

## **TOMENTELLA (THELEPHORALES, BASIDIOMYCOTA) EN BOSQUES DE NOTHOFAGACEAE DE PATAGONIA, ARGENTINA: MICORRIZAS DE NUEVAS ESPECIES**

MARÍA EUGENIA SALGADO SALOMÓN<sup>1,2,4,\*</sup>, CAROLINA BARROETAVERÑA<sup>1,2,4</sup>,  
MARÍA BELEN PILDAIN<sup>1,3,4</sup>, FRANCISCO KUCHAR<sup>1,3,4</sup> y MARIO RAJCHENBERG<sup>1,2,4</sup>

**Summary:** *Tomentella* (Thelephorales, Basidiomycota) in Nothofagaceae forests of Patagonia, Argentina: mycorrhizae of new species. *Tomentella* is a mycorrhizal genus whose presence in temperate, tropical and circumpolar forests has been widely reported. It typically forms ectomycorrhizae (EM), but also orchidioid, ericoid, monotropoid and arbutoid symbiosis. *Tomentella* EM morphotypes have consistent morphological and microscopical features, for which reason their description and characterization is a useful tool in environmental research. In this study, detailed morpho-anatomical descriptions of 4 EM *Tomentella* species associated with *Nothofagus pumilio*, *N. dombeyi*, *N. antarctica*, *Lophozonia alpina* and *L. procera* forests are presented, also molecularly determined at species level, and their ecological relevance is discussed. The morphology and type of exploration of the 4 EM were consistent with previous reports for *Tomentella* species. These EM have no specificity for a single Nothofagaceae host and can be found in at least two species of this family. Our results show that the study of 'EM' morphotypes' morpho-anatomy constitutes an irreplaceable tool for quantification and analysis of the functional diversity of EM community.

**Key words:** *Nothofagus*, ectomycorrhizae, descriptions, morpho-anatomy.

**Resumen:** La presencia de especies de *Tomentella* ha sido reportada abundantemente en bosques templados, tropicales y regiones circumpolares. Las especies del género *Tomentella* forman típicamente ectomicorrizas (EM) aunque también micorrizas orquióides, ericoides, monotróides y arbutoides. La descripción y caracterización de los morfotipos EM constituyen una herramienta muy útil en trabajos ecológicos. En este trabajo se presentan descripciones morfo-anatómicas de 4 EM de *Tomentella* asociadas a *Nothofagus pumilio*, *N. dombeyi*, *N. antarctica*, *Lophozonia alpina* y *L. procera*, identificadas molecularmente a nivel específico. La morfología y el tipo de exploración de las 4 EM fueron consistentes con lo reportado previamente para el género. Estas EM no presentaron especificidad por un único hospedante de Nothofagaceae. Nuestros resultados demuestran que el estudio morfo-anatómico de los morfotipos EM constituye una herramienta insustituible para la cuantificación y el análisis de la diversidad funcional de la comunidad EM.

**Palabras clave:** *Nothofagus*, ectomicorrizas, descripciones, morfo-anatomía.

---

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP), C.C. 14, Ruta 259 km 16.24, Esquel, Chubut, 9200 Argentina.

<sup>2</sup> Universidad Nacional de la Patagonia S.J. Bosco, Facultad de Ingeniería, Sede Esquel, Ruta 259 km 16.24, Esquel, Chubut, 9200 Argentina.

<sup>3</sup> Universidad Nacional de la Patagonia S.J. Bosco, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Esquel, Ruta 259 km 16.24, Esquel, Chubut, 9200 Argentina.

<sup>4</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

\* Autor por correspondencia. E-mail: mesalgadosalomon@ciefap.org.ar

## INTRODUCCIÓN

En los bosques de Nothofagaceae de Patagonia, Argentina, se han reportado hasta el momento 6 especies de *Tomentella* (Thelephorales, Basidiomycota), 3 de ellas nuevas para la ciencia (Fernández *et al.*, 2013; Greslebin, 2002; Kuhar *et al.*, 2016). Sin embargo, Nouhra *et al.* (2013) hallaron secuencias de 5 especies del género a partir de ápices radicales micorrizados en bosques de Nothofagaceae, de las que 3 no coinciden con ninguna de las especies descritas hasta el momento. Esto indica que aún falta detectar más basidiocarpos para conocer la riqueza del género *Tomentella* en Patagonia.

Las técnicas basadas en el uso de ADN han permitido revelar la importancia de las especies fúngicas asociadas a especies forestales cuyos esporocarpos no son frecuentemente observados en ambientes naturales (Smith & Read, 2008). Este es el caso de *Tomentella*, que desde el hallazgo de la primer ectomicorriza (EM) formada por una especie de éste género (Danielson & Pruden, 1989), han mostrado ser abundantes en diferentes ecosistemas, como bosques templados y tropicales (Horton & Bruns, 1998; Kennedy *et al.*, 2003; Jakucs & Erős-Honti, 2008; Lilleskov *et al.*, 2002; Nara, 2006; Richard *et al.*, 2005; Tedersoo *et al.*, 2006, 2008, 2009) y en formaciones boscosas producto de las desglaciaciones en regiones circumpolares (Kõljalg, 1995). El género forma no solo ectomicorrizas, sino también micorrizas orquidoides, ericoides, monotropoides y arbutoides (Bidartondo *et al.*, 2000, 2004; Kõljalg *et al.*, 2000; McKendrick *et al.*, 2000; Selosse *et al.*, 2002; Tedersoo *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2007).

Si bien las técnicas moleculares, especialmente los métodos de “*next generation sequencing*”, han revolucionado el estudio de las comunidades EM, permitiendo la clasificación de numerosos linajes de especies fúngicas, a menudo carecen de la identificación precisa a nivel de especie (Hibbett *et al.*, 2009, 2011). La utilización de métodos moleculares para la detección de micorrizas a partir de muestras ambientales o de esporocarpos permite dilucidar identidades taxonómicas, pero el estudio de los ápices radicales micorrizados sigue siendo el único método para relacionar grupos taxonómicos de hongos con las plantas hospedantes (Agerer & Rambold, 2004-2016). En este sentido, la descripción morfo-anatómica de los morfotipos EM permite caracterizar, seleccionar

y clasificar los ápices radicales micorrizadas, constituyendo una herramienta insustituible para la detección, cuantificación y análisis de la diversidad funcional de la comunidad EM (Jakucs *et al.*, 2015). En el caso del género *Tomentella* sus morfotipos poseen características morfológicas y microscópicas consistentes, que contribuyen a su caracterización certera (Agerer & Rambold, 2004-2016; Binder *et al.*, 2013; Jakucs & Erős-Honti, 2008; Jakucs *et al.*, 2015). En este trabajo se identifican molecularmente a nivel específico y se presentan las descripciones morfo-anatómicas de 4 EM de *Tomentella* asociadas a ápices radicales ectomicorrizados de árboles de bosques de Nothofagaceae.

## MATERIAL Y MÉTODO

### *Sitios de muestreo*

Las especies de árboles en los que se estudiaron EM y sus sitios de colección fueron;

*Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser en Chubut, Futaleufú, Cañadón Huemules (Lat.: -42.77; Long.: -71.46) y Lago Baggilt (Lat.: -43,27; Long.: -71,69);

*N. antarctica* (G. Forst.) Oerst. en Río Negro, Bariloche, Foyel (Lat.: -41,67; Long.: -71.45);

*N. dombeyi* (Mirb.) Oerst. en Neuquén, Lácar, San Martín de los Andes, Estancia “Los Robles” (Lat.: -40.15; Long.: -71.59);

*Lophozonia alpina* (Poepp. & Endl.) Heenan & Smitsen y *L. obliqua* (Mirb.) Heenan & Smitsen, Neuquén, Lácar, San Martín de los Andes, Estancia “Quechuquina” (Lat.: -40,15; Long.: -71,59).

Todos los sitios de muestreo corresponden al Distrito del Bosque Caducifolio, Provincia Subantártica, Dominio Subantártico (Cabrera & Willink, 1980).

Los materiales se colectaron en forma de plantines enteros con pan de tierra de 1-5 años de edad en bosques de Nothofagaceae de Patagonia, Argentina, en otoño y primavera del 2010 al 2014.

### *Análisis y descripción de los morfotipos*

Se analizaron los sistemas radicales completos de 900 plantines de Nothofagaceae spp. de no más de 40 cm de altura. De los mismos, se recolectaron raíces frescas que se lavaron cuidadosamente con agua corriente, colocándolas luego en bandejas con agua. Bajo lupa se distinguieron y separaron

en morfotipos. Los morfotipos se establecieron mediante la evaluación de las dimensiones, y morfología de la EM; color, textura y brillo del manto, presencia de hifas emanantes y rizomorfos, y reacciones químicas con KOH 3%, Melzer y Sulfovainillina. Se realizaron preparados microscópicos a fin de evaluar las características anatómicas del manto externo e interno, siguiendo las metodologías utilizadas por Agerer (1994, 2001), Agerer & Rambold (2004-2016) y Goodman *et al.* (1996). Las muestras fueron preservadas en buffer CTAB 2% [100 mM Tris-HCL (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB] a -20 °C para la posterior extracción de ADN.

Todos los materiales preservados en CTAB 2% a -20 °C, se encuentran depositados en el Herbario del Centro Forestal CIEFAP.

#### *Extracción de ADN y condiciones de PCR*

De cada morfotipo caracterizado, se tomaron 5 ápices radicales micorrizados representativos que fueron lavados con 200 µl de agua ultrapura y cortados en pequeñas porciones con un escalpelo estéril. La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo modificado de Bent & Taylor (2010). Cuando la extracción no resultó exitosa, se utilizó el Kit GenElutePlantGenomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich), según las instrucciones del fabricante.

La región ITS se amplificó usando los primers ITS1F e ITS4 (Gardes & Bruns, 1993; White *et al.*, 1990). Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador MyCycler™ (BioRad) con el protocolo adaptado de Barroetaveña *et al.* (2010) para la región ITS: desnaturalización inicial a 95°C (10 min.), seguido por 41 ciclos de desnaturalización a 94°C (45 seg.), hibridación del primer a 54°C (45 seg.) y elongación a 72 °C (1 min.), con una elongación final a 72 °C (10 min.). Los productos de PCR se separaron en un gel al 1% de agarosa (p/v) teñido con Gel-Red™ (Biotium, California, EE.UU.) y se visualizaron con iluminación UV. Las secuenciaciones fueron tercerizadas, el procesamiento de las muestras siendo realizado por la compañía MACROGEN (Seúl, Corea del Sur).

#### *Análisis filogenético de las secuencias*

Las secuencias se editaron inicialmente con BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999), alinearon automáticamente con MAFFT (Kato & Standley, 2013) y se ajustaron manualmente con MEGA

versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). Para armar la matriz de alineamiento se utilizó la función BLASTn (Atschul *et al.*, 1997) de las bases de datos públicos GenBank (Benson *et al.*, 2000; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) y de UNITE (Kõljalg *et al.*, 2013). Cuando se obtuvieron numerosas secuencias que correspondieran con más del 98% de coincidencia a la del hongo EM secuenciado, se utilizó una secuencia por especie disponible en GenBank. Para construir los árboles filogenéticos se utilizaron aquellas que presentaron mayor longitud (en pares de bases) o mejor calidad. La nomenclatura y la clasificación de las especies identificadas corresponden a las citadas en el Index Fungorum ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)), DEMMY (<http://www.deemy.de>) y PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). El set de datos final para ITS incluyó 91 secuencias y 575 caracteres incluyendo gaps.

El mejor modelo evolutivo fue determinado usando el criterio AIC (Akaike, 1974) implementado en jModel Test (Posada, 2008; <http://darwin.uvigo.es>). El análisis filogenético bayesiano fue realizado usando MrBayes v. 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) por 8.000.000 de generaciones, con cuatro cadenas y el muestreo de árboles cada 100 generaciones. Para determinar convergencia, los archivos Log para cada corrida se analizaron en Tracer v1.6.0 (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html/tracer/>). El soporte de las ramas fue calculado usando la probabilidad posterior, y ésta fue calculada desde el set posterior de árboles luego de alcanzar la fase estacionaria. Se generó un árbol consenso por la regla de la mayoría (*majority rule*) de las cuatro corridas independientes.

## RESULTADOS

### *Identificación molecular*

Se determinaron molecularmente los 4 morfotipos EM de *Tomentella* asociados a bosques de Nothofagaceae. Dos morfotipos correspondieron a las especies de *Tomentella* descritas por Kuhar *et al.* (2016): *T. tenuissima* Kuhar & Rajchenb. (Fig. 1) y *T. patagonica* Kuhar & Rajchenb. (Fig. 1), posiblemente endémicas, otro a la especie *T. ellisii* (Sacc.) Jülich & Stalpers, posiblemente cosmopolita (Fig. 1) y un cuarto taxón que se determinó a nivel genérico (Fig. 1). Las secuencias

de los morfotipos se agruparon con las secuencias de los basidiomas y de muestras ambientales con un soporte del 100%.

#### Morfología

***Tomentella tenuissima* + *Nothofagus pumilio***: Fig. 2A, 2B; 3D

*Material de Referencia*. ARGENTINA, *Prov. Chubut, Dpto. Futaleufú*, Lago Baggilt, -43.2703, -71.685; 10-XI-2014, leg. F. Kuhar (CIEFAP FK15001)

*Descripción morfológica*: ápices radicales ectomicorrizados consistentemente marrón muy oscuro, pinnados poco ramificados, curvados en un plano a tortuosos. Textura fibrosa verrugosa, brillantes. Hifas emanantes tortuosas, marrones a marrones grisáceas, brillantes. Reacciones con KOH al 3%, Melzer y Sulfovainillina negativas.

*Dimensiones*: largo total: 1,02–1,71 mm; largo de las ramificaciones: 0,63–1 mm; diámetro principal: 0,27–0,30 mm; diámetro de las ramificaciones: 0,18–0,27 mm.

*Descripción anatómica*: hifas emanantes fibuladas marrón oscuro, con pared engrosada, espinadas a verrugosas, con ramificaciones a 90° y anastomosis fibuladas. No se observaron cistidios.

Manto externo: pseudoparenquimatoso, con células angulares (Tipo L<sup>1</sup>).

Manto medio: pseudoparenquimatoso, con células epidermoides (Tipo M).

Manto interno: intermedio entre plectenquimatoso y pseudoparenquimatoso (Tipo H).

***Tomentella patagonica* + *Nothofagus dombeyi***

Fig. 2C, 2D; 3A

*Material de referencia*: ARGENTINA, *Prov. Neuquén, Dpto. Lácar*, San Martín de los Andes, Estancia “Los Robles”; -40,1224; -71,3217; 15-XII-2011, leg. M.E. Salgado Salomón (CIEFAP E2N)

*Descripción morfológica*: ápices radicales ectomicorrizados marrón oscuro, no ramificados, curvados en un plano a ligeramente tortuosos. Ápice radicales ectomicorrízicos con textura lisa a aterciopelada, con lustre mate, con hifas emanantes marrones, lanosas, brillantes y tortuosas, en su mayoría restrictas a la base del ápice radical ectomicorrizado. Reacción KOH 3%

ocasionalmente exudados intensamente azules a no observables en colecciones en CTAB 2%. Reacciones con Melzer y Sulfovainillina negativas.

*Dimensiones*: largo total: 1,17–1,80 mm; diámetro: 0,13–0,19 mm.

*Descripción anatómica*: hifas emanantes marrón claro, con septo simple, 5,8–6,8 µm de diámetro, con pared engrosada, con protuberancias, levemente espinada, con ramificaciones a 90° y anastomosis en puente (H) sin fibulas. No se observaron cistidios.

Manto externo: plectenquimatoso, con hifas con ligero arreglo radial (Tipo G).

Manto medio: pseudoparenquimatoso, con células angulares (Tipo L).

Manto interno: pseudoparenquimatoso, con células epidermoides (Tipo M).

Estas ectomicorrizas también fueron encontradas asociadas con *Nothofagus pumilio*, *Lophozonia alpina* y *Lophozonia obliqua*, presentando las mismas características morfológicas en los siguientes materiales:

ARGENTINA, *Prov. Chubut, Dpto. Futaleufú*, Cañadón Huemules, -42,7747; -71,4345; 4-IV-2014; leg. F. Kuhar (CIEFAP FK15002). ARGENTINA, Neuquén, Lácar, San Martín de los Andes, Estancia “Quechuquina”; -40,1508; -71,5946; 25 de noviembre de 2011, leg. M.E. Salgado Salomón (CIEFAP E2QA). ARGENTINA, *Prov. Neuquén, Dpto. Lácar*, San Martín de los Andes, Estancia “Quechuquina”; -40,1508; -71,5946; 25-XI-2011, leg. M.E. Salgado Salomón (CIEFAP E2QO).

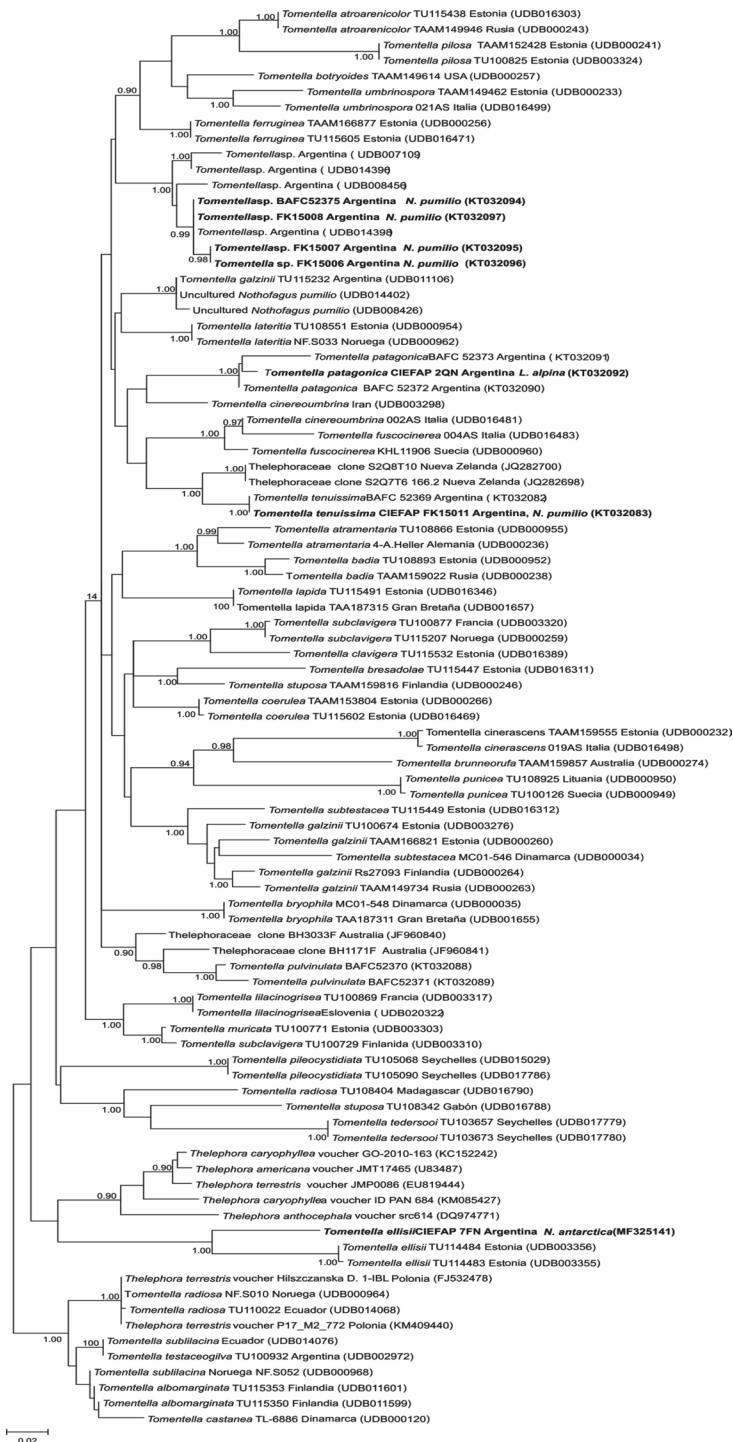
***Tomentella ellisii* + *Nothofagus antarctica*** Fig. 2G, 2H; 3C

*Material de referencia*: ARGENTINA, *Prov. Río Negro, Dpto. Bariloche*, Foyel, Establecimiento Sr. Wheelwell; -41,6691; -71,4538; 10-XII-2012, leg. M.E. Salgado Salomón (CIEFAP E7F).

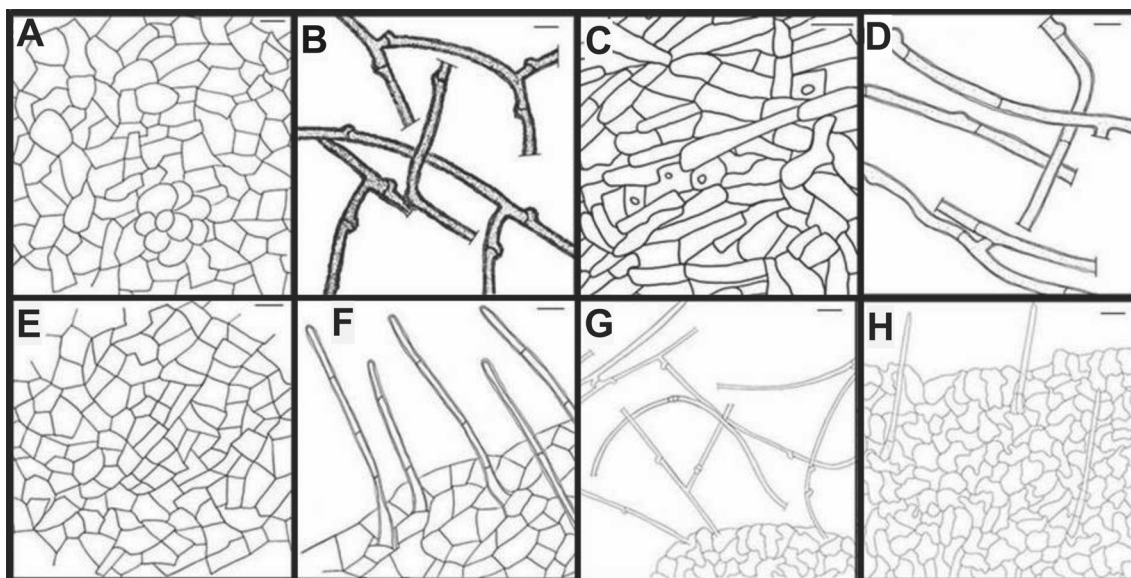
*Descripción morfológica*: ápices radicales ectomicorrizados, irregulares a ligeramente pinnados. De color castaño doradas en la base, con ápice blanquecino. Profusamente ramificados, con ramificaciones curvadas en un plano a tortuosas. Con textura lisa, satinados a ligeramente brillantes, con hifas emanantes poco abundantes, hialinas, muy finas, tortuosas, brillantes, no restrictas a un punto. Reacciones con KOH al 3%, Melzer y Sulfovainillina negativas.

*Dimensiones*: largo total: 3,7–3,9 mm; largo de las ramificaciones: 0,63–1 mm; diámetro principal:

<sup>1</sup> Clasificación según Agerer, 1994.



**Fig. 1.** Filograma mostrando la correspondencia entre basidiocarpio y muestras de EM. Bootstrap significativos según probabilidades del análisis Bayesiano (PP≥0.90) indicados sobre las ramificaciones superiores o inferiores. Los taxones en negrita indican secuencias de morfotipos obtenidos por los autores.



**Fig. 2.** Características microscópicas de los morfotipos EM de especies de *Tomentella*: A-B. *Tomentella tenuissima*, A, manto externo Tipo L (Agerer, 1994) con montículos de células globosas; B, hifas emanantes fibuladas intensamente espinuladas. C-D. *Tomentella patagonica*, A, manto externo Tipo G (Agerer, 1994); D, hifas emanantes sin fibulas. E-F. *Tomentella* sp. 1 manto externo Tipo L (Agerer, 1994); F, cystidios. G-H, *Tomentella ellisii*, G, hifas emanantes fibuladas; H, manto externo Tipo M (Agerer, 1994). Barras= 5µm.

0,25–0,31 mm; diámetro de las ramificaciones: 0,19–0,25 mm.

**Descripción anatómica:** hifas emanantes poco abundantes, cuando presentes, fibuladas, hialinas, de pared delgada y 1,5–2 µm de diámetro, con ramificaciones a 90° y anastomosis en puente (H) fibuladas. Cistidios difícilmente observables (solo observados 2 veces en 12 preparados), en forma de aguja o punzón con células basales ligeramente engrosadas, de 85–90 µm de largo y 3–4 µm de diámetro. No se observaron fibulas en el manto o en los cistidios.

Manto externo: pseudoparenquimatoso, con células epidermoides (Tipo M).

Manto medio: intermedio entre plectenquimatoso a pseudoparenquimatoso (Tipo H).

Manto interno: plectenquimatoso (Tipo A).

***Tomentella* sp. + *Nothofagus pumilio*** Fig. 2E, 2F; 3B

**Materiales de referencia:** ARGENTINA, Prov. Chubut, Dpto. Futaleufú, Cañadón Huemules, -42.7788; -71.4328, 4-IV-2014, leg. F. Kuhar. CIEFAP FK15007. ARGENTINA, Prov. Chubut, Dpto.

*Futaleufú*, Lago Baggilt, -43.2544, -71.6566 10-XI-2014, leg. F. Kuhar (CIEFAP FK15006)

**Descripción morfológica:** ápices radicales ectomicorrizados irregularmente pinnados, lineales a curvados en un plano. Ápices blanco-dorado y translúcidos, en la parte media de color castaño ocre y la base marrón oscura. Textura largamente espinosa, ligeramente brillante. Sin hifas emanantes. Reacciones con KOH al 3%, Melzer y Sulfovainillina negativas.

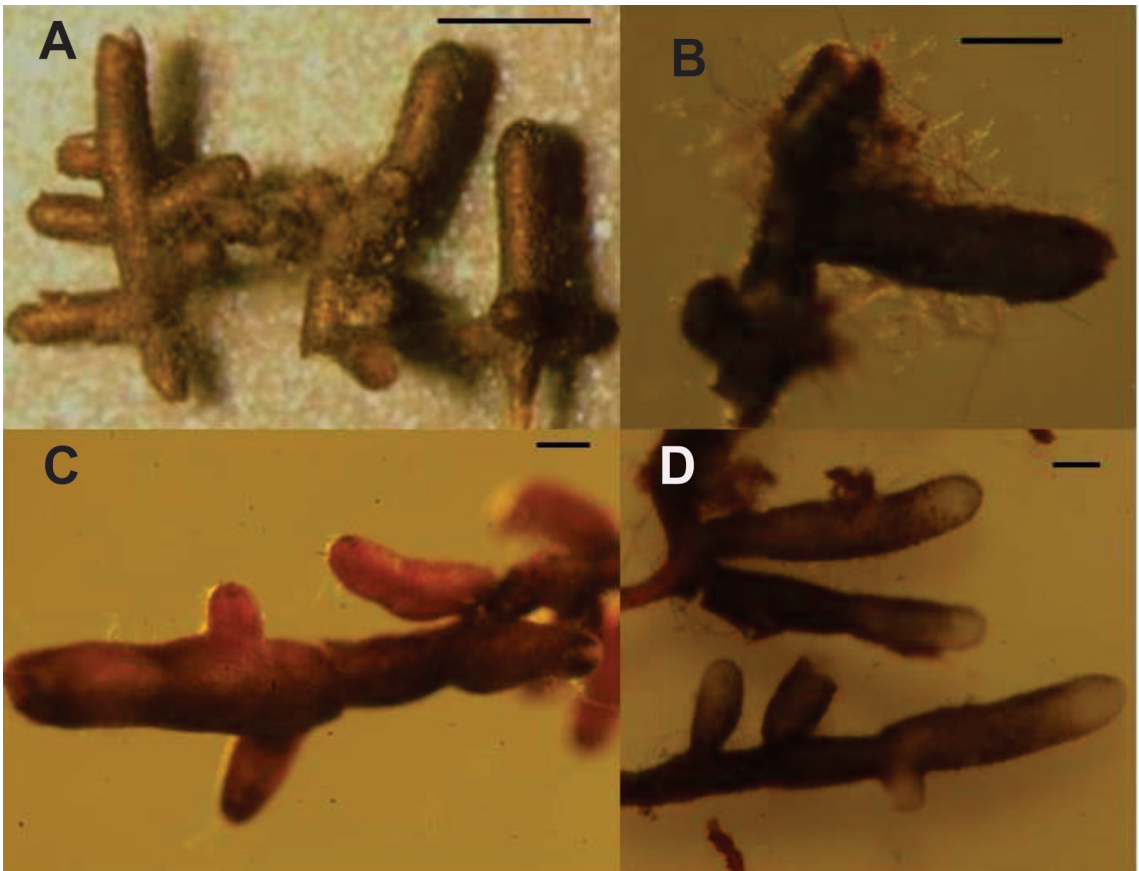
**Dimensiones:** largo total: 3–3,25 mm; largo de las ramificaciones: 1,5–2 mm; diámetro principal: 0,27–0,36 mm; diámetro de las ramificaciones: 0,19–0,25mm.

**Descripción anatómica:** abundantes y prominentes cistidios en forma de aguja o punzón, con 2–3 septos por cistidio, con célula basal y pared engrosada, de 95–100 µm de largo y 3–4 µm de diámetro.

Manto externo: pseudoparenquimatoso, con células angulares (Tipo L).

Manto medio: pseudoparenquimatoso, con células epidermoides (Tipo M).

Manto interno: plectenquimatoso (Tipo A).



**Fig. 3.** Aspecto macroscópico de los morfotipos EM de especies de *Toментella*: A, *Toментella tenuissima*, B, *Toментella patagónica*, C, *Toментella ellisii*, D, *Toментella* sp. 1. Barra= 0,5 mm.

## DISCUSIÓN

En este trabajo, mediante un abordaje morfo-anatómico y molecular, se caracterizan por primera vez 4 especies del género *Toментella* presentes en los bosques de Nothofagaceae de Patagonia (Argentina) y se las asocia con diferentes especies de esa familia. *Toментella* sp. correspondió a muestras ambientales que formaron un clado con muy alto soporte (100%) que no fue asociado con ningún basidioma o taxón conocido. El hallazgo de basidiomas que correspondan con estas secuencias permitiría la descripción de una nueva especie. Los morfotipos EM descritos no presentaron especificidad por un único hospedante sino que fueron encontrados en al menos dos especies de Nothofagaceae. *Toментella patagónica* fue hallada abundantemente en *Nothofagus dombeyi*,

*Lophozonia alpina* y *L. obliqua* (Salgado Salomón, inédito) y *N. pumilio* (Kuhar *et al.*, 2016); *Toментella tenuissima* fue detectada en ápice radiculares ectomicorrizados de *L. alpina* y *N. dombeyi* usando técnicas moleculares (Fernández *et al.*, 2013; Nouhra *et al.*, 2013) y en *N. pumilio* (Kuhar *et al.*, 2016). *Toментella* sp. fue previamente registrada por Nouhra *et al.* (2013) en *L. obliqua*; en cambio, en este trabajo se la describió para *N. pumilio*. Otro ejemplo es *Toментella ellisii*, que fue reportada previamente en ápices radiculares ectomicorrizados de *L. alpina* mediante la aplicación de herramientas moleculares por Fernández *et al.* (2013), mientras que en este trabajo se la describe para *N. antarctica*.

La mayoría de las EM de *Toментella* presentan morfotipos caracterizados por ser poco ramificados, de color marrón oscuro negruzco, marrones,

marrón ocráceo o avellana-castaño dorado; estas características también fueron observadas en los morfotipos de Patagonia (Agerer, 1995; Binder *et al.*, 2013; Jakucs & Erős-Honti, 2008, Jakucs *et al.*, 2005, 2015; Köljalg *et al.*, 2001). En su gran mayoría las EM de *Tomentella* forman fibulas, sin embargo sólo fueron observadas en *Tomentella ellissi* en Patagonia (Agerer, 1995; Binder *et al.*, 2013; Jakucs & Erős-Honti, 2008, Jakucs *et al.*, 2005, 2015; Köljalg *et al.*, 2001). Jakucs & Erős-Honti (2008) describieron 25 EM formadas por especies de *Tomentella* en Europa y Australia. De éstas, el 52% presentó cistidios (*fibulocistidios* o cistidios tipo punzón), mientras que en este trabajo solo se observaron cistidios en *T. ellisii* y en *Tomentella* sp. Los mantos externos son, en general, pseudoparenquimatosos con células angulares o epidermoides (Agerer, 1995; Jakucs & Erős-Honti, 2008, Jakucs *et al.*, 2005, 2015), este tipo de manto solo fue encontrado en tres de los morfotipos, sin embargo uno de ellos forma manto plectequimatoso. Los aspectos morfo-anatómicos de las EM tales como el color, la presencia de cistidios y/o fibulas, el aspecto de las hifas emanantes y las reacciones coincidieron con las características de los basidiocarpos, con la única excepción del morfotipo de *T. ellisii* donde muy raramente fueron observados cistidios aunque están ausentes en el basidiocarpo (Köljalg, 1995; Kuhar *et al.*, 2016).

*Tomentella tenuissima* y *T. patagonica* fueron descritas por primera vez en bosques de *Nothofagus* por Kuhar *et al.* (2016) y encontradas en bosques de *N. dombeyi*, *L. alpina* y *L. obliqua* (Fernández *et al.*, 2013; Noughra *et al.*, 2013). Posiblemente se trate de especies endémicas ya que hasta el momento no se han encontrado en otras formaciones boscosas donde las especies de *Tomentella* son abundantes. Por otro lado, *Tomentella ellisii* podría ser considerada una especie de baja especificidad dado que ha sido reportada como micorrícica de *Alnus*, *Pinus*, *Quercus*, *Betula*, *Castanea* y especies del Amazonas (Buscardo *et al.*, 2010; Kunttu, 2016; Malysheva *et al.*, 2016; Menkis *et al.*, 2005; Noughra *et al.*, 2015; Pritsch *et al.*, 2010; Suvi, 2005; Tedersoo *et al.*, 2009; Yorou & Agerer, 2011), y en viveros forestales (Fernández *et al.*, 2013; Minchin *et al.*, 2012).

Todas las EM de *Tomentella* descritas en este trabajo corresponden al tipo *corta distancia* de

*exploración* (Agerer, 2001), similar a otras especies de *Tomentella* ya descritas (Jakucs & Erős-Honti, 2008, Jakucs *et al.*, 2015). Se ha interpretado que las características anatómicas de las EM podrían estar relacionadas con su biología y, posiblemente, con funciones en la nutrición de la planta (Agerer & Rambold, 2004-2016). Las características morfológicas de los elementos emanantes de las EM se asocian con diferentes funciones ecológicas referidas a las diferentes maneras de explorar y colonizar los sustratos (Agerer, 2001).

Dado que el estudio de los morfotipos micorrícicos sigue siendo el único método para relacionar grupos taxonómicos de hongos con las plantas hospedantes y permite caracterizar, seleccionar y clasificar EM, constituye una herramienta insustituible para la cuantificación y el análisis de la diversidad funcional de la comunidad EM, este trabajo aporta la descripción morfológica de *Tomentella tenuissima*, *T. patagonica*, *T. ellisii* y *Tomentella* sp. datos que permitirán avanzar en nuevos estudios ecológicos y de diversidad funcional en los bosques de Nothofagaceae en Patagonia, Argentina.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los propietarios de los establecimientos y a la Administración de Parques Nacionales-Delegación Patagonia, por permitirnos el acceso a los bosques para realizar el trabajo de campo y el financiamiento provisto por el PIP-CONICET 11220110100388 (a M.R.). Los autores son investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGERER, R. 1994. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag. Berlin.
- AGERER, R. 1995. Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: VARMA, A. K. & B. HOCK (eds.), Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology, pp. 685-734. Springer Verlag, Berlin.
- 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.
- AGERER, R. & G. RAMBOLD. 2004-2016. DEEMY - An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae [online]. Disponible en: <http://www.deemy.de/> [Acceso: 30 de noviembre de 2016].
- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Auto. Control* 19: 716-723.
- ALTSCHUL S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER & D. J. LIPMAN. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- BAAR, J., T. R. HORTON, A. M. KRETZER & T. D. BRUNS. 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytol.* 143: 409-418.
- BARROETAVERÑA, C., M. B. PILDAIN, M. E. SALGADO SALOMÓN & J. L. EBERHART. 2010. Molecular identification of ectomycorrhizas associated with ponderosa pine seedlings in Patagonian nurseries (Argentina). *Can. J. For. Res.* 40: 1940-1950.
- BENSON D. A., I. KARSCH-MIZRACHI, D. J. LIPMAN, J. OSTELL, B. A. RAPP & D. L. WHEELER. 2000. GenBank®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> Nucleic Acids Res. 28: 8-15.
- BENT, E. & D. L. TAYLOR. 2010. Direct amplification of DNA from fresh and preserved ectomycorrhizal root tips. *J Microbiol. Met.* 80: 206-208.
- BIDARTONDO, M. I., B. BURGHARDT, G. GEBAUER, T. D. BRUNS & D. J. READ. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 271: 1799-1806.
- BIDARTONDO M. I., A. M. KRETZER, E. M. PINE & T. D. BRUNS. 2000. High root concentration and uneven ectomycorrhizal diversity near *Sarcodes sanguinea* (Ericaceae): a cheater that stimulates its victims? *Am. J. Bot.* 87: 1783-1788.
- BINDER, A., D. PERSOH, N. S. YOROU, R. VERMA, C. BÄSSLER & R. AGERER. 2013. Ectomycorrhizae of *Tomentella badia*: description and molecular identification. *Acta Mycol.* 48: 155-171.
- BONITO, G., M. E. SMITH, T. BRENNEMAN & R. VILGALYS. 2012. Assessing ectomycorrhizal fungal spore banks of truffle producing soils with pecan seedling trap-plants. *Plant Soil* 356: 357-366.
- BROWN, S. P., M. A. CALLAHAM, A. K. OLIVER & A. JUMPPONEN. 2013. Deep Ion Torrent sequencing identifies soil fungal community shifts after frequent prescribed fires in a southeastern US forest ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86: 557-566.
- BUSCARDI, E., S. RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, M. P. MARTÍN, P. DE ANGELIS, J. S. PEREIRA, H. FREITAS. 2010. Impact of wild fire return interval on the ectomycorrhizal resistant propagules communities of a Mediterranean open forest. *Fungal Biol.* 114: 628-636.
- CABRERA, A. L. & A. WILLINK. 1980. Biogeografía de América Latina. Serie de Biología, Monografía 13. The General Secretariat of the Organization of American States, Washington, DC.
- DANIELSON, R. M. & M. PRUDEN. 1989. The ectomycorrhizal status of urban spruce. *Mycologia* 81: 335-341.
- DICKIE, I. A., & L. B. MARTÍNEZ-GARCÍA, N. A. KOELE, G.-A. GRELET, J. M. TYLIANAKIS, D. A. PELTZER & S. J. RICHARDSON. 2013. Mycorrhizas and mycorrhizal fungal communities throughout ecosystem development. *Plant Soil* 367: 11-39.
- DICKIE, I. A., N. BOLSTRIDGE, J. A. COOPER & D. A. PELTZER. 2010. Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 187: 475-484.
- DICKIE, I. A., R. C. GUZA, S. E. KRAZEWSKI & P. B. REICH. 2004. Shared ectomycorrhizal fungi between a herbaceous perennial (*Helianthemum bicknellii*) and oak (*Quercus*) seedlings. *New Phytol.* 164: 375-382.
- FERNÁNDEZ, N. V., P. MARCHELLI & S. B. FONTENLA. 2013. Ectomycorrhizas naturally established in *Nothofagus nervosa* seedlings under different cultivation practices in a forest nursery. *Microb. Ecol.* 66: 581-92.
- GARDES, M. & T. D. BRUNS. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- GOODMAN, D. M., D. M. DURALL & J. A. TROFYMOW. 1996. *Concise descriptions of North American Ectomycorrhizae*. Mycologue publications & Canada-B.C. Forest Res. Dev. Agreement. Canadian Forest Service. Victoria. Canada.
- GRESLEBIN, A. 2002. Fungi, Basidiomycota, Aphyllophorales: Coniophoraceae, Corticiaceae, Gomphaceae, Hymenochaetaceae, Lachnocladiaceae, Stereaceae, Thelephoraceae, Tulasnellales: Tulasnellaceae. In GUARRERA, S. A., GAMUNDI DE AMOS, I., MATTERI, C.M., (eds.), Flora Criptogámica de Tierra Fuego, 11: 1-212. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura, Buenos Aires.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.

- HIBBETT, D. S., A. OHMAN & P. M. KIRK. 2009. Fungal ecology catches fire. *New Phytol.* 184: 279-282.
- HIBBETT, D. S., A. OHMAN, D. GLOTZER, M. NUHN, P. M. KIRK & R. H. NILSSON. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biol. Rev.* 25: 38-47.
- HORTON, T. R. & BRUNS T. D. 1998. Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*). *New Phytol.* 139: 331-339.
- HYNES, M. H., M. E. SMITH, R. J. ZASOSKI & C. S. BLEDSOE. 2010. A molecular survey of ectomycorrhizal hyphae in a California *Quercus-Pinus* woodland. *Mycorrhiza* 20: 265-274.
- INGLEBY, K., L. T. T. THUY & N. T. PHONG. 2000. Ectomycorrhizal inoculum potential of soils from forest restoration sites in South Vietnam. *J. Trop. For. Sci.* 12: 418-422.
- IZZO, A., D. T. NGUYEN & T. D. BRUNS. 2006. Spatial structure and richness of ectomycorrhizal fungi colonizing bioassay seedlings from resistant propagules in a Sierra Nevada forest: comparisons using two hosts that exhibit different seedling establishment patterns. *Mycologia* 98: 374-383.
- KATOH, K. & D. M. STANDLEY. 2013. MAFFT: multiple sequence alignment software 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772-780.
- KENNEDY, P. G., A. D. IZZO & T. D. BRUNS. 2003. There is high potential for the formation of common mycorrhizal networks between understorey and canopy trees in a mixed evergreen forest. *Journal of Ecology* 91: 1071-1080.
- KÖLJALG, U. 1995. *Tomentella* (Basidiomycota) and related genera in temperate Eurasia. Synopsis Fungorum 9. Fungiflora, Oslo.
- KÖLJALG, U., A. DAHLBERG, A. F. S. TAYLOR, E. LARSSON, N. HALLENBERG, J. STENLID, K.-H. LARSSON, P. M. FRANSSON, O. KÅRÉN & L. JONSSON. 2000. Diversity and abundance of resupinate theleporoid fungi as ectomycorrhizal symbionts in Swedish boreal forests. *Mol. Ecol.* 9: 1985-1996.
- KÖLJALG, U., E. JAKUCS, K. BOKA & R. AGERER. 2001. Three ectomycorrhizae with cystidia formed by different *Tomentella* species as revealed by rDNA-ITS sequences and anatomical characteristics. *Folia Cryptog. Estonia* 38: 27-39.
- KÖLJALG U., R. H. NILSSON, K. ABARENKOV, L. TEDERSOO, A. F. S. TAYLOR, M. BAHRAM, S. T. BATES, T. D. BRUNS, J. BENGTTSSON-PALME, T. M. CALLAGHAN, B. DOUGLAS, T. DRENKHAN, U. EBERHARDT, M. DUEÑAS, T. GREBENC, G.W. GRIFFITH, M. HARTMANN, P. M. KIRK, P. KOHOUT, E. LARSSON, B. D. LINDAHL, R. LÜCKING, M. P. MARTÍN, P. B. MATHENY, N. H. NGUYEN, T. NISKANEN, J. OJA, K. G. PEAY, U. PEINTNER, M. PETERSON, K. PÖLDMAA, L. SAAG, I. SAAR, A. SCHÜBLER, J. A. SCOTT, C. SENÉS, M. E. SMITH, A. SUIJA, D. L. TAYLOR, M. T. TELLERIA, M. WEIß, K.-H. LARSSON. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi. *Molecular Ecology* 22: 5271-5277.
- KUHAR, F., C. BARROETAVERÑA & M. RAJCHENBERG. 2016. New species of *Tomentella* (Thelephorales) from the Patagonian Andes forests. *Mycologia* 108: 780-790.
- KUNTTU, P. 2016. Dead-wood-associated aphylloroid fungi: perspectives on the diversity, ecology and conservation biology of species and their habitats. *Dissertationes Forestales* 225. 66 p. <http://dx.doi.org/10.14214/df.225>
- JAKUCS, E., G. M. KOVÁCS, R. AGERER, C. ROMSICS & Z. ERŐS-HONTI. 2005. Morphological-anatomical characterization and molecular identification of *Tomentella stuposa* ectomycorrhizae and related anatomotypes. *Mycorrhiza* 15: 247-258.
- JAKUCS, E. & Z. ERŐS-HONTI. 2008. Morphological-anatomical characterization and identification of *Tomentella* ectomycorrhizas *Mycorrhiza* 18: 277-285.
- JAKUCS, E., Z. ERŐS-HONTI, D. SERESS & G. M. KOVÁCS. 2015. Enhancing our understanding of anatomical diversity in *Tomentella* ectomycorrhizas: characterization of six new morphotypes. *Mycorrhiza* 15: 459-470.
- LILLESKOV, E. A., T. J. FAHEY, T. R. HORTON & G. M. LOVETT. 2002. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* 83: 104-115.
- MAH, K., L. E. TACKABERRY, K. N. EGGER, H. B. MASSICOTTE. 2001. The impacts of broadcast burning after clearcutting on the diversity of ectomycorrhizal fungi associated with hybrid spruce seedlings in central British Columbia. *Can J For Res* 31: 224-235.
- MALYSHEVA, E. F., V. F. MALYSHEVA, A. E. KOVALENKO, E. A. PIMENOVA, M. N. GROMYKO, S. N. BONDARCHUK & E. Y. U. VORONINA. 2016. Below-ground ectomycorrhizal community structure in the post fire successional *Pinus koraiensis* forests in the central Sikhote-Alin (the Russian Far East). *Botanica Pacifica* 5: 19-31.

- MCKENDRICK, S. L., J. R. LEAKE & D. J. READ. 2000. Symbiotic germination and development of mycoheterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytol.* 145: 539-548.
- MENKIS A., R. VASILIAUSKAS, A. F. S. TAYLOR, J. STENLID & R. FINLAY. 2005. Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16: 33-41.
- MINCHIN, R. F., H. J. RIDGWAY, L. CONDRON, E. E. JONES. 2012. Influence of inoculation with a *Trichoderma* bio-inoculant on ectomycorrhizal colonization of *Pinus radiata* seedlings. *Ann. Appl. Biol.* 161: 57-67.
- MORRIS, M. H., M. A. PÉREZ-PÉREZ, M. E. SMITH, C. S. BLEDSOE. 2008. Multiple species of ectomycorrhizal fungi are frequently detected on individual oak root tips in a tropical cloud forest. *Mycorrhiza* 18: 375-383.
- NARA, K. 2006. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytol.* 169: 169-178.
- NARA, K., H. NAKAYA & T. HOGETSU. 2003a. Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytol.* 158:193-206.
- NARA, K., H. NAKAYA, B. Y. WU, Z. H. ZHOU & T. HOGETSU. 2003b. Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytol.* 159: 743-756.
- NOUHRA, E., C. URCELAY, S. LONGO & L. TEDERSOO. 2013. Ectomycorrhizal fungal communities associated to *Nothofagus* species in Northern Patagonia. *Mycorrhiza* 23: 487-496.
- NOUHRA E., N. PASTOR, A. BECERRA, E. S. AREITIO & J. GEML. 2015. Greenhouse seedlings of *Alnus* showed low host intrageneric specificity and a strong preference for some *Tomentella* ectomycorrhizal associates. *Microb. Ecol.* 69: 813-825.
- PEAY, K. G., T. D. BRUNS, P. G. KENNEDY, S. E. BERGEMANN & M. GARBELOTTO. 2007. A strong species-area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecol. Lett.* 10: 470-480.
- PRITSCH, K., A. BECERRA, S. PÖLME, L. TEDERSOO, M. SCHLOTTER & R. AGERER. 2010. Description and identification of *Alnus acuminata* ectomycorrhizae from Argentinean alder stands. *Mycologia* 102: 1263-1273.
- RICHARD, F., S. MILLOT, M. GARDES & M. A. SELOSSE. 2005. Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytol.* 166: 1011-1023.
- RONQUIST, F. & J. P. HUELSENBECK. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- SELOSSE, M. A., M. WEIß, J. L. JANY & A. TILLIER. 2002. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Mol. Ecol.* 11: 1831-1844.
- SMITH, M. E., G. W. DOUHAN, D. M. RIZZO. 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytol.* 174: 847-863.
- SMITH, S. E. & D. J. READ. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3th ed. Academic Press. Cambridge, U.K.
- SUVI, T. 2005. Ectomycorrhizal fungal diversity of birch in Tagamoisa wooded meadow and the adjacent forest. Master of Sciences Thesis. 47 pp. Tartu University, Tartu, Estonia. Disponible en: <http://mobile.dspace.ut.ee/handle/10062/1215>
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI & S. KUMAR. 2013. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- TAYLOR, D. L. & T. D. BRUNS. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Mol. Ecol.* 8: 1837-1850.
- TEDERSOO, L., G. GATES, C. W. DUNK, T. LEBEL, T. W. MAY, U. KÖLJALG & T. JAIRUS. 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: 403-416.
- TEDERSOO, L., P. PELLET, U. KÖLJALG & M. A. SELOSSE. 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* 151: 206-217.
- TEDERSOO, L., T. SUVI, E. LARSSON, U. KÖLJALG. 2006. Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. *Mycol. Res.* 110: 734-748.
- TEDERSOO, L., T. SUVI, T. JAIRUS & U. KÖLJALG. 2008. Forest microsite effects on community composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Piceaabies* and *Betula pendula*. *Environ Microbiol* 10: 1189-1201.

- WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE & J. W. TAYLOR. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. S., D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY & T. J. WHITE (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*, pp 315-322, Academic. Press. New York.
- WU, Y. T., T. WUBET, S. TROGISCH, S. BOTH, T. SCHOLTEN, H. BRUELHEIDE, & F. BUSCOT. 2013. Forest age and plant species composition determine the soil fungal community composition in a Chinese subtropical forest. *PLoS ONE* 8:e66829.
- YOROU, N. S. & R. AGERER. 2011. Rhizomorphic resupinate Thelephorales (Agaricomycetes, Basidiomycota) from Italy. *Nova Hedwigia* 92: 391-424.
- ZIMMER, K, N. A. HYMSON, G. GEBAUER, E. B. ALLEN, M. F. ALLEN & D. J. READ. 2007. Wide geographic and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytol.* 175: 166-175.

Recibido el 8 de febrero de 2017, aceptado el 15 de julio de 2017.