



Universidad
Nacional
de Córdoba



Universidad Nacional de Córdoba.

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

Carrera de Ciencias Biológicas.

Ectomicorrizas en *Salix humboldtiana* Willd.: patrones de asociación
y especificidad en un gradiente amplio de distribución en Argentina

Tesinista: Magali Burni

Firma:

Director: Dr. Eduardo Nouhra

Firma:

Co-directora: Dra. Silvana Longo

Firma:

Laboratorio de Micología

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET-UNC)

Ectomicorrizas en *Salix humboldtiana* Willd.: patrones de asociación y especificidad en un gradiente amplio de distribución en Argentina

Tribunal Examinador

Dr. Nicolás Marro Firma:

Dr. Diego Gurvich Firma:

Dra. Laura Stiefkens Firma:

Calificación:

Fecha:

Ectomicorrizas en *Salix humboldtiana* Willd.: patrones de asociación y especificidad en un gradiente amplio de distribución en Argentina

Resumen

En Argentina, se conocen varios árboles ectomicorrícicos (ECM): *Salix humboldtiana*, *Alnus acuminata* y las especies de la familia Nothofagaceae. Éstas, se encuentran distribuidas a lo largo del país en un gradiente latitudinal. En el norte *A. acuminata* habita en la región fitogeográfica de Las Yungas, solapándose con la distribución de *S. humboldtiana* en las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán. Esta especie de *Salix* se extiende hacia el sur a través de la región Pampeana, hasta el norte de la Patagonia, donde se solapa con la distribución andina de las especies de Nothofagaceae. A la fecha se propone que las especies de *Salix* serían generalistas en la asociación ECM, si bien por el momento no hay estudios que evalúen concretamente la especificidad de *Salix humboldtiana*. El objetivo de este trabajo fue dilucidar si *S. humboldtiana* presenta algún grado de especificidad respecto a las especies fúngicas ectomicorrícicas a las cuales se asocia en Argentina. Para esto se evaluó si las raíces de *S. humboldtiana* se asocian exclusivamente a hongos ECM provenientes de su propia rizósfera o tienen la capacidad de asociarse a hongos pertenecientes a la rizósfera de árboles ECM con rango de distribución solapados, como lo son *A. acuminata* y especies de la familia Nothofagaceae. Para ello se hicieron crecer en condiciones controladas de invernadero plantines de *S. humboldtiana* con cinco inóculos micorrícicos de suelos diferentes. Tres inóculos fueron provenientes de su propia rizósfera de las regiones norte, centro y sur de Argentina, y dos con inóculo de la rizósfera de árboles que habitan en simpatria con *S. humboldtiana* como lo son *Alnus acuminata* y especies de Nothofagaceae. A partir de las raíces se determinó el porcentaje de colonización micorrícica total, el porcentaje de colonización de cada morfotipo, y la diversidad y riqueza de los mismos para cada uno de los cinco inóculos. Los principales resultados fueron: 1) Las raíces de *S. humboldtiana* se colonizaron exclusivamente por hongos ECM provenientes del inóculo micorrícico de su propia rizósfera de las zonas norte y centro. 2) Se identificaron un total de nueve morfotipos ECM. 3) La diversidad y riqueza de morfotipos fue igual para los plantines tratados con suelo de *S. humboldtiana* de las zonas norte y centro. Por lo tanto, estos resultados sugieren que *S. humboldtiana* sería específico para la asociación ECM y que las especies fúngicas a las cuales se asocia se mantienen relativamente constantes desde el norte al centro de su distribución en Argentina.

Palabras clave: *Salix humboldtiana*, *Alnus acuminata*, Nothofagaceae, especificidad ectomicorrícica, ectomicorrizas, hongos septados oscuros.

Introducción

La simbiosis ectomicorrícica es el tipo dominante de asociación en un gran grupo de plantas leñosas y numerosos hongos Basidiomycota y Ascomycota (Landeweert et al, 2001; Smith & Read, 1997). Existen unas 7750 especies de hongos ectomicorrícicos descritas, siendo ésta una estimación conservadora (Rinaldi et al, 2008), distribuidas en aproximadamente 251 géneros de hongos comprendidos en alrededor de 78 linajes predefinidos (Tedersoo et al, 2010 y Tedersoo & Smith, 2013). Las ectomicorrizas (ECM) como estructura anatómica se ubican en los extremos de las raíces secundarias más finas y se caracterizan por la presencia de tres componentes estructurales: 1. Un manto de hifas fúngicas que envuelve la raíz, 2. Una red de hifas (Red de Hartig) presente entre las células epidérmicas y corticales de la raíz y 3. Sistema de hifas o micelio extraradical que se proyecta hacia afuera de la raíz y está en contacto con el suelo circundante (Smith & Read, 2008). Estos componentes son entidades metabólicas activas que en conjunto proporcionan nutrientes esenciales (fósforo, nitrógeno, etc.) a la planta hospedadora, a cambio de la provisión de carbohidratos, haciendo de esta relación una simbiosis mutualista (Martin et al, 2001). En la anatomía y organización de estos tejidos fúngicos (manto) se basa la descripción de morfotipos ectomicorrícicos, con el fin de facilitar su estudio (Agerer, 1991). Los morfotipos presentan características particulares a cada par de especies en simbiosis (hospedante vegetal/especie fúngica), y se han utilizado ampliamente para el estudio de las ectomicorrizas (Agerer, 1991). Por otra parte, se conocen alrededor de 6000 especies de plantas ECM (Brundrett, 2009) y aunque es un número relativamente pequeño, probablemente menor del 5% (Meyer, 1973) del total de fanerógamas, su importancia global es considerable por la desproporcionada ocupación de la superficie terrestre, formando extensos bosques distribuidos en las regiones templadas y frías del planeta, y por su valor económico como principales productores de madera. Más específicamente, en Argentina se conocen hasta el momento las siguientes especies arbóreas ectomicorrícicas: sauce criollo (*Salix humboldtiana* Willd., Salicaceae), aliso del cerro (*Alnus acuminata* Kunth, Betulaceae) y varias especies de Nothofagaceae: raulí (*Lophozonia alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst.), roble pellín (*L. obliqua* (Mirb.) Oerst.); ñire (*Nothofagus antarctica* (G. Forst.) Oerst.), coihue (*N. dombeyi* (Mirb.) Oerst.), lenga (*N. pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser) y guindo (*N. betuloides* (Mirb.) Oerst.).

Los sauces (*Salix* L.) se distribuyen principalmente en el Hemisferio Norte con algunos pocos representantes en el Hemisferio Sur (Kuzovkina, 2008). *S. humboldtiana* o sauce criollo es la única especie nativa de América del Sur (Ragonese et al, 1987; García Berguecio & Ormazabal Pagliotti, 2008) y habita márgenes de ríos y riberas arenosas (Liotta, 2001) desde México hasta la región sur de Argentina (Chubut) (Ragonese, 1987; Demaio et al, 2002). Hasta el momento se han identificado unas pocas especies de hongos Basidiomycota ECM asociados a sus raíces y en estudios restringidos a ejemplares del centro de Argentina como así también, especies fúngicas formadoras de micorrizas arbusculares (MA) y hongos endófitos septados oscuros (SO) (Lugo et al, 2012; Becerra et al, 2009a; Fracchia et al, 2009).

El género *Alnus* Mill. posee una distribución similar a *Salix* con numerosas especies distribuidas en el hemisferio Norte, y una única especie en América del Sur, *A. acuminata*, que habría migrado desde México a lo largo de los Andes hasta el norte de Argentina (Furlow, 1979; Holdrige, 1951; Russo, 1990; Kennedy et al, 2011; Nouhra et al, 2015). En Argentina, *A. acuminata* se distribuye en bosques de montaña entre los 1700 y 2700 m s.n.m. en la región biogeográfica de las Yungas (Grau et al, 2003), asociándose en simbiosis con hongos ECM, MA y actinobacterias fijadoras de nitrógeno del género *Frankia* (Molina, 1981; Nouhra et al, 2015; Becerra et al, 2005a; Becerra et al, 2009b).

Por otra parte, *Nothofagus* y *Lophozonia* (Nothofagaceae) habitan en el hemisferio Sur, encontrándose actualmente varias especies en América del Sur, Australia, Nueva Zelanda, Nueva Caledonia y Tasmania (Swenson et al, 2001). En la región Patagónica, las Nothofagaceas constituyen el mayor componente de los bosques templados subantárticos (Fernández et al, 2015; Trierveiler-Pereira et al, 2014). Las raíces de estas especies son colonizadas por una gran variedad de hongos ECM (Nouhra et al, 2013; Fernández et al, 2015), y en menor medida se han registrado asociaciones con SO en plantas cultivadas en invernadero (Salgado Salomón et al, 2013) y en árboles de *L. alpina* (Fernández et al, 2015), y con MA en *N. dombeyi* (Bidartondo et al, 2002).

Cabe destacar que estas especies arbóreas se encuentran distribuidas a lo largo del territorio argentino en un gradiente latitudinal. En el norte *A. acuminata* se distribuye en la región fitogeográfica de Las Yungas, alcanzando su punto más austral en la provincia de Catamarca (Becerra et al, 2005b), y solapándose con la distribución de *S. humboldtiana* en las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán (Ragonese, 1987) en los cinturones de vegetación intermedios y bajos de las Yungas. Esta especie de *Salix* se extiende hacia el sur a través de la región Pampeana, alcanzando el norte de la Patagonia, donde se solapa nuevamente, pero en este caso con la distribución andina

de las especies de *Nothofagus* y *Lophozonia* (Nouhra et al, 2012; Trierveiler-Pereira et al, 2014).

Numerosas evidencias empíricas postulan que la composición de especies de las comunidades de hongos ECM se encuentra modelada por la interacción de varios factores que operan a diferentes escalas e incluyen procesos históricos, ecológicos y ambientales, entre otros (Taylor, 2008; Tedersoo et al, 2012). En algunos casos, un buen predictor de la composición de especies de las comunidades de hongos ECM es la presencia y dominancia de determinadas plantas huésped (afiliación taxonómica) (Bahram et al, 2012; Urbanová et al, 2015) que a su vez pueden poseer preferencias a la hora de asociarse con sus simbioses, lo que se conoce como rangos de receptividad, que varían desde un número restringido a uno más amplio de socios fúngicos, y pudiendo además constituir simbiosis facultativas u obligadas y de mayor o menor especificidad (Molina et al, 1992). Por ejemplo, se propone que especies arbóreas de alta especificidad ECM y amplia distribución geográfica presentan una comunidad fúngica estable. Kennedy et al (2011) y Nouhra et al (2015), analizaron hongos ECM asociados a las especies de *Alnus* del continente americano y observaron que la composición de las comunidades fúngicas se mantiene constante, con pocas diferencias a nivel global y sus hospedantes muestran una alta especificidad por sus simbioses, asociándose con especies fúngicas de un set acotado de linajes ECM. Por otro lado, resulta difícil predecir las comunidades ECM asociadas a especies arbóreas de baja especificidad o rangos de receptividad amplios, debido a que pueden ser otros los factores que determinan la asociación. Es por esto que, además de la influencia que tiene la especie hospedadora (afiliación taxonómica) y sus niveles de especificidad y rango de receptividad, las condiciones bióticas y abióticas propias de cada región (Brundrett, 1991; Taylor, 2008; Bahram et al, 2012; Tedersoo et al, 2012; Toljander et al, 2006) y la estación (Harvey et al, 1978; Becerra et al, 2005a; Becerra et al, 2005c) pueden afectar de manera directa la composición de las comunidades de hongos ECM. Además, se ha visto que la abundancia de los morfotipos y especies fúngicas puede variar con el transcurso del tiempo (Miller et al, 1992).

Los árboles ectomicorrícicos nativos de Argentina presentan diferentes grados de especificidad. *A. acuminata* ha mostrado alta especificidad, por unos pocos linajes de hongos ECM (Becerra et al, 2005a; Becerra et al, 2005c; Kennedy et al, 2011; Nouhra et al, 2015). Además, es una especie altamente dependiente de su comunidad fúngica para poder suplir el alto consumo de fósforo demandado por las actinobacterias simbioses, *Frankia*, en la fijación de nitrógeno en sus raíces (Benson & Clawson, 2000). Por otro lado, las especies de los géneros *Nothofagus* y *Lophozonia*, son menos específicas y se consideran de rango de receptividad amplio ya que se asocian a un

mayor número de simbioses ECM de linajes diversos (Nouhra et al, 2013; Fernández et al, 2015; Tedersoo et al 2008; 2009). Al igual que *A. acuminata*, son simbioses ECM obligados y esto resulta lógico porque los suelos andino-patagónicos poseen alta retención de fósforo y por ello este nutriente está limitado para el uso de las plantas (Diehl et al, 2008; Mazzarino & Gobbi, 2005). Por último, se ha propuesto que *Salix* spp. poseen baja especificidad y se asocian con hongos ECM que presentan una distribución cosmopolita y que serían compatibles con una amplia gama de huéspedes (Nara & Hogetsu, 2004; Nara, 2006; Tedersoo et al, 2010; Tedersoo et al, 2013; Ryberg et al, 2011). Por otro lado, se sabe que las especies de *Salix* de otras regiones son facultativas para la simbiosis ECM (Meyer, 1973). En Argentina no hay estudios que evalúen los patrones de asociación y especificidad de *S. humboldtiana* respecto a las comunidades fúngicas asociadas a su rizósfera en un gradiente amplio de distribución.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo es dilucidar si *S. humboldtiana* presenta algún grado de especificidad respecto a las especies ectomicorrícicas a las cuales se asocia en Argentina. Para esto se evaluará si las raíces de *S. humboldtiana* se asocian exclusivamente a hongos ECM provenientes de su propia rizósfera o tienen la capacidad de asociarse, además a hongos pertenecientes a la rizósfera de árboles ECM con rango de distribución solapados en Argentina, como lo son *A. acuminata* y especies de la familia Nothofagaceae. De acuerdo a los antecedentes reportados hasta el momento para la mayoría de las especies de *Salix* se predice que *S. humboldtiana* se asocie a hongos ECM pertenecientes a su propia rizósfera y a la rizósfera de *A. acuminata* y Nothofagaceae. Es decir que el factor afiliación taxonómica de los simbioses ECM tenga una baja incidencia en la composición de especies asociadas a sus raíces. Por lo tanto, se postula que la composición de especies de hongos ECM en las raíces de *S. humboldtiana* en su amplia distribución estará principalmente explicada por la disponibilidad de inóculo de cada rizósfera. Se propone, que las comunidades fúngicas asociadas a las raíces de *S. humboldtiana* serán distintas entre las tres regiones de estudio. Para ello se hará crecer en condiciones controladas de invernadero plantines de *S. humboldtiana* con inóculo micorrícico proveniente de su propia rizósfera de tres regiones (norte, centro y sur de Argentina) y con inóculo micorrícico de la rizósfera de las otras especies arbóreas en cuestión, *Alnus acuminata* y especies de Nothofagaceae, que habitan en simpatria con *S. humboldtiana*, pero con rangos mutuamente excluyentes entre ellas dos, en las regiones norte y sur del país, respectivamente.

Objetivos

-Objetivo general

- Evaluar si *S. humboldtiana* tiene algún grado de especificidad o no respecto a los hongos ECM a los que se asocia en Argentina.

-Objetivos particulares

- Estimar el porcentaje de colonización ECM total y porcentaje de colonización de cada morfotipo ECM en cada muestra y tratamiento.
- Cuantificar la riqueza y diversidad de morfotipos ECM asociados a *S. humboldtiana* en los tratamientos con diferentes suelos utilizados como inóculo y tiempos de cosecha.
- Evaluar si existen diferencias en el porcentaje de colonización total ECM y de cada morfotipo y en la diversidad y riqueza de los morfotipos según los tratamientos procedencia del inóculo y tratamiento tiempo de cosecha.
- Describir macro morfológicamente y fotografiar los morfotipos ECM observados.

Materiales y métodos

Obtención de estacas de *Salix humboldtiana*

En invierno, se obtuvieron 60 estacas de 30-40 cm de largo y 1-5 cm de diámetro a partir de ramas del año anterior de un individuo de *S. humboldtiana* en la localidad de La Calera (Córdoba) (31°21'20.0"S; 64°21'42.1"O) dónde existe una población natural en la ribera del río. En invernadero se les colocó hormona de enraizamiento (ác. giberélico) en el extremo basal y se plantaron en macetas con arena estéril. Las macetas se colocaron sobre una mesada calefaccionada, a fin de estimular el enraizamiento, con condiciones de riego por aspersión tres veces al día (08:00hs, 13:00 hs. y 18:00 hs), durante 30 días. El protocolo de enraizamiento fue provisto por el INTA., EEA Bariloche.

Obtención de inóculos

Las muestras de suelo y raíces fueron colectadas con pala bajo la canopia de especies de Nothofagaceae y *S. humboldtiana* en la Patagonia Argentina (sur), de *A. acuminata* y *S. humboldtiana* del norte del país (norte) y de *S. humboldtiana* en la provincia de Córdoba (centro), donde en esta última región no coexiste con los otros árboles ECM mencionados.

Sitios de colección:

Suelo de *S. humboldtiana*

- NORTE: localidades de Lamadrid (27°38'42"S; 65°14'49"O) y Rio Chico (27°28'45"S; 65°37'36"O), prov. de Tucumán.

- SUR: localidad de Los Altares (43°52'58.06"S; 68°24'33.03"O), prov. de Chubut.
- CENTRO: en la localidad de Río Chico, Nono (31°46'00"S; 64°59'56"O), prov. de Córdoba.

Suelo de *A. acuminata*

- NORTE: localidades de Lamadrid (27°38'42"S; 65°14'49"O), Las Lenguas (27°19'41.07"S; 65°55'56.58"O) y camino a Tafí del Valle (26°52'00"S; 65°41'00"O), prov. de Tucumán.

Suelo de Nothofagaceae (*N. dombeyii*, *N. antartica*, *N. pumilio*, *L. alpina* y *L. oblicua*).

- SUR: localidades de Hua hum camino al Lago Queñi (40°7'4.07"S; 71°40'17.11"O); Laguna Verde (39°49'59.10"S; 71°32'14.00"O) y Camino a Lahuencó (39°49'2.14"S; 71°37'28.82"O) en Parque Nacional Lanín. Camino de los Siete Lagos (40°28'58.89"S; 71°37'58.43"O), Brazo la Última Esperanza (40°41'25.41"S; 71°43'29.14"O), prov. de Neuquén. Localidades de Pampa Linda (41°13'53.97"S; 71°46'25.91"O), Lago Mascardi (41°15'52.56"S; 71°39'13.34"O) y Cerro Tronador (41°11'51.40"S; 71°49'57.07"O), Parque Nacional Nahuel Huapi, prov. de Río Negro.

Para los ensayos de invernadero las muestras de suelo provenientes de cada hospedante y región fueron homogeneizados, totalizando así cinco inóculos: 1. Suelo de *S. humboldtiana* NORTE, 2. Suelo de *A. acuminata* NORTE, 3. Suelo de *S. humboldtiana* CENTRO, 4. Suelo de *S. humboldtiana* SUR, 5. Suelo de Nothofagaceae SUR.

Tratamientos

Para los tratamientos de procedencia del inóculo, se cultivaron las estacas enraizadas de *S. humboldtiana* en cada tipo de suelo, según se detalla:

1. *S. humboldtiana* en suelo inóculo de *S. humboldtiana*, NORTE (de ahora en adelante *Salix* norte).
2. *S. humboldtiana* en suelo inóculo de *A. acuminata*, NORTE (*Alnus*).
3. *S. humboldtiana* en suelo inóculo de *S. humboldtiana*, CENTRO (*Salix* centro).
4. *S. humboldtiana* en suelo inóculo de *S. humboldtiana*, SUR (*Salix* sur).
5. *S. humboldtiana* en suelo inóculo de Nothofagaceae, SUR (Nothofagaceae).

Además, se realizaron dos tiempos de cosecha conformando otros tratamientos:

1. Primer tiempo de cosecha, siete meses después de haber colocado las estacas en sus respectivos suelos inóculo.
2. Segundo tiempo de cosecha, diez meses después de haber colocado las estacas en sus respectivos suelos inóculo (tres meses después del primer tiempo de cosecha).

Un total de 59 estacas previamente enraizadas (doce para cada tratamiento de procedencia del inóculo, excepto en *Salix* centro donde fueron once por falta de las mismas) se trasplantaron a tubetes de plástico individuales (con capacidad de 350 ml. o 450 g. de suelo) con suelo/inóculo de cada uno de los tratamientos arriba mencionados. El suelo fue previamente mezclado con arena esterilizada en proporción 1:1. Los mismos se rotularon y permanecieron en invernadero en gradillas plásticas por separado. Las estacas se regaron por aspersión tres veces al día (08:00hs, 13:00 hs y 18:00 hs) y cada tubete fue rotado periódicamente de lugar dentro de las gradillas a fin de homogeneizar las posibles variaciones en condiciones de luz, riego, etc.

Luego de siete meses aproximadamente, se analizaron las raíces de la mitad de las plantas en una primera cosecha (seis plantas de cada procedencia de inóculo) y a los diez meses luego del inicio del experimento, la otra mitad en una segunda cosecha (las seis plantas restantes de cada procedencia del inóculo, excepto en *Salix* centro donde fueron cinco).

Análisis de las raíces de plantines de *S. humboldtiana*

- Aislamiento de raíces

Para la observación de la parte radical, cada estaca fue extraída con el suelo de cultivo y sus raíces lavadas cuidadosamente bajo el agua de la canilla evitando que las mismas se rompan. Se separó la parte aérea de la radical y ésta última se puso en un recipiente con agua para su posterior observación.

- Recuento de colonización

Por cada planta se tomó una submuestra del sistema radical constituida por un volumen uniforme de raíces suficientes para completar una caja de Petri con superficie de 63,62 cm². Las raíces se observaron bajo lupa estereoscópica LF Wild M5A en una caja de Petri cuadrículada con espacios de 1 x 1 cm de lado (1cm²) y sumergidas en agua con el fin de cuantificar siguientes ítems:

- Extremos radicales colonizados: valor obtenido como la sumatoria de los extremos radicales colonizados por la totalidad de los morfotipos observados en cada submuestra.
- Extremos radicales no colonizados: Número total de los extremos radicales no colonizados por ECM en cada sub muestra.

- Extremos radicales totales: corresponde al total de extremos radicales contabilizados.
- Extremos colonizados por morfotipo: valor obtenido de la sumatoria de extremos radicales observados para cada morfotipo en cada submuestra.

Luego, con dichos valores se calculó:

- El porcentaje de colonización total como el número de extremos radicales colonizados dividido por el número total de extremos radicales observados en cada submuestra (Gehring & Whitham, 1994) y este valor expresado en porcentaje.
- El porcentaje de colonización para cada morfotipo como el número de extremos radicales colonizados por cada morfotipo dividido el número total de extremos radicales colonizados contabilizados en cada submuestra, multiplicado por 100 (Helm et al, 1999 modificado).

-Caracterización de morfotipos

En la misma submuestra los tipos radicales colonizados fueron separados y clasificados en morfotipos según sus características morfológicas descriptivas, como color y apariencia del manto, presencia y tipo de ramificaciones, presencia de hifas emanantes y cistidios, etc. (Agerer, 1991). A cada morfotipo se le asignó un nombre y se le tomaron fotografías bajo la lupa.

Luego se revisó la muestra en su totalidad, a fin de registrar la presencia de algún morfotipo no observado en la submuestra seleccionada.

Análisis de datos

El procesamiento de los datos fue realizado mediante un análisis de Modelo Lineal Generalizado (MLG) con dos factores y la interacción entre los mismos: procedencia del inóculo con los niveles *Salix* norte, *Alnus*, *Salix* centro, *Salix* sur y *Nothofagaceae*; y tiempo de cosecha con los niveles primer tiempo de cosecha y segundo tiempo de cosecha. Se utilizó el índice de Simpson como indicador de la diversidad de los morfotipos en cada muestra y tratamiento. Se consideró la riqueza como el número total de morfotipos presentes en cada tratamiento.

Los análisis se realizaron usando el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al, 2017).

Resultados

Colonización micorrícica de las raíces:

Se observó la colonización de las raíces por hongos ectomicorrícicos (ECM). A continuación, se describen características y parámetros observados.

Porcentaje de colonización ECM total

Fueron contabilizados un total de 21090 extremos radicales a partir de los 59 plantines de *S. humboldtiana* analizados. De éstos, 1459 (6,92%) extremos se encontraron colonizados por tejido fúngico ECM, en 20 plantines.

Los resultados obtenidos muestran que las raíces de *S. humboldtiana* fueron colonizadas por hongos ECM provenientes de dos de los cinco inóculos utilizados: suelo propio de la rizósfera de sauce criollo del norte y del centro del país. Los plantines inoculados con *Salix* norte presentaron un 23,15% de colonización total mientras que los que crecieron bajo el tratamiento *Salix* centro presentaron un 13,47% de colonización total (fig. 1), siendo estos valores significativamente diferentes ($p= 0,02$). Los plantines que crecieron bajo los tratamientos *Alnus*, *Salix* Sur y *Nothofagaceae* no presentaron colonización por hongos ECM (fig. 1).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de colonización total entre la primera (21,98 %) y segunda cosecha (14,06 %) ($p= 0,06$) (fig. 2), ni para la interacción de los factores procedencia del inóculo y tiempo de cosecha ($p= 0,14$) (29,97% para la primera cosecha de *Salix* norte y 15,88% para la segunda; 13,98% para la primera cosecha de *Salix* centro y 12,25% para la segunda cosecha) (fig. 3).

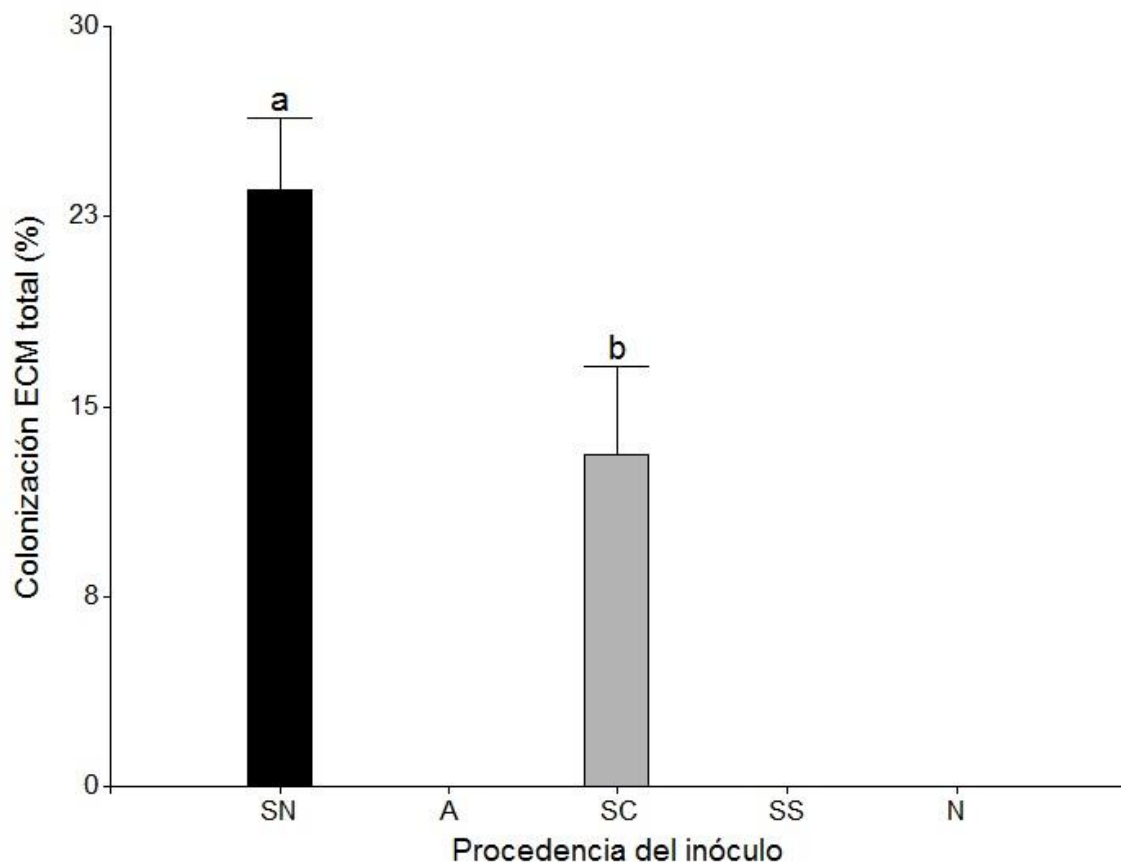


Figura 1. Porcentaje de colonización ECM total en raíces de plántulas de *S. humboldtiana* con inóculo proveniente de *S. humboldtiana* del norte de Argentina (SN); *A. acuminata* (A), *S. humboldtiana* del centro (SC), *S. humboldtiana* del sur (SS) y Nothofagaceae (N). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

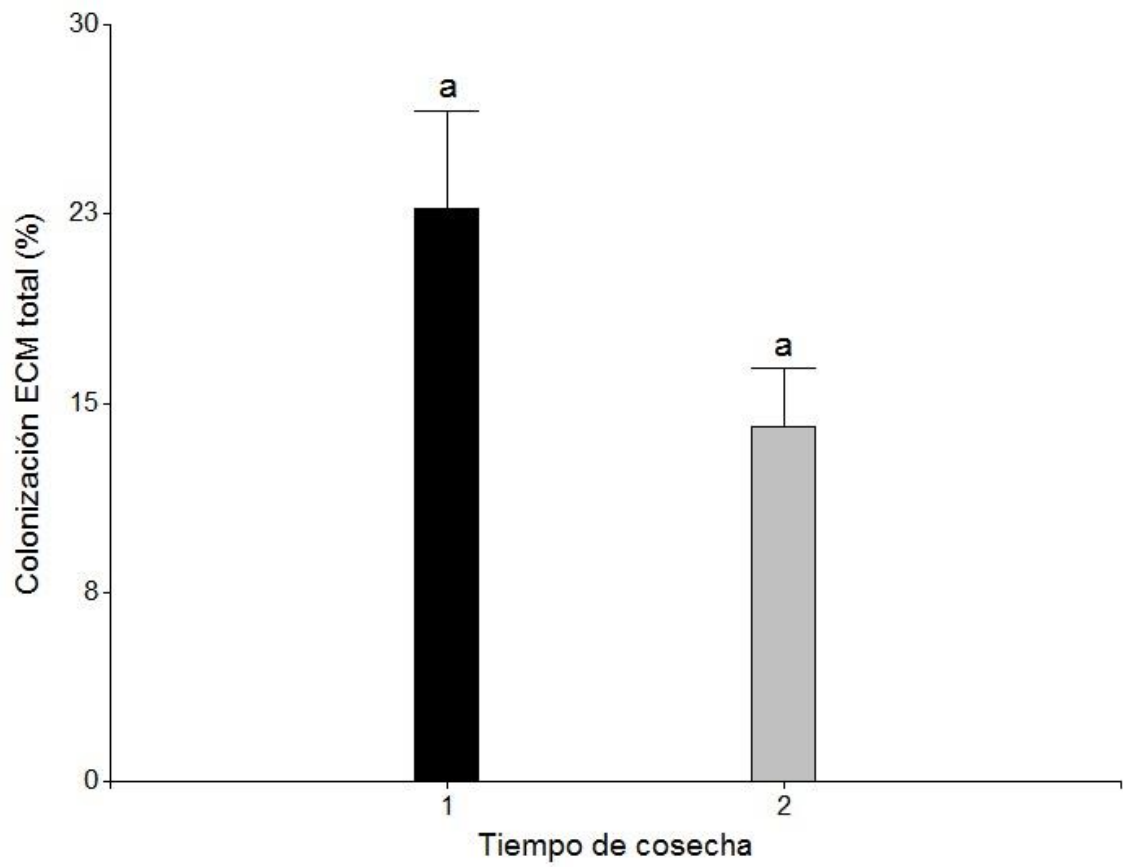


Figura 2. Porcentaje de colonización ECM total en los tiempos de cosecha 1 (7 meses) y 2 (10 meses). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

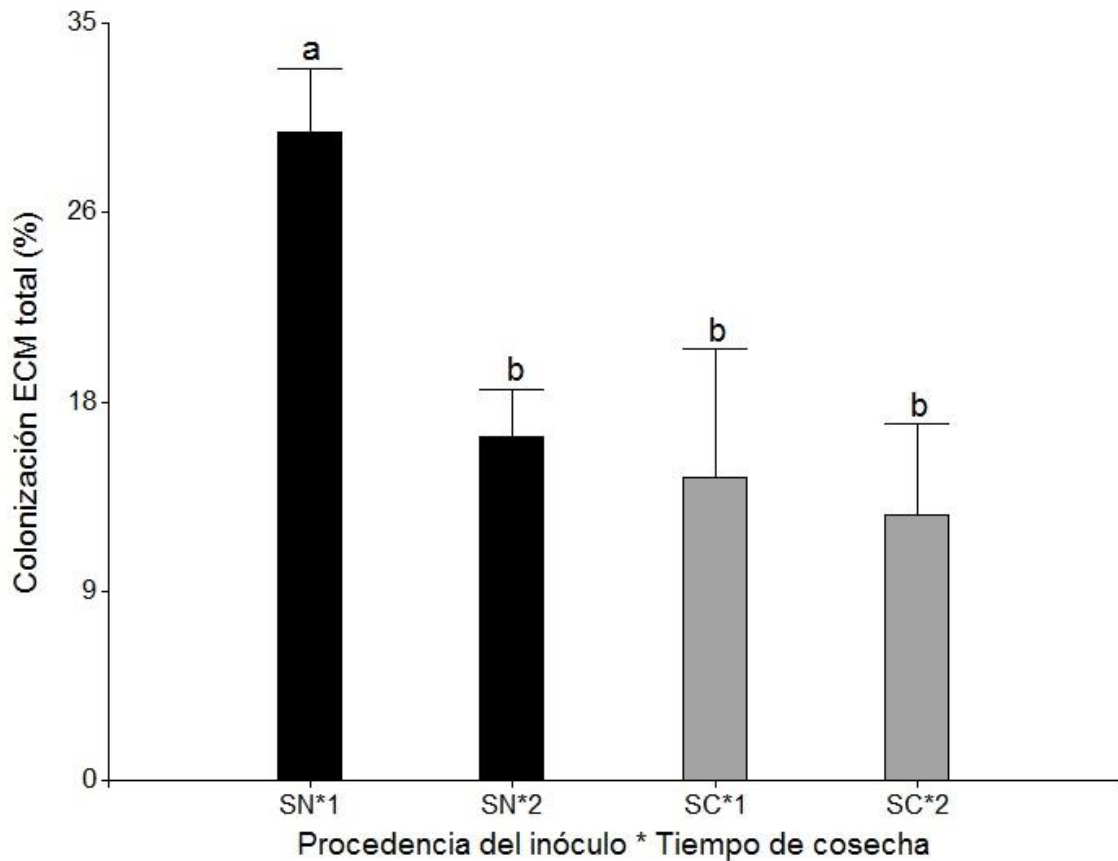


Figura 3. Porcentaje de colonización total por hongos ECM en raíces de plántulas de *S. humboldtiana* cosechadas en el tiempo 1 (7 meses) y 2 (10 meses) con inóculo proveniente de *S. humboldtiana* del norte (SN) y *S. humboldtiana* del centro de Argentina (SC). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

SN*1: Interacción entre procedencia del inóculo SN y tiempo de cosecha 1.

SN*2: Interacción entre procedencia del inóculo SN y tiempo de cosecha 2.

SC*1: Interacción entre procedencia del inóculo SC y tiempo de cosecha 1.

SC*2: Interacción entre procedencia del inóculo SC y tiempo de cosecha 2.

Caracterización de morfotipos ECM

Un total de nueve morfotipos fueron identificados, y clasificados de la siguiente manera: M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 y M9.

Los plantines que crecieron con inóculo micorrícico proveniente de *Salix* del norte fueron colonizados por seis morfotipos en total (M1, M3, M4, M5, M6 y M7), mientras que los plantines que crecieron con inóculo de *Salix* del centro de Argentina fueron colonizados por ocho (M1, M2, M3, M4, M5, M7, M8 y M9), siendo cinco los morfotipos que se encontraron en ambos tratamientos. El morfotipo M6 sólo fue encontrado en el tratamiento *Salix* norte, mientras que los morfotipos M2, M8 y M9 fueron solo observados en *Salix* centro.

Los morfotipos más abundantes que crecieron en las raíces bajo los tratamientos de procedencia de inóculo *Salix* centro y *Salix* norte fueron M1 y M4. Específicamente, en *Salix* norte M4 presentó un promedio de colonización de 49,64%, seguido por M1 con 25,18%, mientras que los morfotipos M3, M5, M6 y M7 tuvieron los porcentajes de menor valor con 8,02%, 5,18%, 6,09% y 5,89%, respectivamente. En cambio, en *Salix* centro M4 tuvo el mayor porcentaje de colonización con un valor promedio de 46,62%, seguido por M1 con 38,82%, M5 tuvo un valor intermedio con 9,28%, M9 con 2,11%, M7 con 1,69% mientras que M2, M3 y M8 obtuvieron los porcentajes de colonización más bajos con valores menores al 1%.

Se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de cosecha para los morfotipos M1 y M4. El morfotipo M1 fue más abundante en el primer tiempo de cosecha ($p=0,03$), mientras que M4 lo fue en el segundo tiempo de cosecha ($p=0,02$) (Tabla 1).

El porcentaje de colonización del morfotipo M5 presentó diferencias significativas ($p=0,04$) en la interacción entre los factores procedencia del inóculo y tiempo de cosecha; esto es debido a que el tratamiento *Salix* centro presentó valores de colonización más altos en el segundo tiempo de cosecha (25,83%) respecto al primero (3,72%), mientras que para el tratamiento *Salix* norte el patrón fue inverso (6,28% en el primer tiempo de cosecha y 2,66% en el segundo). No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de colonización de los diferentes morfotipos entre los tratamientos *Salix* norte y *Salix* centro ($p > 0,05$).

Un morfotipo, denominado M10, fue identificado en pequeña proporción en el primer tiempo de cosecha de *Salix* centro, pero fuera de la unidad muestral por lo que no se tuvo en cuenta en los análisis estadísticos.

Morfotipo	Factor	Nivel del factor	Media (%)
M1	TC	TC 1	46,32
		TC 2	17,45
M4	TC	TC 1	27,94
		TC 2	56,50

Tabla 1. Medias de los porcentajes de colonización ECM de los morfotipos para los tratamientos con diferencias significativas.

TC: tiempo de cosecha.

TC 1: primer tiempo de cosecha.

TC 2: segundo tiempo de cosecha.

Riqueza y diversidad de morfotipos ECM

La riqueza y diversidad de los morfotipos ECM no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de procedencia de inóculo *Salix* norte y *Salix* centro (riqueza con $p = 0,1$ y diversidad con $p = 0,41$), tiempos de cosecha ($p = 0,41$ para la riqueza y $p = 0,65$ para la diversidad) ni para la interacción entre dichos factores ($p = 0,17$ para la riqueza y $p = 0,57$ para la diversidad) (tabla 2).

	Procedencia del inóculo		Tiempo de cosecha		Interacción procedencia del inóculo x tiempo de cosecha			
	SN	SC	1	2	SN*1	SN*2	SC*1	SC*2
Índice de Simpson	0,47	0,58	0,47	0,58	0,40	0,56	0,56	0,59
Riqueza	6	8	8	6	6	5	6	6

Tabla 2. Valores del índice de Simpson y riqueza para los tratamientos procedencia del inóculo, tiempo de cosecha y la interacción entre procedencia del inóculo y tiempo de cosecha.

SN: *Salix* norte; SC: *Salix* centro; 1: primer tiempo de cosecha; 2: segundo tiempo de cosecha; SN*1: primer tiempo de cosecha de *Salix* norte; SN*2: segundo tiempo de cosecha de *Salix* norte; SC*1: primer tiempo de cosecha de *Salix* centro; SC*2: segundo tiempo de cosecha de *Salix* centro.

Además de las ECM, una gran cantidad de raíces presentaron colonización por hongos septados oscuros (SO) (Ascomycota), por lo que se consideró interesante reportar este dato. Las mismas fueron reconocidas por la presencia de hifas marrón oscuro creciendo paralelas al eje longitudinal de las raíces o formando manto incompleto o en parches y poco desarrollado. En este último caso se observó en microscópico óptico una disposición pseudoparenquimatosa de las hifas y, en algunas raíces, la presencia de hifas densamente compactadas con pared gruesa formando microesclerocios (figura 4). Las raíces colonizadas por SO fueron contabilizadas con la misma metodología usada para las colonizadas por ECM.

Se encontraron extremos colonizados por SO en todos los tratamientos de procedencia del inóculo, excepto en Nothofagaceae, con diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre los porcentajes de colonización. En *Salix* sur y *Alnus* se encontraron los mayores porcentajes promedio de colonización: 38,23% y 26,63% respectivamente,

mientras que en los tratamientos *Salix* centro se observó un 7,65% y en *Salix* norte, 3,37% de colonización promedio (figura 5).

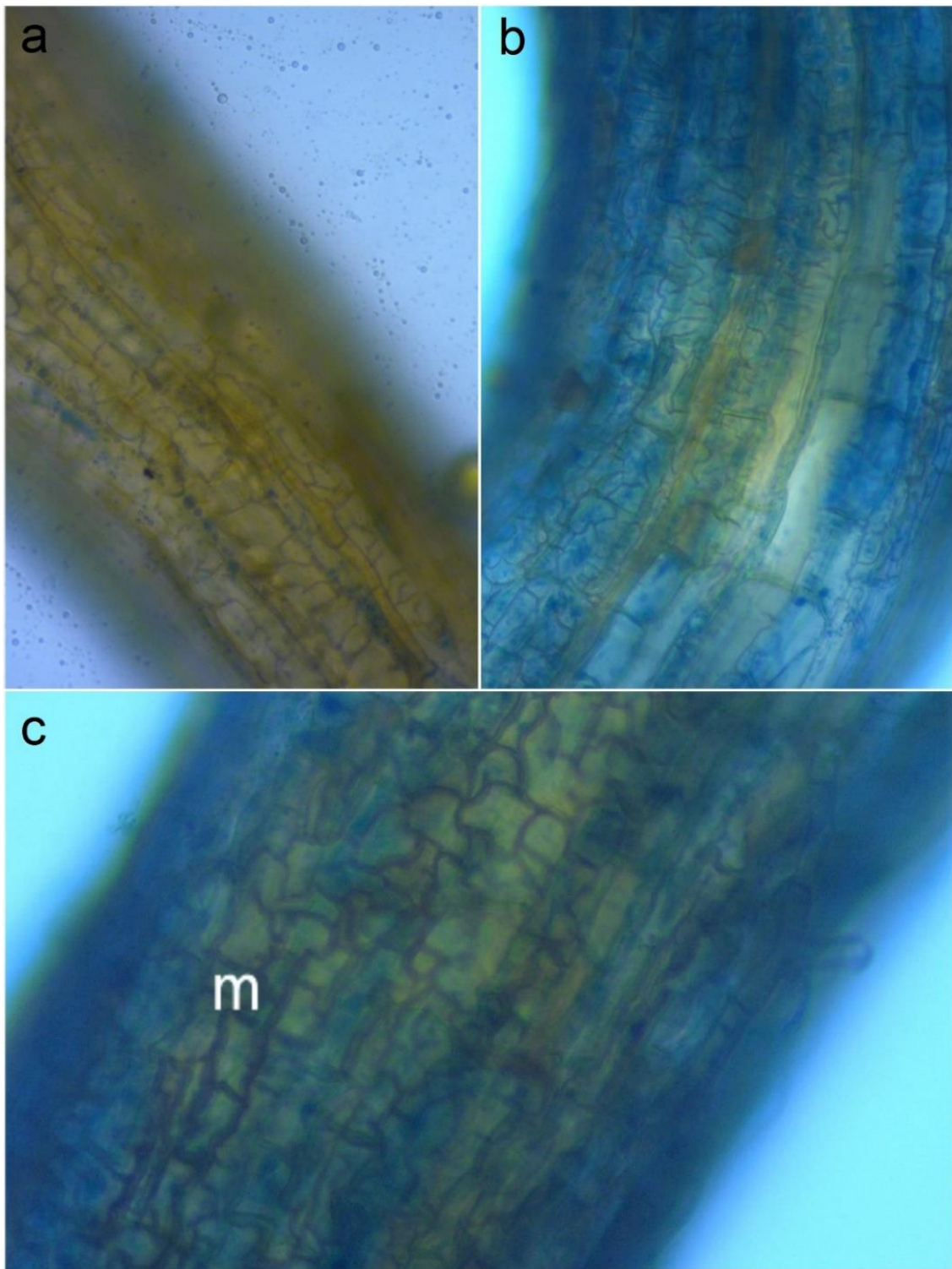


Figura 4. Fotografías de las hifas de SO bajo microscopio óptico en aumento 400x. a: se observa la disposición pseudoparenquimatosa de las hifas; en b, la disposición de las hifas en forma de manto discontinuo o en parche. c: disposición de las hifas formando un manto superficial pseudoparenquimatoso con formación de microesclerocios (m).

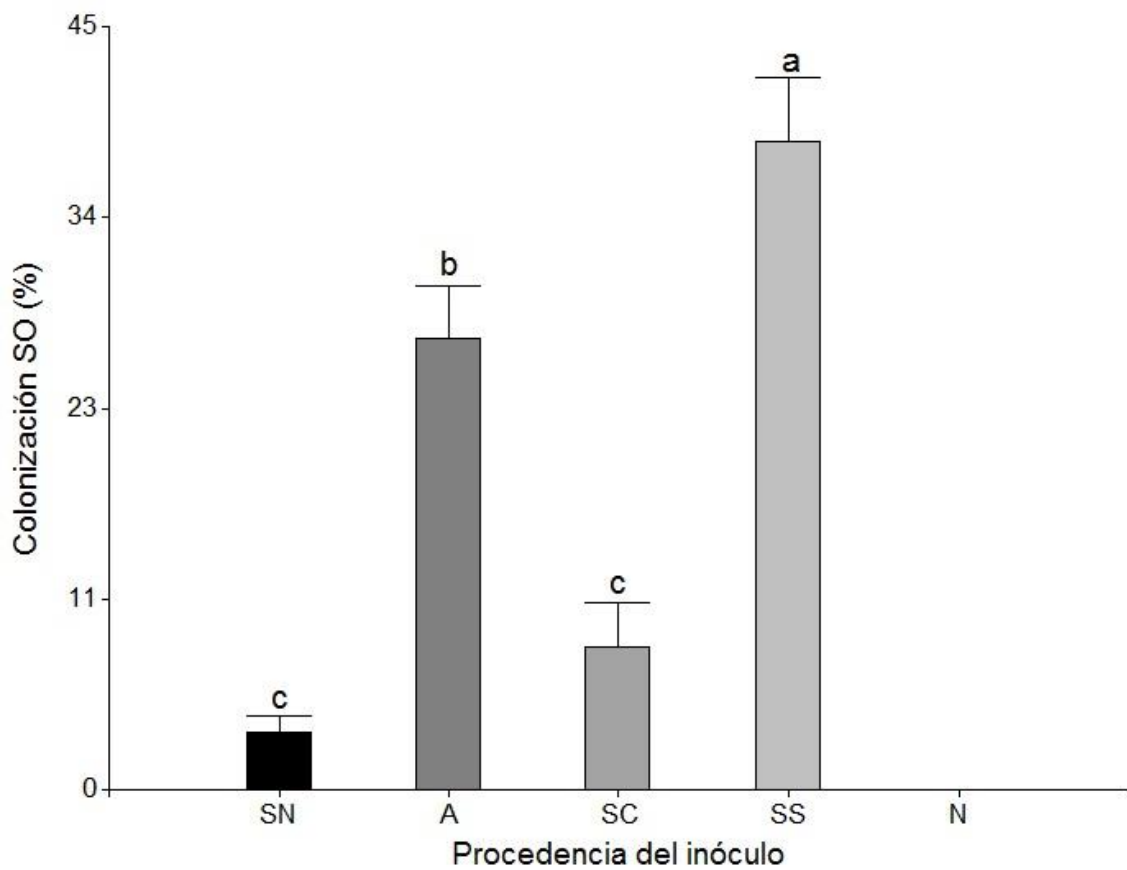










Figura 5. Porcentaje de colonización total por SO en raíces de plántulas de *S. humboldtiana* con inóculo proveniente de *S. humboldtiana* del norte de Argentina (SN), *A. acuminata* (A), *S. humboldtiana* del centro (SC), *S. humboldtiana* del sur (SS) y Nothofagaceae (N). Letras distintas en las barras indican diferencias significativas.

Descripción de morfotipos ECM

Morfotipo	Manto (color)	Morfología	Hifas emanantes y rizomorfos	Representante
M1	Castaño oscuro a castaño rojizo con superficie brillante en algunos sectores.	Monopodial o ramificaciones irregulares.	Hifas emanantes hialinas a blanquecinas distribuidas irregularmente por sectores.	
M2	Castaño oscuro con superficie brillante, algo aterciopelada.	Ramificación monopodial de corta longitud. Ápice terminado en punta.	Sin hifas emanantes.	
M3	Castaño claro con superficie de apariencia brillante.	No ramificado o con ramificación pinnada irregular.	Sin hifas emanantes.	
M4	Blanquecino a amarillo claro con superficie opaca.	Ramificaciones irregularmente pinnadas o monopodial. Agrupadas.	Hifas emanantes abundantes, irregularmente distribuidas formando cordones miceliales.	
M5	Manto castaño a blanquecino en los ápices.	Sistema de ramificación monopodial simple. Por lo general agrupadas. Ápices ahusados.	Hifas emanantes blanquecinas, irregulares de aspecto algodonoso. Con partículas	

			adheridas al manto.	
M6	Manto castaño oscuro a castaño rojizo.	Ramificación irregular, curvadas a algo sinuosas. Generalmente agrupadas.	Hifas emanantes largas, castaño doradas, irregularmente agrupadas y con partículas de suelo adheridas.	
M7	Manto castaño, con superficie algodonosa.	Sistema de ramificación monopodial simple a pinnada irregular. Ápice redondeado.	Hifas emanantes largas, amarillentas.	
M8	Manto color castaño anaranjado. Superficie opaca.	Sin ramificaciones, con forma de clava y ápice redondeado	Sin hifas emanantes.	
M9	Manto castaño claro a amarillento o anaranjado.	Monopodial o con ramificaciones irregulares, algo tortuosas. Ápices ahusados.	Hifas emanantes hialinas y largas en algunos sectores y cistidios cortos a modo de setas.	

M10	Manto grueso amarillo a color miel.	Monopodial o con ramificaciones irregulares. Ápices anchos y redondeados. Superficie del manto con una capa de células globosas.	Hifas emanantes cortas a modo de setas hialinas.	
------------	-------------------------------------	--	--	---

Discusión

Se analizaron las micorrizas asociadas a plantines de sauce criollo inoculados con suelo natural obtenido de poblaciones de la misma especie y con suelo propio de otros árboles nativos ECM (*A. acuminata* y Nothofagaceas). Esto se realizó con el fin de conocer si *S. humboldtiana* es capaz de asociarse a especies fúngicas provenientes de la rizósfera de los hospedantes ECM mencionados, y así estimar si es específico o no para la simbiosis ECM.

Los resultados obtenidos, contrario a nuestra predicción, muestran que *S. humboldtiana* no se asocia a ECM provenientes de la rizósfera de *A. acuminata* y Nothofagaceae, sino que solo lo hace a aquellas provenientes de su suelo de las zonas norte y centro del país. Esto sugiere cierto grado de especificidad en la simbiosis ectomicorrícica de *S. humboldtiana* en las condiciones de invernadero estudiadas, contrariamente a lo reportado para otras especies de *Salix* (Nara, 2006; Ryberg, 2011). Uno de los interrogantes que se desprende de este trabajo es saber por qué los plantines de *S. humboldtiana* cultivados con suelo de *Salix* sur no fueron colonizados por hongos ECM. Además, se muestra que el sauce criollo se asocia a otros hongos, SO, más generalistas provenientes de suelo propio y de la rizósfera de *A. acuminata*.

Tanto la riqueza como la diversidad de morfotipos ECM fueron similares entre plantines que crecieron con suelo de *S. humboldtiana* del norte y centro de Argentina. Además, los valores de riqueza obtenidos en este experimento en invernadero no difieren a los valores reportados en las raíces de *S. humboldtiana* a campo por Becerra et al (2009a). Por lo tanto, es plausible postular que la composición de hongos ECM asociados a *S. humboldtiana* se mantiene relativamente constante y que posiblemente la afiliación taxonómica sea un predictor importante de los hongos ECM asociados a sus raíces. Aunque Becerra et al (2009a) identificaron a dos de los morfotipos encontrados en raíces de sauce criollo en la provincia de Córdoba a nivel de género, *Tomentella* sp.

(Telephoraceae) e *Inocybe* sp. (Cortinariaceae), sería interesante realizar análisis moleculares de los morfotipos encontrados en el presente trabajo, para así poder determinar con exactitud cuáles son las especies de hongos que intervienen en la simbiosis.

En este trabajo, los plantines de sauce criollo en condiciones de invernadero presentaron porcentajes de colonización ECM total menores a aquellos valores reportados por Becerra et al (2009a) en raíces muestreadas a campo de dos poblaciones en el centro de Argentina. Estas diferencias en el porcentaje de colonización pueden estar dadas por las condiciones de invernadero (temperatura, humedad, horas de luz, etc.) que pueden diferir con aquellas a campo, aunque también es posible considerar cambios en las condiciones del suelo y su estructura al recolectarlo y trasladarlo hasta las instalaciones donde fue realizado el experimento.

Contrariamente a los tratamientos *Salix* centro y *Salix* norte, los plantines de sauce criollo inoculados con suelo propio de la región sur, no presentaron extremos radicales colonizados por ECM. Posiblemente, en esta región el sauce criollo pueda vivir sin la asociación ECM siendo de carácter facultativo como lo son otras especies de *Salix* (Meyer, 1973).

En relación a los SO, el patrón general reportado en este trabajo es que todos los tratamientos presentaron colonización por este tipo de hongos, a excepción de los individuos que crecieron con suelo de Nothofagaceae. Los tratamientos con mayor porcentaje de colonización por SO (*Salix* sur y *Alnus*), tuvieron a su vez porcentajes de colonización ECM nulos. Por el contrario, los tratamientos con baja colonización por SO (*Salix* norte y *Salix* centro), mostraron altos porcentajes de colonización ECM. Este patrón es similar a aquellos reportados por Horton et al (1998) en *Pinus muricata*, sugiriendo que las raíces que no han sido colonizadas por hongos ECM, quedan disponibles para la colonización por SO o MA (Horton et al, 1998). En el caso de *S. humboldtiana*, podría indicar por un lado, que las plantas ante la ausencia de simbiontes ECM compatibles, tienen la facultad de asociarse a otros simbiontes generalistas disponibles, o podría estar reflejando algún tipo de competencia entre hongos simbiontes ECM y SO (Richard et al, 1971; Reininger & Siebepor, 2013).

Otro de los interrogantes que se desprenden de este trabajo es saber por qué los plantines de *S. humboldtiana* cultivados con suelo Nothofagaceae no fueron colonizados por SO. Es algo que merece seguir estudiando, ya que Fernández et al (2015) indica que estos hongos endófitos están presentes al menos en raíces de *Lophozonia alpina* (Nothofagaceae), una de las especies registradas en la región Andino Patagónica, por lo que es probable que haya existido disponibilidad de inóculo en los suelos utilizados para este experimento.

Los resultados también sugieren que diferentes tiempos de cosecha pueden afectar la composición y abundancia de hongos ECM en las raíces. Si bien no se encontraron diferencias en los porcentajes de colonización total ECM entre la primera y segunda cosecha, si las hubo para los morfotipos M1 y M4. Siendo más abundante M1 al comienzo del experimento y luego remplazado por M4. Estos resultados soportan estudios anteriores (Miller et al, 1992; Peay, 2018), los cuales señalan la relevancia de evaluar las comunidades de hongos ECM en diferentes tiempos, ya que una cosecha única y temprana puede obviar o subestimar la existencia de morfotipos que aún no se han desarrollado; de la misma manera, una sola cosecha tardía puede mostrar solo los morfotipos dominantes (Miller et al, 1992).

Cambios en la abundancia de hongos ECM en diferentes cosechas también han sido reportados por Nouhra et al (2003) en *Alnus acuminata* en un experimento en invernadero. Estos resultados podrían estar indicando competencia entre las especies fúngicas o tasas de crecimiento diferentes según las especies de hongos (Visser, 1995).

Conclusión

Este trabajo es un aporte novedoso al conocimiento de la simbiosis ectomicorrícica de *S. humboldtiana*. Específicamente, los resultados obtenidos proporcionan datos concretos sobre los patrones de asociación y especificidad de esta especie en un gradiente amplio de distribución en Argentina. Plantines de *S. humboldtiana* que crecieron en condiciones de invernadero durante siete y diez meses se asociaron exclusivamente a hongos ECM provenientes de su propia rizósfera de las zonas norte y centro de Argentina. Contrariamente a lo esperado, *S. humboldtiana* no se colonizó con hongos pertenecientes a la rizósfera de árboles ECM que poseen rangos de distribución solapados en Argentina, como lo son *A. acuminata* y especies de la familia Nothofagaceae, indicando que existe cierto grado de especificidad en la simbiosis ECM de *S. humboldtiana*. También queda de manifiesto la facultad de asociarse a hongos SO disponibles.

Bibliografía

- Agerer R. 1991. Characterization of Ectomycorrhiza. *Methods in microbiology* 23: 25-73.
- Bahram M, Pölme S, Kõljalg U, Zarre S & Tedersoo L. 2012. Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytologist* 193 (2): 465-473.
- Becerra A, Zak MR, Horton TR & Micolini J. 2005a. Ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal colonization of *Alnus acuminata* from Calilegua National Park (Argentina). *Mycorrhiza* 15 (7): 525–531.
- Becerra A, Nouhra E, Daniele G, Domínguez L & McKay D. 2005b. Ectomycorrhizas of *Cortinarius helodes* and *Gyrodon monticola* with *Alnus acuminata* from Argentina. *Mycorrhiza* 15 (1): 7-15.
- Becerra A, Pritsch K, Arrigo N, Palma M & Bartoloni N. 2005c. Ectomycorrhizal colonization of *Alnus acuminata* Kunth in northwestern Argentina in relation to season and soil parameters. *Annals of Forest Science* 62 (4): 325-332.
- Becerra A, Nouhra E, Silva M & McKay D. 2009a. Ectomycorrhizae, arbuscular mycorrhizae and dark-septate fungi on *Salix humboldtiana* in two riparian populations from central Argentina. *Mycoscience* 50 (5):343-352.
- Becerra A, Menoyo E, Lett I & Li CY. 2009b. *Alnus acuminata* in dual symbiosis with *Frankia* and two different ectomycorrhizal fungi (*Alpova austroalnicola* and *Alpova diplophloeus*) growing in soilless growth medium. *Symbiosis* 47 (2): 85-92.
- Benson DR & Clawson ML. 2000. Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. In EW Triplett (ed.), *Evolution of the actinorhizal plant symbiosis* 207-224. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press.
- Bidartondo MI, Redecker D, Hijri I, Wiemken A, Bruns TD, Domínguez L, Sérsic A, Leake JR & Read DJ. 2002. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 419 (6905): 389.
- Brundrett M. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. In *Advances in ecological research* 21: 171-313. Academic Press.
- Brundrett MC. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320 (1-2): 37-77.
- Demaio P, Karlin UO & Medina M. 2002. *Árboles nativos del centro de Argentina*. Colin Sharp, Buenos Aires, Argentina.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M & Robledo CW. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.

Diehl P, Mazzarino MJ & Fontenla SB. 2008. Plant limiting nutrients in Andean-Patagonian woody species: effects of interannual rainfall variation, soil fertility and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management* 255 (7): 2973-2980.

Fernández NV, Marchelli P, Gherghel F, Kost G & Fontenla SB. 2015. Ectomycorrhizal fungal communities in *Nothofagus nervosa* (Raulí): A comparison between domesticated and naturally established specimens in a native forest of Patagonia, Argentina. *Fungal Ecology* 18: 36-47.

Fracchia S, Aranda A, Gopar A, Silvani V, Fernandez L & Godeas A. 2009. Mycorrhizal status of plant species in the Chaco Serrano Woodland from central Argentina. *Mycorrhiza* 19 (3): 205-214.

Furlow JJ. 1979. The systematics of the American species of *Alnus* (Betulaceae). *Rhodora* 81 (825): 1-121.

García Berguecio N & Ormazabal Pagliotti C. 2008. *Árboles nativos de Chile*. Enersis S.A, Santiago, Chile.

Gehring CA & Whitham TG. 1994. Comparisons of ectomycorrhizae on Pinyon Pines (*Pinus edulis*; Pinaceae) across extremes of soil type and herbivory. *American Journal of Botany* 81 (12): 1509-1516.

Grau HR, Easdale TA & Paolini L. 2003. Subtropical dendroecology-dating disturbances and forest dynamics in northwestern Argentina montane ecosystem. *Forest Ecology and Management* 177 (1): 131-143.

Harvey AE, Jurgensen MF & Larsen MJ. 1978. Seasonal distribution of ectomycorrhizae in a mature Douglas-fir/larch forest soil in western Montana. *Forest Science* 24: 203-208.

Helm DJ, Allen EB & Trappe JM. 1999. Plant growth and ectomycorrhiza formation by transplants on deglaciated land near Exit Glacier, Alaska. *Mycorrhiza* 8(6): 297-304.

Holdrige LR. 1951. The alder, *Alnus acuminata*, as a farm timber tree in Costa Rica. *Caribeann Forester* 12 (2): 47-57.

Horton TR, Cázares E & Bruns TD. 1998. Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months of growth after wildfire. *Mycorrhiza* 8: 11-18.

Kennedy PG, Garibay-Orijel R, Higgins LM & Angeles-Arguiz R. 2011. Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza* 21: 559-568.

Kuzovkina YA, Weih M, Romero MA, Charles J, Hust S, McIvor I, Karp A, Trybush S, Labrecque M, Teodorescu TI, Singh NB, Smart LB & Volk TA. 2008. *Salix*: botany and global horticulture. *Horticultural Reviews* 34: 447-489.

Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW & van Breemen N. 2001. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution* 16 (5): 248-254.

Liotta J. 2001. Rasgos biológicos de *Salix humboldtiana* Willd. y régimen de pulsos de inundación. *Interciencia* 26 (9): 397-403.

Lugo MA, Becerra A, Nouhra E & Ochoa A. 2012. Capítulo 10: Mycorrhizal diversity in native and exotic willows (*Salix humboldtiana* and *Salix alba*) in Argentina. In M. Pagano (ed.), *Mycorrhiza: Occurrence in natural and restored environments* 201-222. Nova Science Publishers, New York, USA.

Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C & Lapeyrie F. 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist*, 151 (1): 145-154.

Mazzarino MJ & Gobbi ME. 2005. Ediciones INTA, Número especial sobre Forestales. Indicadores de circulación de nutrientes en bosques Andino-Patagónicos. *IDIA XXI* 5: 15-18.

Meyer FH. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology* 79-105.

Miller S, Koo CD & Molina R. 1992. Early colonization of red alder and Douglas fir by ectomycorrhizal fungi and *Frankia* in soils from the Oregon coast range. *Mycorrhiza* 2: 53-61.

Molina R. 1981. Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. *Canadian Journal of Botanic* 59 (3): 325-334.

Molina R, Massicotte H & Trappe JM. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In Allen MF (ed.), *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process* 357-423. Chapman and Hall, New York, USA.

Nara K & Hogetsu T. 2004. Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. *Ecology* 85 (6): 1700-1707.

Nara K. 2006. Pioneer dwarf willow may facilitate tree succession by providing late colonizers with compatible ectomycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert. *New Phytologist* 171 (1): 187-198.

Nouhra E, Domínguez L, Becerra A & Mangeaud, A. 2003. Colonización micorrízica y actinorrízica en plantines de *Alnus acuminata* (Betulaceae) cultivados en suelos nativos de *Alnus rubra*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 38 (34): 199-206.

Nouhra ER, Urcelay C, Longo MS & Fontenla S. 2012. Differential hypogeous sporocarp production from *Nothofagus dombeyi* and *N. pumilio* forests in southern Argentina. *Mycologia* 104 (1): 1-8.

Nouhra E, Urcelay C, Longo S & Tedersoo L. 2013. Ectomycorrhizal fungal communities associated to *Nothofagus* species in Northern Patagonia. *Mycorrhiza* 23 (6): 487-496.

Nouhra E, Pastor N, Becerra A, Sarrionandia Areito E & Geml J. 2015. Greenhouse seedlings of *Alnus* showed low host intrageneric specificity and a strong preference for some *Tomentella* ectomycorrhizal associates. *Microbial ecology* 69 (4): 813-825.

Peay KG. 2018. Timing of mutualist arrival has a greater effect on *Pinus muricata* seedling growth than interspecific competition. *Journal of Ecology* 106: 514-523.

Ragonese AE. 1987. Fitotecnia de Salicaceas en el Centro Nacional de Investigaciones agropecuarias Castelar (INTA). Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Comunicado N° 6. Tomo XLI.

Reininger V & Sieber TN. 2013. Mitigation of antagonistic effects on plant growth due to root co-colonization by dark septate endophytes and ectomycorrhizal. *Environmental Microbiology Reports* 5 (6): 892-898.

Richard C, Fortin JA & Fortin A. 1971. Protective effect of an ectomycorrhizal fungus against the root pathogen *Mycelium radices atrovirens*. *Canadian Journal of Forest Research* 1: 246-251.

Rinaldi AC, Comandini O & Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal diversity* 33:1-45.

Russo RO. 1990. Evaluating *Alnus acuminata* as a component in agroforestry systems. *Agroforestry Systems* 10 (3): 241-252.

Ryberg M, Andreasen M & Björk RG. 2011. Weak habitat specificity in ectomycorrhizal communities associated with *Salix herbacea* and *Salix polaris* in alpine tundra. *Mycorrhiza* 21: 289-296.

Salgado Salomón ME, Barroetaveña C & Rajchenberg M. 2013. Occurrence of dark septate endophytes in *Nothofagus* seedlings from Patagonia, Argentina. *Southern Forests: A Journal of Forest Science* 75 (2): 97-101.

Smith SE & Read DJ. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2 nd edition. Academic Press, London, UK.

Smith SE & Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3 rd edition. Academic Press, London, UK.

Swenson U, Backlund A, McLoughlin S & Hill RS. 2001. *Nothofagus* biogeography revisited with special emphasis on the enigmatic distribution of subgenus *Brassospora* in New Caledonia. *Cladistics* 17 (1): 28-47.

Taylor AFS. 2008. Recent advances in our understanding of fungal ecology. *Coolia* 51 (4): 197-212.

Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, Abarenkov K, Suvi T, Saar I & Kõljalg U. 2008. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytologist* 180 (2): 479-490.

Tedersoo L, Gates G, Dunk CW, Lebel T, May TW, Kõljalg U & Jairus T. 2009. Establishment of ectomycorrhizal fungal community on isolated *Nothofagus cunninghamii* seedlings regenerating on dead wood in Australian wet temperate forests: does fruit-body type matter? *Mycorrhiza* 19 (6): 403-416.

Tedersoo L, May TW & Smith ME. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217-263.

Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diedhiou AG, Henkel TW, Kjølner R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KG, Polme S, Ryberg M, Smith ME & Kõljalg U. 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21 (17): 4160-4170.

Tedersoo L & Smith ME. 2013. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal biology reviews* 27 (3): 83-99.

Tedersoo L, Mett M, Ishida TA & Bahram M. 2013. Phylogenetic relationships among host plants explain differences in fungal species richness and community composition in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 199 (3): 822-831.

Toljander JF, Eberhardt U, Toljander YK, Paul LR & Taylor AF. 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist* 170 (4): 873-884.

Trierveiler-Pereira L, Smith ME, Trappe JM & Nouhra ER. 2014. Sequestrate fungi from Patagonian *Nothofagus* forests: *Cystangium* (Russulaceae, Basidiomycota). *Mycologia* 107 (1): 90-103.

Urbanová M, Šnajdr J & Baldrian P. 2015. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology and Biochemistry* 84: 53-64.

Visser S. 1995. Ectomycorrhizal Fungal Succession in Jack Pine Stands Following Wildfire. *New Phytology* 129: 389-401.