presentan distinta diversidad genética (elevada, intermedia o baja), lo cual fue determinado en base al análisis de distintos parámetros de diversidad genética, tales como el número de alelos, la riqueza alélica, la heterocigosis y su comparación entre distintas poblaciones de la especie (Marchelli & Gallo 2004).

Para poder evaluar la existencia de algún tipo de asociación entre la diversidad genética de *N. nervosa* y las comunidades de hongos en su sistema radical, se seleccionaron en el ensayo de la región de Yuco (instalado bajo bosque nativo en el año 1999) y en el de Meliquina (instalado en la plantación de pinos en el año 2000) 3 procedencias: a) la correspondiente al área de estudio considerada en este trabajo de Tesis (Yuco), que posee diversidad genética intermedia; b) la procedencia que presentaba mayor diversidad genética (Hua-Hum en el ensayo bajo bosque nativo y Queñi en la plantación de pinos); y c) la procedencia que tuviera menor diversidad genética (Pudú-pudú). Para seleccionar las procedencias según este criterio se utilizaron los datos obtenidos a partir de 2 técnicas que utilizan marcadores moleculares previamente descritos para la especie: isoenzimas Marchelli & Gallo (2004) y microsatélites (Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal INTA EEA Bariloche, no publicada). Las procedencias utilizadas en cada ensayo y su descripción se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1.- Ubicación y características genéticas (basadas en isoenzimas) de las poblaciones de Raulí seleccionadas en los ensayos de progenies y procedencias a partir de las cuales se colectaron las semillas utilizadas para cultivar las plantas ubicadas en los mismos. **Ensayo** = Ensayo de procedencias en el que se seleccionó esa población; **Y** = Yuco; **M** = Meliquina; **DivGen** = Diversidad genética de la población; **P** = Porcentaje de loci polimórficos; **A_L** = Número promedio de alelos por locus; **v** = Diversidad genética de la población (Gregorius 1978); **He** = Heterocigosis esperada (Nei 1973) (Marchelli & Gallo 2004).

NOMBRE POBLACIÓN	CUENCA (LAGO)	ENSAYO	DIVGEN	LAT S	LONG O	P	A _L	v	H _E
Hua Hum	Lácar	Y	Elevada	40° 10'	71° 40'	100	2,75	1,32	0,24
Queñi	Lácar	M	Elevada	40° 10'	71° 46'	75,0	1,75	1,23	0,19
Yuco	Lácar	Y - M	Intermedia	40° 14'	71° 49'	62,5	1,75	1,23	0,19
Pudú- Pudú	Hermoso	Y - M	Baja	40° 22'	71° 28'	62,5	1,75	1,23	0,12

A fines de la primavera del año 2010 se escogieron al azar 5 individuos jóvenes de cada una de las 3 procedencias seleccionadas para cada ensayo (Tabla 5.1). Para el aislamiento de levaduras se consideraron además 5 ejemplares jóvenes pertenecientes al bosque nativo, obteniéndose un total de 35 individuos. De cada uno se tomaron 3 submuestras del sistema radical y el suelo circundante a éste utilizando un sacabocado y de la misma forma que la descrita en el Capítulo 4. El sacabocado era desinfectado con alcohol 70 % cada vez que se muestreaba un árbol diferente. Las muestras de suelo y raíces fueron colocadas en bolsas de plástico individuales y previamente rotuladas, transportadas al laboratorio y analizadas a la brevedad (1-2 días). Para cada individuo se hizo un *pool* con las 3 submuestras.

Para los análisis de TGGE se analizaron un total de 30 individuos jóvenes (5 ejemplares por cada una de las 3 poblaciones seleccionadas en los ensayos de Yuco y Meliquina), mientras que para llevar a cabo el aislamiento de levaduras a partir de los ectomorfortipos de *N. nervosa* se estudiaron un total de 15 árboles (5 ejemplares nativos y los 5 ejemplares correspondientes a la procedencia Yuco comprendidos en cada uno de los ensayos). De cada uno de los ejemplares muestreados se coleccionaron 10-15 hojas para realizar la caracterización genética del individuo. Para ello se seleccionaron aquellas que estuvieran en buen estado (no senescentes, ni afectadas por insectos) y se conservaron en bolsas de papel, donde se dejaron secar a temperatura ambiente

Para el análisis de las muestras se separaron las mismas en tres fracciones: 1) para realizar los análisis de TGGE se homogeneizó la muestra y se fraccionaron 10 g de suelo en bolsas plásticas estériles que se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento; 2) para llevar a cabo el aislamiento de levaduras a partir de los ectomorfortipos presentes en las raíces frescas de *N. nervosa* se tamizó el resto de la muestra y se separaron las raíces en cajas de Petri

estériles; y 3) el suelo tamizado se conservó para realizar la caracterización físico-química del mismo, la cual se describe a continuación.

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL SUELO

Para caracterizar el suelo en el que se desarrollan los diferentes ejemplares jóvenes de *N. nervosa* utilizados para el aislamiento de levaduras se determinó el Carbono total (C_T), el Nitrógeno total (N_T), el Fósforo extraíble (P_E), el pH en agua, la granulometría y la Clase textural del suelo. Para los 4 primeros parámetros (C_T , N_T , P_E y pH) los análisis se realizaron a nivel individual, es decir para la muestra de suelo correspondiente a cada uno de los 5 individuos analizados por categoría (Jvn, JvDom-n y JvDom-e). La granulometría y la clase textural se determinaron en una muestra conjunta del suelo perteneciente a los 5 individuos incluidos en una misma categoría (es decir, para un total de 3 muestras: Jvn, JvDom-n y JvDom-e).

Para realizar los análisis se secaron las muestras de suelo a temperatura ambiente. Luego, se tamizaron con una malla de 2 mm (pH, P_E) o 0.5 mm (C_T , N_T), según requiriera cada análisis. El C_T se analizó por digestión de Walkley-Black, el N_T por el método de Kjeldahl (Nelson & Sommers 1996) y el P_E se analizó en solución alcalina tamponada (0.5 N NaHCO_3) por el método del ácido ascórbico (Kuo 1996). Estos análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Suelos del Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue. La granulometría y clase textural del suelo se determinó por el método de Day (1965) en el Laboratorio de Suelos del INTA EEA Bariloche. El pH se midió en una suspensión suelo:agua (1:2.5) con un pHómetro en el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología (Page *et al.* 1982).

LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS ASOCIADOS A ECTOMORFOTIPOS

Selección de los ectomorfotipos y aislamiento y agrupamiento de las cepas

Como se mencionó anteriormente, este análisis se realizó para un total de 15 individuos. Para cada uno de ellos se lavaron las raíces cuidadosamente en agua estéril y se observaron bajo microscopio estereoscópico (Olympus SZ30) en condiciones de asepsia. A fin de poder evaluar si la presencia de micelio extrarradical influye en las comunidades de levaduras asociadas a la EcM, se seleccionaron en cada individuo 2 ectomorfotipos: uno liso sin micelio extrarradical (de Tipo Exploratorio 1) y otro con abundante micelio extrarradical (de Tipo 2 o 3 según el individuo). Todos los ectomorfotipos seleccionados correspondieron a alguno de los grupos de afinidad morfológica descriptos en el Capítulo 4.

Para cada individuo se tomaron de la muestra todos los ápices ectomicorrícicos correspondientes a cada uno de los 2 ectomorfortipos seleccionados y se colocaron en tubos plásticos de 1,5 mL estériles y previamente pesados (uno para los ectomorfortipos correspondientes al Tipo exploratorio 1 y otro los de Tipo 2 y 3). Es decir que se contó con un total de 30 tubos, 15 correspondientes a ectomorfortipos lisos y 15 a aquellos con abundante micelio extrarradical. A cada tubo se le agregó solución fisiológica (NaCl 0,9 % p/v) hasta obtener una dilución 1:25 p/v. Los tubos se agitaron en *vortex* a máxima velocidad durante 5 min y luego se centrifugaron por 30 s a 10000 g para precipitar los restos de ectomorfortipos. Para cada muestra se sembraron por agotamiento en superficie 100 µL de la suspensión en cajas de Petri con medio MYP (Anexo II) adicionado con cloranfenicol 0,01 % (Yarrow 1998). Para optimizar la recuperación de levaduras a partir de las muestras, se utilizó este medio con y sin el agregado de fungistático. El fungistático utilizado fue Rosa de Bengala (Cicarelli) en una concentración de 25 µg/mL (Mestre *et al.* 2009). Se incubaron las placas a 20 °C por 72 hs y luego a 4 °C por 48 hs, período durante el cual las colonias desarrollaron muchas de sus características morfológicas distintivas, principalmente color, textura y presencia de micelio. Luego, se cuantificaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en cada placa y se aislaron la totalidad de las levaduras. En caso que hubiera más de 15 UFC, se aislaron un 75 % de las mismas. Las levaduras fueron repicadas en medio MYP hasta obtener cultivos puros. Los aislamientos fueron crioconservados a -80 °C en solución de glicerol 20 %.

Una vez puros, los aislamientos fueron clasificados en grupos preliminares de afinidad según sus características macromorfológicas (color, forma de la colonia, textura, presencia de micelio o pseudomicelio) y su capacidad de producir pigmentos (carotenos o melanina) y micosporinas. La producción de pigmentos carotenoides y melaninas se evaluó visualmente y bajo luz blanca en todos los aislamientos luego de haber sido cultivados 3 días a 20 °C y 2 semanas a 4 °C (Muñoz 2010). La inducción, extracción y análisis de micosporinas se llevó a cabo en todos los aislamientos y de acuerdo a la técnica descrita el Capítulo 2 (Moliné *et al.* 2011). Brevemente, ésta consistió en cultivar las cepas en placas de Petri con medio MMS (Anexo II) en forma de césped y en cámara (Semedic I-500PF) durante 4 días a 20 °C con fotoperíodo 12 hs luz visible/12 hs oscuridad. La biomasa obtenida se resuspendió en tubos plásticos estériles conteniendo 1 mL de metanol 20 % v/v, se homogeneizó la suspensión en *vortex* y se incubó durante 24 hs a 4 °C y luego 2 hs a 45 °C. Luego, se centrifugaron las muestras a 12000 g por 15 min (centrifuga Sigma 4K15), se recuperó el sobrenadante y se midió su absorbancia a 310 nm utilizando una cubeta de cuarzo (espectrofotómetro Hewlett Packard P 8453-E).

Extracción de ADN genómico, análisis moleculares y filogenéticos de levaduras y hongos dimórficos asociadas a ectomorfitos de *Nothofagus nervosa*

Se realizaron extracciones de ADN genómico de todos los aislamientos de levaduras y hongos dimórficos obtenidos. Para ello se procedió de la misma forma que la descrita en el Capítulo 2, que consistió en sembrar las levaduras en medio MYP (Anexo II) e incubarlas por 72 hs a 20 °C. Luego se suspendió una ansada del cultivo en 100 µL de *buffer* de lisis (Anexo II) y se homogenizó en el *vortex* a máxima velocidad durante 1 min. Los tubos fueron colocados a -80 °C durante 1 h y transferidos inmediatamente a un baño termostático a 100 °C durante 10 min. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 13000 g por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio (Fernández *et al.* 2012). Para confirmar la homogeneidad de los grupos macromorfológicos formados anteriormente, se estudiaron los patrones de huellas moleculares (*fingerprinting*) de todos los aislamientos de levaduras por medio de la técnica MSP-PCR, en la que se analizaron las regiones Mini/Microsatélites del ADN genómico. Este procedimiento fue llevado a cabo según se describió en el Capítulo 2, utilizando el *primer* M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') para realizar las amplificaciones y luego analizando los patrones de bandas obtenidos (Libkind *et al.* 2003, de García *et al.* 2007). Una vez confirmada la homogeneidad de los grupos, 2-3 representantes de cada uno de ellos fueron secuenciados. En este caso se amplificó la región D1/D2 y una porción de la región ITS con los *primers* NL1 y NL4 (GBT Oligos). La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 50 µL según las siguientes concentraciones: 0,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, 0,2 µM de cada primer, 1U Taq polimerasa (Invitrogen), 1X buffer de reacción y 3,8 µL de una dilución 1:100 1:100 µl de ADN stock/agua MiliQ estéril. Las condiciones de reacción fueron: un ciclo de desnaturalización de 95 °C por 2 min, 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 25 s a 54 °C y 20 s a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron purificados (BioNer) y enviados a secuenciar con el primer NL4 por la empresa MacroGen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias nucleotídicas fueron corregidas manualmente, alineadas y sujetas a análisis filogenéticos utilizando el programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). Una vez corregidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank-NCBI para identificar el taxón al que correspondían (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

Se construyeron 2 árboles filogenéticos, uno correspondiente al Phylum Basidiomycota y el otro al Phylum Ascomycota, utilizando el algoritmo *Neighbor Joining* (NJ), valores de significancia estadística para 1000 repeticiones (*bootstrap*) y el modelo Kimura de 2 parámetros (Kimura *et al.* 2004). En caso de contarse con varias secuencias de una misma especie, sólo 4 fueron consideradas para construir el árbol. Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron alineadas con los representantes más afines taxonómicamente de acuerdo a la

información disponible en el NCBI y con las cepas tipo en caso de contarse con las mismas. La nomenclatura y clasificación de las especies identificadas corresponden a la citada en la base de datos *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>) e *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org).

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE INDIVIDUOS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA*

Para la extracción de ADN a partir de las hojas de *N. nervosa* se utilizó el protocolo de extracción descrito por Dumolin *et al.* (1995), que se detalla en el Anexo V. La caracterización de los genotipos de los 35 individuos de Raúl se realizó mediante marcadores genéticos hipervariables, utilizándose un set de 7 pares de microsatélites, algunos de ellos desarrollados para la especie y otros transferidos desde *N. pumilio* y puestos a punto para poder utilizarse en la misma (Azpilicueta *et al.* 2004, Marchelli *et al.* 2008, Soliani *et al.* 2010) (Tabla 5.2). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ L. Para cada par de *primers* se utilizaron distintas concentraciones de reactivos, las cuales se detallan en la Tabla 5.3. Para la lectura de las muestras en el secuenciador capilar se utilizó un *primer* de cada par marcado con un fluoróforo, excepto en el caso de los *primers* transferidos desde *N. pumilio* donde se empleó la metodología de un tercer *primer* marcado con el fluoróforo (M13) (Schuelke 2000). Para la mayor parte de las reacciones se utilizó la polimerasa GoTaq (Promega), a excepción de las amplificaciones con el *primer* NnBio11 para las cuales se utilizó la enzima TaqPlatinum (Invitrogen) y sus correspondientes *buffers*. Las condiciones de amplificación por PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 4 min seguido por 35 ciclos a 94°C 30s, Ta por 30s (Tabla 5.3), 72°C 30s y una extensión final de 72°C por 30 minutos. Para confirmar la amplificación de las muestras y la correcta intensidad de banda (cantidad de ADN) se chequearon los productos de PCR en geles de agarosa 2 %. Finalmente, los productos de PCR se enviaron a la Unidad de Genómica del INTA Castelar para ser analizados con un Secuenciador ABI 3700.

Los electroferogramas¹² obtenidos se visualizaron, corrigieron y analizaron con el programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems). Se armó una base de datos en la que se detalló qué alelo/s poseía cada individuo para los siete locus analizados. Esta base fue utilizada para calcular los parámetros de diversidad genética poblacional e individual. Para el cálculo de los parámetros poblacionales se consideraron los cinco individuos de cada

¹² La electroforesis capilar es una técnica de separación que proporciona un mapa detallado de las sustancias que conforman la muestra. El resultado es un electroferograma en el cual se representa cada sustancia por una forma de onda (similar a campana de Gauss) en donde la amplitud de cada pico está relacionada con la concentración de cada sustancia (Ceballos 2005). En el caso del análisis realizado en el presente trabajo de Tesis, la sustancia corresponde al ADN y cada pico a un alelo.

procedencia en cada ensayo por separado como una población, por lo que el número de poblaciones considerado fue 7 (las poblaciones detalladas en Tabla 5.1 y población de jóvenes nativos-de Yuco). En primer lugar, se calcularon las frecuencias de los distintos alelos, y luego se estimaron los siguientes parámetros: número de alelos, número medio de alelos por locus, heterocigosis observada y heterocigosis esperada. Se analizó la existencia de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. Para ello se utilizó el programa GenAlEx 6.2 (Peakall & Smouse 2006), de acceso libre (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx>).

Para evaluar la diversidad genética de cada ejemplar se calcularon diferentes parámetros individuales: la heterocigosis observada (H_o), el índice de relación interna (IR - *Internal Relatedness*) (Amos *et al.* 2001) y la heterocigosis ponderada por locus (HL - *Heterozygosity weighted by Locus*) (Aparicio *et al.* 2006). Éstos fueron calculados con el macro IRmacroN4 (<http://www.zoo.cam.ac.uk/zoostaff/meg/amos.htm#ComputerPrograms>), de acceso libre. Éste funciona bajo Excel y fue desarrollado por Amos *et al.* (2001) para calcular diferentes parámetros genéticos. Además, se calculó para cada individuo un parámetro al que se denominó heterocigosis individual (HI) dividiéndose el número de alelos que posea sobre el total de alelos distintos posibles para los siete locus, es decir 14 (ej. si un individuo fuera homocigota para todos los locus $HI = 0,5$, y si fuera heterocigota para todos ellos $HI = 1$).

ANÁLISIS DE TGGE

Esta sección se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica Integrativa e Funcional (BioFIG), del Centro de Biodiversidade, de la Faculdade de Ciências, en la Universidade de Lisboa, Portugal, producto de un trabajo en colaboración entre la Dra. Chaves Sandra y el Dr. Tenreiro Rogério de Portugal y la Dra. Fontenla y la autora de esta Tesis de Argentina.

Para extraer el ADN de las muestras de suelo se utilizó el kit de extracción PowerSoil® (MoBio Laboratories, Inc.) según las instrucción del fabricante, utilizándose 0,25 g de suelo. Para amplificar el ADN se aplicó la técnica de PCR anidadas (*Nested PCR*). Se realizaron 3 reacciones: una para hongos totales, otra para hongos pertenecientes al Phylum Basidiomycota y la tercera para aquellos incluidos en el Phylum Ascomycota. Para ello, las primeras amplificaciones se realizaron con los siguientes 3 pares de *primers*: ITS1F-ITS4 para amplificar hongos en general, ITS1F-ITS4B para amplificar hongos del Phylum Basidiomycota e ITS1F-ITS4A para los incluidos en el Phylum Ascomycota (Invitrogen). Las amplificaciones se llevaron a cabo según las siguientes concentraciones: 6 mM $MgCl_2$, 0,32 mM dNTPs, 0,2 μM de cada primer, 1U Taq polimerasa, 1X buffer de reacción y 5 μL de ADN genómico o de una dilución 1:50. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C y 1 min a 72 °C, y una extensión final de 10 min

a 72 °C. Los productos de PCR obtenidos fueron utilizados como molde (*template*) para realizar una segunda amplificación con los *primers* ITS1F e ITS2. Para esta amplificación se utilizó el *primer* adicionado con el *CGclamp* a fin de obtener una mejor resolución de los perfiles de TGGE. Se verificaron los productos de PCR en geles de agarosa 1 %.

El análisis de TGGE fue llevado a cabo en un equipo (Biometra). Para correr las muestras se utilizó un gel de poliacrilamida. Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis a través de un gradiente continuo de temperatura y los geles fueron teñidos con nitrato de plata. Una vez obtenidos los patrones de bandas, se utilizó el programa Bionumerics 6.6 (Applied Maths) para analizar los perfiles de bandas obtenidos. Para la construcción de los dendrogramas se aplicó el índice de Dice con un valor de tolerancia de 0.5%. Este índice se basa en la presencia/ausencia de las bandas y la tolerancia que define corresponde a la distancia máxima que puede haber entre dos bandas de diferentes muestras para que sean consideradas la misma. Se utilizó el método de UPGMA (*Unweighted pair group method*) para realizar los agrupamientos de los perfiles de bandas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizaron análisis factoriales de una vía (ANOVA) para comparar: los contenidos de nutrientes (C_T , N_T , P_E) y pH del suelo en los individuos jóvenes de *N. nervosa* analizados en las distintas categorías de edad (3 niveles: Jvn, JvDom-n y JvDom-e); el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de levaduras respecto de: el tipo de medio de cultivo utilizado (2 niveles: medio MYP y medio MYP+RB), el Tipo exploratorio del ectomorfotipo a partir del cual fueron aisladas (2 niveles: Tipo 1 y Tipo 2 y 3), y el ambiente en el que se encontraban (2 niveles: bosque y plantación de pinos). Se llevaron a cabo 3 análisis factoriales (ANOVA) de 2 vías para analizar el número de bandas de los perfiles fúngicos del suelo obtenidos a partir de la técnica de TGGE, uno correspondiente a hongos totales, otro a los perfiles obtenidos para hongos del Phylum Basidiomycota y el último para los del Phylum Ascomycota. Los factores considerados para estos análisis fueron: ambiente con 2 niveles (bosque nativo y plantación de pinos) y diversidad genética con 3 niveles (elevada, intermedia y baja). Se realizó un análisis de *Chi-cuadrado* para evaluar si existía asociación entre las proporciones de levaduras pertenecientes a los Phyla Basidiomycota y Ascomycota respecto de las categorías de jóvenes estudiadas. Para los análisis *a posteriori*, en aquellos casos en los que las diferencias estadísticas fueron significativas se utilizó la Prueba de Tukey.

Para evaluar si existía correlación entre el número de bandas de los perfiles obtenidos para cada individuo y los distintos parámetros de diversidad genética calculados se utilizó el Índice de correlación de Pearson (r).

Tabla 5.2.- Descripción de los marcadores microsatélites utilizados para caracterizar genéticamente al Raulí. **F** = Primer forward; **R** = Primer reverse; * = Fluoróforo incluido en el Primer F; ** = El fluoróforo se adiciona al primer M13; ¹ Azpilicueta *et al.* 2004; ² Marchelli *et al.* 2008; ³ Soliani *et al.* 2010; ⁴ de Vendramin (en preparación).

LOCUS	SECUENCIA DEL PRIMER (5'-3')	MOTIVO REPETIDO	TAMAÑO ALELOS (PB)	FLUORÓFORO
NgBio14 ¹	F: AGAACACAGACAGATCACCC R: TATTTTGGACATGATCCTTG	(CA) ₃ (CACAA) ₄ (CA) ₅	246-281	Hex (verde)*
NnBio11 ¹	F: AGGGACGCACATTTCAAAC R: GACTTGGCCTACATCACTTCTTC	(GT) ₁₀	221-247	Fam (azul)*
NnBio37 ²	F: CAACGACTGTTCCCAACTCC R: TTACCTGGTGGGAGATTTCCG	(CT) ₁₂	112-136	Fam (azul)*
NnBio111 ²	F: TATGTGAACGCGTCTGCTTC R: CGCTCTCAGACCAGAAAGG	(GT) ₂ A(GT) ₁₀	118-140	Ned (negro)*
Npum9 ³	F: TAATGGACGCGAACTGATGA R: AGGGGTGGGTTTGAATTAG	(TTC) ₉	150-168	Hex (verde)**
Npum14 ³	F: TGAGATTTTCGTCTCATCCA R: CAGGAGGTCCACCTCATCAT	(GA) ₃ (CA) ₂ (GA) ₅	274-280	Fam (azul)**
Oakpum64 ⁴	F: CATTTCATGGCGTACCACAAC R: AGCCATTGGTTTGAGGATTG	(CAA) ₈	370-379	Hex (verde)**

Tabla 5.3.- Concentración de los reactivos utilizados en los mix de PCR de cada par de primers y temperatura de annealing del ciclado correspondiente a cada uno de ellos.

Primer F = Primer forward; **Primer R** = Primer reverse; **T_A** = Temperatura de annealing del programa de ciclado; * = Se utilizó la polimerasa Taq Platinum

LOCUS	BUFFER (X)	MgCl ₂ (mM)	PRIMER F (μM)	PRIMER R (μM)	PRIMER M13 (μM)	DNTPS (mM)	TAQ (U/ μL)	BSA (MG/ ML)	T _A (°C)
NgBio14	1	1,5	0,2	0,2	-	0,1	0,04	0,3	55
NnBio11	1	1,5	0,2	0,2	-	0,1	0,04*	0,3	59
NnBio37	1	3	0,33	0,33	-	0,1	0,04	0,3	59
NnBio111	1	3	0,16	0,16	-	0,1	0,04	0,3	53
Npum9	1	1,5	0,01	0,04	0,04	0,1	0,05	0,3	60
Npum14	1	3,5	0,01	0,04	0,04	0,1	0,05	0,3	60
Oak_pum64	1	3,5	0,01	0,04	0,04	0,1	0,05	0,3	55

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO ASOCIADO A LOS ECTOMORFOTIPOS ANALIZADOS

En la Tabla 5.4 se muestran los valores C_T , N_T , P_E y pH obtenidos para las muestras de suelo analizadas para cada individuo joven de *N. nervosa*. La diferencia entre los valores obtenidos para el suelo bajo los jóvenes nativos (Jvn) y los jóvenes cultivados implantados en el bosque (JvDom-n) fueron similares entre sí pero estadísticamente mayores que los registrados bajo los jóvenes ubicados en la plantación de pinos (JvDom-e) para C_T ($p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente), N_T ($p < 0,001$ y $p = 0,006$) y P_E ($p = 0,009$ y $p = 0,039$). El pH fue significativamente más ácido en la plantación de pinos respecto del bosque ($p = 0,013$ al compararlo con los Jvn y $p = 0,04$ al hacerlo con los JvDom-n).

La granulometría y la clase textural correspondiente al suelo de los jóvenes nativos y de aquellos provenientes de procesos de domesticación e implantados en el bosque también fueron comparables entre sí, presentando cantidades similares de arcilla, limo y arena y perteneciendo a suelos de textura franco-arenosa. Por el contrario, en el suelo de la plantación de pinos se registró un menor porcentaje de arcilla y limo, y mayor cantidad de arena, correspondiendo entonces a la clase textural arenoso-franco (Tabla 5.5).

Tabla 5.4.- Características químicas del suelo asociado a los sistemas radicales de de *Nothofagus nervosa*. C_T = Carbono total; N_T = Nitrógeno total; P_E = Fósforo extraíble; **Jvn** = Jóvenes nativos; Jóvenes cultivados e implantados en el bosque nativo = **JvDom-n** y en la plantación de pinos = **JvDom-e**. Distintas letras en el superíndice indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos para las distintas categorías de edad.

CATEGORÍA DE EDAD	C_T (%)	N_T (%)	P_E (mg/kg)	pH
Jvn	4,7 ± 0,9 ^a	0,3 ± 0,06 ^a	19,6 ± 11,4 ^a	5,8 ± 0,2 ^a
JvDom-n	3,8 ± 0,7 ^a	0,2 ± 0,04 ^a	14,1 ± 6,4 ^a	5,7 ± 0,1 ^a
JvDom-e	1,3 ± 0,2 ^b	0,1 ± 0,02 ^b	2,7 ± 0,9 ^b	5,5 ± 0,07 ^b

Tabla 5.5.- Granulometría del suelo asociado a los sistemas radicales de los jóvenes de Raulí analizados y clase textural a la que pertenecen los mismos. **Jvn** = Jóvenes nativos; Jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados bajo bosque nativo = **JvDom-n** y la plantación de pinos = **JvDom-e**.

CATEGORÍA DE EDAD	GRANULOMETRÍA			CLASE TEXTURAL
	Arcilla (%)	Limo (%)	Arena (%)	
Jvn	8	31	61	Franco arenoso
JvDom-n	7,2	28,5	64,3	Franco arenoso
JvDom-e	3,1	18	78,9	Arenoso franco

LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS ASOCIADOS A ECTOMORFOTIPOS

En este ensayo se estudiaron 2 ectomorfotipos en cada uno de los 15 ejemplares jóvenes de *N. nervosa* de procedencia Yuco seleccionados: uno sin hifas emanantes ni rizomorfos (Tipo Exploratorio 1) y el otro con abundante micelio extrarradical (Tipo Exploratorio 2 ó 3 según el individuo). Para el cultivo de las levaduras se utilizó medio MYP sin (MYP) y con el agregado de Rosa de Bengala (MYP+RB).

El número promedio de UFC/g de ectomorfotipo obtenido para cada grupo de ectomorfotipos y tratamiento se muestra en la Tabla 5.6. Los valores correspondientes a los ectomorfotipos de los Tipos 2 y 3 fueron significativamente mayores que los registrados en los de Tipo 1 ($p = 0,026$). Si bien se cuantificó un mayor número de levaduras y hongos dimórficos en las placas con medio MYP+RB, la diferencia en el número de UFC/g ectomorfotipo obtenido para cada tratamiento no fue significativa. El agregado de este colorante al medio de cultivo tuvo diferentes efectos sobre las muestras, se observó que reducía la formación de micelio aéreo por parte de hongos filamentosos, el tamaño y/o el número de sus colonias (Figura 5.5). El número promedio de UFC/g ectomorfotipo no difirió significativamente entre el bosque y la plantación para ninguno de los medios utilizados.

Tabla 5.6.- Cuantificación de levaduras y hongos dimórficos en los distintos tipos exploratorios de ectomorfotipos. **Tipo 1** = Sin micelio extrarradical; **Tipos 2y3** = Con abundante micelio extrarradical; **MYP** = Medio de cultivo sin fungistático; **MYP+RB** = Medio con Rosa de Bengala. Distintas letras en el superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los valores obtenidos para los distintos tipos exploratorios en medio MYP (minúsculas) y MYP+RB (mayúsculas).

TIPO EXPLORATORIO	LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS (UFC / g ECTOMORFOTIPO)	
	MYP	MYP+RB
Tipo 1	$7,2 \times 10^3$ ^a	$9,9 \times 10^3$ ^A
Tipo 2 y 3	$4,4 \times 10^4$ ^b	$4,6 \times 10^4$ ^B

Se obtuvieron un total de 107 aislamientos correspondientes tanto a levaduras como a hongos dimórficos (Tabla 5.7). Como se observa en la Figura 5.6a, la mayor parte de los mismos fueron recuperados a partir de las placas con medio MYP+RB. Se observaron estos hongos en el 53 % de los ectomorfotipos lisos sin micelio extrarradical (Tipo exploratorio 1) y en el 93 % de los que presentaban abundante micelio extrarradical (Tipos exploratorios 2 y 3), obteniéndose la mayor parte de aislamientos a partir de estos últimos (Figura 5.6b). El porcentaje de aislamientos recuperados a partir de las EcM presentes en las raíces de Jóvenes nativos (Jvn), de Jóvenes cultivados e implantados en el bosque nativo (JvDom-n) y en la plantación (JvDom-e) varió ampliamente, señalándose los valores correspondientes a cada categoría de jóvenes en la Figura 5.6c.

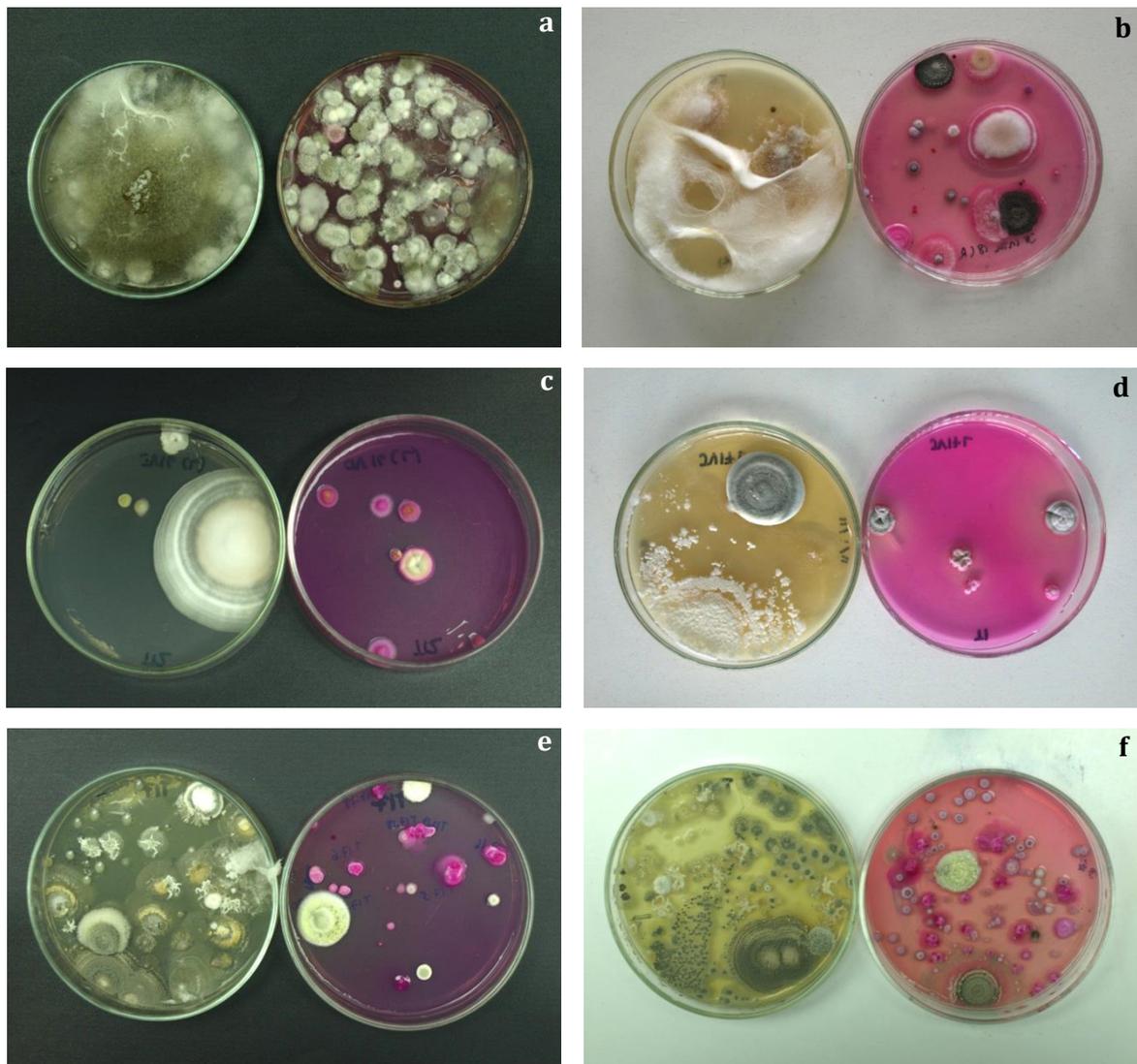


Figura 5.5.- Placas de aislamiento de levaduras y hongos dimórficos donde se muestran los efectos del agregado de Rosa de Bengala al medio de cultivo (la placa con este medio se sitúa a la derecha de la fotografía en todos los casos). Disminución de **a,b)** La formación de micelio aéreo de hongos filamentosos; **c,d)** Tamaño de las colonias de los mismos; **e,f)** Número de UFC de este grupo fúngico.

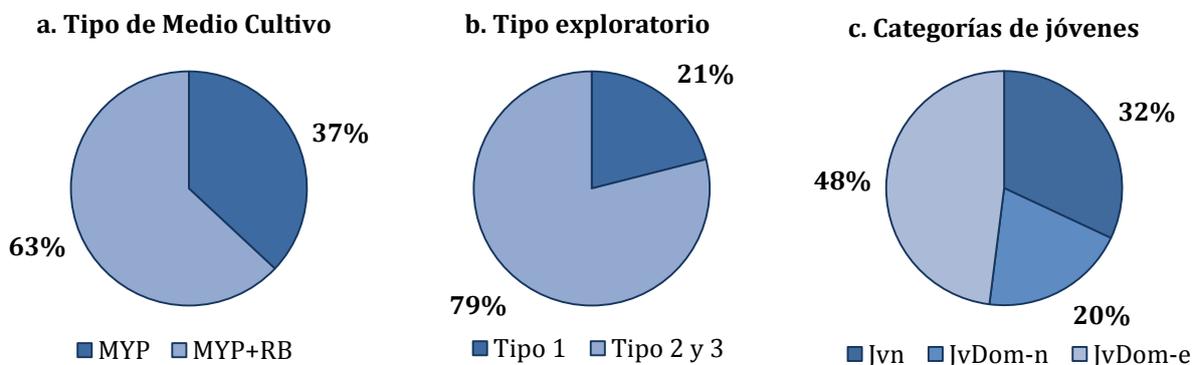


Figura 5.6.- Porcentajes de aislamientos de levaduras y hongos dimórficos obtenidos a partir de los ectomorfitipos de *Nothofagus nervosa* según: **a)** El tipo de medio de cultivo utilizado; **b)** El tipo exploratorio de la EcM; **c)** La categoría de jóvenes analizada.

Tabla 5.7.- Identificación y caracterización de las levaduras y hongos dimórficos aisladas a partir de ectomorfortipos de *Nothofagus nervosa*. **MYP** = Medio MYP sin el agregado de Rosa de Bengala; **MYP+RB** = Medio MYP adicionado con Rosa de Bengala; **Total (%)** = Número y porcentaje de aislamientos obtenidos por especie; **Mcl** = Micelio; **Pig** = Pigmentos; ^M = Melanina; **Mic** = Micosporinas.

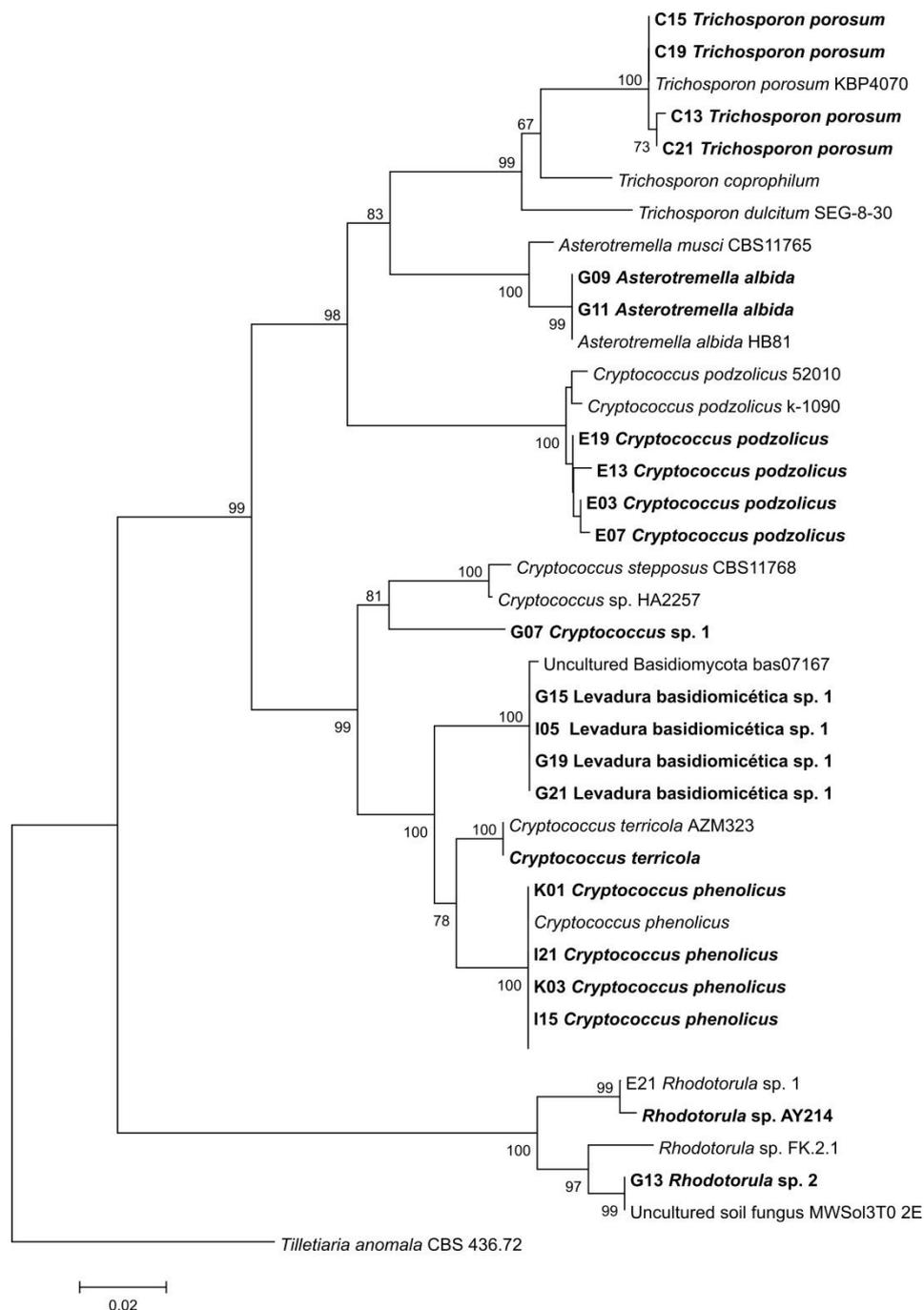
TAXA DE LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS	MEDIO CULTIVO		TOTAL (%)	MCL	PIG	MIC
	MYP	MYP+RB				
Ascomycota						
Dothideales						
<i>Dothidea</i> sp. 1	-	1	1 (~1 %)	+	+ ^M	+
<i>Dothidea</i> sp. 2	-	2	2 (~2 %)	+	+ ^M	+
Saccharomycetales						
<i>Candida</i> sp. 1	-	1	1 (~1 %)	-	-	-
<i>Candida</i> sp. 2	2	-	2 (~2 %)	-	-	-
<i>Candida</i> sp. 3	17	14	31 (29 %)	+	-	-
<i>Incertae sedis</i>						
Hongo dimórfico ascomicético sp. 3	4	10	14 (13 %)	+	+ ^M	-
Levadura ascomicética sp. 1	-	4	4 (~4 %)	-	-	-
Basidiomycota						
Filobasidiales						
<i>Cryptococcus phenolicus</i>	3	13	16 (15 %)	-	-	+
<i>Cryptococcus terricola</i>	-	1	1 (~1 %)	-	-	-
Tremellales						
<i>Asterotremella albida</i>	1	1	2 (~2 %)	-	-	-
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	1	10	11 (10 %)	-	-	-
<i>Trichosporon porosum</i>	4	5	9 (8 %)	-	-	-
<i>Incertae sedis</i>						
<i>Cryptococcus</i> sp. 1	7	3	10 (9 %)	-	-	+
Levadura basidiomicética sp. 1	-	1	1 (~1 %)	-	-	+
<i>Rhodotorula</i> sp. 1	1	-	1 (~1 %)	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp. 2	-	1	1 (~1 %)	-	-	-
Total aislamientos por tratamiento	40	67	107			

De igual forma que lo descrito en el Capítulo 2 de este trabajo de Tesis (Figura 2.4), los patrones de bandas de microsatélites obtenidos para los diferentes aislamientos de levaduras y hongos dimórficos permitieron confirmar la homogeneidad de los grupos morfológicos conformados y seleccionar de cada uno los representantes que fueron enviados a secuenciar.

Se hallaron un total de 16 especies de levaduras y hongos dimórficos. En la Figura 5.7 puede observarse que la mayor parte de las mismas corresponden a posibles especies nuevas (69 %). El 49 % del total de aislamientos y el 56 % de las especies pertenecen al Phylum Basidiomycota, y el resto de las mismas están comprendidas en el Phylum Ascomycota (Tabla 5.7). Las especies del Phylum Basidiomycota, pertenecientes a los géneros *Asterotremella*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*, eran de color blanco o crema (no poseían

pigmentos) y generaban micelio. Entre las pertenecientes al Phylum Ascomycota, se hallaron 3 especies de hongos dimórficos de color oscuro (grises, negros) debido al contenido de melanina y capaces de formar micelio conspicuo, siendo éstas *Dothidea* sp. 1, *Dothidea* sp. 2 y Hongo dimórfico ascomicético sp. 3. La especie *Candida* sp. 3 era blanca y formaba micelio, mientras que el resto de las especies halladas dentro de este Phylum no producían pigmentos ni micelio (*Candida* sp. 1, *Candida* sp. 2, Levadura ascomicética sp. 1). El 31 % de las especies sintetizaban micosporinas (Tabla 5.7).

a



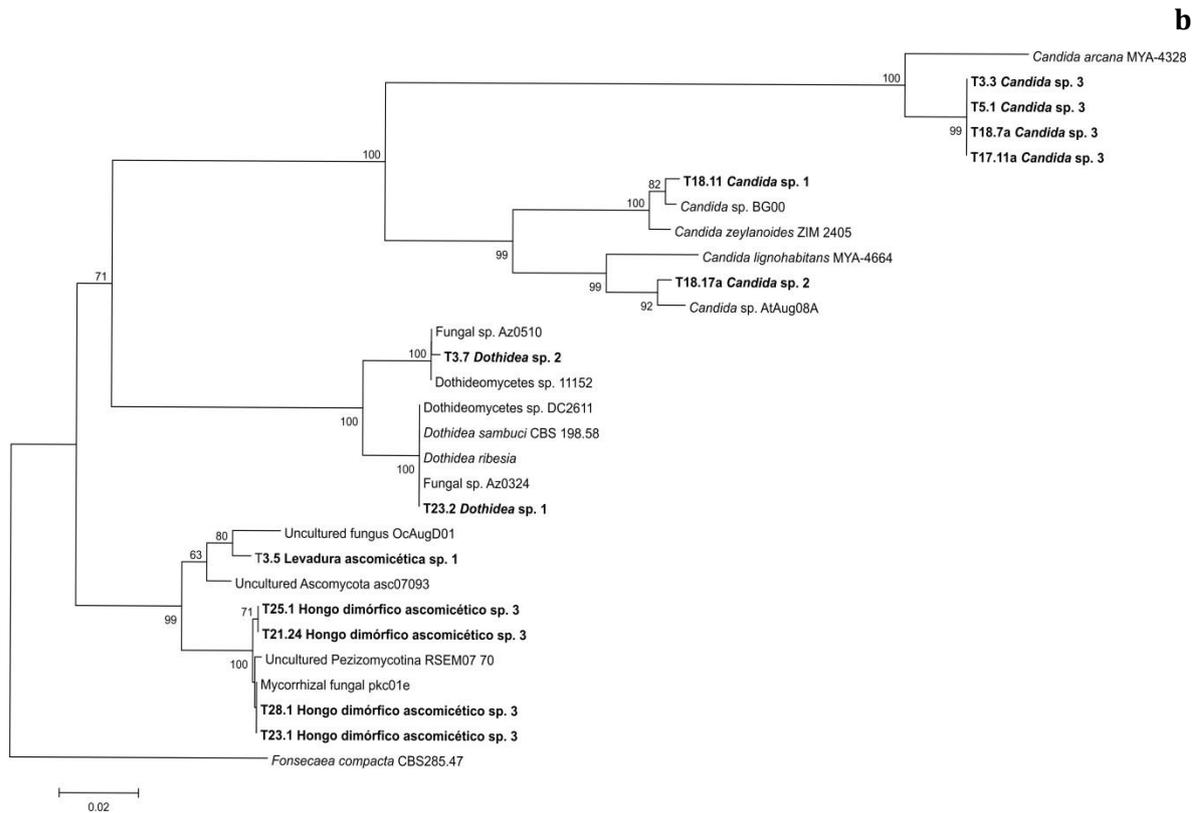


Figura 5.7.- Árboles filogenéticos construidos en base al algoritmo Neighbor Joining y al modelo Kimura de 2 parámetros para estimar las distancias evolutivas entre las secuencias del dominio D1/D2. Los números sobre las ramas corresponden a la frecuencia con la que la rama se ubicó de esa forma en 1000 repeticiones (*bootstrap*), los valores inferiores al 50 % no se muestran. Secuencias correspondientes a las especies *Tilletiaria anomala* y *Fonsecaea compacta* fueron utilizadas como raíz (*outgroup*) en el árbol perteneciente al Phylum **a**) Basidiomycota y **b**) Ascomycota, respectivamente. Las secuencias obtenidas en este trabajo se señalan en negrita.

En la Figura 5.8 se muestra que del total de levaduras y hongos dimórficos aislados a partir de los ectomorfortipos analizados en el bosque para las categorías Jvn y JvDom-n¹³, el porcentaje correspondiente al Phylum Basidiomycota fue mayor respecto del observado para el Phylum Ascomycota, tanto a nivel de aislamientos como de especies. Por el contrario, entre las levaduras y hongos dimórficos aislados a partir de los ectomorfortipos asociados a los jóvenes en la plantación de pinos (JvDom-e), se observa que el porcentaje de especies y principalmente el de aislamientos pertenecientes al Phylum Ascomycota fue mayor (Figura 5.8, Tabla 5.7). En base al análisis de *Chi*-cuadrado realizado se estableció que esta relación entre la proporción de hongos pertenecientes al Phylum Basidiomycota o Ascomycota y las

¹³ Cabe recordar en este punto que los ectomorfortipos a partir de los cuales fueron aisladas las levaduras y hongos dimórficos corresponden a los descritos en el Capítulo 4, por lo que en la Tabla 5.8 se detalla el nombre de cada uno de ellos o del hongo que lo forma basándose en esta información.

categorías de individuos jóvenes de *N. nervosa* analizados (Jvn, JvDom-n y JvDom-e) es significativa ($p < 0.001$).

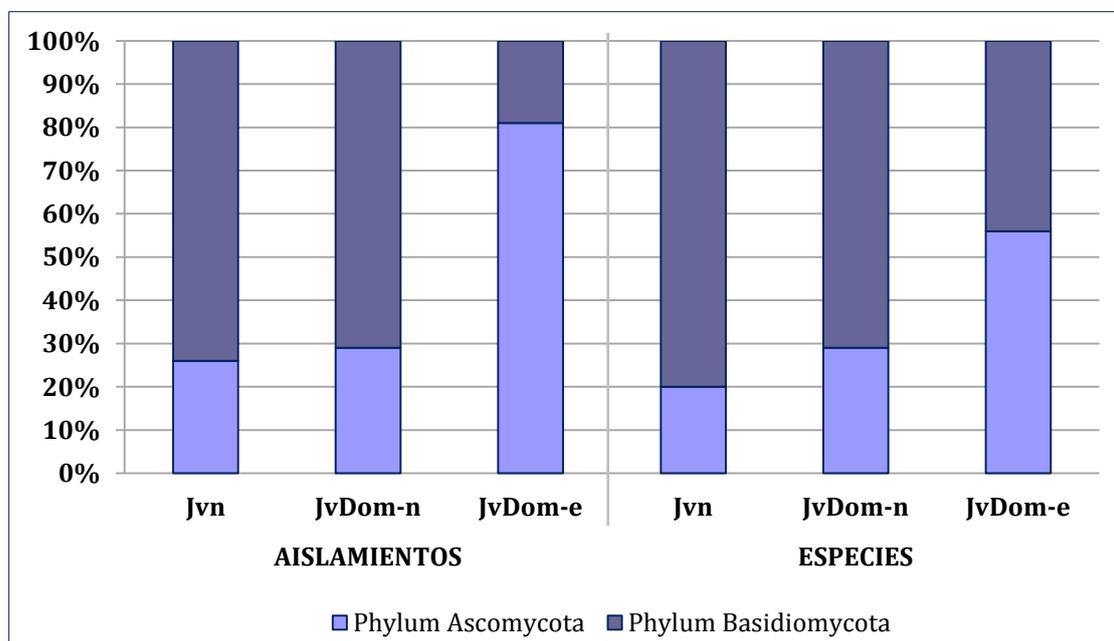


Figura 5.8.- Porcentaje de aislamientos y de especies de levaduras y hongos dimórficos aisladas a partir de los ectomorfitipos analizados en cada categorías de jóvenes. **Jvn** = Jóvenes nativos; **JvDom-n** = Jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados en el bosque; **JvDom-e** = Jóvenes implantados bajo pino (cada barra corresponde al 100 % de aislamientos y especies obtenidos en cada categoría).

Las especies de levaduras y hongos dimórficos halladas fueron variables entre los ectomorfitipos, pero también entre los ambientes analizados. En el bosque, el mayor número de aislamientos correspondieron a las especies basidiomicéticas *Cryptococcus phenolicus*, *Cr. podzolicus* y *T. porosum*, y al Hongo dimórfico ascomicético sp. 3. Este último correspondió además a la especie más distribuida entre los ejemplares analizados, ya que se encontró asociada a ectomorfitipos del Tipo Exploratorio 1 y de los Tipos 2 y 3, y tanto en jóvenes nativos como en jóvenes cultivados e implantados en el bosque. En la plantación de pinos las dos especies abundantes fueron *Candida* sp. 3 y *Cryptococcus* sp. 1. De las 16 especies encontradas, sólo 3 fueron comunes a ambos ambientes: *Cr. phenolicus*, *Cr. podzolicus* y *Cryptococcus* sp. 1, siendo las dos primeras más frecuentes en el bosque nativo y la última en la plantación. Los únicos géneros que presentaron más de 2 especies fueron *Cryptococcus* y *Candida*, en los que se identificaron 4 y 3 especies, respectivamente (Tabla 5.8).

En la Tabla 5.8 se observa que la mayor parte (69 %) de las especies de levaduras y hongos dimórficos aisladas se hallaron en sólo un individuo y representadas generalmente

por 1-2 aislamientos (a excepción de las especies Levadura ascomicética sp. 1 y *T. porosum*, para las que se obtuvieron 4 y 9 aislamientos respectivamente). Esta situación dificultó poder analizar si la diversidad de este grupo de hongos se encuentra relacionada con las características genéticas individuales de los ejemplares de Raulí analizados. A nivel de población, considerada como los 5 árboles pertenecientes a cada categoría, se hallaron 5 especies de levaduras y hongos dimórficos asociadas a los ectomorfortipos de los ejemplares nativos (Jvn), 7 a los cultivados e implantados bajo bosque nativo (JvDom-n) y 9 a los ubicados en la plantación (JvDom-e).

DIVERSIDAD GENÉTICA EN EJEMPLARES JÓVENES DE *NOTHOFAGUS NERVOSA*

En la Figura 5.9 se muestran ejemplos de los electroferogramas obtenidos para tres de los loci analizados, cada uno de los cuales estaba asociado a un fluoróforo diferente (Ned: Negro, Hex: verde y Fam: azul). En cada gráfico, los picos más altos corresponden a los alelos que presenta ese individuo para el locus analizado (si el ejemplar de *N. nervosa* fuera homocigota para el locus se observaría sólo un pico).

Entre los 35 individuos de *N. nervosa* analizados se encontraron un total de 29 alelos. Para las siete poblaciones consideradas, el locus NgBio14 resultó monomórfico (se halló sólo un alelo). El locus Npum14 también fue monomórfico para la mayor parte de las poblaciones, a excepción de los jóvenes nativos y de los ejemplares cultivados pertenecientes a la procedencia Yuco e instalados en el bosque nativo, para los cuales se detectaron dos alelos. Para los loci NnBio11, Npum9 y Oakpum64 se observaron cuatro alelos y cinco para el locus NnBio111. El locus más diverso fue el NnBio37, para el cual se registraron nueve alelos. Las poblaciones correspondientes a las procedencias Pudú-Pudú y Yuco bajo bosque de pino fueron las únicas que presentaron tres de los siete loci analizados monomórficos (Tabla 5.9).

Los valores de heterocigosis observada variaron entre 0,20 y 1,00 mientras que la heterocigosis esperada osciló entre 0,18 y 0,80. Entre los ejemplares estudiados en el bosque nativo, se encontraron desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en cuatro loci (NnBio 11 para la población de Hua-Hum, NnBio37 y Oakpum64 para la población Yuco y Npum9 para la población conformada por jóvenes nativos). En el caso de los individuos implantados bajo pino se registró sólo una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg en la población de Queñi y para el locus NnBio 11 (Tabla 5.9). Cabe aclarar que el análisis de las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg se hizo en forma exploratoria ya que el número de individuos analizado para cada población no fue lo suficientemente elevado como para darle validez estadística apropiada a este parámetro en particular.

Tabla 5.8.- Número de aislamientos obtenidos para los ectomorfortipos analizados en Raulí. **ID** = Individuo; **TE** = Tipo exploratorio (1- sin micelio extrarradical, 2/3- con abundante micelio extrarradical); **MT** = Total de aislamientos obtenidos por ectomorfortipo; **Cat** = Total de aislamientos para las distintas categorías de jóvenes; * = Ectomorfortipo de *Tomentella* sp. 1 sin hifas emanantes; **Dt1** = *Dothidea* sp. 1; **Dt2** = *Dothidea* sp. 2; **Cd1** = *Candida* sp. 1; **Cd2** = *Candida* sp. 2; **Cd3** = *Candida* sp. 3; **Hd1** = Hongo dimórfico ascomicético sp. 3; **La1** = Levadura ascomicética sp. 1; **Cph** = *Cryptococcus phenolicus*; **Cte** = *Cr. terricola*; **Aal** = *Asterotremella albida*; **Cpo** = *Cr. podzolicus*; **Trp** = *Trichosporom porosum*; **Cr1** = *Cryptococcus* sp. 1; **Lb1** = Levadura basidiomicética sp. 1; **Rh1** = *Rhodotorula* sp. 1; **Rh2** = *Rhodotorula* sp. 2. Se somborean en gris los ectomorfortipos que no presentaron levaduras.

ID	TE	HONGO ECTOMICORRÍCICO	PHYLUM ASCOMYCOTA					PHYLUM BASIDIOMYCOTA							Total					
			Dt1	Dt2	Cd1	Cd2	Cd3	Hd1	La1	Cph	Cte	Aal	Cpo	Trp	Cr1	Lb1	Rh1	Rh2	MT	Cat
Jvn1	1	Gr 8b																	0	34
	3	<i>Cortinarius</i> sp. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
Jvn2	1	Thelephoraceae 1																	0	
	3	<i>Cortinarius</i> sp. 4	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Jvn3	1	<i>Russula</i> sp. 1																	0	
	2	<i>Tricholoma</i> sp. 1																	0	
Jvn4	1	<i>Tomentella</i> sp. 1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
	3	<i>Tricholoma</i> sp. 2	-	-	-	-	-	7	-	14	-	-	6	-	1	-	-	-	28	
Jvn5	1	Thelephoraceae 1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	3	<i>Cortinarius</i> sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2	
JvDom-n1	1	<i>Laccaria</i> sp. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	21
	3	<i>Cortinarius</i> sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	8	
JvDom-n2	1	<i>Clavulina</i> sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	
	3	<i>Cortinarius</i> sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	
JvDom-n3	1	<i>Inocybe</i> sp. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	
	2	<i>Tricholoma</i> sp. 1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
JvDom-n4	1	<i>Laccaria</i> sp. 1																	0	
	3	<i>Cortinarius</i> sp. 1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	5	
JvDom-n5	1	<i>Tomentella</i> sp. 1*	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	3	<i>Cortinarius</i> sp. 1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
JvDom-e1	1	<i>Sebacina</i> sp. 2																	0	52
	2	<i>Hebeloma</i> sp. 1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	3	
JvDom-e2	1	<i>Sebacina</i> sp. 2																	0	
	2	<i>Hebeloma</i> sp. 1	-	2	-	-	3	-	4	1	-	-	-	1	-	-	1	-	12	
JvDom-e3	1	<i>Leotiomyces</i> sp. 1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	2	<i>Hebeloma</i> sp. 1	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	
JvDom-e4	1	<i>Sebacina</i> sp. 2	-	-	1	2	8	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	15	
	2	<i>Hebeloma</i> sp. 1	-	-	-	-	13	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	15	
JvDom-e5	1	<i>Leotiomyces</i> sp. 1																	0	
	2	<i>Hebeloma</i> sp. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	

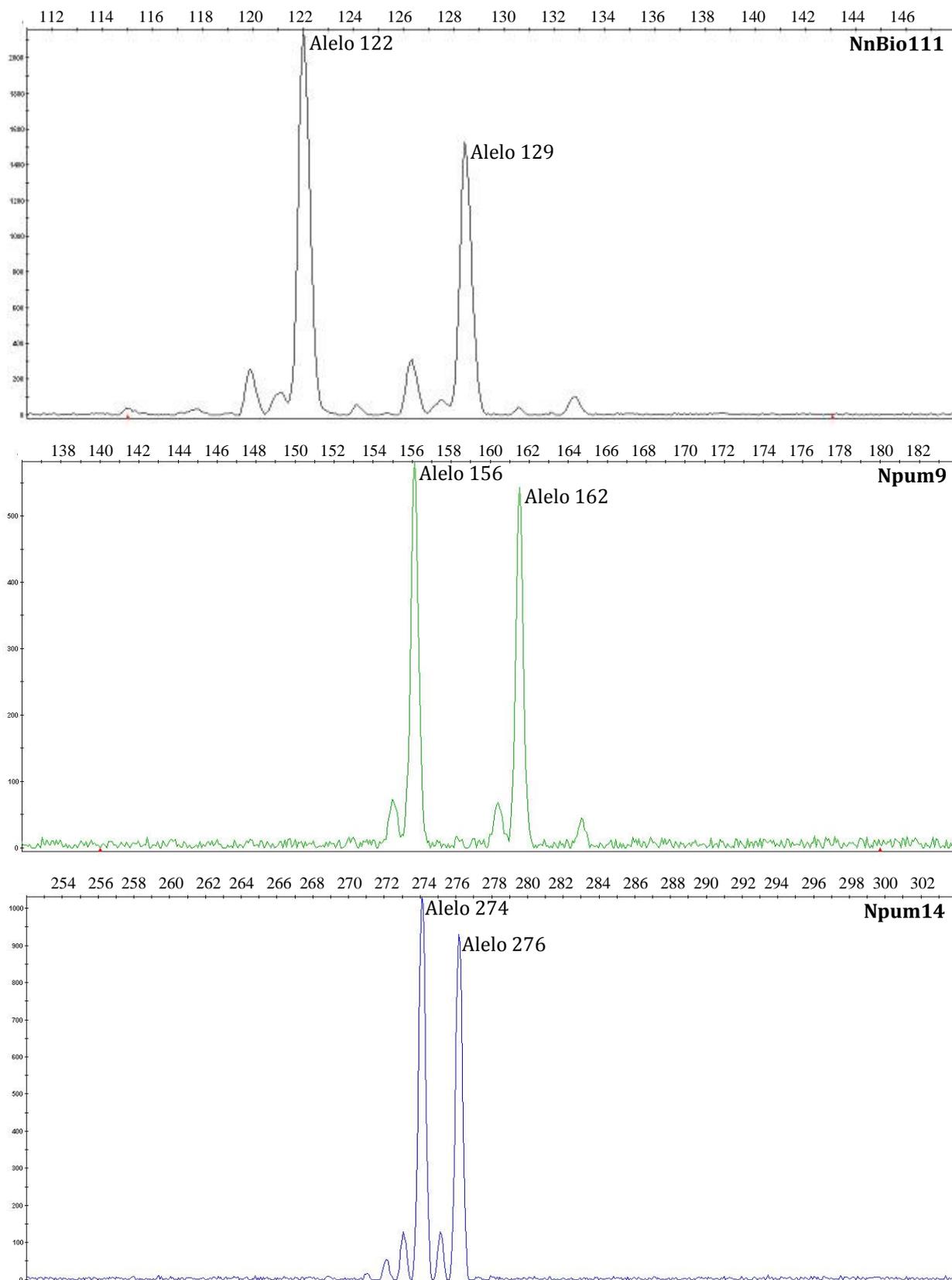


Figura 5.9.- Electroferogramas de individuos heterocigotas para los loci NnBio111, Npum4 y Npum9. Los distintos colores corresponden al fluoróforo utilizado para marcar los primers con los que se realizaron las amplificaciones de cada loci (Ned: Negro, Hex: verde y Fam: azul).

Tabla 5.9- Estimaciones de los parámetros de diversidad genética para cada locus analizado en las poblaciones de *Nothofagus nervosa*. **Na** = Número de alelos; **Ne** = Número de alelos efectivo; **Ho** = Heterocigosis observada; **He** = Heterocigosis esperada; **HW** = Desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg; **M** = Monomórfico; **ns** = No significativo; * = Significativo ($p < 0,05$).

AMBIENTE	POBLACIÓN	LOCUS	Na	Ne	Ho	He	HW	
Bosque nativo	Hua-Hum	NgBio14	1	1,000	0,000	0,000	M	
		NnBio 11	2	1,600	0,000	0,375	*	
		NnBio37	6	5,000	0,800	0,800	ns	
		NnBio111	4	3,846	0,800	0,740	ns	
		Npum9	2	1,724	0,600	0,420	ns	
		Npum14	1	1,000	0,000	0,000	M	
		Oakpum64	3	2,381	1,000	0,580	ns	
	Pudó-Pudú	NgBio14	1	1,000	0,000	0,000	M	
		NnBio 11	2	1,220	0,200	0,180	ns	
		NnBio37	4	2,778	0,800	0,640	ns	
		NnBio111	4	3,333	1,000	0,700	ns	
		Npum9	3	1,515	0,400	0,340	ns	
		Npum14	1	1,000	0,000	0,000	M	
		Oakpum64	1	1,000	0,000	0,000	M	
	Yuco	NgBio14	1	1,000	0,000	0,000	M	
		NnBio 11	3	2,909	0,250	0,656	ns	
		NnBio37	5	2,500	0,400	0,600	*	
		NnBio111	4	2,941	0,800	0,660	ns	
		Npum9	3	1,515	0,400	0,340	ns	
		Npum14	2	1,220	0,200	0,180	ns	
		Oakpum64	2	1,600	0,000	0,375	*	
		Jóvenes Nativos	NgBio14	1	1,000	0,000	0,000	M
			NnBio 11	3	2,909	0,250	0,656	ns
			NnBio37	4	3,571	0,800	0,720	ns
NnBio111	4		2,778	0,800	0,640	ns		
Npum9	4		2,381	0,200	0,580	*		
Npum14	2		1,923	0,400	0,480	ns		
Oakpum64	2		1,923	0,800	0,480	ns		
Plantación de pinos	Queñi	NgBio14	1	1,000	0,000	0,000	M	
		NnBio 11	2	1,471	0,000	0,320	*	
		NnBio37	4	2,909	0,750	0,656	ns	
		NnBio111	4	3,333	0,800	0,700	ns	
		Npum9	2	1,471	0,400	0,320	ns	
		Npum14	1	1,000	0,000	0,000	M	
		Oakpum64	3	2,381	0,200	0,580	ns	
	Pudú-Pudú	NgBio14	1	1,000	0,000	0,000	M	
		NnBio 11	1	1,000	0,000	0,000	M	
		NnBio37	5	4,545	0,600	0,780	ns	

AMBIENTE	POBLACIÓN	LOCUS	Na	Ne	Ho	He	HW
Pudú-Pudú (Continuación)		NnBio111	4	3,333	0,600	0,700	ns
		Npum9	2	1,220	0,200	0,180	ns
		Npum14	1	1,000	0,000	0,000	M
		Oakpum64	2	1,471	0,400	0,320	ns
Yuco		NgBio14	1	1,000	0,000	0,000	M
		NnBio 11	3	2,462	0,750	0,594	ns
		NnBio37	3	2,133	0,500	0,660	ns
		NnBio111	4	2,941	0,800	0,660	ns
		Npum9	2	1,471	0,400	0,000	M
		Npum14	1	1,000	0,000	0,000	M
		Oakpum64	3	1,852	0,600	0,460	ns

En la Tabla 5.10 se muestran los parámetros calculados para cada una de las poblaciones. Puede observarse que los jóvenes nativos (Jvn) presentaron los mayores valores de número de alelos efectivo (*Ne*) y heterocigosis observada (*Ho*) y esperada (*He*), indicando que este grupo de plantas presentaron mayor diversidad genética que las demás categorías de jóvenes consideradas (JvDom-n y JvDom-e). Entre los ejemplares cultivados a partir de distintas procedencias e implantados en el bosque nativo (JvDom-n), los pertenecientes a la población Hua-Hum fueron los más diversos genéticamente, los de la población Pudú-Pudú los que presentaron menor diversidad genética y los correspondientes a la procedencia Yuco presentaron valores intermedios, pero muy próximos a los máximos. Esta tendencia se mantuvo para los individuos jóvenes de *N. nervosa* correspondientes a las 3 procedencias analizadas en el ensayo ubicado bajo la plantación de pinos (JvDom-e). En conjunto, estos resultados coinciden con los previamente obtenidos con marcadores isoenzimáticos que se consideraron para elegir las procedencias (Marchelli & Gallo 2004).

Tabla 5.10.- Estimaciones de los parámetros poblacionales de diversidad genética, para el pool de 7 loci. **Na** = Número de alelos promedio por locus; **Ne** = Número de alelos efectivo; **He** = Heterocigosis esperada.

AMBIENTE	POBLACIÓN	Na	Ne	Ho	He
Bosque nativo	Hua-Hum	2,714	2,364	0,457	0,416
	Pudú-Pudú	2,286	1,692	0,343	0,266
	Yuco	2,857	1,955	0,293	0,402
	Jóvenes Nativos	2,857	2,355	0,494	0,508
Plantación de pinos	Queñi	2,429	1,938	0,307	0,368
	Pudú-Pudú	2,286	1,938	0,257	0,283
	Yuco	2,429	1,837	0,436	0,366

ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE BANDAS OBTENIDOS POR LA TÉCNICA DE TGGE

Los patrones de bandas obtenidos por la técnica de TGGE para hongos pertenecientes al Phylum Basidiomycota y Ascomycota y para los hongos totales presentes en el suelo asociado a las raíces de individuos jóvenes de *N. nervosa* de distinta procedencia implantados en el bosque nativo y bajo pino se muestran en las Figuras 5.10, 5.11 y 5.12, respectivamente. En cada dendrograma los números ubicados en la base de las ramas (nodos) corresponden a la frecuencia con la que la rama se ubicó de esa forma en 1000 repeticiones (*bootstrap*).

A partir de los dendrogramas obtenidos para cada grupo de hongos se observa una tendencia común, según la cual los perfiles de bandas correspondientes a hongos asociados a los ejemplares de *N. nervosa* implantados bajo la plantación de pinos (JvDom-e de procedencia Queñi, Yuco y Pudú-pudú) se agrupan entre sí y se separan de los perfiles pertenecientes a hongos asociados a los jóvenes implantados en el bosque nativo (JvDom-n de procedencia Hua-Hum, Yuvo y Pudú-pudú).

Con respecto a los perfiles de hongos del Phylum Basidiomycota, se registró un número de bandas significativamente superior en los ejemplares del ensayo instalado en el bosque nativo respecto de los ubicados en la plantación ($p < 0,001$). También se halló que la interacción entre los factores diversidad genética de la población (elevada, intermedia y baja) y ambiente (bosque nativo y plantación de pinos) fue estadísticamente significativa ($p = 0,021$), implicando que la composición del suelo en los diferentes niveles del primer factor dependen del ambiente en el que se analicen. Esto se debe a que en la plantación bajo bosque nativo se hallaron diferencias significativas en el número de bandas asociadas a las poblaciones de Raulíes con distinta diversidad genética, mientras que en la plantación de pinos las diferencias no fueron significativas. En el bosque, los Raulíes cultivados pertenecientes a la población Yuco (diversidad genética intermedia) presentaron un número de bandas significativamente superior que los de la población Pudú-Pudú (baja diversidad genética) ($p = 0,007$). En la Figura 5.10 se observa que los perfiles de los ejemplares implantados en la plantación de pinos son similares entre sí, presentando mayor homogeneidad que los perfiles de los individuos del bosque.

En el dendrograma correspondiente a los hongos del Phylum Ascomycota (Figura 5.11), se registró una tendencia opuesta a la descrita anteriormente. El número de bandas de los perfiles fue significativamente superior en la plantación de pinos ($p = 0,01$). En ninguno de los dos ambientes se hallaron diferencias significativas entre el número de bandas de los perfiles y las poblaciones analizadas. Sin embargo, en la plantación de pinos el número de bandas más elevado estuvo asociado a ejemplares de las poblaciones de Yuco (10

y 11 bandas) y Queñi (10 bandas), de diversidad genética intermedia y elevada respectivamente.

Al comparar los perfiles obtenidos para hongos en general (Figura 5.12) se observó que entre los ejemplares del bosque, los pertenecientes a la población Yuco presentaron un número de bandas significativamente superior que los correspondientes a la población Hua-Hum ($p = 0,045$). A diferencia de este ambiente, no se detectaron diferencias significativas en el número de bandas de las distintas poblaciones estudiadas en la plantación de pinos. Tampoco se registró diferencia significativa al comparar estos ambientes. Resulta interesante notar que los perfiles correspondientes a los 5 individuos de *N. nervosa* pertenecientes a cada una de 3 de las 6 poblaciones consideradas en este ensayo quedaron incluidos en un mismo clado del dendrograma, siendo éstas la población Pudú-Pudú en el bosque nativo (Figura 5.12a), y las poblaciones Yuco (Figura 5.12b) y Queñi (Figura 5.12c) en la plantación de pinos. Las poblaciones Yuco y Hua-Hum estudiadas en el bosque, y correspondientes a las de diversidad genética más elevada, quedaron también agrupadas en una misma rama, aunque los individuos pertenecientes a ambas poblaciones se intercalan dentro de la misma (Figura 5.12d).

El dendrograma consenso construido en base a los tres anteriores (Figura 5.13) muestra nuevamente una clara división entre los perfiles pertenecientes a los ejemplares plantados bajo bosque y los plantados bajo pino. Los individuos de la población Pudú-Pudú analizada en el bosque fueron los únicos en agruparse en una misma rama (Figura 5.13a), mientras que para el resto de las poblaciones se observaron agrupamientos de sólo 2 ó 3 individuos.

RELACIÓN DE LOS PERFILES CON LA DIVERSIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL

En la Tabla 5.11 se muestran los valores de correlación de Pearson (r) para las diferentes variables consideradas. Como se observa en el misma, todos los índices utilizados para evaluar la diversidad genética individual del árbol están altamente correlacionados entre sí ($r > 0,970$). No se registraron correlaciones significativas entre estos índices y el número de bandas de los perfiles de TGGE obtenidos para cada individuo.

Resulta interesante notar que el número de bandas correspondiente al Phylum Ascomycota está negativamente correlacionado ($r = -0,564$, $p < 0,001$) con el número de bandas registrado para el Phylum Basidiomycota.

Tabla 5.11.- Coeficientes de correlación de Pearson calculados para evaluar la relación entre el número de bandas correspondiente a cada grupo de hongos y la diversidad genética individual de los ejemplares de *Nothofagus nervosa* analizados. **Ho** = Heterocigosis observada; **IR** = Índice de relación interna; **HL** = Heterocigosis ponderada por locus; **HI** = Heterocigosis individual; **ASCO** = Phylum Ascomycota; **Basidio** = Phylum Basidiomycota; **ns** = No significativo. Se resaltan en negrita los coeficientes de correlación significativos.

	Ho	IR	HL	HI	Nº BANDAS ASCO	Nº BANDAS BASIDIO
IR	-1,000 p < 0,001					
HL	-0,980 p < 0,001	-0,980 p < 0,001				
HI	0,992 p < 0,001	0,992 p < 0,001	-0,972 p < 0,001			
Nº BANDAS ASCO	-0,199 ns	-0,199 ns	0,264 ns	-0,185 ns		
Nº BANDAS BASIDIO	0,00951 ns	0,00951 ns	-0,0319 ns	-0,0129 ns	-0,564 p < 0,001	
Nº BANDAS HONGOS GENERAL	0,0745 ns	0,0745 ns	0,0216 ns	0,0792 ns	-0,00602 ns	0,113 ns

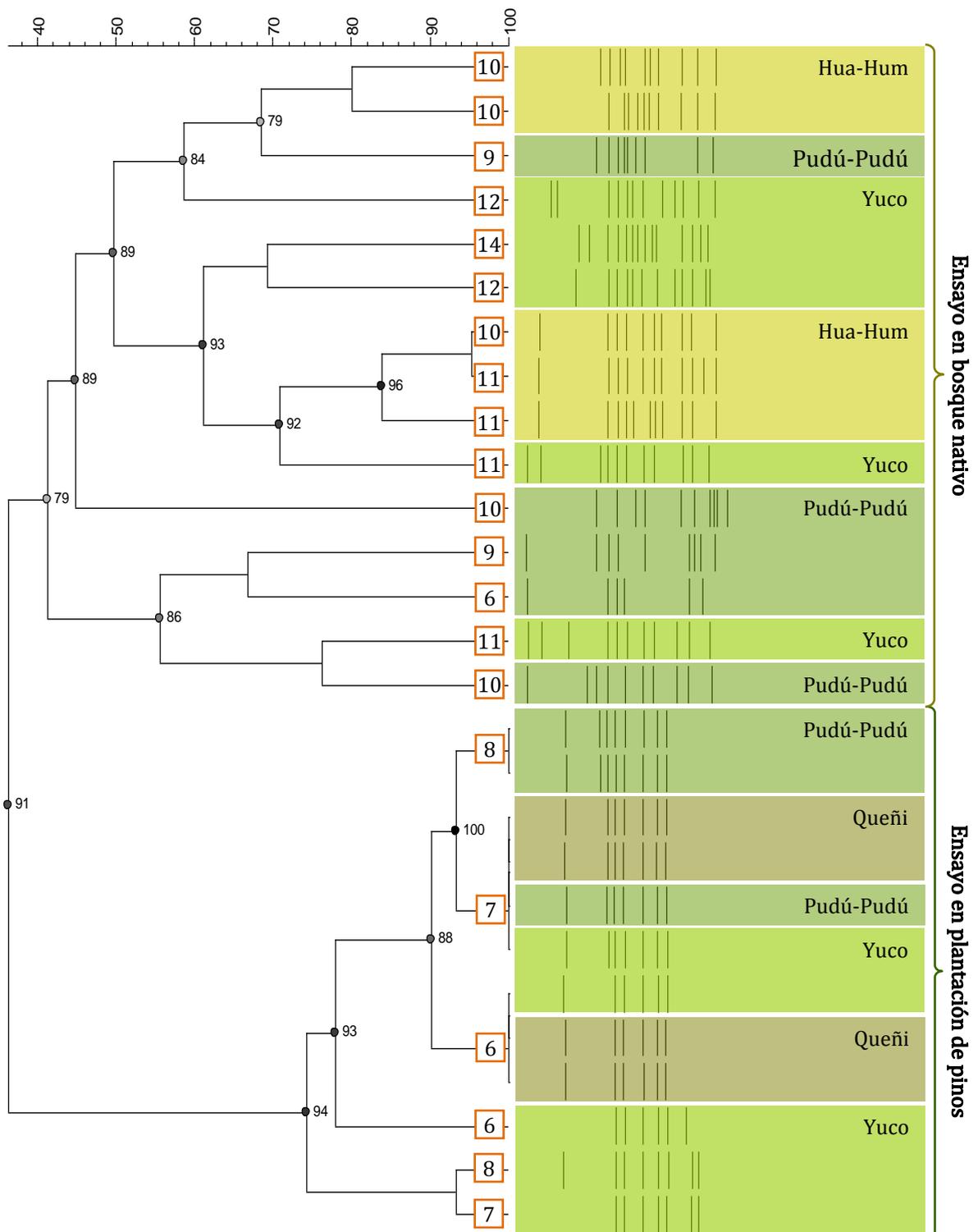


Figura 5.10.- Dendrograma correspondiente a los perfiles de bandas obtenidos para hongos del suelo del Phylum Basidiomycota según los análisis de TGGE. Se señalan con un mismo color los individuos jóvenes pertenecientes a la misma procedencia en cada uno de los ensayos estudiados (bajo bosque nativo y plantación de pinos). **Amarillo** = Población Hua-Hum – Diversidad genética elevada; **Marrón** = Población Queñi – Diversidad genética elevada; **Verde claro** = Población Yuco – Diversidad genética intermedia; **Verde oscuro** = Población Pudú-Pudú – Diversidad genética baja. El cuadrado sobre las ramas corresponde al número de bandas de esa terminal.

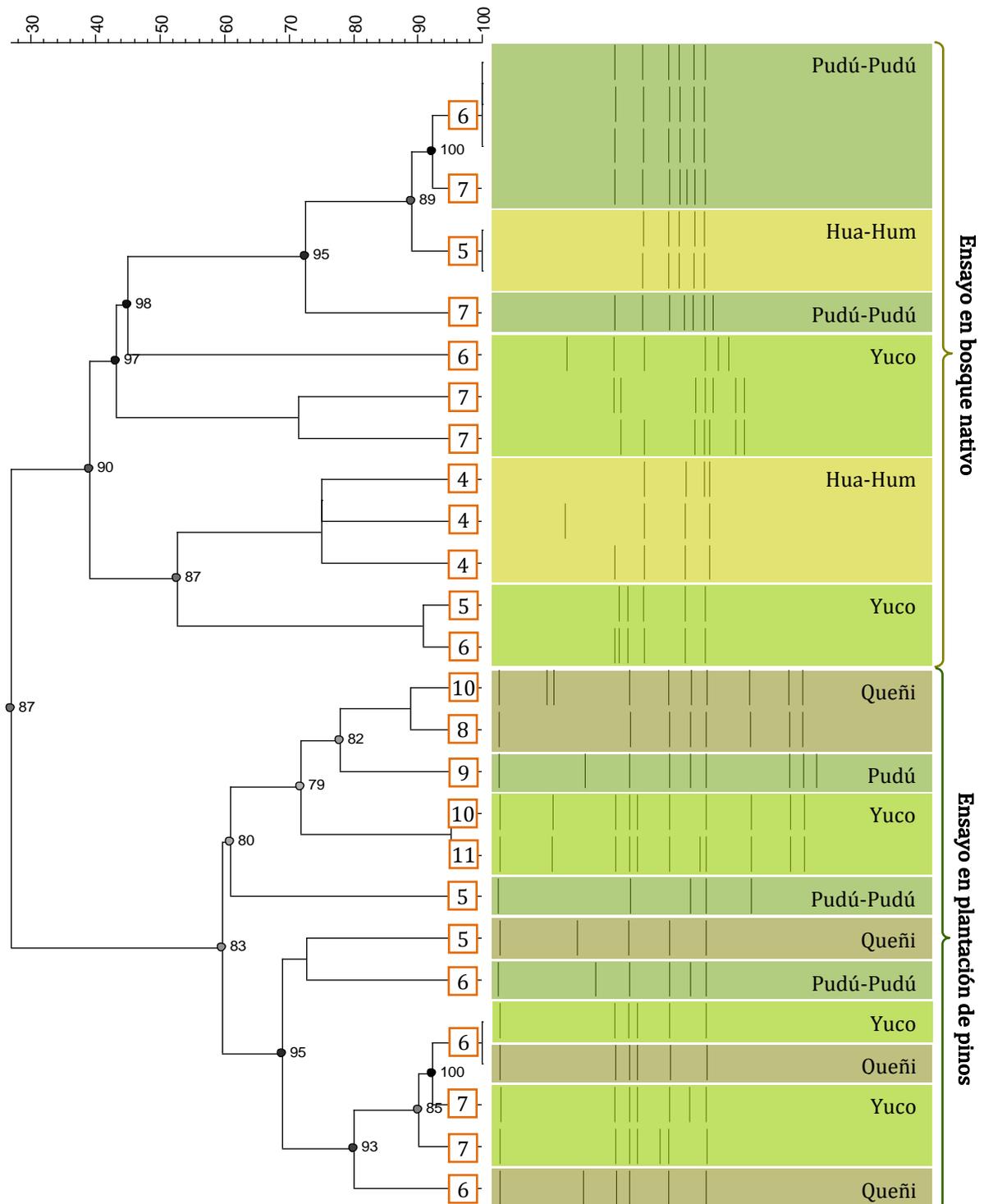


Figura 5.11.- Dendrograma correspondiente a los perfiles de bandas obtenidos para hongos edáficos del Phylum Ascomycota según los análisis de TGGE. Se señalan con un mismo color los individuos jóvenes pertenecientes a la misma procedencia en cada uno de los ensayos estudiados (bajo bosque nativo y plantación de pinos). **Amarillo** = Población Hua-Hum - Diversidad genética elevada; **Marrón** = Población Queñi - Diversidad genética elevada; **Verde claro** = Población Yuco - Diversidad genética intermedia; **Verde oscuro** = Población Pudú-Pudú - Diversidad genética baja. El cuadrado sobre las ramas corresponde al número de bandas de esa terminal.

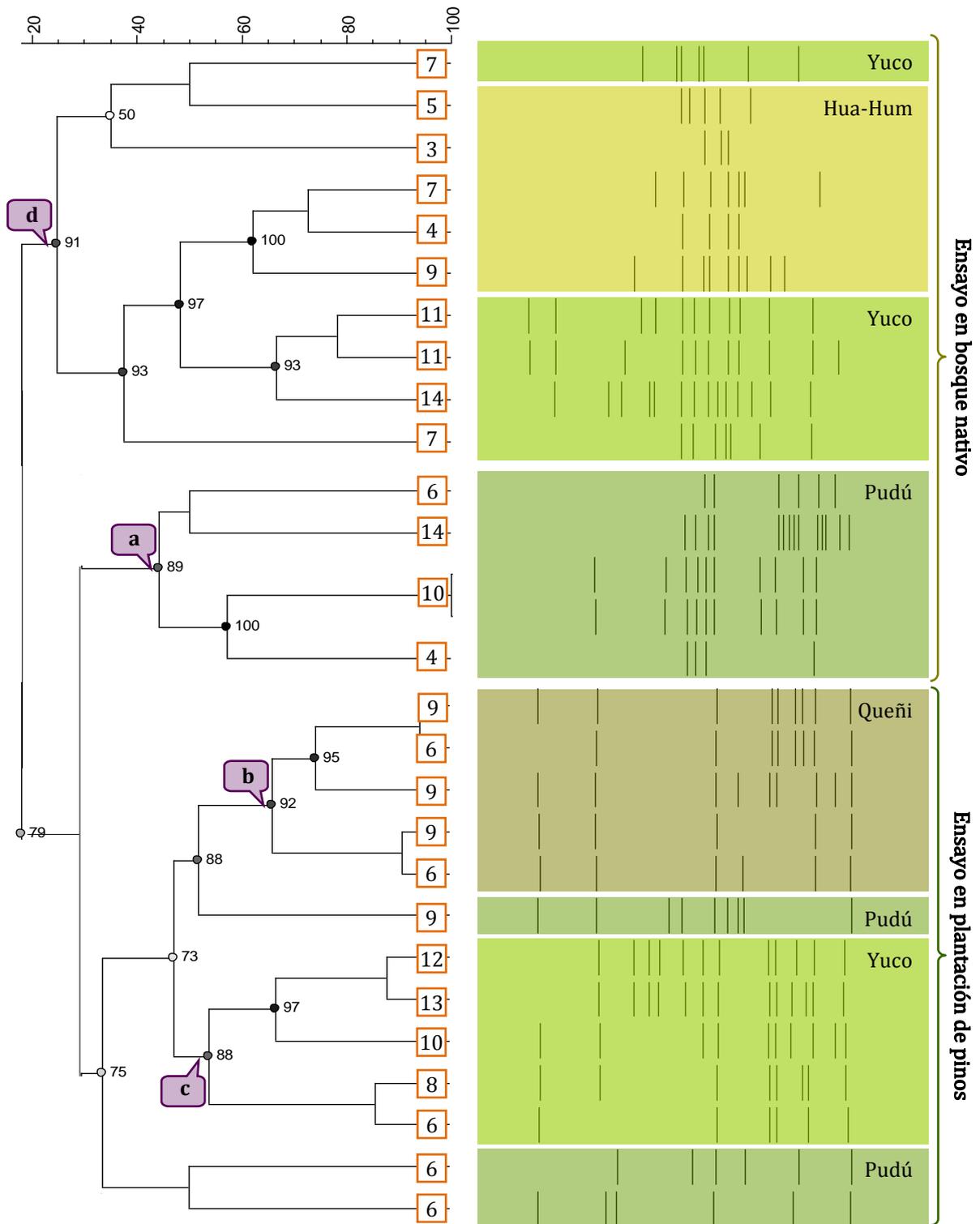


Figura 5.12.- Dendrograma correspondiente a los perfiles de bandas obtenidos para hongos totales del suelo según los análisis de TGGE. Se señalan con un mismo color los individuos jóvenes pertenecientes a la misma procedencia en cada ensayo estudiado. **Amarillo** = Población Hua-Hum – Diversidad genética elevada; **Marrón** = Población Queñi – Diversidad genética elevada; **Verde claro** = Población Yuco – Diversidad genética intermedia; **Verde oscuro** = Población Pudú-Pudú – Diversidad genética baja. El cuadrado sobre las ramas corresponde al número de bandas de esa terminal y las distintas letras señalan las ramas que agrupan todos los individuos analizados para la/s o las misma/s población/es **a)** Pudú-Pudú en el bosque; **b)** Queñi y **c)** Yuco en la plantación; **d)** Yuco + Hua-Hum en el bosque.

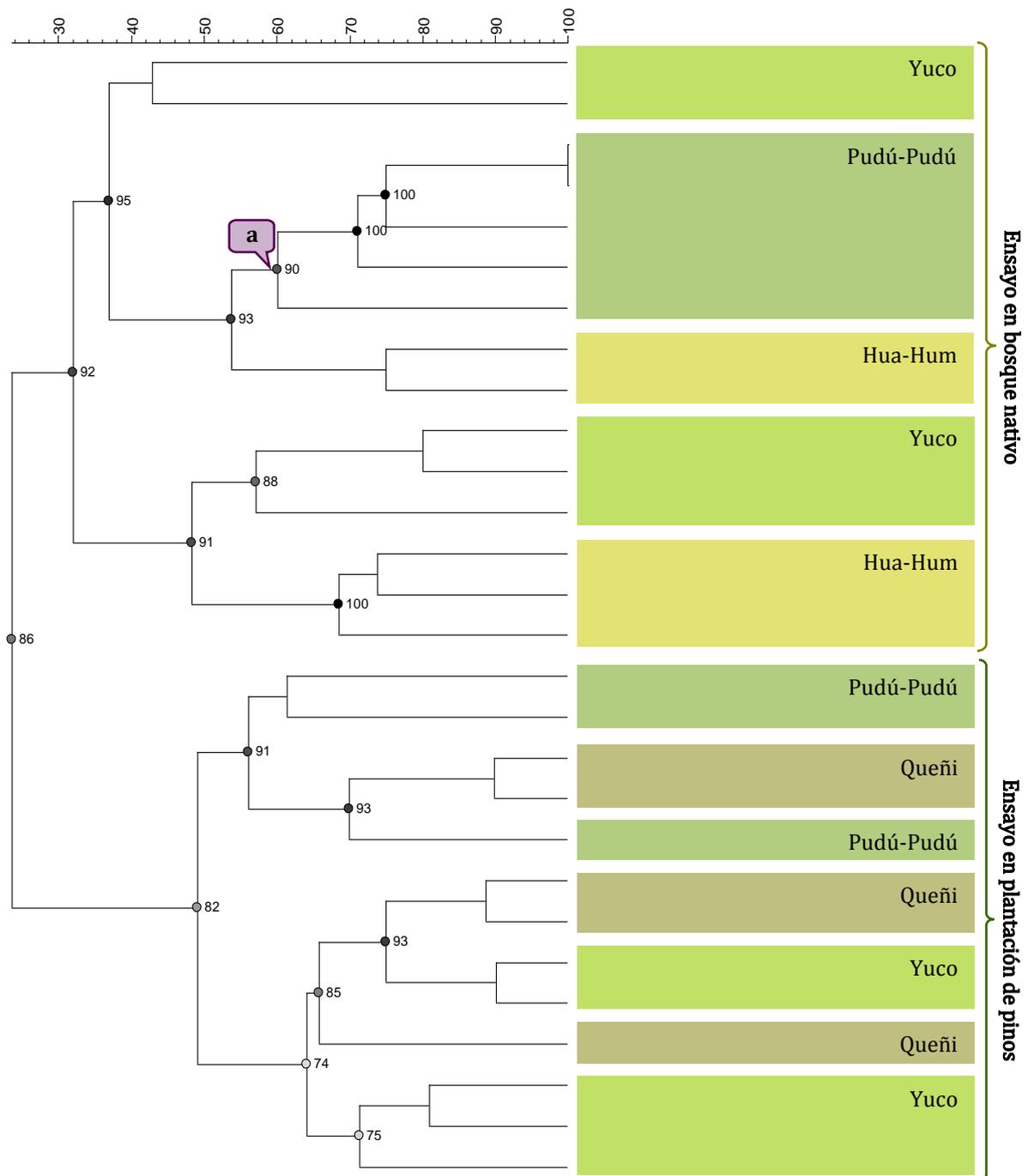


Figura 5.13.- Dendrograma consenso basado en los generados anteriormente para *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* y hongos totales. Se señalan con un mismo color los individuos jóvenes pertenecientes a la misma procedencia en cada uno de los ensayos estudiados (bajo bosque nativo y plantación de pinos). **Amarillo** = Población Hua-Hum – Diversidad genética elevada; **Marrón** = Población Queñi – Diversidad genética elevada; **Verde claro** = Población Yuco – Diversidad genética intermedia; **Verde oscuro** = Población Pudú-Pudú – Diversidad genética baja. La letra **a)** señala la rama en que todos los ejemplares pertenecientes a la población Pudú-Pudú del bosque quedaron agrupados.

DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO EN EL BOSQUE Y EN LA PLANTACIÓN DE PINOS

En este trabajo se observó que la cantidad de nutrientes (C_T , N_T y P_E) y los valores de pH fueron mayores en el bosque nativo que en la plantación de pinos. La clase textural a la que pertenecía cada suelo también fue diferente, clasificándose el del bosque como franco-arenoso, mientras que en la plantación el suelo poseía mayor cantidad de arena (~80 %) y correspondió a la clase arenoso-franco (Tabla 5.4). Estos resultados acordarían con otros estudios en los que se ha demostrado que el cambio en el uso del suelo al desplazar la flora nativa por una plantación exótica disminuye el contenido de C y N del mismo, principalmente a través de la pérdida y aceleración de los procesos de oxidación, que alteran la cantidad y composición de la materia orgánica del suelo (Guo & Gifford 2002, Bastias *et al.* 2007). Sin embargo, al no contar con la caracterización del suelo en el que se encuentra la plantación previamente al establecimiento de la misma, no puede por el momento confirmar esta teoría. También se ha determinado que estos cambios son consecuencia directa de la cantidad y calidad de materia orgánica tanto aérea (hojarasca) como subterránea (raíces) que las distintas especies vegetales aportan al suelo (Priha & Smolander 1997; He *et al.* 2006 en Burton *et al.* 2010, Burton *et al.* 2010). Por ejemplo, las acículas de las coníferas poseen una superficie cerosa y elevadas concentraciones de compuestos recalcitrantes (ej. compuestos fenólicos) que inhiben la actividad de los microorganismos, retardando las tasas de descomposición y mineralización de la materia orgánica del suelo (Ross 1996, Satti *et al.* 2003). En este sentido, Valenzuela *et al.* (1998) determinaron que el bajo porcentaje de especies de hongos saprófitos en plantaciones exóticas de *P. radiata* indica una escasa afinidad de estos hongos por el material vegetal aportado por esta especie y, por lo tanto, baja degradación de la materia orgánica presente en el suelo de las mismas. En Chile, Frank & Finckh (1997) evaluaron el impacto de las plantaciones de *Pseudotsuga menziesii* sobre las características del suelo, señalando cambios significativos en las propiedades químicas del mismo, particularmente en el empobrecimiento de bases, cationes básicos y contenido de P. En este mismo país, Huygens *et al.* (2005) indicaron que cambios en el uso del suelo alteran la calidad y cantidad de la materia orgánica, de la biomasa microbiana y del sustrato potencialmente mineralizable. Es de destacar el trabajo realizado en Chile por Rivas *et al.* (2009), quienes demostraron que al desplazar un bosque nativo de *N. obliqua* por una plantación de coníferas exóticas (*P. radiata*) se reduce el estatus nutritivo del suelo, modificándose los valores de pH, el contenido de nutrientes y las tasas de mineralización. Estos autores discuten que frente al cambio en el uso de suelo y al establecimiento de monocultivos de coníferas exóticas, que tienen tasas de crecimiento generalmente superiores

a las especies arbóreas nativas, se produciría un crecimiento acelerado de los árboles implantados y consecuentemente una mayor demanda de nutrientes, resultando en un empobrecimiento del sustrato y posterior carencia de nutrientes para las plantas y biota del suelo. La importancia de tener en cuenta esta información radica en que a largo plazo estos cambios en la cantidad y disponibilidad de nutrientes no sólo podrían tener un impacto directo sobre la productividad de la plantación (Burton *et al.* 2010), sino que además producirían cambios irreversibles en el suelo y la biota asociada, generando una degradación del ecosistema.

LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS EN RELACIÓN CON EL MEDIO DE CULTIVO Y EL TIPO EXPLORATORIO

Como parte de este Capítulo, se cuantificaron, aislaron e identificaron las levaduras y hongos dimórficos asociados a ectomorfortipos previamente descritos de *N. nervosa* (Capítulo 4) utilizando medios de cultivo con características diferentes (MYP y MYP+RB). Si bien se registraron levaduras en los dos tipos de medios utilizados, se observó que aquél adicionado con el fungistático Rosa de Bengala facilitó tanto la cuantificación como el aislamiento de estos microorganismos, ya que reduce el número y/o el crecimiento de hongos filamentosos, permitiendo entonces visualizar mejor las colonias y recuperar mayor cantidad y diversidad de levaduras y hongos dimórficos. Estos resultados coinciden con los descritos por Mestre *et al.* (2009) y Mestre (2012), quienes sugieren la utilización de este fungistático para el aislamiento de levaduras a partir de suelo, rizósfera y ectomicorrizósfera.

El número de UFC de levaduras/g de ectomorfortipo observado en este estudio (cuyos valores medios se encontraron en el rango $7.2 \times 10^3 - 4,6 \times 10^4$) fue comparable al registrado anteriormente en la región Andino-patagónica, donde Mestre (2012) analizó las levaduras asociadas a diferentes ectomorfortipos de Lengua y Ñire y halló que los valores de recuento oscilaban entre $9,7 \times 10^2$ y $1,6 \times 10^4$ UFC/ g de ectomorfortipo en la primera especie y entre $2,5 \times 10^2$ y $1,7 \times 10^3$ UFC/ g de ectomorfortipo en la segunda. En este trabajo se observó que el número promedio de UFC/g ectomorfortipo registrado en el bosque nativo fue comparable al de la plantación, lo cual acuerda con lo descrito por Yurkov *et al.* (2012), quienes no hallaron diferencias significativas en la cuantificación total de levaduras entre suelos con distinta intensidad de manejo forestal.

Se observaron levaduras y hongos dimórficos en casi la totalidad (93 %) de los ectomorfortipos con abundante micelio extrarradical (Tipos Exploratorios 2 y 3), y en el 53 % de aquellos que carecían de este micelio (Tipo Exploratorio 1). El número de UFC de levaduras/g de ectomorfortipo fue significativamente superior en los primeros respecto de los últimos. Esta tendencia ha sido descrita recientemente por Mestre (2012), quien halló los

mayores valores de recuento de levaduras en ectomorfortipos del Tipo Exploratorio 2 en bosques de *N. pumilio* y del Tipo 3 en ejemplares de *N. antarctica*. Este fenómeno podría estar relacionado con 2 características de los ectomorfortipos: su anato-morfología y su fisiología. En este sentido, es posible que aquellos ectomorfortipos que tengan abundante micelio extrarradical no sólo generen en su entorno condiciones micro-ambientales más propicias para el desarrollo de estos hongos unicelulares (ej. mayor concentración de nutrientes y agua, que quedarían retenidos entre las abundantes y delgadas hifas del hongo) (Mestre 2012), sino que además presentan una mayor relación superficie/volumen que les brinda la capacidad de interactuar con mayor cantidad de levaduras y hongos dimórficos. Ha sido descrito por Mogge *et al.* (2000) que tanto el manto como las hifas emanantes de las EcM presentan *biofilms* bacterianos, por lo que sería de esperar que aquellas EcM que presenten estructuras extrarradicales estén asociadas a un mayor número de microorganismos que las que carecen de ellas. En cuanto a la fisiología, se sabe que las EcM alteran los exudados radicales tanto cuanti- como cualitativamente y que estos cambios dependen de la especie fúngica que desarrolle la EcM (Arocena *et al.* 1999, Smith & Read 2008). En la revisión publicada por Boer *et al.* (2005), se observan numerosas citas que describen cómo las EcM se relacionan con las comunidades microbianas del suelo a través de la producción de distintos compuestos que aportan al suelo (ej. trealosa, manitol, ácidos orgánicos, antibióticos). En este sentido, Ramanankierana *et al.* (2006) demostraron que el efecto de esta simbiosis sobre las comunidades de *Pseudomonas* difiere entre la región más próxima al ectomorfortipo y el micelio circundante a éste (compartimientos denominados por los autores como micorrizósfera e hifósfera, respectivamente) y Arocena *et al.* (1999) hallaron que la ectomicorrizósfera de una EcM con abundante micelio radical presenta el doble de C_T y N_T total y mayor cantidad de cationes intercambiables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+), que la correspondiente a ectomorfortipos con menor cantidad de hifas emanantes. En base a esta información, puede sugerirse que las EcM que presentan abundante micelio extrarradical producirían mayor cantidad de exudados respecto de las EcM de Tipo Exploratorio 1, o bien que alterarían las condiciones microambientales (elevando las concentraciones de nutrientes) favoreciendo el desarrollo de levaduras y hongos dimórficos.

DIVERSIDAD DE LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS ASOCIADA A ECTOMORFORTIPOS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA*

En este trabajo se hallaron 16 especies de levaduras y hongos dimórficos asociadas a distintos ectomorfortipos de *N. nervosa*. La mayor parte de ellas (69 %) correspondieron a especies posiblemente nuevas, incluyendo las 7 especies incluidas en el Phylum Ascomycota

y 4 de las pertenecientes al Phylum Basidiomycota. Esta información resalta la importancia de estudiar los microorganismos en ambientes naturales para describir la biodiversidad asociada a estos ambientes, para comprender los procesos ecológicos que se desarrollan en el suelo del bosque de *Nothofagus* y para plantear estrategias de conservación y de aprovechamiento biotecnológico de la diversidad de microorganismos del bosque y la región (Libkind *et al.* 2011, Mestre 2012).

En el bosque nativo la mayor parte de las levaduras y hongos dimórficos aislados a partir de ectomorfortipos estuvieron comprendidas en el Phylum Basidiomycota (>70 % tanto a nivel de aislamientos como de especies) (Figura 5.7). La predominancia de levaduras correspondientes a este Phylum en suelos ha sido descrita por diferentes autores alrededor del mundo (Wuckowski *et al.* 2003, 2004, Hong *et al.* 2004, Vishniac 2006, Yurkov *et al.* 2012). En Patagonia, Mestre (2012) también halló que la mayor parte de las levaduras y hongos dimórficos presentes en el suelo, rizósfera y ectomicorrizósfera de *N. pumilio* y *N. antarctica* eran basidiomicéticas, sugiriendo que es una tendencia general para las distintas fracciones de suelo de bosques nativos de *Nothofagus* en el Norte de Patagonia. Por el contrario, la mayor parte de las levaduras y hongos dimórficos asociados a los ectomorfortipos de los ejemplares jóvenes de *N. nervosa* analizados en la plantación de pinos correspondieron al Phylum Ascomycota (>80 % de los aislamientos y 55 % de las especies) (Figura 5.7). Asimismo, Yurkov *et al.* (2012) observaron que la proporción y diversidad de levaduras pertenecientes al Phylum Ascomycota cambiaban entre ambientes cuyo suelo había sido sometido a distintas prácticas de manejo (producción agrícola vs manejo forestal), y que la proporción de este grupo de hongos en pastizales aumentaba a medida que se intensificaba el uso del suelo. Es probable que las diferencias en la composición de las comunidades fúngicas entre los 2 ecosistemas estudiados en este trabajo estén relacionadas con las distintas características físico-químicas del suelo descritas anteriormente (C_T , N_T y P_E , pH, granulometría), con la especie vegetal dominante (*Pinus* vs *Nothofagus*) y con el uso del suelo (plantación forestal respecto del bosque nativo) (Priha & Smolander 1997, Priha *et al.* 2001, Garbeva *et al.* 2004, He *et al.* 2005, Bastias *et al.* 2007, Burton *et al.* 2010, Curlevski *et al.* 2010, Grantina *et al.* 2011). Otro factor que podría contribuir a las diferencias observadas en las propiedades del suelo y en la composición de levaduras y hongos dimórficos en cada ambiente es que los hongos formadores de EcM asociados a los ejemplares de *N. nervosa* implantados bajo pino fueron distintas a las descritas en el bosque, no hallándose especies en común entre estos ambientes (Capítulo 4). Estos resultados sustentan el hecho de que las EcM asociadas a la especie forestal que se implante afectan las comunidades de

microorganismos edáficos, tal como sugieren otros autores (Dunstan *et al.* 1998, Chapela *et al.* 2001, Bastias *et al.* 2007).

Se observó que la mayor parte de las especies halladas en este ensayo (69 %) se encontraron en sólo un individuo y generalmente representadas por 1-2 aislamientos, a excepción de las especies *T. porosum* y Levadura ascomicética sp. 1, para las que se obtuvieron 4 y 9 aislamientos, respectivamente. En su estudio, Mestre (2012) también observó gran cantidad de especies con frecuencia de ocurrencia baja, tanto en bosque de *N. pumilio* como de *N. antarctica*. Son numerosos los estudios que han reportado que las comunidades de levaduras del suelo se caracterizan por un número limitado de especies abundantes y numerosas especies raras que se hallan sólo en algunos sitios o bajo determinadas condiciones (Slavikova & Vadkertiova 2000, Maksimova & Chernov 2004, Vishniac 2006, Yurkov *et al.* 2012). Las especies de levaduras y hongos dimórficos fueron variables tanto entre los ectomorfortipos analizados dentro del mismo ambiente como entre el bosque nativo y la plantación. Esta tendencia ha sido descrita por diversos autores, quienes mostraron que las levaduras presentan una distribución desigual en los suelos, incluso dentro del mismo hábitat (Slavikova & Vadkertiova 2000, Maksimova & Chernov 2004, Frey 2007, Botha 2011, Mestre 2012, Yurkov *et al.* 2012), posiblemente debido a la variabilidad en las condiciones microambientales característica de los sistemas edáficos (Frey 2007).

En este estudio se encontró que en el bosque nativo el género *Cryptococcus* fue el que presentó el mayor número de especies (25 % del total) y de aislamientos (36 % del total). Las 3 especies más abundantes en este ambiente fueron *Cr. phenolicus*, *Cr. podzolicus* y *T. porosum* (*Basidiomycota*), las cuales han sido previamente descritas en suelo de diferentes regiones del mundo y consideradas pedobiontes (es decir directamente asociadas al ambiente del suelo) (Maksimova & Chernov 2004, Vishniac 2006, Yurkov *et al.* 2012) y de Patagonia (Mestre 2012). Estas 3 especies son capaces de sintetizar diferentes enzimas extracelulares de importancia para la degradación de la madera y de otros materiales vegetales presentes en el suelo (Fonseca *et al.* 2000, Shubakov 2000, Midelhoven *et al.* 2001, Schmidt 2006). Esta información sugiere que estas especies poseen un rol en el ciclo del C de los suelos de Patagonia, degradando compuestos complejos y dando lugar a la formación de la materia orgánica del suelo (Mestre 2012). Otra de las especies más abundantes en el bosque fue el Hongo dimórfico ascomicético sp. 3 (*Ascomycota*), que correspondió a la más distribuida entre los ejemplares analizados, ya que se encontró asociada a ectomorfortipos sin (Tipo Exploratorio 1) y con micelio extrarradical (Tipos 2 y 3), y tanto en jóvenes nativos como en cultivados. La presencia de esta especie en ejemplares de *N. nervosa* resulta interesante porque coincide (Mestre *com. personal*) con una especie recientemente descrita como

asociada a la ectomicorrizósfera de *N. antarctica* y *N. pumilio*, denominada “Hongo micorrícico no identificado” (Mestre 2012). Esta información sugiere que este hongo está fuertemente asociado a la ectomicorrizósfera o ectomicorrizoplano de diferentes especies de *Nothofagus*.

En la plantación de pinos el género mayormente representado fue *Candida* (19 % de las especies y el 32 % de los aislamientos), que también ha sido frecuentemente descrito en el suelo de diferentes regiones del mundo (Mestre 2012, Yurkov *et al.* 2012). La especie más abundante fue *Candida* sp. 3 (29 % del total de aislamientos), seguida por *Cryptococcus* sp. 1 (9 %). Éstas corresponden a 2 potenciales especies nuevas, hallándose la primera exclusivamente en la plantación de pinos. De las 16 especies encontradas, sólo 3 de las más numerosas fueron comunes a ambos ambientes: *Cr. phenolicus*, *Cr. podzolicus* y *Cryptococcus* sp. 1, siendo las dos primeras más frecuentes en el bosque nativo y la última en la plantación. Como se mencionó anteriormente, las especies *Cr. phenolicus* y *Cr. podzolicus* son capaces de degradar compuestos complejos (xylano, fenol, lignina, compuestos aromáticos), lo cual podría explicar su presencia en un ambiente donde la degradación de la materia orgánica es más lenta y compleja que en el bosque (Ross 1996, Satti *et al.* 2003). Tal como ocurrió en el trabajo realizado por Yurkov *et al.* (2012) al comparar las muestras pertenecientes a los dos sitios analizados, la heterogeneidad en la composición de las comunidades de levaduras y hongos dimórficos fue elevada, por lo que no pudo realizarse un análisis estadístico verosímil de la distribución de las especies entre los ectomorfortipos estudiados. Esta situación también dificultó poder analizar si la diversidad de este grupo de hongos se encuentra relacionada con las características genéticas individuales de los ejemplares de Raulí analizados.

Entre las especies de levaduras y hongos dimórficos halladas en este ensayo, se observó que una proporción relativamente baja eran pigmentadas (19 % del total) o capaces de formar micelio (25 %), perteneciendo todas ellas al Phylum Ascomycota. Estos resultados acuerdan con otros trabajos en los que se ha descrito una reducida cantidad de levaduras pigmentadas en el suelo (Slavikova & Vadkertiova 2000, Mestre 2012, Yurkov *et al.* 2012). El 31 % del total de especies sintetizaron micosporinas. Estos valores son diferentes a los registrados para este grupo de hongos en la filósfera (frutos) de la misma especie (Capítulo 2), donde el 65 % de las especies analizadas eran pigmentadas, el 65 % formaban micelio y el 71 % producían micosporinas. Estos resultados sustentan el rol de los pigmentos y las micosporinas como compuestos fotoprotectores (Sterflinger 2006, Moliné *et al.* 2011, Muñoz 2012), y demuestran que las comunidades de levaduras y hongos dimórficos asociadas a diferentes fracciones de la misma especie vegetal poseen adaptaciones particulares para desarrollarse en ese micro-hábitat, tal como lo describen Kowalchuk *et al.* (2010).

DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *NOTHOFAGUS NERVOSA* ANALIZADAS

El número de alelos por cada uno de los siete loci analizados en *N. nervosa* varió entre 1 y 9, y fue similar al registrado por otros autores para los mismos loci. Por ejemplo, para el locus NnBio11, Azpilicueta *et al.* (2004) hallaron 3 alelos diferentes en 8 individuos de *N. nervosa*, y en este estudio se encontraron 4 alelos para el mismo locus. Estos autores observaron 2 alelos para el locus NgBio14 en 5 individuos de la misma especie, siendo este locus monomórfico para la totalidad de los ejemplares considerados en este estudio. Por otro lado, Marchelli *et al.* (2008) analizaron 25 individuos de *N. nervosa* y observaron 8 alelos para el locus NnBio 37 y 6 para el NnBio111, mientras que entre los 35 ejemplares jóvenes considerados en este Capítulo se registraron 9 y 5 alelos respectivamente. Al analizar 8 individuos de *N. nervosa*, Soliani *et al.* (2010) encontraron 2 alelos para los loci Npum9, Npum14 y Oak64, siendo 4, 2 y 4 alelos los hallados en este estudio para los mismos loci, respectivamente. Los resultados obtenidos sustentan la eficacia del set de microsatélites seleccionados para estudiar la diversidad genética de *N. nervosa* aún en poblaciones de pequeño tamaño ($n = 5$ para las 7 poblaciones consideradas).

A nivel poblacional, los resultados obtenidos confirman el criterio utilizado para seleccionar las procedencias con diversidad genética elevada, intermedia y baja. Los valores de diversidad genética (N_a , N_e y H_o) asociados a los ejemplares cultivados (JvDom-n y JvDom-e) de las procedencias Hua-Hum y Queñi fueron los más elevados, seguidos por los correspondientes a la procedencia Yuco y siendo los índices de las poblaciones de procedencia Pudú-Pudú los más bajos. El valor más elevado de diversidad genética fue hallado para la población de jóvenes nativos (Jvn) analizados en el bosque de Yuco (Tabla 5.10), existiendo diferentes causas que podrían explicar el hecho de que estos últimos presenten mayor diversidad genética que cualquiera de las procedencias analizadas en los ensayos. En primer lugar, debe tenerse en cuenta que si bien al recolectarse los frutos de cada población para cultivar las plántulas se toma una muestra representativa, al no abarcar la totalidad de los individuos de la población puede reducirse el aporte genético de los progenitores al lote de plántulas que se obtendrán a partir de los frutos colectados. Además, durante el cultivo en el vivero no germinan la totalidad de las semillas, por lo que hay una selección a favor de las plántulas más aptas y no todas ellas sobreviven al ser trasplantadas al campo. En el bosque, la selección natural también ejerce su acción sobre semillas y plántulas, pero no necesariamente de la misma manera. Por lo tanto, los jóvenes cultivados e implantados en el campo han sido afectados por factores de selección “artificiales” (colección de semillas acotada a una parte de la población, germinación y trasplante) distintos a los que

existen en las condiciones naturales en las que se desarrolla la especie y que podrían haber reducido la diversidad genética de las plantas correspondientes a cada población.

RIQUEZA FÚNGICA ASOCIADA A EJEMPLARES CULTIVADOS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA* EN DISTINTOS AMBIENTES

En base al análisis de TGGE realizado entre individuos jóvenes de *N. nervosa* pertenecientes a ensayos de procedencias del INTA instalados bajo el bosque nativo y bajo pino, se observó que las comunidades fúngicas del suelo difieren significativamente entre ambos ambientes. En los dendrogramas realizados para hongos de los Phyla Ascomycota y Basidiomycota y para hongos totales, los patrones de bandas de los ejemplares de *N. nervosa* implantados en bosque se agruparon entre sí y se separaron claramente de los correspondientes a los individuos de la plantación de pino (Figura 5.9, 5.10 y 5.11).

Considerando que diferentes autores han descripto que el número de bandas de cada patrón es estimativo del número de especies dominantes en la muestra (Muyzer & Smalla 1998, Muyzer 1999, Nubel *et al.* 1999), puede decirse que la riqueza de hongos pertenecientes al Phylum Basidiomycota es mayor en el bosque nativo que en la plantación. Además, en esta última la semejanza entre los perfiles de cada muestra fue notable, sugiriendo que las comunidades de hongos basidiomicéticos en este ambiente tienen una composición similar independientemente del ejemplar de *N. nervosa* analizado y de su procedencia. Esta observación acuerda con citas previas en las que se describe que, debido a la heterogeneidad en la vegetación y a la cobertura del suelo, los bosques naturales proveen mayor diversidad de hábitats con características diferentes que aquellos que presentan algún tipo de manejo (ej. plantaciones forestales, aprovechamiento maderero de bosques nativos, entre otros), los cuales suelen estar caracterizados por menor complejidad y heterogeneidad ambiental (Christensen & Emborg 1996). Por el contrario, en la plantación de pinos la riqueza de hongos incluidos en el Phylum Ascomycota fue mayor que la registrada en el bosque. De hecho, en base al cálculo del coeficiente de correlación de Pearson se halló que la riqueza de hongos pertenecientes a cada uno de estos Phylum está correlacionada negativamente. No se observó diferencia en la riqueza fúngica total de cada ambiente. Esto podría deberse a una compensación en la cantidad total de hongos por las diferencias entre los Phylum ya mencionados. Estos resultados coinciden con los previamente descriptos para el aislamiento de levaduras y hongos dimórficos a partir de los distintos ectomorfortipos de *N. nervosa*, en los que se determinó que en el bosque predominan los hongos del Phylum Basidiomycota y en la plantación de pinos los del Phylum Ascomycota.

Cabe destacar que las técnicas de microbiología tradicional (cultivo, aislamiento e identificación de levaduras y hongos dimórficos asociados a ectomorfotipos) y los métodos moleculares (amplificación de ADN total y análisis de perfiles de bandas por la técnica de TGGE) utilizados mostraron tendencias similares en cuanto a la composición de las comunidades fúngicas asociadas al suelo y al ectomicorrizoplaneo de distintos ectomorfotipos de *N. nervosa* (predominancia de hongos basidiomicéticos en el bosque y ascomicéticos en la plantación). Estos resultados acuerdan con Grantina *et al.* (2011), quienes demostraron que los análisis microbiológicos convencionales y moleculares presentan cierta correlación al determinar la cantidad de hongos totales, su distribución en los diferentes horizontes del suelo y el efecto de diferentes factores ambientales sobre las comunidades fúngicas (uso del suelo, humedad y temperatura).

Como se ha mencionado, el suelo es un ambiente heterogéneo y existen distintos factores bióticos y abióticos que afectan el desarrollo, actividad y composición de las comunidades microbianas que habitan en el mismo: procesos de formación, granulometría, características físico-químicas, especies vegetales que en él se desarrollan, cantidad y calidad de la materia orgánica que se aporte al mismo (Garbeva *et al.* 2004, Priha *et al.* 2001). Tanto el uso y manejo del suelo (agricultura, pastura, forestación) como las técnicas silviculturales que se utilicen (ej. manejo de residuos, fertilización) tienen efectos significativos sobre las comunidades microbianas del mismo (Grantina *et al.* 2011, Burton *et al.* 2010). Estos cambios varían de acuerdo al clima, tipo de suelo, vegetación e intensidad de las prácticas de manejo (Lugo & Brown 1993, Guo & Gifford 2002). Entre los trabajos que han abordado esta temática se encuentra el de Burton *et al.* (2010), quienes observaron que el establecimiento de plantaciones exóticas de *Araucaria cunninghamii* reduce la biomasa y actividad de las comunidades microbianas del suelo y altera la composición de las mismas respecto de los bosques nativos mixtos adyacentes. En cuanto a las comunidades fúngicas, Curlevski *et al.* (2010) describen cambios significativos en la composición de las mismas entre el suelo analizado en el bosque nativo y en plantaciones de *A. cunninghamii*, hallándose especies diferentes en cada ambiente o bien la misma especie, pero en distinta proporción. Asimismo, Bastias *et al.* (2007) hallaron en base a análisis de DGGE y T-RFLP que la diversidad total y funcional de las comunidades fúngicas en bosques de *Eucalyptus* nativos de Australia difieren significativamente de las observadas en plantaciones monoespecíficas de *Pinus elliotti* próximas a los mismos. He *et al.* (2005) detectaron la presencia de hongos de los Phyla Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota tanto en el bosque nativo como en las plantaciones de *A. cunninghamii*, siendo los primeros dominantes en ambos ambientes, pero cambiando las proporciones de cada grupo de hongos entre los mismos (en el bosque nativo 50 %

Zygomycota, 33,4 % Ascomycota y 16,6 % Basidiomycota, y en la plantación 68,7 % Zygomycota, 18,8 % Ascomycota y 12,5 % Basidiomycota). En este trabajo de Tesis lo que se observó fue un cambio en la proporción de hongos pertenecientes a los Phyla analizados, siendo los ascomicetes dominantes en la plantación y los basidiomicetes en el bosque. En conjunto, esta información demuestra que las comunidades microbianas del suelo perteneciente al bosque nativo y a la plantación de pinos presentan diferencias a nivel de diversidad, biomasa y actividad funcional (He *et al.* 2005, Bastias *et al.* 2007, Burton *et al.* 2010, Curlevski *et al.* 2010).

Como se discutió anteriormente, es probable que las diferencias en las comunidades fúngicas presentes en el bosque y en la plantación de pinos se deban a las distintas características físico-químicas edáficas, a la especie vegetal dominante y/o al manejo del suelo (Priha & Smolander 1997, Priha *et al.* 2001, Garbeva *et al.* 2004, He *et al.* 2005, Bastias *et al.* 2007, Burton *et al.* 2010, Curlevski *et al.* 2010, Grantina *et al.* 2011). El hecho de que los individuos jóvenes de *N. nervosa* provenientes de procesos de domesticación e implantados en estos ambientes presenten hongos ectomicorrícicos diferentes, también podría explicar estas variaciones en las comunidades fúngicas del suelo y del ectomicorrizoplaneo. Esta observación acuerda con el trabajo realizado por Bastias *et al.* (2007), quienes sugieren que el cambio en la composición microbiana del suelo del bosque nativo respecto de la observada en la plantación de pinos se debe, al menos en parte, a las diferentes comunidades de hongos ectomicorrícicos asociadas a los eucaliptos y los pinos, respectivamente. Por otro lado, Dunstan *et al.* (1998) en Australia y Chapela *et al.* (2001) en Ecuador demostraron que el establecimiento de plantaciones monoespecíficas de *Pinus* spp. reduce en gran magnitud la diversidad de hongos formadores de EcM. En el Capítulo 4 de esta Tesis se observó una tendencia similar al comparar la diversidad de EcM presente en ejemplares de *N. nervosa* creciendo en el bosque nativo, donde se describieron 27 grupos de morfotipos y al menos 24 especies fúngicas, con los implantados bajo pino, en los que se detectaron 4 grupos de morfotipos y 3 hongos ectomicorrícicos. Asimismo, el hecho de que el 77 % de los hongos ectomicorrícicos identificados en el bosque pertenezcan al Phylum Basidiomycota no sólo es consistente con los patrones de TGGE obtenidos (que indican que la riqueza de especies comprendidas en este Phylum es mayor en el bosque que en la plantación), sino que también sugiere que esta especie forestal establece EcM principalmente con hongos de este Phylum. Por lo tanto, es posible que la menor riqueza de hongos basidiomicéticos en el suelo de la plantación de pinos, donde predominan los hongos del Phylum Ascomycota, limite la colonización ectomicorrícica. Estos resultados plantean la necesidad de profundizar los estudios de poblaciones microbianas en el suelo de ambos ambientes para poder describir en

mayor detalle la dinámica de las comunidades fúngicas y el efecto del establecimiento de plantaciones de exóticas sobre las mismas.

RELACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *NOTHOFAGUS NERVOSA* Y LAS COMUNIDADES FÚNGICAS DEL SUELO

A lo largo de las últimas décadas, se ha demostrado que los boques naturales presentan elevada variabilidad genética (White *et al.* 2007), siendo escaso lo que se conoce sobre las consecuencias ecológicas, biogeográficas y evolutivas de la misma (Whitham *et al.* 2006, Johnson & Stinchcombe 2007). En este Capítulo se estudió la relación entre las comunidades fúngicas del suelo y ejemplares jóvenes de *N. nervosa* cultivados a partir de semillas provenientes de poblaciones con distinta variabilidad genética. Este análisis se realizó a niveles poblacional, considerando los 5 individuos pertenecientes a cada población, e individual al analizar el perfil obtenido para cada muestra respecto de la diversidad genética del individuo.

Al comparar los perfiles de suelo obtenidos con TGGE con los parámetros genéticos poblacionales calculados para los ejemplares de *N. nervosa* analizados, se observaron algunas tendencias. En el bosque nativo, los jóvenes cultivados a partir de semillas pertenecientes a la población Yuco, procedencia de diversidad genética intermedia, presentaron mayor riqueza de hongos pertenecientes al Phylum Basidiomycota que los de la población Pudú-Pudú, que correspondió a la de menor diversidad genética (Figura 5.9). En cuanto a los hongos del Phylum Ascomycota, se observó que el mayor número de bandas registrado en el suelo de la plantación de pinos estaba asociado a ejemplares de las poblaciones Yuco y Queñi (Figura 5.10), de diversidad genética intermedia y alta respectivamente. Al comparar los perfiles obtenidos para hongos totales entre los individuos del bosque (Figura 5.11), los pertenecientes a la población Yuco presentaron mayor riqueza fúngica que los correspondientes a la población Hua-Hum. Estos resultados sugieren que la diversidad genética de la población podría influenciar la composición de las comunidades fúngicas presentes en el suelo circundante a las raíces. El hecho de que en el dendrograma construido para hongos totales los 5 individuos de 3 de las 6 poblaciones analizadas quedaran incluidos en un mismo clado y que las 2 poblaciones de mayor diversidad genética estudiadas en el bosque (Yuco y Hua-Hum) se agruparan en una misma rama, sustentan lo anteriormente mencionado. Es posible que no se hayan detectado mayores tendencias debido a que el número de individuos analizados para cada población fue relativamente bajo (5). Sería conveniente entonces realizar este ensayo con mayor cantidad de ejemplares.

Los resultados obtenidos acuerdan con distintos estudios en los que se señala el efecto de la diversidad genética de una especie vegetal sobre la estructura de las comunidades asociadas a la misma (otras plantas, insectos y otros animales, microorganismos) y sobre los procesos ecosistémicos del ambiente donde se encuentra. Por ejemplo, Crutsinger *et al.* (2006) demostraron que la riqueza de artrópodos se incrementaba con la diversidad genética de *Solidago altissima*, de forma que el número de especies de artrópodos fue aproximadamente 27 % mayor en las poblaciones que presentaban ejemplares con 12 genotipos diferentes que en aquellas que estaban compuestas por individuos genotípicamente iguales. Madritch *et al.* (2006) hallaron que la diversidad genética intraespecífica en *Populus tremuloides* puede influenciar la tasa de descomposición microbiana de la hojarasca, afectando así la dinámica de los ciclos de nutrientes a largo plazo. Asimismo, distintos trabajos han señalado que la diversidad genética de la especie vegetal dominante afecta la biomasa (Schweitzer *et al.* 2008), la funcionabilidad y la composición de las comunidades microbianas del suelo (Madritch & Lindroth 2011, Schweitzer *et al.* 2011), encontrándose entre ellas los hongos ectomicorrícicos. Karst *et al.* (2009) hallaron que el nivel de colonización ectomicorrícica de *P. contorta* depende del genotipo del árbol, mientras que Leski *et al.* (2010) observaron que el origen y genotipo de las semillas utilizadas para cultivar *P. sylvestris* influye sobre las comunidades de EcM asociadas al sistema radical de las plantas. Los efectos de la variabilidad genética intraespecífica de la especie vegetal sobre la biomasa, estructura y/o funcionabilidad de las comunidades de organismos asociadas a ella estarían relacionadas con las características propias de cada genotipo, tales como tasa de crecimiento de la planta, la estructura de la planta y/o la composición química de las hojas y raíces o de sus exudados (Madritch *et al.* 2006, Schweitzer *et al.* 2008, Barbour *et al.* 2009, Deshpande *et al.* 2011, Madritch & Lindroth 2011, Schweitzer *et al.* 2011).

En este estudio no se detectó una correlación significativa entre la diversidad genética individual (*Ho*, *IR*, *HL* y *HI*) y la riqueza fúngica en el suelo asociado al mismo. Esto podría deberse a que realmente no existe asociación entre ambas variables o bien a que la diversidad genética se evaluó en base a marcadores selectivamente neutros, existiendo la posibilidad que al utilizar marcadores adaptativos (ej. que confieran cambios en la composición química de las hojas o de los exudados) surjan relaciones significativas. Sin embargo, ante la dificultad de contar con marcadores adaptativos, se asume que la diversidad general observada es representativa. No obstante, estos resultados también podrían estar relacionados con algunas características propias de la técnica de TGGE, ya que en ocasiones las bandas correspondientes a los miembros menos dominantes de la comunidad (raros) pueden no teñirse adecuadamente y por lo tanto no ser detectadas (Anderson & Cairney

2004, Escalante 2007). De hecho, se ha mencionado que debido a la gran complejidad de las comunidades microbianas del suelo, las bandas de los perfiles obtenidos por las técnicas de DGGE y TGGE suelen corresponder a los miembros más abundantes de la comunidad (MacNaughton *et al.* 1999, Muyzer 1999, He *et al.* 2005). Entonces, si la diversidad genética individual de los ejemplares de *N. nervosa* estuviera relacionada, por ejemplo, con la ocurrencia de especies raras, posiblemente no podría detectarse esta relación con la técnica de TGGE. Además, se ha demostrado que en ciertas circunstancias una única banda del perfil puede comprender dos o más microorganismos (ej. Costa *et al.* 2005), en cuyo caso el método estaría subestimando la diversidad real de la comunidad (Gelsomino *et al.* 1999, Muyzer 1999, Anderson & Cairney 2004, Escalante 2007). Es necesario entonces realizar posteriores estudios que nos permitan analizar más detalladamente las asociaciones entre estas variables (separación y reamplificación de bandas, clonado, muestreos estacionales).

Resulta interesante mencionar que en este trabajo se halló una correlación positiva y significativa entre todos los parámetros de diversidad genética individual considerados. Esta correlación había sido descrita previamente entre la heterocigosis observada (H_o), el índice de relación interna (IR) y heterocigosis ponderada por locus (HL) (Aparicio *et al.* 2006). En este trabajo se utilizó además el parámetro que denominamos heterocigosis individual (HI), y el hecho de que correlacione positiva y significativamente con los anteriormente mencionados significa que este parámetro de fácil cálculo puede ser utilizado para evaluar la relación entre la diversidad genética de los individuos y diferentes características asociadas al mismo, como en este caso, las comunidades microbianas del suelo.

CONCLUSIONES PARCIALES

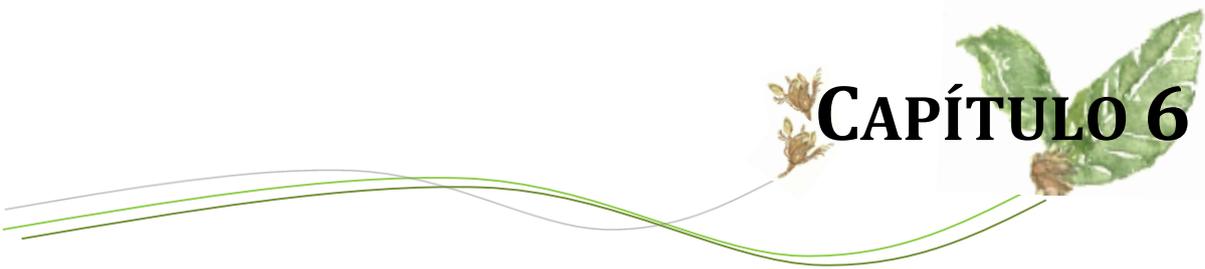
En este Capítulo se describieron diferentes aspectos de las comunidades fúngicas asociadas a los ectomorfortipos y al suelo circundante a las raíces de ejemplares jóvenes de *N. nervosa* en 2 ambientes: el bosque nativo y la plantación de pinos. Los resultados obtenidos a partir de las técnicas tradicionales de cultivo y de métodos moleculares (extracción de ADN total, amplificación por PCR, obtención de perfiles de bandas a través de la técnica de TGGE) señalaron que tanto los hongos del suelo, como las levaduras y hongos dimórficos asociados a los ectomorfortipos en el bosque nativo difieren de los presentes en la plantación de coníferas exóticas, al igual que los hongos formadores de EcM (Capítulo 4). Estos cambios en las comunidades fúngicas están probablemente relacionados, entre otros factores, con: las diferencias en las características físico-químicas del suelo entre el bosque y la plantación, con las propiedades del material vegetal que estas especies arbóreas aportan al sistema

(hojarasca, raíces, exudados) y/o con el uso y manejo del suelo de la plantación forestal respecto del bosque nativo.

Se determinó que los ectomorfortipos que presentaban micelio extrarradical se encontraban asociados a mayor cantidad de levaduras y hongos dimórficos respecto de aquellos que carecían de estas estructuras fúngicas. De igual forma que lo observado en los frutos de *N. nervosa*, a partir de los ectomorfortipos se aislaron pocas especies dominantes y numerosas especies raras. Resulta interesante destacar que las 3 especies dominantes en el bosque (*Cr. phenolicus*, *Cr. podzolicus* y *T. porosum*) son capaces de sintetizar diferentes enzimas extracelulares de importancia para la degradación de madera y de otros materiales vegetales, mientras que las 2 más abundantes en la plantación corresponden a especies posiblemente nuevas (*Candida* sp. 3 y *Cryptococcus* sp. 1), cuya función ecológica se desconoce. El elevado porcentaje de especies posiblemente nuevas aisladas a partir de los ectomorfortipos de *N. nervosa* señala la importancia de los ambientes naturales como fuente de microorganismos nuevos, muchos de los cuales podrían tener aplicación biotecnológica y ser útiles para los procesos de domesticación. En base a esto último, se afirma que es necesario llevar a cabo posteriores estudios que permitan determinar si las cepas de levaduras y hongos dimórficos aislados son capaces de favorecer la germinación, de incrementar el crecimiento de la plántula o de actuar como antagonistas contra distintos patógenos radicales.

En base a los análisis realizados pudieron describirse algunas tendencias que relacionaban la diversidad genética de las poblaciones de los ejemplares cultivados de *N. nervosa* con la riqueza de los hongos del suelo circundante a sus raíces. Estos resultados son relevantes ya que señalan que los patrones naturales de diversidad genética podrían estar relacionados con la diversidad de organismos asociada a la especie vegetal, lo que a su vez podría influir en distintos procesos a nivel de comunidades y ecosistemas. Sin embargo, las tendencias halladas en este estudio no fueron concluyentes, siendo necesario incrementar el número de individuos analizados y profundizar los estudios en este sentido para poder describir más detalladamente este tipo de relaciones. Esta información resultaría de importancia para los programas de conservación y manejo de los bosques nativos cuyo fin sea preservar la diversidad genética y biológica de los mismos. Desde el punto de vista de la domesticación de especies forestales nativas, este tipo de información resulta relevante ya que brinda una herramienta adicional en el momento de seleccionar la población a partir de la que se colectarán las semillas para el cultivo de las plantas que luego serán llevadas a campo. Por ejemplo, si se determina que mayor diversidad genética de la planta se asocia a mayor número y diversidad de microorganismos en el sistema radical, y que éstos resultan

beneficiosos para el crecimiento de la misma, sería óptimo coleccionar las semillas a partir de poblaciones de elevada diversidad genética a fin de obtener plántulas que se adapten y desarrollen mejor a las condiciones del campo.



CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

DISCUSIÓN GENERAL

A fin de responder al objetivo general planteado y a los correspondientes objetivos específicos, a lo largo de esta Tesis se describió el comportamiento micorrícico de *Nothofagus nervosa* en ejemplares cultivados en vivero y en los pertenecientes a bosque nativo. Asimismo, se analizaron las levaduras y hongos dimórficos presentes en dos fracciones diferentes de la planta: la superficie de los frutos y de los ectomorfortipos. En cada Capítulo se discutieron las implicancias ecológicas y aplicadas de los resultados obtenidos.

Durante la domesticación de *N. nervosa*, esta especie se encuentra asociada a distintos tipos de hongos. En cuanto a las levaduras y hongos dimórficos, se determinó que en la superficie de los frutos de *N. nervosa* que son utilizados para el cultivo de las plántulas en el vivero predominaban las del Phylum Ascomycota. Además, las levaduras presentes en los frutos presentan estrategias de adhesión (micelio, cápsulas) y de protección contra la radicación y el estrés oxidativo (pigmentos, micosporinas). Se comprobó que la conservación de los frutos en cámara de frío reduce significativamente el número y diversidad de levaduras y hongos dimórficos en su superficie, y que la ruptura de la latencia fisiológica de la semilla (lavado) tiende a cambiar la composición de las comunidades. Esta información resulta relevante para plantear posteriores estrategias de cultivo y manejo de los frutos (semillas) durante los procesos de domesticación.

De igual forma que lo observado en los frutos, las levaduras y hongos dimórficos asociados a los ectomorfortipos de los ejemplares de *N. nervosa* implantados bajo la plantación de pinos (JvDom-e) pertenecieron principalmente al Phylum Ascomycota. Por el contrario, la mayor parte de las levaduras y hongos dimórficos presentes en la superficie de los ectomorfortipos de ejemplares de *N. nervosa* nativos (Jvn) y de aquellos provenientes de procesos de domesticación e implantados en el bosque (JvDom-n) estuvieron incluidos en el Phylum Basidiomycota. Este fenómeno podría estar relacionado con las diferentes propiedades físico-químicas del suelo entre estos dos ambientes. A diferencia de las levaduras y hongos dimórficos asociados a los frutos, aquellos presentes en los ectomorfortipos de *N. nervosa* carecían de pigmentos, micosporinas y micelio. Una tendencia general observada para estos hongos en ambas fracciones de la planta (frutos y ectomorfortipos) es que existen pocas especies dominantes y numerosas minoritarias. Además, a partir de ambos sustratos se aislaron posibles especies nuevas, resaltando la potencialidad de los ambientes naturales comprendidos en los bosques Andino-patagónicos como fuentes de microorganismos no descritos hasta el momento, muchos de los cuales podrían tener aplicaciones biotecnológicas. Conjuntamente, estos resultados resaltan tanto la existencia de poblaciones microbianas propias de las distintas fracciones de la planta como la

capacidad de estos microorganismos de desarrollar distintas estrategias de adaptación al medio donde se encuentran. En base a esta información se acepta la hipótesis que planteaba que *las levaduras presentes en la superficie de los frutos de N. nervosa son diferentes a las asociadas a los ectomorfotipos de sus raíces (Hipótesis E)*.

A partir del ensayo de vivero realizado en las instalaciones del INTA EEA Bariloche se determinó que las plántulas desarrollaron EcM naturalmente (sin inoculación) entre los 6 y 12 meses de edad, lo cual sugiere que existe una fuente de inóculo externa asociada al proceso de cultivo (turba, herramientas, sistema de riego, calzado, viento). Las especies de hongos formadores de EcM en los ejemplares de *N. nervosa* que permanecieron en el invernáculo fueron las mismas que las halladas en las plántulas trasplantadas al cantero, pero en estas últimas se observaron además ectomorfotipos formados por especies fúngicas no halladas en el invernáculo, probablemente como consecuencia de estar expuestas a un inóculo natural. Concluyendo, a partir de este ensayo se determinó que las raíces de las plántulas cultivadas en el vivero para luego ser llevadas al campo se hallan colonizadas por EcM independientemente de la técnica de cultivo empleada (con o sin trasplante previo al cantero). Sin embargo, las comunidades de hongos ectomicorrícos presentes en las plántulas sí está relacionada con la estrategia de cultivo, ya que las plántulas que pasaron por el cantero presentaron mayor riqueza de hongos EcM que las que permanecieron en el invernáculo. Resulta importante destacar que las plántulas analizadas en el ensayo de vivero presentaron menor riqueza de EcM que las estudiadas en el bosque nativo (Pln). En base a esta información, se acepta la hipótesis que enunciaba que *en etapas tempranas del cultivo de N. nervosa en el vivero las plantas presentan baja diversidad de ectomicorrizas (Hipótesis A)*. En este sentido, una opción interesante de cultivo sería inocular las plántulas con suelo del mismo bosque en el que se implantarían durante su estadía en el cantero, y así favorecer el desarrollo de EcM nativas en el sistema radical de las mismas. De esta forma, al ser llevadas a campo las plántulas estarían asociadas a hongos ectomicorrícos propios del lugar, lo que posiblemente les permitiría adaptarse más rápidamente a las condiciones ambientales. Sin embargo, teniendo en cuenta que las plántulas que pasan un período de crecimiento en el cantero presentan menor crecimiento que las que permanecen en el invernáculo, sería necesario evaluar los costos y beneficios de optar por una u otra técnica.

La riqueza de hongos EcM y los porcentajes de colonización de los ejemplares ubicados en el cantero (técnica de cultivo utilizada en los años de establecimiento de los ensayos: 1999 y 2000) fueron similares a los observados en los jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados bajo pino. Por el contrario, los jóvenes provenientes de procesos de domesticación e implantados en el bosque nativo presentaron

valores de colonización y riqueza de EcM sumamente superiores, sugiriendo que la presencia de un inóculo natural y compatible con la especie arbórea favorece la colonización y la mayor diversidad de hongos formadores de EcM en sus raíces. No se observaron especies fúngicas formadoras de EcM en común al bosque nativo y a la plantación de pinos, ni entre estos ambientes y las descritas previamente en las plántulas cultivadas en el vivero del INTA. Estos resultados permiten aceptar la hipótesis que planteaba que *los individuos cultivados en vivero presentan en sus raíces hongos EcM diferentes a los asociados al sistema radical de los ejemplares de N. nervosa llevados a campo (Hipótesis B)*.

Todos los ejemplares de *N. nervosa* estudiados en el bosque y en la plantación de pinos presentaron EcM en sus sistemas radicales, siendo la dinámica de sus comunidades compleja. Se registraron diferencias en la colonización, riqueza y diversidad de EcM respecto de la edad de las plantas y de la estación del año. Otra tendencia común entre las EcM asociadas a *N. nervosa* en el bosque y en la plantación de pinos es que en ambos ambientes se hallaron EcM con distintas estrategias de exploración y explotación del sustrato (Tipos exploratorios), sugiriendo que esta especie forestal establece esta simbiosis con distintos hongos que le otorgan diferentes beneficios, tales como acceder a variadas fuentes de nutrientes, alcanzar mayores distancias de exploración, protección contra patógenos vegetales, entre otros. Tal como se observó para las levaduras y hongos dimórficos, entre los hongos ectomicorrícicos descritos en *N. nervosa* existen pocas especies abundantes y numerosas minoritarias.

En conjunto, esta información sustenta la hipótesis que afirmaba que *la composición de micorrizas asociadas a N. nervosa varía entre diferentes ambientes (bosque nativo y plantación de pinos), categorías de edad (plántulas, jóvenes y adultos) y estaciones (otoño y primavera) (Hipótesis C)*.

La mayor parte de los hongos ectomicorrícicos analizados presentaron bajo porcentaje de homología con secuencias disponibles en el GenBank. Este hecho sugiere que existen poblaciones de hongos ectomicorrícicos propias de estos ambientes y aun escasamente estudiadas, y resalta la necesidad de continuar con el estudio de la diversidad taxonómica de estos hongos en los bosques Andino-patagónicos. La mayor parte de las especies de hongos formadores de EcM identificadas pertenecieron al Phylum Basidiomycota y a taxones fúngicos previamente citados en bosques de *Nothofagus*, siendo el orden Agaricales y el género *Cortinarius* los más ampliamente representados.

En base a los resultados obtenidos a partir de los análisis de TGGE se determinó que la composición de las comunidades de hongos asociadas al suelo circundante a las raíces es diferente en el bosque, donde predominaron los hongos pertenecientes al Phylum

Basidiomycota, y en la plantación de pinos, donde se observó una mayor riqueza de hongos pertenecientes al Phylum Ascomycota. Dado que *N. nervosa* forma EcM principalmente con hongos basidiomicéticos, es de esperar que una menor ocurrencia de los mismos en el suelo de la plantación de pinos justifique que los ejemplares implantados en este ambiente presenten menor porcentaje, riqueza y diversidad de EcM. Esta diferencia en la composición de las comunidades fúngicas del suelo está probablemente relacionada con la especie exótica implantada (*Pinus ponderosa*), con las prácticas de manejo propias de las plantaciones, con las propiedades físico-químicas del suelo y/o con las distintas EcM asociadas a las especies arbóreas dominantes en cada ambiente.

Respecto de la hipótesis que planteaba que *el suelo y las raíces asociadas a plantas de N. nervosa cultivadas a partir de semillas provenientes de poblaciones con elevada diversidad genética presentan una composición fúngica diferente a la de las poblaciones con menor diversidad genética (Hipótesis D)*, se observaron algunas tendencias que sugerirían que la diversidad genética de las poblaciones a partir de las cuales se coleccionan los frutos para cultivar las plántulas influye sobre las comunidades fúngicas del suelo, pero los resultados obtenidos no permitieron llegar a conclusiones definitivas, siendo necesario ampliar el número de ejemplares analizados y continuar con los estudios que abarquen estos aspectos.

En ninguno de los ejemplares de *N. nervosa* analizados durante este trabajo de Tesis se observó una colonización micorrízico-arbuscular, indicando que independientemente de la edad, de la estación del año y del ambiente en el que se encuentren los individuos, esta especie no desarrolla este tipo de simbiosis.

CONCLUSIONES FINALES

- ✿ Los frutos y los ectomorfortipos de *Nothofagus nervosa* poseen poblaciones de levaduras y hongos dimórficos características de cada uno de ellos, entre las que se encuentran especies nuevas y otras de potencial aplicación biotecnológica (promotoras del crecimiento, biocontroladoras).
- ✿ Los distintos procesos a los que son sometidos los frutos (conservación, ruptura de dormancia) modifican las comunidades de levaduras y hongos dimórficos asociadas a los mismos.
- ✿ En las plántulas cultivadas durante el proceso de domesticación (sin inoculación) se establecen en forma natural ectomicorrizas propias del sistema de cultivo en vivero, sugiriendo que las plántulas se encuentran micorrizadas cuando son implantadas en el campo.

- ✦ Las distintas técnicas de cultivo (en invernáculo o con posterior trasplante a cantero) influyen sobre las comunidades de ectomicorrizas presentes en las plántulas.
- ✦ Los porcentajes de colonización, riqueza y diversidad de EcM varían en función de: la edad de planta, la estación del año, del tipo (bosque nativo o plantación de pinos) y manejo del ambiente.
- ✦ Entre los individuos provenientes de procesos de domesticación, los jóvenes implantados bajo el bosque nativo presentan valores de colonización, riqueza y diversidad de ectomicorrizas superiores a los implantados bajo la plantación de pinos.
- ✦ En el bosque nativo, todas las categorías de edad estudiadas poseen elevada diversidad de ectomicorrizas con tres estrategias diferentes de exploración y explotación del sustrato.
- ✦ En el bosque domina una especie de hongo ectomicorrícico no identificado (estación y categoría de edad) y las especies del género *Cortinarius* se encuentran ampliamente distribuidas.
- ✦ Las especies de hongos formadores de ectomicorrizas son diferentes en los tres sistemas estudiados: vivero forestal, bosque nativo y plantación de pinos.
- ✦ Las comunidades de hongos del suelo asociado al sistema radical de ejemplares jóvenes de *Nothofagus nervosa* difieren significativamente entre el bosque nativo y la plantación de pinos.

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE TRABAJO

La información presentada contribuye a la descripción de la ecología de esta especie forestal y de los bosques Andino-patagónicos, y brinda información preliminar relevante para los programas de domesticación que podrá ser tenida en cuenta para plantear recomendaciones de cultivo y estrategias de inoculación y manejo.

La presencia de EcM en los ejemplares cultivados de *N. nervosa* así como en las plántulas, jóvenes y adultos pertenecientes a bosque nativo señala la importancia de esta simbiosis para el desarrollo de la especie forestal y la necesidad de estudiarla a fin de poder utilizarla en la producción de *N. nervosa* y de optimizar su desempeño en el campo y su rendimiento final. En este sentido, la caracterización taxonómica y funcional (Tipos exploratorios 1, 2 y 3) de los hongos formadores de EcM llevada a cabo representa un marco adecuado en el cual basar posteriores investigaciones ecológicas y aplicadas. Esta información permitiría, por ejemplo, seleccionar especies fúngicas de interés en cultivar a fin de realizar posteriores inoculaciones con especies ectomicorrícicas que le brinden a los

ejemplares cultivados de *N. nervosa* ventajas adaptativas en el ambiente donde serán implantados, o bien que incrementen su crecimiento y productividad (ej. especies fúngicas que desarrollen ectomorfitipos con abundante micelio radical o que sinteticen algún compuesto de interés, tales como sideróforos, enzimas y sustancias antagonicas de patógenos vegetales).

La ocurrencia de distintas especies de levaduras y hongos dimórficos en la superficie de los frutos y de los ectomorfitipos, algunas de las cuales perteneces a taxones que han sido previamente descritos como promotores del crecimiento o como antagonistas contra distintos patógenos vegetales, resalta la importancia de tener en cuenta estos microorganismos durante la domesticación de esta especie forestal.

En conjunto, esta información destaca la importancia de considerar las comunidades microbianas asociadas a *N. nervosa* para plantear futuras estrategias de conservación y uso sustentable de los sistemas naturales y para poder utilizar los mismos en la optimización de prácticas de cultivo, existiendo la posibilidad de aplicarlos como biofertilizantes o biocontroladores, reduciendo entonces la cantidad de productos químicos que se utilizan para estos fines. Resulta entonces necesario continuar con la caracterización de estos organismos, con su aislamiento a partir de ectomorfitipos, con la selección de cepas que promuevan el crecimiento o que brinden protección contra patógenos vegetales y principalmente en la forma de inoculación apropiada, compatible con los actuales procesos de domesticación.

ANEXOS

ANEXO I

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SIETE TIPOS DE MICORRIZAS DESCRIPTOS HASTA EL MOMENTO

		TIPOS DE MICORRIZA						
		ECTOTRÓFICAS		ENDOTRÓFICAS				
		Ecto	Ectendo	Arbusculares	Arbutoides	Monotropoide	Ericoides	Orquidioides
Hongo	Septado	+	+	-	+	+	+	+
	Aseptado	-	-	+	-	-	-	-
	Hifas intracelulares	-	+	+	+	+	+	+
	Manto	+	+ 0 -	-	+ 0 -	+	-	-
	Red de Hartig	+	+	-	+	+	-	-
	Taxón del Hongo	Ascomycota	Ascomycota	Glomeromycota	Basidiomycota	Basidiomycota	Ascomycota	Basidiomycota
		>Basidiomycota	Basidiomycota					
Plantas que colonizan		algunas	Angiospermas y	Briofitas	Ericales	Monotropoidea	Ericales y algunas	Orchidiales
		Angiospermas y	Gimnospermas	Pteridofitas			algunas	
		>Gimnospermas		>Angiospermas y algunas			Briofitas	
				Gimnospermas				

Referencias: + / -: Presente/Ausente; >: Indica que la mayoría de ese grupo taxonómico de hongos forma la micorriza o el grupo de plantas a la que está mayormente asociada (Smith & Read 2008 modificada).

ANEXO II

FÓRMULAS DE MEDIOS DE CULTIVO Y *BUFFERS***MYP (g/100 mL)**

Extracto de malta	0,7
Extracto de Levadura	0,05
Peptona de Soja	0,23
Agar	1,5

MMS (g/100 mL)

Glucosa	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2
KH ₂ PO ₄	0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,0075
Extracto de levadura	0,1

BUFFER DE LISIS (g L⁻¹)

Tris	50 mM
NaCl	250 mM
EDTA	50 mM
SDS	0,3 % p/v
pH	8

BUFFER TE 10X (g L⁻¹)

Tris	60 mM
EDTA	100 mM
pH	7

ANEXO III

NÚMEROS DE ACCESO AL GENBANK (HQ629551–HQ629619), SUSTRATO A PARTIR DEL CUAL FUERON AISLADAS LAS LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS Y TIPO DE HONGO CORRESPONDIENTES A LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS OBTENIDAS EN EL CAPÍTULO 2 Y A LAS UTILIZADAS PARA CONSTRUIR LOS ÁRBOLES FILOGENÉTICOS (FIGURA 2.5). SE SEÑALAN EN NEGRITA LAS UTILIZADAS PARA CONSTRUIR LOS ÁRBOLES.

NOMBRE DEL AISLAMIENTO	TAXON*	GENBANK	SUSTRATO DE AISLAMIENTO	TIPO DE HONGO
YF12.4	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629567	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF2.2	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629598	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF4.4	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629595	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF5.5primab	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629574	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF5.7	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629600	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF9.5b	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629570	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL10.1b	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629575	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL10.7b	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629571	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL12.2	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629568	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL13.10d	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629572	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL14.1	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629566	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL14.7	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629569	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL15.2	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629599	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL6.3c	Ascomycetous yeast sp. 1	HQ629573	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YCL7.3a	Ascomycetous yeast sp. 2	HQ629596	Surface of CW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YCL11.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629552	Surface of CW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF3.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629555	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF3.3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629584	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF5.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629587	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF8.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629585	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF8.3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629551	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL10.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629553	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL11.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629586	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL7.4a	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629554	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL9.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ629588	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
CBS100524	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>aubasidani</i>^T	FJ150952	Slime flux in <i>Betula</i> sp., Russia	Hongo dimórfico
CBS147.97	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>namibiae</i>^T	AJ244231	Dolomitic marble, Namibia	Hongo dimórfico
EXF-3640	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. nov.	FJ150896	Subglacial ice from sea water, Arctic glaciers	Hongo dimórfico

CBS146.30	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i> ^T	FJ150916	Slime flux in <i>Quercus</i> sp., Germany	Hongo dimórfico
YFL13.7	<i>Coniozyma leucospermi</i>	HQ629581	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
CBS111289	<i>Coniozyma leucospermi</i> ^I	EU552113	Proteaceae leaves, South Africa	Hongo dimórfico
YFL7.2	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	HQ629606	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL7.5	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	HQ629607	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
ZIM600	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	AM748527	Grape berries, Slovenia	Levadura
CBS 8351	<i>Cryptococcus adeliensis</i> ^T	AF137603	Decayed algae, Antactica	Levadura
MA-M35	<i>Cryptococcus diffluens</i>	GU373799	tank of municipal wastewater treatment plant, China	Levadura
YF11.3	<i>Cryptococcus diffluens</i>	HQ629579	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
CBS 160	<i>Cryptococcus diffluens</i> ^T	AF075502	Fingernail, Austria	Levadura
CBS8976	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	AF406890	Flowering plant of <i>Arabis alpina</i> , Germany	Levadura
YCL8.1	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	HQ629608	Surface of CW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YF3.4	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	HQ629610	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YF4g	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	HQ629611	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YF8.7	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	HQ629609	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL1.1	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	HQ629577	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL2.5	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	HQ629576	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL7.1	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	HQ629578	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
CBS569	<i>Cryptococcus heveanensis</i> ^T	AF075467	Sheet rubber stored in a damp room, Indonesia	Levadura
D187_2	<i>Cryptococcus weringae</i>	HM627149	Insect associated, Bulgaria	Levadura
YF12.2	<i>Cryptococcus weringae</i>	HQ629605	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
CBS1937	<i>Cryptococcus weringae</i> ^T	AF181541	Dew-retted flax, Netherlands	Levadura
dH12609	<i>Dothichiza pithyophila</i>	FJ150969	Plant associated, Slovenia	Hongo dimórfico
YF10.2c	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629560	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF14.5	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629557	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF3.2	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629593	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF6.3	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629558	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF6.3e	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629561	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF8.2	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629592	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF9.1b	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629563	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF9.1c	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629559	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL10.3	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629589	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL12.3	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629594	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL13.8	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629590	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL2.1e	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629556	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL7.6b	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629564	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico

YFL7.6d	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629562	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YFL8.6bb	<i>Dothichiza</i> sp. 1	HQ629565	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF14.6	<i>Dothichiza</i> sp. 2	HQ629591	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
CBS285.47	<i>Fonsecaea compacta</i> ^T	AF050275	Clinical strain, Puerto Rico	Hongo dimórfico
9096	Fungal endophyte	F420042	Endophyte in cupressaceous (asymptomatic tissue), USA	Hongo dimórfico
CBS303.62	<i>Lecytophora mutabilis</i>	AF353605	Soil, Netherlands	Hongo dimórfico
YFL11.8	<i>Lecytophora mutabilis</i>	HQ629602	Surface of CnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
YF4.3a	<i>Lecytophora mutabilis</i>	HQ629603	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
CBS157.44	<i>Lecytophora mutabilis</i> ^T	AF353604	River water, Germany	Hongo dimórfico
CBS239.74	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	AB278179	<i>Vitis vinifera</i> , USA	Hongo dimórfico
YF13.1	<i>Phaeomoniella</i> sp.	HQ629601	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
CBS114905	<i>Phaeomoniella zymoides</i>	HQ779324	<i>Pinus densiflora</i> leaves, South Korea	Hongo dimórfico
STE-U6120	<i>Phaeomoniella zymoides</i>	GQ154641	<i>Prunus salicina</i> wood, South Africa	Hongo dimórfico
YF8.4	<i>Phaeomoniella zymoides</i>	HQ629582	Surface of FnW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
DBVPG5006	<i>Rhodotorula colostri</i>	GQ911527	Calderone Glacier, Italy	Levadura
YCL7.1	<i>Rhodotorula colostri</i>	HQ629613	Surface of CW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL10.6	<i>Rhodotorula colostri</i>	HQ629612	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
CBS 348	<i>Rhodotorula colostri</i> ^T	AY372177	Colostrum from woman, Portugal	Levadura
AY-31	<i>Rhodotorula fujiisanensis</i>	FN357238	<i>Betula</i> sp. green leaves, Russia	Levadura
YFL10.4	<i>Rhodotorula fujiisanensis</i>	HQ629614	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL10.5	<i>Rhodotorula fujiisanensis</i>	HQ629580	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL3.2	<i>Rhodotorula fujiisanensis</i>	HQ629616	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL4.1	<i>Rhodotorula fujiisanensis</i>	HQ629618	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL6.2	<i>Rhodotorula fujiisanensis</i>	HQ629615	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
YFL9.6	<i>Rhodotorula fujiisanensis</i>	HQ629617	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Levadura
CBS4551	<i>Rhodotorula fujiisanensis</i> ^T	AF189928	Droppings of hare, Japan	Levadura
CPC14927	<i>Sydowia eucalypti</i>	GQ303328	<i>Eucalyptus</i> sp., Portugal	Hongo dimórfico
CBS275.28	<i>Taphrina wiesneri</i>	AF492072	-	Hongo dimórfico
IFO7776	<i>Taphrina wiesneri</i>	AY548292	Plant, USA	Hongo dimórfico
YFL9.5	<i>Taphrina wiesneri</i>	HQ629583	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
CBS 436.72	<i>Tilletiaria anomala</i> ^T	AJ235284	Decayed wood, Canada	Hongo dimórfico
HB940	<i>Trichosporon dulcitum</i>	AJ507663	Soil, Austria	Levadura
YFL6.4	<i>Trichosporon dulcitum</i>	HQ629619	Surface of FW <i>N. Nervosa</i> seeds, Argentina	Hongo dimórfico
CBS8257	<i>Trichosporon dulcitum</i> ^T	AF075517	Soil, Netherlands	Levadura

* Se mantiene el nombre con el que la secuencia correspondiente a cada muestra se encuentra cargada en la base de datos del GenBank.

ANEXO IV

DIETAS DE FERTILIZANTES UTILIZADAS DURANTE LAS DISTINTAS FASES DE CRECIMIENTO DURANTE EL CULTIVO DE *NOTHOFAGUS NERVOSA* EN EL VIVERO (MODIFICADA DE AZPILICUETA *ET AL.* 2010)

FASE	DURACIÓN APROXIMADA (DÍAS)*	FERTILIZANTE	CONCENTRACIÓN (g/l)	FRECUENCIA DE APLICACIÓN (VECES/SEMANA)
Establecimiento 1	30	NPK 11-46-16	0,14	2
		KH ₂ PO ₄	0,10	2
		CaNO ₃	0,20	1
		Micronutrientes	0,01	1
Establecimiento 2	15	NPK 11-46-16	0,44	2
		KH ₂ PO ₄	0,20	2
		CaNO ₃	0,20	1
		Micronutrientes	0,01	1
Crecimiento rápido 1	15	NPK 18-7-17	0,17	2
		CaNO ₃	0,10	1
		Micronutrientes	0,01	1
Crecimiento rápido 2	15	NPK 18-7-17	0,28	2
		CaNO ₃	0,10	1
		Micronutrientes	0,01	1
Crecimiento rápido 3	45	NPK 18-7-17	0,58	2
		CaNO ₃	0,10	1
		Micronutrientes	0,01	1
Rustificación 1	30	NPK 4-27-38	0,11	2
		KH ₂ PO ₄	0,055	2
		CaNO ₃	0,155	1
		Micronutrientes	0,01	1
Rustificación 2	15	NPK 4-27-38	0,225	2
		KH ₂ PO ₄	0,12	2
		CaNO ₃	0,155	1
		Micronutrientes	0,01	1
Rustificación 3	30	NPK 4-27-38	0,225	1
		KH ₂ PO ₄	0,12	1
		CaNO ₃	0,155	1
		Micronutrientes	0,01	1

* La duración de las distintas fases en días es variable y está influenciada por la época de siembra, las condiciones del invernáculo y las características del año de producción.

ANEXO V

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL A PARTIR DE LAS HOJAS DE *NOTHOFAGUS NERVOSA* SEGÚN DUMOLIN *ET AL.* (1995)

- 1) Se colocaron 70-80 mg de tejido vegetal cortado en pequeños trozos en tubos plásticos de 1.5 mL. Para romper el tejido se agregaron tres esferas de acero inoxidable de 3 mm de diámetro a cada tubo y se colocaron los mismos en nitrógeno líquido durante un minuto. Luego, se agitaron en un molino de homogenización (MixerMill, Resch) a máxima velocidad (30 rpm) durante 3 minutos, obteniéndose un polvo fino de color verde claro.
- 2) Se calentó el *buffer* de extracción suplementado con DTT y PVP soluble a 65 °C y luego se agregó 1 mL a cada muestra. Las muestras fueron incubadas en baño termostático con agitación durante 1 h a 65 °C.
- 3) Transcurrido este tiempo se dejaron enfriar los tubos y se agregaron 400 µL de diclorometano, mezclándose suavemente hasta obtener una emulsión.
- 4) Se centrifugaron las muestras 10 min a 13000 g en centrífuga refrigerada (4 °C) y se pasó el sobrenadante a un tubo limpio cuidando de no pipetear la interfase. Se repitió este paso dos veces.
- 5) Se agregaron 400 µL de isopropanol a cada tubo, se homogeneizaron las muestras suavemente y posteriormente se centrifugaron 10 min a 13000 g en centrífuga refrigerada (4 °C). Se removió el sobrenadante y se dejaron secar los tubos 15 min sobre papel de filtro.
- 6) Luego, Se agregó 1 mL de etanol 76 % a cada tubo, se homogeneizó y se centrifugaron las muestras 10 min a 13000 g (4 °C). Se removió el sobrenadante cuidadosamente y se dejaron secar los tubos durante 30 min a 1 h sobre papel de filtro.
- 7) Finalmente, se agregaron 40 µL de buffer 1x TE con RNAsa (2 µl/mL solución stock: 10 mg/mL) y se incubaron las muestras a 37 °C por 30 min. Se realizaron diluciones de trabajo 1:50 ADN/agua MiliQ estéril y se conservó a -20 °C el ADN *stock*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adjoud D & R Halli-Hargas (2000) Occurrence of arbuscular mycorrhiza on aged *Eucalyptus*. *Mycorrhiza* 9: 287-290.
- Adjoud D, Plenchette C, Halli-Hargas R & F Lapeyrie (1996) Response of 11 eucalyptus species to inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6: 129-135.
- Agerer R (1987-2006) Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Munich, Alemania.
- Agerer R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae: A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107-114.
- Alberdi M, Álvarez M, Valenzuela E, Godoy R, Olivares E & M Barrientos (2007) Respuesta al déficit hídrico de plantas de *Nothofagus dombeyi* inoculadas con un hongo ectomicorrícico específico (*Descolea antarctica* Sing) y no específico (*Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch). *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 479-491.
- Alpert P (2006) Constraints of tolerance, why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *Journal of Experimental Biology* 209: 1575-1584.
- Amos W, Worthington Wilmer J, Fullard K, Burg TM, Croxall JP, Bloch D & T Coulson (2001) The influence of paternal relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society B* 268: 2021-2027.
- Anderson IC & JWG Cairney (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 6: 769-779.
- Anderson MJ, Ellingsen KE & BH McArdle (2006) Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology letters* 9: 683-693.
- Andrade G, Mihara KL, Linderman RG & GJ Bethlenfalvai (1997) Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 192: 71-79.
- Andrews JH & RF Harris (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38: 145-180.
- Aparicio J, Ortego MJ & PJ Cordero (2006) What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? *Molecular Ecology* 15: 4659-4665.
- Arocena JM, Glowa KR, Massicotte HB & L Lavkulich (1998) Chemical and mineral composition of ectomycorrhizosphere soils of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) in the Ae horizon of a Luvisol. *Canadian Journal of Soil Science* 79: 25-35.
- Arroyo KM, Cavieres L, Peñaloza A, Riveros M & Faggi AM (1995) Relaciones fitogeográficas y patrones regionales de riqueza de especies en la flora del bosque lluvioso templado de sudamérica. En: Armesto JJ, C Villagran & M Kalin Arroyo(Eds.) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Azcon-Aguilar C & JM Barea (1996) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.
- Azpilicueta MM, Caron H, Bodenés C & LA Gallo (2004) SSR Markers for analyzing South American *Nothofagus* Species. *Silvae Genetica* 53: 240-243.
- Azpilicueta MM, Varela S, Martínez A & Gallo L (2010) Manual de viverización, cultivo y plantación de Roble pellín en el norte de la región Patagónica. Ediciones INTA EEA Bariloche.
- Baar J, Horton TR, Kretzer AM & TD Bruns (1999) Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytologist* 143: 409-418.
- Bailey JK, Wooley SC, Lindroth RL & TG Whitham (2006) Importance of species interactions to community heritability: a genetic basis to trophic-level interactions. *Ecology letters* 9: 78-85.
- Bandaranayake WM (1998) Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Natural Product Reports* 15: 159-172.
- Barbour BR, Baker SC, O'Reilly-Wapstra JM, Harvest TM & BM Potts (2009b) A footprint of tree genetics on the biota of the forest floor. *Oikos* 118: 1917-1923.

- Barea JM, Azcón R & C Azcón-Aguilar (2002) Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 343–351.
- Barroetaveña C, Schinelli C, Bassani VN, Tejera L & L Gallo (2009) Inoculación ectomicorrícica de *Nothofagus* spp. Informe técnico Proyecto “Domesticación de especies Forestales Nativas” INTA.
- Bastias BA, Andersonb IC, Xuc Z & JWG Cairney (2007) RNA- and DNA-based profiling of soil fungal communities in a native Australian eucalypt forest and adjacent *Pinus elliotti* plantation. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 3108–3114.
- Bastias BA, Xu Z & JWG Cairney (2006) Influence of long-term repeated prescribed burning on mycelial communities of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 172: 149–158.
- Becerra A, Pritsch K, Arrigo N, Palma M & N Bartoloni (2005) Ectomycorrhizal colonization of *Alnus acuminata* Kunth in northwestern Argentina in relation to season and soil parameters. *Annals of Forest Science* 62: 325–332.
- Bennett A & JM Whipps (2008) Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. *Applied Soil Ecology* 38: 83–89.
- Bent E & L Taylor (2010) Direct amplification of DNA from fresh and preserved ectomycorrhizal root tips. *Journal of Microbiological Methods* 80: 206–208.
- Bhadra B, Rao RS, Singh PK, Sarkar PK & S Shivaji (2008) Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. *Current Microbiology* 56: 489–494.
- Bonfante P & A Iulia-Andra (2009) Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology* 63: 363–383.
- Bossdorf O, Shuja Z & JA Banta (2009) Genotype and maternal environment affect belowground interactions between *Arabidopsis thaliana* and its competitors. *Oikos* 118: 1541–1551.
- Botha A (2006) Yeasts in Soil. *En: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Rosa C & G Péter (Eds.). Springer-Verlag Berlin, Alemania: 221–240.
- Botha A (2011) The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 1–8.
- Boudarga K, Lapeyrief & J Dexheimer (1990) A technique for dual vesicular-arbuscular endomycorrhizal / ectomycorrhizal infection of *Eucalyptus* in vitro. *New Phytologist* 114: 73–76.
- Bowen GD (1994) The ecology of ectomycorrhiza formation and functioning. *Plant and Soil* 159: 61–67.
- Brand F (1991b) *Russula mairei*. In: Agerer R (ed) Colour atlas of ectomycorrhizae, plate 65. Einhorn, Schwäbisch Gmünd.
- Brand F (1992) Mixed associations of fungi in ectomycorrhizal roots. *En: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH, Alexander IJ (eds). Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB International, Wallingford: 142–147.
- Brandão LR, Libkind D, Vaz AB, Espírito Santo LC, Moliné M, de García V, van Broock M & CA Rosa (2011) Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiology Ecology* 76: 1–13.
- Brandl MT, Quinones B & SE Lindow (2001) Heterogeneous transcription of an indoleacetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola* on plant surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 3454–3459.
- Bridge P & B Spooner (2001) Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil* 232: 147–154.
- Brizzio S & M van Broock (1998) Characteristics of wild yeast killer from Nahuel Huapi National Park (Patagonia, Argentina). *Food Biotechnology* 36: 273–278.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T & N Malajczuk (1996) Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Brundrett MC (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79: 273–295.

- Bruzzone MC (2010) Micorrizas y hongos septados marrones de la Flora Altoandina. Tesis de grado para optar al grado de Licenciada en Ciencias Biológicas. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Argentina.
- Buck JW (2004) Combinations of fungicides with phylloplane yeasts for improved control of *Botrytis cinerea* on *Geranium* seedlings. *Phytopathology* 94: 196-202.
- Buck JW, Lachance MA & JA Traquair (1998) Mycoflora of peach bark: population dynamics and composition. *Canadian Journal of Botany* 76: 345-354.
- Bull AT, Goodfellow M & Slater JH (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Review of Microbiology* 46: 219-252.
- Burgess TI, Dell B & N Malajczuk (1994) Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist* 127: 731-739.
- Burgess TI, Malajczuk N & TS Groves (1993) The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake of *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. diversicolor*. *Plant and Soil* 153: 155-164.
- Burton J, Chengrong C, Xu Z & H Ghadiri (2010) Soil microbial biomass, activity and community composition in adjacent native and plantation forests of subtropical Australia. *Journal of Soils and Sediments* 10: 1267-1277.
- Buscot F, Munch JC, Charcosset JY, Gardes M, Nehls U & R Hampp (2000) Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 601-14.
- Calvaruso C, Turpault MP, Leclerc E & P Frey-Klett (2007) Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microbial Ecology*.
- Ceballos G (2005) Reconocimiento de Patrones en electroforesis capilar utilizando Análisis Multiresolución y Programación Dinámica. Trabajo de Grado. Universidad de Los Andes. Mérida.
- Chakravarty P & L Chatarpaul (1990) Effect of fertilization on seedling growth, ectomycorrhizal symbiosis, and nutrient uptake in *Larix laricina*. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 245-248
- Chand-Goyal T & RA Spotts (1996a) Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest Biotechnology* 7: 51-64.
- Chand-Goyal T & RA Spotts (1996b) Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. *Biological Control* 6: 253-259.
- Chao A, Chazdon RL, Colwell RK & S Tsung-Jen (2005) A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology letters* 8: 148-159.
- Chauchard L (1989) Plan de ordenación Quilánlahue. Municipalidad de Junín de los Andes-Administración de Parques Nacionales. San Martín de los Andes, Neuquén-Argentina.
- Chauchard L, Sbrancia R, Gonzales Peñalba M, Rabino A, Maresca L & C Blacher (1997) Dinámica y manejo del bosque de *Nothofagus*. Universidad Nacional del Comahue-Administración de Parques Nacionales-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Informe final de Proyecto.
- Christensen M & J Emborg (1996) Biodiversity innatural versus managed forest in Denmark. *Forest Ecology and Management* 85: 47-51.
- Clemmensen KE & A Michelsen (2006) Integrated long-term responses of an arctic-alpine willow and associated ectomycorrhizal fungi to an altered environment. *Canadian Journal of Botany* 84: 831-843.
- Colpaert JV (1999) Thelephora. En: Cairney JWG y SM Chambers (Eds.). Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile. Springer, Berlin, Alemania.

- Correa MN (1984) Fagaceae. En: Correa, M.N. (Ed.), Flora Patagónica, Parte IVa. Colección Científica INTA. Buenos Aires: 4-11.
- Costa R, Monika G, Mrotzek N, Lottmann J, Berg G & K Smalla (2006). Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 236-249.
- Cram MM, Mexal JG & R Souter (1999) Successful reforestation of south Carolina *Sandhills* is not influenced by seedling inoculation with *Pisolithus tinctorius* in the nursery. *Southern Journal of Applied Forestry* 1: 46-52.
- Crutsinger GM, Collins MD, Fordyce JA, Gompert Z, Nice CC & NJ Sanders (2006) Plant genotypic diversity predicts community structure and governs an ecosystem process. *Science* 313: 966-968.
- Curlevski NJA, Xu Z, Anderson IC & JWG Cairney (2010) Soil fungal communities differ in native mixed forest and adjacent *Araucaria cunninghamii* plantations in subtropical Australia. *Journal of Soils and Sediments* 10: 1278-1288.
- Dahlberg A & E Stenstrom (1991) Dynamic changes in nursery and indigenous mycorrhiza of *Pinus sylvestris* seedlings planted out in forest and clearcuts. *Plant and Soil* 136: 73-86.
- Dahlberg A, Jonsson L & JE Nylund (1997) Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden. *Canadian Journal of Botany* 75:1323-1335.
- Day PR (1965) Particle Fractionation and Particle-Size Analysis. En Black CA, Evans DD, White JL, Ensminger LE & FE Clark (Eds.) Method of soil analysis Part 1 Physical and Mineralogical Properties, Including Statistics of Measurement and Samplig. American Society of Agronomy, Inc.. Madison, Wisconsin.
- de Azeredo LA, Gomes EAT, Mendonça-Hagler LC & AN Hagler (1998) Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *International Microbiology* 1: 205-208.
- de García V, Brizzio S, Libkind D, Buzzini P & van Broock M (2007) Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 331-341.
- de Garcia (2011) Levaduras de Ambientes Glaciaros del Parque Nacional Nahuel Huapi, Estudios Básicos y Aplicados. Trabajo de Posgrado para la obtención del grado de Doctora en Bioquímica. Universidad Nacional de Tucumán Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
- De la Bastide PY, Kropp BD & Y Piché (1995) Mechanisms for the development of genetically variable mycorrhizal in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3609-3616.
- Deak T (2006) Environmental factors influencing yeasts. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (Rosa CA & Peter G, eds). Springer Verlag, Berlin: 155-174.
- Dell B, Malajczuk N, Bougher NL & G Thomson (1994) Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma* ectomycorrhizas formed in vitro with *Allocasuarina*, *Casuarina* and *Eucalyptus*. *Mycorrhiza* 5:129-138.
- Deshpande A, Pontaroli AC, Chaluvadi SR, Lu F & JL Bennetzen (2011) Chapter 4: Plant Genetics for Study of the Roles of Root Exudates and Microbes in the Soil. En: Costa de Oliveira A & RK Varshney (eds.), Root Genomics, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 99-111.
- Dickie IA, Koidel RT & AC Fayish (2001) Vesicular-arbuscularmycorrhizal infection of *Quercus rubra* seedlings. *New Phytologist* 151: 257-264
- Diehl P & S Fontenla (2010) Arbuscular mycorrhizal infection in two morphological root types of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 133-137.
- Diehl P, Mazzarino M J & S Fontenla (2008) Plant limiting nutrients in Andean-Patagonian woody species: Effects of interannual rainfall variation, soil fertility and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management* 255: 2973-2980.

- Diehl P, Mazzarino MJ, Funes F, Fontenla S, Gobbi M & J Ferrari (2003) Nutrient conservation strategies in native Andean-Patagonian forests. *Journal of Vegetation Science* 14: 63-70.
- Diehl P. 2006. Indicadores de conservación de nitrógeno y fósforo en especies arbóreas de la región Andino-Patagónica. Tesis de Doctorado en Biología, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche, Bariloche.
- Ding GC (2011) Analyses of microbial communities at biogeochemical interfaces and their interaction with organic pollutants in soil. Von der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina.
- Donegan KK, Seidler RJ, Doyle JD, Porteous LA, Digiovanni G, Widmer F & LS Watrud (1999) A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. *Journal of Applied Ecology* 36: 920-936.
- Donoso C & Lara A (1995) Utilización de los bosques nativos en Chile: pasado, presente y futuro. *En: Armesto JJ, C Villagrán & M Kalin Arroyo (Eds.) Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 363-388.
- Donoso C (1993) Bosques templados de Chile y Argentina: Variación, estructura y dinámica. *Ecología Forestal*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Donoso P, Donoso C, Gallo L, Azpilicueta MM, Baldini A & B Escobar (2006) *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. Roble, Pellín, Hualle. *En: Donoso C. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. Autoecología, Valdivia, Chile.
- Droby S, Hofstein R, Wilson CL, Wisniewski M, Fridlender B, Cohen L, Weiss B, Daus A, Timar D & E Chalutz (1993) Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. *Biological Control* 3: 47-52.
- Dumolin S, Demesure B & RJ Petit (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1253-1256.
- Dunstan WA, Dell B & N Malajczuk (1998) The diversity of ectomycorrhizal fungi associated with introduced *Pinus* spp. in the Southern Hemisphere, with particular reference to Western Australia. *Mycorrhiza* 8: 71-79.
- Duponnois R & J Garbaye (1990) Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. *Canadian Journal of Botany* 68: 2148-2152.
- Edward H. Simpson (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- El Karkouri K, Martin F, Douzery JPE & D Mousain (2005) Diversity of ectomycorrhizal fungi naturally established on containerised *Pinus* seedlings in nursery conditions. *Microbiological Research* 160: 47-52.
- Elad Y, Köhl J & NJ Fokkema (1994) Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology* 84: 1193-1200.
- El-Mehalawy AA (2004) The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Agriculture and Biology* 6: 310-316.
- El-Mehalawy AA, Hassanin SM, Hassanin NM & SA Zaki (2007) Induction of resistance and biocontrol of *Rhizoctonia* in cotton against damping-off disease by rhizosphere yeasts and fungi. *Internet Journal of Microbiology* 3.
- El-Sayed SM & El-Nady MF (2008) Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. *Acta Biol Szeged* 52: 271-275.
- El-Tarabily KA (2004) Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal of Applied Biotechnology* 96: 69-75.
- Elwakil MA, Awadallah OA, El-Refai IM, El-Metwally MA & MS Mohammed (2009) The use of bread yeasts as a biocontrol agent for controlling seed-borne fungi of Faba bean. *Plant Pathology Journal* 8: 133-143.

- Enricci J, Alday G & D Massone (2001) Producción de plantines en contenedores. Acta de las VI jornadas de viveristas forestales de la Patagonia, 15 y 16 de noviembre de 2001. Esquel, Argentina.
- Escalante AE (2007) Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. En: Ecología molecular. Eguiarte LE, Souza V & X Aguirre (Eds). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ettema C H & DA Wardle (2002) Spatial soil ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 177-183.
- Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G & A Stetzell-Tallman (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 50: 1351-1371
- Fernández N, Fontenla S & MI Messuti (2008) Arbuscular mycorrhizas and dark septate fungi in *Lycopodium paniculatum* (Lycopodiaceae) and *Equisetum bogotense* (Equisetaceae) in a Valdivian temperate forest of Patagonia, Argentina. *American Fern Journal* 98: 117-127.
- Fernández N, Fontenla S & MI Messuti (2010) Mycorrhizal status of obligate and facultative epiphytic ferns in a Valdivian Temperate Forest of Patagonia, Argentina. *American Fern Journal* 100: 17-28.
- Fernández N, Mestre MC, Marchelli P & S Fontenla (2012) Yeast and yeast-like fungi associated with dry indehiscent fruits of *Nothofagus nervosa* in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 176-192.
- Filion M, St-Arnaud M & JA Fortin (1999) Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist* 141: 525-533.
- Fitter AH & J Garbaye (1994) Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil* 159: 123-132.
- Flores R, Godoy R & G Palfner (1997) Morfo-anatomía de la ectomicorriza *Cenococcum geophilum* en *Nothofagus alessandrii*. *Gayana Botanik* 54: 157-162.
- Fokkema NJ, den Houter JG, Kosterman YJC & AL Nelis (1979) Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Transactions of the British Mycological Society* 72: 19-29.
- Fonseca A & J Inácio (2006) Phylloplane yeasts. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (Rosa CA & Peter G, eds). Springer Verlag, Berlin: 263-301.
- Fonseca Á, Scorzetti G & Fell JW (2000) Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 7-27
- Fontenla S, Baccala N & M Havrylenko (2001) Dinámica de las micorrizas arbusculares en dos bosques de *Austrocedrus chilensis* con diferente estado sanitario. *Ecología* (España) 15: 37-44.
- Fontenla S, Godoy R, Rosso P & M Havrylenko (1998) Root associations in *Austrocedrus* forests and seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizas. *Mycorrhiza* 8: 29-33.
- Founoune H, Duponnois R, Bâ AM, Sall S, Branget I, Lorquin J, Neyra M & JL Chotte (2002) Mycorrhiza Helper Bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba*. *New Phytologist* 153: 81-89.
- Fracchia S, Godeas A, Scervino JM, Sampedro I, Ocampo JA & I García-Romera (2003) Interaction between the soil yeast *Rhodotorula mucilaginosa* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 701-707.
- Frank AB (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Ber. deutsch. Bot. Ges.* 3: 128-145.
- Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.

- Frey SD (2007) Spatial distribution of soil organisms. *En*: Paul EA (ed), Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry, 3rd edn. Academic Press, London: 283-300.
- Frey-Klett P & J Garbaye (2005). Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions. *New Phytologist* 168: 1-4.
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clause ML, Courrier S, Le Roux C, Raaijmakers J, Martinotti MG, Pierrat JP & J Garbaye (2005) Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165: 317-328.
- Gallo LA (2009) Proyecto Específico: Domesticación de especies forestales nativas patagónicas. Programa Nacional - FORESTALES.
- Gallo LA, Donoso C, Marchelli P & P Donoso (2004) Variación en *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil (*N. alpina*, *N. procera*). *Variación intraespecífica en especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina* (Donoso C, Premoli A, Gallo L & Ipinza R, eds). Editorial Universitaria, Santiago, Chile: 115-144.
- Gallo LA (2000) Modelling natural inter-specific hybridisation between two mountain southern beeches (*Nothofagus* spp). Symposium "Modelling and experimental research on genetic processes in tropical and temperate forests". French Guiana. Abstracts book: 31.
- Gallo LA (2006) Domesticación de especies forestales nativas patagónicas de aptitud comercial (PNFOR4232). Proyecto Específico INTA.
- Gallo LA, Marchelli P & P Crego (2000) Distribución y variación genética en características seminales y adaptativas de poblaciones y progenies de raulí en Argentina. *En*: Domesticación y mejora genética de raulí y roble. Ipinza R, B Gutiérrez y V Emhart (Eds.). Universidad Austral de Chile, Valdivia: 133-156.
- Garbaye J & GD Bowen (1989). Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas *New Phytologist* 112: 383-388.
- Garbaye J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128: 197-210.
- Garbeva P, van Veen JA & JD van Elsas (2004) Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42: 243-270.
- García-Romera I, JM García-Garrido, J Martín, S Fracchia, MT Mujica, A Godeas & JA Ocampo (1998) Interactions between saprotrophic *Fusarium* strains and arbuscular mycorrhizas of soybean plants. *Symbiosis* 24: 235-246.
- Gardes M & TD Bruns (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gardes M & TD Bruns (1996) Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* 74:1572-1583
- Gebhardt S, Neubert K, Wöllecke J, Münzenberger B & RF Hüttl (2007) Ectomycorrhiza communities of red oak (*Quercus rubra* L.) of different age in the Lusatian lignite mining district, East Germany. *Mycorrhiza* 17: 279-290.
- Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G & JD van Elsas (1999) Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiology Methods* 38: 1-15.
- Giachini AJ, Souza LAB & VL Oliveira (2004) Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. *Mycorrhiza* 14: 375-381.
- Glickmann E, Gardan L, Jacquet S, Hussain S, Elasri M, Petit A & Y Dessaux (1998) Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interactions* 11: 156-162.

- Glushakova AM & YI Chernov (2004) Seasonal dynamics in a yeast population on leaves of the common wood sorrel *Oxalis acetosella* L. *Microbiology* 73: 184–188.
- Glushakova AM & YI Chernov (2007) Seasonal dynamic of the numbers of epiphytic yeasts. *Microbiology* 76: 590–595.
- Godoy M M & G Defossé (2004) Introducción de especies forestales para la diversificación de forestaciones y la rehabilitación de sitios degradados en la Patagonia Argentina. Informe final PIA 05/00 SAGPyA-BIRF. 97pp.
- Godoy R & G Palfner (1997) Ectomicorrizas en *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst y *N. dombeyi* (Mirb.) Oerst del sur de Chile. *Boletín Micológico* 12: 55-61.
- Godoy R, Romero R & R Carrillo (1994) Estatus micotrófico de la flora vascular en bosques de coníferas nativas del sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 67: 209-220.
- Golubev WI (1991) Capsules. En: Rose AH & JS Harrison (Eds) *The yeasts*. Academic, London: 175–197.
- Gomes EA, Kasuya MCM, de Barros EG, Borges AC & EF Araújo (2002) Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology* 25: 477-483.
- Gorbushina AA & WJ Broughton (2009) Microbiology of the atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annual Review of Microbiology* 63: 431–450.
- Grand LF & AE Harvey (1982) Quantitative measurement of ectomycorrhizae on plant roots. En: *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Shenck NC (Ed.). American Phytopathological Society, Saint Paul: 157-164.
- Grantina L, Seile E, Kenigvalde K, Kasparinskis R, Tabors G, Nikolajeva V, Jungerius P & I Muiznieks (2011) The influence of the land use on abundance and diversity of soil fungi: comparison of conventional and molecular methods of analysis. *Environmental and Experimental Biology* 9: 9–21.
- Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M & AJ Beattie (2004) Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* 432: 747–750.
- Gregorius HR (1978) The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Mathematical Biosciences* 41: 253–271.
- Griffiths BS, Geoghegan IE & WM Robertson (2000) Testing genetically engineered potato, producing lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes. *Journal of Applied Ecology* 37: 159-170.
- Guo L & R Gifford (2002) Soil carbon stocks and land use change: a metaanalysis. *Global Change Biology* 8: 345-360.
- Hadanich D, Perédi J, Juhász-Román M & B Nagy (2008) The effect of microorganisms deteriorating quality in storing sunflower seed. *Acta Alimentaria* 37: 77-86.
- Halleen F, Schroers HF, Groenewald JZ & PW Crous (2004) Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50: 431–455
- He JZ, Xu ZH & J Hughes (2005) Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18 S rRNA genes. *FEMS Microbiology Letters* 247: 91–100.
- He XH, Bledsoe CS, Zasoski RJ, Southworth D & WR Horwath (2006) Rapid nitrogen transfer from ectomycorrhizal pines to adjacent ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal plants in a California oak woodland. *New Phytologist* 170: 143–151.
- Helmisaari HS, Ostonen I & K Lohmus (2009) Ectomycorrhizal root tips in relation to site and stand characteristics in Norway spruce and Scots pine stands in boreal forests. *Tree Physiology* 29:445–456.

- Hill GT, Mitkowskia NA, Aldrich-Wolfe L, Emelea LR, Jurkonie DD, Ficke A, Maldonado-Ramireza S, Lynch ST & EB Nelson (2000) Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15: 25–36.
- Hobbie JE & EA Hobbie (2006) N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in Arctic tundra. *Ecology* 87: 816–822.
- Hogberg M & P Hogberg (2002) Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist* 154: 791–795.
- Horton TR & Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10: 1855-1871.
- Horton TR, Molina R & K Hood (2005) Douglas-fir ectomycorrhizae in 40- and 400-yr-old stands: mycobiont availability to late successional western hemlock. *Mycorrhiza* 15: 393–403.
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MTJ, Underwood N & M Vellend (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* 11: 609–623.
- Iason GR, Lennon JJ & RJ Pakeman (2005) Does chemical composition of individual Scots pine trees determine the biodiversity of their associated ground vegetation? *Ecology Letters* 8: 364–369.
- Informe de la Administración de Parques Nacionales.
- Iotti M & A Zambonelli (2005) A quick and precise technique for identifying ctomycorrhiza by PCR. *Mycological Research* 110: 60–65.
- Izzo A, Agbowo J & TD Bruns (2005) Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytologist* 166: 619– 630.
- Jackson EF, Echlin HL & CR Jackson (2006) Changes in the phyllosphere community of the resurrection fern, *Polypodium polypodioides*, associated with rainfall and wetting. *FEMS Microbiology Ecology* 58: 236–246.
- Janisiewicz WJ (1987) Postharvest biological control of Blue Mold on apples. *Phytopathology* 77: 481-485.
- Janisiewicz W & L Yourman (1991) Postharvest control of Blue Mold and Gray Mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas ceparia*. *Plant Disease* 75: 490-494.
- Janisiewicz WJ & J Roitman (1988) Biological control of Blue Mold and Gray Mold on apple and pear with *Pseudomonas ceparia*. *Phytopathology* 78: 1697-1700.
- Janisiewicz WJ & L Korsten (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40: 411–441.
- Janisiewicz WJ, Kurtzman CP & JS Buyer (2010) Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast* 27: 389–398.
- Janisiewicz WJ, Peterson DL & R Bors (1994) Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Disease* 78: 466-470.
- Johansson JF, Paul LR & RD Finlay (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 1–13.
- Jumpponen A, Jones KL, Mattox D & C Yaeger (2010) Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus* spp. Ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Molecular Ecology* 19: 41–53.
- Kammerbauer H, Agerer R & H Sandermann (1989) Studies on ectomycorrhiza. XXII. Mycorrhizal rhizomorphs of *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* in association with Norway spruce (*Picea abies*): formation in vivo and translocation of phosphate. *Trees* 3: 78–84.

- Karén O, Hogberg N, Dahlberg A, Jonsson L & JE Nylund (1997) Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* 136: 313-325.
- Karst J, Jones MD & R Turkington (2009) Ectomycorrhiza colonization and intraspecific variation in growth responses to lodgepole pine. *Plant Ecology* 200: 161-165
- Khasa P, Sigler L, Chakravarty P, Dancik BP, Erickson L & D Mc Curdy (2001) Effect of fertilization on growth and ectomycorrhizal development of container-grown and bare-root nursery conifer seedlings. *New Forests* 22: 179-197.
- Killham K (1994) *Soil Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kimura S, Kawasaki T, Hatakeyama M, Naka T, Konishi F & A Konagaya (2004) OBIYagns: a grid-based biochemical simulator with a parameter estimator. *Bioinformatics* 20: 1646-1648.
- Kjøller R (2006) Disproportionate abundance between ectomycorrhizal root tips and their associated mycelia. *FEMS Microbiology Ecology* 58: 214-224.
- Kowalchuk GA, Yergeau E, Leveau JHJ, Sessitsch A & M Bailey (2010) Plant-associated microbial communities. *Environmental Molecular Microbiology* (Lui WT & Jansson JK, eds). Caister Academic Press, New York: pp. 131-148.
- Kuo S (1996) Phosphorus. *En: Sparks et al (ed.) Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods. SSSA Book Series Nr. 5: 869-919.*
- Kurtzman C P & J W Fell (1998) *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th ed. Amsterdam: Elsevier.
- Lachance M & T Starmer (1998) *Ecology and Yeast. En: The Yeasts, A Taxonomic Study. Kurtzman & Fell (Eds.), 4ta Ed., Elsevier Science Publishers, Florida (USA): 21-30.*
- Laclau P (1997) Los ecosistemas forestales y el hombre en el sur de Chile y Argentina. Boletín Técnico de la Fundación Vida Silvestre Argentina. Fundación Vida Silvestre Argentina-Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF/US).
- Landeweert R, Leeftang P, Smit E & T Kuyper (2005) Diversity of an ectomycorrhizal fungal community studied by a root tip and total soil DNA approach. *Mycorrhiza* 15: 1-6.
- Lapeyrie FF & GA Chilvers (1985) An endomycorrhiza-ectomycorrhiza succession associated with enhanced growth of *Eucalyptus dumosa* seedlings planted in a calcareous soil. *New Phytologist* 100: 93-104.
- Lenc L, Kwaśna H & C Sadowski (2011) Dynamics of the root/soil pathogens and antagonists in organic and integrated production of potato. *European Journal of Plant Pathology* 131: 603-620.
- Leski T, Aučina A, Skridaila A, Pietras M, Riepšas E & M Rudawska (2010) Ectomycorrhizal community structure of different genotypes of Scots pine under forest nursery conditions. *Mycorrhiza* 20: 473-481.
- Levisohn I (1954) Occurrence of ectotrophic and endotrophic mycorrhizas in forest trees. *Forestry* 27: 145-146.
- Liasu MO & O Shoshanya (2007) Studies of microbial development on mycorrhizosphere and rhizosphere soils of potted maize plants and the inhibitory effect of rhizobacteria isolated on two fungi. *African Journal of Biotechnology* 6: 504-508.
- Libkind D & MR van Broock (2006) Biomass and carotenoid pigments production by Patagonian native yeasts. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 22: 687-692
- Libkind D, Brizzio S, Ruffini A, Gadanho M, Broock M van & P Sampaio (2003) Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 313-322.

- Libkind D, Brizzio S, Ruffini A, Gadanho M, van Broock MR & JP Sampaio (2003) Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 313–322.
- Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, Gonçalves P & Sampaio JP (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 14539-14544.
- Libkind D, Pérez P, Sommaruga R, Diéguez MC, Ferraro M, Brizzio S, Zagarese H & MR van Broock (2004) Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochemical Photobiology Science* 3:281-286.
- Libkind D, Ruffini A & M van Broock (2004) Levaduras teleomórficas pigmentadas de ambientes naturales de la Patagonia Noroccidental. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 39: 5-12.
- Libkind D, Sommaruga R, Zagarese H & van Broock MR (2005) Mycosporines in carotenogenic yeasts. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 749–754.
- Linderman RG (1988) Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366–371.
- Lindow SE & Brandl MT (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1875–1883.
- Longo MS, Urcelay C & E Nouhra (2011) Long term effects of fire on ectomycorrhizas and soil properties in *Nothofagus pumilio* forests in Argentina. *Forest Ecology and Management* 262: 348–354.
- Lugo A & E Brown (1993) Management of tropical soils as sinks or sources of atmospheric carbon. *Plant and Soil* 149: 27-41.
- MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang YJ & DC White (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3566–3574.
- Madritch M, Donaldson JR & RL Lindroth (2006) Genetic identity of *Populus tremuloides* litter influences decomposition and nutrient release in a mixed forest stand. *Ecosystems* 9: 528–537.
- Madritch Michael D. & Richard L. Lindroth (2011) Soil microbial communities adapt to genetic variation in leaf litter inputs. *Oikos* 120: 1696–1704.
- Magaña SM (1999) Crecimiento y supervivencia de repoblaciones forestales sobre terrenos agrícolas con *Pinus halepensis* Mill. y *Pinus pinea* L. producidos en vivero sobre diferentes sustratos e inoculados con *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. M. Fr. Trabajo Práctico Tutorado, Universitat De Lleida, Escola Tècnica Superior D'enginyeria Agrària.
- Maksimova IA, Chernov IYu, 2004. Community structure of yeast fungi in forest biogeocenoses. *Microbiology* 73: 474-481.
- Mao W, Lewis JA, Hebbbar PK & Lumsden RD (1997) Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Disease* 81: 450-454.
- Marchelli P & Gallo LA (1999) Annual and geographic variation in seed traits of Argentinean populations of southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *Forest Ecology and Management* 121: 239-250.
- Marchelli P & LA Gallo (2004) The combined role of glaciation and hybridization in shaping the distribution of genetic variation in a Patagonian southern beech. *Journal of Biogeography* 31: 451–460.
- Marchelli P (2002) Variabilidad genética en Raulí (*Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim et Mil.), su relación con procesos evolutivos y la importancia en la conservación y utilización de sus recursos genéticos. Tesis Doctoral, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue.

- Marchelli P, Caron H, Azpilicueta MM & LA.Gallo (2008). Primer Note: A New Set of Highly Polymorphic Nuclear Microsatellite Markers for *Nothofagus nervosa* and Related South American Species. *Silvae Genetica* 57: 82-85.
- Markkola A, Kuikka K, Pasi Rautio, Esa Härmä, Marja Roitto & Juha Tuomi (2004) Defoliation increases carbon limitation in ectomycorrhizal symbiosis of *Betula pubescens*. *Oecologia* 140: 234–240.
- Martin F, Ramstedt M & K Soderha (1987) Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *Biochimie* 69: 569-581.
- Martin KJ (2007) Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. *Soil Science Society of America Journal* 71: 601-610.
- Martinez A & T Schinelli (2009) Viverización de especies forestales nativas de nuestra región: Los *Nothofagus* caducifolios Parte 1: Cosecha y procesamiento de semillas. *Presencia* 53: 36-41.
- Martínez DB, Barroetaveña C & M Rajchenberg (2007) Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque* 28: 226-233.
- Martini A (1992) Biodiversity and conservation of yeasts. *Biodiversity and Conservation* 1: 324-333.
- Mazzarino MJ & ME Gobbi (2005) Indicadores de Circulación de Nutrientes en Bosques Andino-Patagónicos. IDIA XXI 5: 15-18 (Ediciones INTA, Número especial sobre Forestales).
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL & JA Swan (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501.
- McGuire KL, Henkel TW, Granzow I, de la Cerda, Villa G, Edmund Y & C Andrew (2008) Dual mycorrhizal colonization of forest-dominating tropical trees and the mycorrhizal status of non-dominant tree and liana species. *Mycorrhiza* 18: 217-22.
- McLaughlin RJ, Wilson CL, Droby S, Ben-Arie R & E Chalutz (1992) Biological control of postharvest diseases of grape, peach and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Disease* 76: 470-473.
- Medina A, Vassileva M, Caravaca F, Roldan A & R Azcon (2004) Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chemosphere* 56:449-56.
- Medina CM, Cristancho D & D Uribe (2009) Respuesta fisiológica y capacidad antagonista de aislamientos filoféricos de levaduras obtenidos en cultivos de mora (*Rubus glaucus*). *Acta Biológica Colombiana* 14: 181-198.
- Mejstrik V (1971) The classification and relative frequency of mycorrhizae in *Nothofagus solandri* var. *cliffortoides*. *New Zealand Journal of Botany* 10: 243–253.
- Menkis A & R Vasaitis (2011) Fungi in Roots of Nursery Grown *Pinus sylvestris*: ectomycorrhizal colonisation, genetic diversity and spatial distribution. *Microbial Ecology* 61: 52–63.
- Mestre MC (2012) Biodiversidad de levaduras de suelo y rizósfera asociadas a especies de *Nothofagus* ectomicorrícicos del Bosque Andino-patagónico. Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue.
- Mestre MC, Libkind D & S Fontenla (2009) Comparación de condiciones de cultivo para el aislamiento y recuento simultáneo de levaduras de suelos de bosques nativos de *Nothofagus* spp. (Fagaceae) de la Patagonia Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 44: 229-238.
- Mestre MC, Rosa CA, Safar SVB, Libkind D & SB Fontenla (2011) Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in Northwestern Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 531-541.

- Middelhoven WJ (1997) Identity and biodegradative abilities of yeasts isolated from plants growing in an arid climate. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 81–89.
- Middelhoven WJ, Scorzetti G & JW Fell (2001) *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the loubieri / laibachii group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. *FEMS Yeast Research* 1: 15-22
- Mikola P (1989) The Role of Ectomycorrhiza In Forest Nurseries. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 28: 343-350
- Mogge BC, Loferer A, Agerer R, Hutzler P & A Hartmann (2000) Bacterial community structure and colonization patterns of *Fagus sylvatica* L. ectomycorrhizospheres as determined by fluorescence in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Mycorrhiza* 9: 271-278.
- Mohammadi K, Shiva Khalesro, Yousef Sohrabi & Gholamreza Heidari (2011) A review: beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *Journal of Applied Environmental Biological Science* 1: 310-319.
- Moliné M, Arbeloa EM, Flores MR, Libkind D, Fariñas ME, Bertolotti SG, Churio MS & MR van Broock (2011) UVB photoprotective role of mycosporines in yeast: photostability and antioxidant activity of mycosporine-glutaminol-glucoside. *Radiation Research* 175: 44-50.
- Moliné M, Libkind D, Diéguez MC & M van Broock (2009) Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 95: 156-161.
- Montgomery DC & GC runger (1996) Probabilidad y Estadística aplicadas a la ingeniería. McGraW Hill, Interamericana Editores, México.
- Moreira MSF & JO Siqueira (2006) Microbiología e bioquímica do solo 2da Ed. Editorial UFLA (Universidad Federal de Lavras), Mina Gerais, Brasil.
- Moyersoen B & AH Fitter (1999) Presence of arbuscular mycorrhizas in typical ectomycorrhizal host species from Cameroon and New Zealand. *Mycorrhiza* 8: 247-253.
- Muñoz MI (2010) Levaduras y hongos dimórficos del filoplano de *Nothofagus pumilio* y el papel de la exposición solar en su distribución y producción de metabolitos fotoprotectores. Tesis de Licenciatura, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Argentina.
- Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322.
- Nash SM (1965) Relative frequency of lesions on beans incited by common soil-borne pathogens. *Phytopathology*, 55: 126.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 70: 3321–3323.
- Nelson & Sommers (1996) Total carbon, Organic carbon and organic matter. *En: Sparks et al (ed.) Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods. SSSA Book Series Nr. 5: pp.961-1010.*
- Nichols D (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 351–357.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M & KH Larsson (2005) Approaching the taxonomic affiliation of unidentified sequences in public databases –an example from the mycorrhizal fungi. *BMC Bioinformatics* 6: 178.
- Nogales B (2005) La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 14: 41-51.
- Nouhra ER, Urcelay C, Longo MS & S Fontenla (2012) Differential hypogeous sporocarp production from *Nothofagus dombeyi* and *N. pumilio* forests in Southern Argentina. *Mycologia* 104:45-52.

- Nubel U, Garcia-Pichel F, Kiihl M & G Muyzer (1999) Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16s rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Applied Environmental Microbiology* 65: 422-430.
- O'Callaghan M & TR Glare (2001) Impacts of transgenic plants and microorganisms on soil biota. *New Zealand Plant Protection* 54: 105-110.
- Oliveira RS, Franco AR, Vosátka M & PML Castro (2010) Management of nursery practices for efficient ectomycorrhizal fungi application in the production of *Quercus ilex*. *Symbiosis* 52: 125-131.
- Page AL, Miller DH & DR Keeney (1982) Methods of Soil Analysis, Part 2, 2nd edn Chemical and microbiological properties. Agronomy Series 9 ASA SSSA, Madison, Wi. USA.
- Palfner G (1998) *Descolea antarctica*. En Agerer R (ed) Colour Atlas of Ectomycorrhizae, plate 116, Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Palfner G (2001) *Taxonomische Studien An Ektomykorrhizen Aus Den Nothofagus-Waldern*. Mittelsudchiles. Gebrüder Borntraeger Verlag, Alemania.
- Palfner G, Casanova-Katny MA & DJ Read (2005) The mycorrhizal community in a forest chronosequence of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] in Northern England. *Mycorrhiza* 15: 571-579.
- Paolocci F, Rubini A, Granetti B & Arcioni S (1999) Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 23-30.
- Paulitz TC & RR Bélanger (2001) Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103-133.
- Peakall R & PE Smouse (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pera J & J Parladé (2005) Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigaciones Agrarias y Sistemas de Recursos Forestales* 14: 419-433.
- Pestaña M & S Santolamazza (2011) Carbone Defoliation negatively affects plant growth and the ectomycorrhizal community of *Pinus pinaster* in Spain. *Oecologia* 165: 723-733.
- Peterson RL, Massicotte HB & LH Melville (2004) Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. NRC Research Press, CABI Publishing, Ottawa.
- Phillips JM & DS Hayman (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycological Society* 55: 158-161.
- Priha O & A Smolander (1997) Microbial biomass and activity in soil and litter under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at originally similar field afforestation sites. *Biology and Fertility of Soils* 24:45-51.
- Priha O, Grayston SJ, Hiukka R, Pennanen T & A Smolander (2001) Microbial community structure and characteristics of the organic matter in soils under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at low forest sites. *Biology and Fertility of Soils* 33: 17-24.
- Punja ZK & RS Utkhede (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* 21: 400-407.
- Pusey PL, Stockwell VO & M Mazzola (2009) Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 99: 571-581.
- Quoreshi AM (2003) Nutritional preconditioning and ectomycorrhizal formation of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. seedlings. *Eurasian Journal of Forest Research* 6: 1-63.

- Quoreshi AM, Piché Y & DP Khasa (2008) Field performance of conifer and hardwood species 5 years after nursery inoculation in the Canadian Prairie Provinces. *New Forest* 35: 235–253
- Rai M & A Varma (2011). Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae 1ra Ed. Soil Biology, Vol. 25. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Raidl S (1997) Studien zur Ontogenie an Rhizomorphen von Ektomykorrhizen. *Brbl Mycol* 169:1–184.
- Rao CS, Sharma GD & AK Shukla (1997) Distribution of ectomycorrhizal fungi in pure stands of different age groups of *Pinus kesiya*. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 85-91.
- Read DJ (1992) The mycorrhizal mycelium. En: Allen MF (ed) Mycorrhizal functioning. Chapman and Hall, New York: 102–132.
- Read DJ (1999) The ecophysiology of mycorrhizal symbiosis with special reference to impacts upon plant fitness. *En: Physiological Plant Ecology*. Press MC, JD Scholes y MG Barker (Eds.). Blackwell Science, London: 133-152.
- Reglinski T, Wurms K & P Elmer (2011) Short report on commercially available elicitors, natural products and microbes for evaluation against *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*. Plant & Food Research, Ruakura.
- Rhoades C (1997) Single-tree influences on soil properties in agroforestry ecosystems: lessons from natural and savannah ecosystems. *Agroforest Systems* 35: 71–94.
- Rinaldi AC, Comandini O & TW Kuyper (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33: 1–45.
- Rincón A, de Felipe MR & M Fernández-Pascual (2007) Inoculation of *Pinus halepensis* Mill. with selected ectomycorrhizal fungi improves seedling establishment 2 years after planting in a degraded gypsum soil. *Mycorrhiza* 18: 23–32.
- Rincón A, Parladé J & J Pera (2005) Effects of ectomycorrhizal inoculation and the type of substrate on mycorrhization, growth and nutrition of containerised *Pinus pinea* L. seedlings produced in a commercial nursery. *Annals of Forest Science* 62: 1–6.
- Rivas Y, Oyarzun C, Godoy R & E Valenzuela (2009) Mineralización del nitrógeno, carbono y actividad enzimática del suelo en un bosque de *Nothofagus obliqua* (Mirb) Oerst. y una plantación de *Pinus radiata* D. Don. del centro-sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 119-134.
- Rodríguez R, Matthei O & M Quezada (1983) Flora arbórea de Chile. Ediciones de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Roig FA (1998) La vegetación de la Patagonia. En: Correa, M.N. (Ed.), Flora Patagónica, Parte 1. Colección Científica INTA. Buenos Aires: 48-166.
- Ross D, Tate K & W Feltham (1996) Microbial biomass, and C and N mineralization, in litter and mineral soil of adjacent montane ecosystems in a southern beech (*Nothofagus*) forest and a tussock grassland. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 1613- 1620.
- Russo G, Libkind D, Sampaio JP & MR van Broock (2008) Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbiology Ecology* 65: 415-424
- Ryberg M, Erik K, Sjökvist E & RH Nilsson (2009) An outlook on the fungal internal transcribed spacer sequences in GenBank and the introduction of a web-based tool for the exploration of fungal diversity. *New Phytologist* 181: 471–477.
- Saari SK, Campbell CD, Russell J, Alexander IJ & IC Anderson (2005) Pine microsatellite markers allow roots and ectomycorrhizas to be linked to individual trees. *New Phytologist* 165: 295–304.
- Sabatier Y, Azpilicueta MM, Marchelli P, González-Peñalba M, Lozano L, García L, Martínez A, Gallo LA, Umaña F, Bran D & MJ Pastorino (2011) Distribución natural de *Nothofagus alpina* y *Nothofagus obliqua* (Nothofagaceae)

- en Argentina, dos especies de primera importancia forestal de los bosques templados norpatagónicos. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 46: 131-138.
- Saikkonen K, SH Faeth, M Helander & TJ Sullivan. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with their host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343.
- Satti P, Mazzarino M, Gobbi M, Funes F & L Roselli (2003) Soil N dynamics in relation to leaf litter quality and soil fertility in north-western Patagonian forests. *Journal of Ecology* 91: 173-181.
- Satyanarayana T & G Kunze (2009) Yeast Biotechnology: Diversity and applications. Yeast Biotechnology: Diversity and applications. Satyanarayana T. & G. Kunze (Eds.) Springer: 1-2.
- Schena L, Finetti SM & D Gallitelli (2002) Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease* 86: 54-60.
- Schinelli T & A Martinez (2010) Viverización de especies forestales nativas de nuestra región: Los *Nothofagus caducifolios* Parte 2: "Viverización en condiciones controladas. *Presencia* 55: 26-30.
- Schmidt O (2006) Wood Cell Wall Degradation. En: Schmidt O (Ed.), Wood and tree fungi. Biology, Damage, Protection and Use. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany: 87-108.
- Schoeman MW, Webber JF & DJ Dickinson (1999) The development of ideas in biological control applied to forest products. *International Biodeterioration and Biodegradation* 43: 109-123.
- Schramm JR (1966) Plant colonization studies on block wastes from anthracite mining in Pennsylvania. *Transaction of American Philosophy Society* 56: 1-189.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Schweitzer JA, Bailey JK, Fischer DG, LeRoy CJ, Lonsdorf EV, Whitham TG & SC Hart (2008a) Soil microorganism-plant interactions: heritable relationship between plant genotype and associated microorganisms. *Ecology* 89: 773-781.
- Schweitzer JA, Fischer DG, Rehill BJ, Wooley SC, Woolbright SA, Lindroth RL, Whitham TG, Zak DR & SC Hart (2011) Forest gene diversity is correlated with the composition and function of soil microbial communities. *Population Ecology* 53: 35-46.
- Shannon CE & Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU.
- Shubakov AA (2000) The B-Xylosidase production by yeast *Cryptococcus podzolicus*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 26: 550-552.
- Siciliano SD & JJ Germida (1999) Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the nontransgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 263-272
- Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM & R Molina (1997) Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579-582.
- Simons AJ & RRB Leakey (2004) Tree domestication in tropical agroforestry. *Agroforestry Systems* 61: 167-181.
- Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- Singer MJ & DN Munns (2006) Soils: an Introduction. Pearson Education Inc. New Jersey.
- Singer R & M Moser (1965) Forest mycology and forest communities in South America. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 26: 9-189.
- Singer R (1971) Forest mycology and forest communities in South America II. Mycorrhiza sociology and fungus succession in the *Nothofagus dombeyi* - *Austrocedrus chilensis* woods of Patagonia. Proceedings of the North American Conference on Mycorrhizae. USDA Misc. Publ.

- Singh GS, Kapoor A & SS Wange (1991) The enhancement of root colonisation of legumes by vesicular–arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi through the inoculation of the legume seed with commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Plant and Soil* 131:129–133.
- Sláviková E & R Vadkertiová (2000) The occurrence of yeasts in the forest soils. *Journal of Basic Microbiology* 40: 207–212.
- Sláviková E, Vadkertiová R & D Vránová (2007) Yeasts colonizing the leaf surfaces. *Journal of Basic Microbiology* 47: 344–350.
- Smalla K & JD Van Elsas (2010) The soil environment.. En: Liu WT & JK Janson (Eds.) *Environmental molecular microbiology*. Caister Academic Press. Norfolk, UK: 111-130.
- Smit E, Veenman C & J Baar (2003) Molecular analysis of ectomycorrhizal basidiomycete communities in a *Pinus sylvestris* L. stand reveals long-term increased diversity after removal of litter and humus layers. *FEMS Microbiology Ecology* 45: 49–57.
- Smith JE, Molina R, Huso MMP, Luoma DL, McKay D, Castellano MA, Lebel T & Y Valachovic Y (2002) Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in young, rotation-age, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, USA. *Canadian Journal of Botany* 80:186–204.
- Smith KP, Handelsman J & RM Goodman (1999) Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 96: 4786–4790.
- Smith ME, Douhan GW & DM Rizzo (2007) Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus* woodland. *Mycorrhiza* 18: 15–22.
- Smith ME, Greg WD & DM Rizzo (2007) Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps. *New Phytologist* 174: 847–863.
- Smith SE & Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic press, London.
- Soliani C, Sebastiani F, Marchelli P, Gallo LA & GG Ventrini (2010) Development of novel genomic microsatellite markers in the southern beech *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. *Molecular Ecology Resources* 10: 104-408.
- Sousa NR, Franco AR, Oliveira RS & PML Castro (2012) Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. *Journal of Environmental Management* 95: 269–274.
- Spencer JFT & DM Spencer (1997) Taxonomy: The Names of Yeasts. En: Spencer JFT & DM Spencer (Eds). *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Springer-Verlag Berlín, Alemania: 11-32.
- Sterflinger K (2006) Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Rosa CA & Peter G, eds. Springer Verlag, Berlin: 505-518.
- Sylvia D, Fuhrmann, J, Hartel P, & D Zuberer (2005) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Pearson Education Inc. New Jersey.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & S Kumar (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tedersoo L, May TW & ME Smith (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217–263
- Tedersoo L, Pärtel K, Jairus T, Gates G, Põldmaa K & H Tamm (2007) Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and host shifts from the native *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia*

- bijuga* (Caesalpinaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). *New Phytologist* 175: 321–333.
- Tedersoo L, Pärtel K, Jairus T, Gates G, Põldmaa K & H Tamm (2009b) Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environmental Microbiology* 11: 3166–7318.
- Thomson BD, Grove TS, Malajczuk N & GES Hardy (1994) The effectiveness of ectomycorrhizal fungi increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytologist* 126: 517–524.
- Thorn G (1997) The fungi in soil. *En: Modern soil microbiology*. Van Elsas JD, JT Trevors y EM H. Wellington (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, USA: 63–127.
- Timms-Wilson TM, Smalla K, Goodall TI, Houlden A, Gallego V & Bailey MJ (2006) Microbial diversity in the phyllosphere and rhizosphere of field grown crop plants: microbial specialization at the plant surface. *Microbial ecology of aerial plant surfaces* (Bailey MJ, Lilley AK, Timms-Wilson TM & Spencer-Phillips PTN, eds). CABI International, London: 21–36.
- Trappe JM (1996) What is a mycorrhiza? Proceedings of the 4th European Symposium on Mycorrhiza, Granada. EC Report EUR 16728: 2–9.
- Treseder KK & PM Vitousek (2001) Potential ecosystem-level effects of genetic variation among populations of *Metrosideros polymorpha* from a soil fertility gradient in Hawaii. *Oecologia* 126:266–275
- Trocha LK, Rudawska M, Leski T & M Dabert (2006) Genetic diversity of naturally established ectomycorrhizal fungi on Norway spruce seedlings under nursery conditions. *Microbial Ecology* 52: 418–425
- Twieg BD, Durall DM & SW Simard (2007) Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytologist* 176: 437–447.
- Ulloa J, Libkind D, Fontenla S & M van Broock (2009) Levaduras fermentadoras aisladas de *Cyttaria hariotii* (Fungi) en Bosques Andino-patagónicos (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 44: 239–248
- Unestam T & YP Sun (1995) Extramatrix structures of hydrophobic and hydrophilic ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 5: 301–311.
- Urquhart EJ & ZK Punja (1997) Epiphytic growth and survival of *Tilletiopsis pallescens*, a potential biological control agent of *Sphaerotheca fuliginea*, on cucumber leaves. *Canadian Journal of Botany* 75: 892–901.
- Vaartnou H, Tewari I & J Horricks (1974) Fungi associated with diseases on polish-type rape in Alberta. *Mycopathologia et Mycologia applicata* 52: 255–260.
- Valenzuela E, Hipp J, Alonso C, Godoy R, Alberdi M, Alvarez M & I Saavedra (2008) Physiological-enzymatic characteristics and inoculation of mycelia strains of *Descolea antarctica* Sing. in *Nothofagus* seedlings. *Electronic Journal of Biotechnology* 2: 1–17.
- Valenzuela E, Leiva S & R Godoy (1998) Micosociología en bosques de *Nothofagus* y plantaciones de *Pinus radiata* en la X Region de Chile: diversidad y rol ecológico. *Revista Chilena de Historia Natural* 71: 133–146.
- Varela S, Gyenge J, Fernández ME & T Schlichter (2008) Hacia la domesticación de especies forestales nativas y la importancia de los estudios en ecofisiología. *Patagonia Forestal*: 18 – 19.
- Vassilev N, Vassileva M, Azcon R & Medina A. 2001. Application of free and Ca-alginate entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil–plant system. *Journal of Biotechnology* 91:237–242.
- Vaz Aline BM, Luiz HR, Vieira MLA, de Garcia V, Brandão LR, Teixeira LCRS, Moliné M, Libkind D, van Broock M & CA Rosa (2011) The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 937–947.

- Vishniac HS (1995) Simulated in situ competitive ability and survival of a representative soil yeast *Cryptococcus albidus*. *Microbial Ecology* 30: 309–320.
- Vishniac HS (2006) A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microbial Ecology* 52: 90–103.
- Vogt KA, Grier CC & Meier CE (1982) Mycorrhizal role in net primary production and nutrient cycling in *Abies amabilis* ecosystems in western Washington. *Ecology* 63: 370–380.
- Wang B & YL Qiu (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299–363.
- Wang Q, He HX & DL Guo (2011). Ectomycorrhizal fungus communities of *Quercus liaotungensis* Koidz of different ages in a northern China temperate forest. *Mycorrhiza* 6: XXX-XXX.
- Weber E, Görke C & D Begerow (2002) The *Lecytophthora-Coniochaeta* complex II. Molecular studies based on sequences of the large subunit or ribosomal DNA. *Nova Hedwigia* 74: 187–200.
- Whipps JM, Hand P, Pink D & GD Bending (2008) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1744–1755.
- White TJ, Bruns T, Lee S & JW Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York: 315–322.
- Whitham TG *et al.* (2006) A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics* 7: 510–523.
- Whitham TG, Bailey JK, Schweitzer JA, Shuster SM, Bangert RK, LeRoy CJ, Lonsdorf EV, Allan GJ, DiFazio SP, Potts BM, Fischer DG, Gehring CA, Lindroth RL, Marks JC, Hart SC, Wim| GM & SC Wooley (2006) A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics* 7: 510–523.
- Whitham TG. *et al.* (2003) Community and ecosystem genetics: a consequence of the extended phenotype. *Ecology* 84: 559–573.
- Wright B, Rowse H & JM Whipps (2003) Application of beneficial microorganisms to seeds during drum priming. *Biocontrol Science Technology* 13: 599–614.
- Wurzburger N, Hartshorn AS & RL Hendrick. (2004) Ectomycorrhizal fungal community structure across a bog-forest ecotone in southeastern Alaska. *Mycorrhiza* 14: 383–389.
- Yarrow D (1998) Methods of isolation, maintenance and identification of yeasts (4th Edition). En: The Yeasts, A Taxonomic Study. Kurtzman y Fell (Eds.). Elsevier Science Publishers. Florida: 77–100.
- Young J (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Plant Physiology* 83: 702–708.
- Yurkov AM, Kemler M & D Begerow (2012) Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology* 5: 24–35.
- Zacchi L, Vauchan A & P Angelini (2003) Yeast distribution in a truffle–field ecosystem. *Annals of Microbiology* 53: 275–282.
- Zhdanova NM, Vasylevskaya AI, Tugay TI, Artyshkova LV, Nakonechnaya LT & J Dighton (2007) Results of 20 year monitoring of soil mycobiota within the 10-km alienation zone of the Chernobyl nuclear power plant. Abstr. XV Congress of European Mycologists. Saint Petersburg, Russia: 108.
- Zhdanova NM, Zakharchenko VO, Vasylevskaya AI, Shkolnyi OT, Nakonechnaya LT & LV Artyshkova (1994) Peculiarities of soil mycobiota composition in Chernobyl NPP. *Ukrayins'kyi. Bot Zhurn* 51: 134–143.
- Zhong Z & F Makeschin (2006) Differences of soil microbial biomass and nitrogen transformation under two forest types in central Germany. *Plant and Soil* 283: 287–297.

Zilberstein IM, Noy M, Levy E, Elkind G, Zeidan M, Teverovski E & IB Zeev (2007) Wilting Disease Of Young Avocado Trees Caused By *Neonectria radicola*. Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) Viña Del Mar, Chile. 12 – 16 Nov.

ARTÍCULO DE RESPALDO