



# Uso de la secuenciación de segunda generación (NGS) para descubrir la diversidad de hongos degradadores de la madera en los bosques Andino-Patagónicos

Use of second generation sequencing (NGS) to discover the diversity of wood-degrading fungi in Andean-Patagonian forests

Molina, L.<sup>1,2</sup> ; María B. Pildain<sup>1,2</sup> \* 

1 Área de Fitopatología y Microbiología Aplicada, Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP), Ruta 259 km 16,24, (9200) Esquel, Chubut, Argentina.

2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

\* Autor correspondiente: <mbpildain@ciefap.org.ar>

## RESUMEN

Los hongos son los principales degradadores de la madera en los ecosistemas boscosos, contribuyendo significativamente al ciclo global del carbono. Los enfoques metagenómicos basados en un amplicón específico (*metabarcoding*) constituyen una herramienta poderosa para su prospección y estudio. El objetivo principal de este estudio fue caracterizar a través de secuenciación de segunda generación (NGS), comunidades de hongos degradadores en la albura de dos especies de *Nothofagus* de los bosques del norte de la Patagonia, para evaluar patrones de diversidad en sitios, estaciones, hospedadores, compartimentos del árbol y condiciones de salud, como una contribución a la autoecología de las especies de este género. Nuestro estudio comprendió tres pasos metodológicos principales: (i) muestreo de madera de árboles vivos sanos y enfermos de las especies forestales *N. dombeyii* y *N. pumilio*; (ii) extracción de ADN, amplificación y secuenciación de la región ITS1 en la plataforma MiSeq *Illumina*, (iii) procesamiento de lecturas y extracción de datos de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales y (iv) análisis de datos e interpretación. Se obtuvieron un total de 35 unidades taxonómicas (variantes de secuencia de amplicón -ASV-), las cuales fueron asignadas a 23 géneros de hongos putativos en 15

► Ref. bibliográfica: Molina, L.; Pildain, M. B. 2022. Uso de la secuenciación de segunda generación (NGS) para descubrir la diversidad de hongos degradadores de la madera en los bosques Andino-Patagónicos. *Lilloa* 59 (Suplemento): 155-172. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2022.59.S/2022.09.22>

► Recibido: 11 de julio 2022 – Aceptado: 22 de septiembre 2022 – Publicado en línea: 18 de octubre 2022.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

familias. *Postia pelliculosa* fue la especie detectada con mayor frecuencia en el estudio. El hospedador fue el factor más fuerte entre las variables estudiadas en cuanto a su efecto sobre la estructura y la composición de la comunidad fúngica analizada. Para *N. dombeyi*, que se distribuye en una amplia gama de condiciones climáticas, el sitio fue el modelador más fuerte de sus comunidades, mientras que para *N. pumilio* se observó una mayor susceptibilidad a los cambios de temperatura y estacionalidad, que son, ciertamente, factores relevantes para la conservación de los bosques en el actual escenario de cambio climático. Este es el primer estudio que utiliza NGS como una estrategia rápida y a gran escala para descubrir la diversidad de hongos que degradan la madera en los bosques templados de Patagonia.

**Palabras clave** — Decaimiento; Hymenochaetales; Illumina; *Nothofagus*; Polyporales.

### ABSTRACT

Fungi are the main degraders of wood in forest ecosystems, contributing significantly to the global carbon cycle. Metagenomic approaches based on a specific amplicon (metabarcoding) constitute a powerful tool for their prospecting and study. The main objective of this study was to characterize, through second-generation sequencing NGS, communities of degrading fungi in the sapwood of two species of *Nothofagus* from the forests of northern Patagonia, to evaluate diversity patterns in sites, seasons, hosts, plant compartments and health conditions, as a contribution to the autoecology of the species of this genus. Our study comprised three main methodological steps: (i) sampling of wood from healthy and diseased living trees of the forest species *N. dombeyii* and *N. pumilio*; (ii) DNA extraction, amplification and sequencing of the ITS1 region on the MiSeq Illumina platform, (iii) read processing and data extraction of the orders Polyporales and Hymenochaetales and (iv) data analysis and interpretation. A total of 35 molecular operational taxonomic units (amplicon sequence variant -ASV-) were obtained, to 23 putative fungal genera in 15 families. *Postia pelliculosa* was the most frequently detected species in the study. The host was the strongest factor among the variables studied in terms of its effect on the structure and composition of the fungal community analyzed. For *N. dombeyi*, which is distributed in a wide range of climatic conditions, the site was the strongest shaper of its communities, while for *N. pumilio* a greater susceptibility to changes in temperature and seasonality was discovered, which are, in fact, relevant factors for the conservation of forests in the current scenario of climate change. This is the first study to use NGS as a rapid, large-scale strategy to elucidate the diversity of wood-degrading fungi in Patagonian temperate forests.

**Keywords** — Decay; Hymenochaetales; Illumina; *Nothofagus*; Polyporales.

## INTRODUCCIÓN

Los bosques andino patagónicos son una de las últimas reservas mundiales de bosques templados con poca alteración antrópica y valiosa diversidad (Arroyo *et al.*, 1996). Entre los 20 géneros endémicos de árboles presentes, el 90% del área total está ocupada por especies de *Nothofagus* Blume (Donoso Zegers, 1993). *Nothofagus dombeyi* es la especie dominante en los bosques templado-húmedos de la Patagonia Norte y *Nothofagus pumilio* domina los rodales de altura en la Patagonia Norte y Central (Daniels y Veblen, 2004; Donoso Zegers, 1993). Ambas especies de *Nothofagus* presentan una situación distintiva de muerte en pie progresiva que exhibe un patrón espacial agrupado y del cual se han recuperado patógenos fúngicos potenciales, pero sin conducir a ninguna etiología patógena fúngica primaria (de Errasti *et al.*, 2015; Molina *et al.*, 2020; Pildain *et al.*, 2009). Hay antecedentes, acumulados durante las últimas décadas de investigación, sobre la diversidad de hongos asociados a estos árboles en ciertos grupos, como políporos, ectomicorrizas, hongos ofiostomatoides y otros hongos de descomposición (Barroetaveña *et al.*, 2019; de Errasti *et al.*, 2016; Rajchenberg, 2006). Se sabe que esta micobiota juega un papel clave en la aptitud y el funcionamiento de los árboles a través de dinámicas complejas (Baldrian, 2016) y expresadas a lo largo de un continuo de mutualismo, comensalismo y parasitismo que puede transcurrir, incluso, durante la vida del mismo organismo fúngico (Robinson *et al.*, 2004). En este sistema, los hongos degradadores de madera (HDM) son patógenos relevantes y reconocidos para los árboles muertos y en crecimiento.

Los HDM son capaces de descomponer componentes complejos de alto peso molecular en la pared celular de la planta en pequeñas moléculas para su asimilación por los hongos involucrados, así como por otros microorganismos (Blanchette, 1991). Juegan un rol esencial en el reciclado de nutrientes, ya que la descomposición de la madera es un proceso ambiental sumamente crítico y representa el principal recurso de carbono en los ecosistemas y ejerce una gran influencia en el desarrollo de los suelos (Blanchette, 1991). La mayoría de los hongos son saprótrofos que viven en madera muerta. Sin embargo, algunos son patógenos, que pueden infectar árboles vivos y causar pudrición o descomposición en los tallos y raíces de los árboles. Los HDM durante mucho tiempo han sido categorizados como hongos de pudrición marrón, blanca y blanda en base a las preferencias de sustratos y el patrón de degradación. Esta separación es arbitraria y actualmente se conoce que los tipos de pudrición son más un continuo (Riley *et al.*, 2014), pero la categorización es útil para la clasificación general de estos agentes degradadores y para su discusión. Los hongos de pudrición blanca exhiben excelentes habilidades de descomposición y son los responsables de la degradación de la lignina, celulosa y hemicelulosa (Tuor *et al.*, 1995), contribuyen al 90% de los hongos que causan la descomposición de la madera y son muy diversos, particularmente en áreas tropicales (Dai, 2005). Los hongos de la podredumbre parda se caracterizan por ser rápidos degradadores de celulosa y hemicelulosa, y acceden a los polisacáridos de la planta a través de una potencial modificación o degradación de la lignina (Hatakka, 2005). Estos hongos son los mayores invasores de la biomasa forestal, representando el 10% de los hongos que causan la descomposición de la madera, distribuyéndose principalmente en zonas

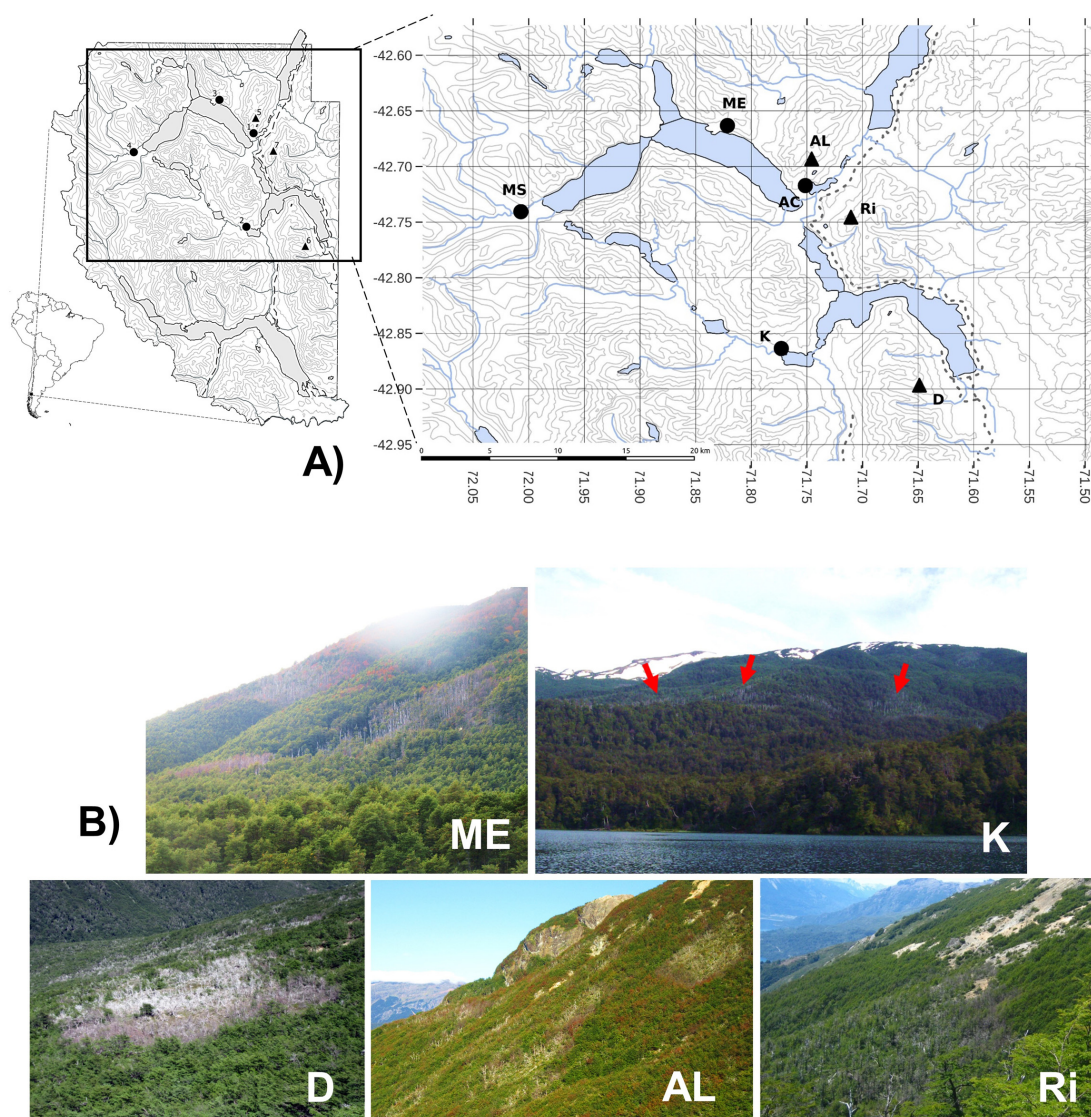
templadas y frías. Varios estudios han reportado que los hongos de la pudrición parda han evolucionado de un hongo saprofítico de pudrición blanca (Arantes y Goodell, 2014). Tanto los hongos de pudrición blanca como los hongos de pudrición parda son Basidiomicetes. Los hongos de pudrición blanda son principalmente Ascomicetes que en presencia de excesiva humedad descomponen la celulosa y las hemicelulosas y no se considera un problema en los árboles vivos en pie.

En las últimas décadas, las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés) se volvieron frecuentes y accesibles, lo que llevó al progreso en las investigaciones de micobiotas vegetales, especialmente a través de enfoques de *metabarcoding*. De todos modos, los esfuerzos en la investigación de micobiotas y los antecedentes disponibles en dicho tópico se distribuyen de manera desigual entre los distintos compartimentos vegetales, las regiones geográficas y los biomas (Harrison y Griffin, 2020). En lo que respecta a los biomas forestales, se han realizado varios estudios en hoja, mientras que la micobiota degradadora de madera cuenta hasta la fecha con muy pocos estudios en ecosistemas de bosques templados del hemisferio sur. En este contexto el objetivo de este trabajo fue caracterizar la micobiota degradadora de la madera pertenecientes a los órdenes Hymenochaetales y Polyporales de Basidiomycota en los bosques de *Nothofagus* describiendo sus patrones de diversidad y detectando las variables de estado sanitario, estación del año y de hospedador que afectan sus estructuras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio y muestreo

El estudio se realizó en el Parque Nacional Los Alerces (PNLA), Argentina (42° 58' 27.075" S 71° 38' 37.725" O), de noviembre de 2017 a mayo de 2018. El muestreo se repitió estacionalmente al principio y al final de la temporada de crecimiento (denominada primavera y otoño, respectivamente) para las especies de *Nothofagus*. Se definieron como sitios de muestreo cuatro rodales de *N. dombeyi* y tres rodales de *N. pumilio* y, todos ellos con mortalidad progresiva en pie (Fig. 1). Se muestrearon diez árboles de diámetro a la altura del pecho (DAP) similares en cada sitio por muestreo, por temporada: 5 sintomáticos y 5 asintomáticos según lo definido en Molina *et al.* (2020). Se muestrearon un total de 140 árboles. De cada árbol seleccionado se recolectaron muestras de 5 mm de diámetro y 2 cm de largo de madera (albura) del fuste al DAP y de las raíces utilizando un barrenador de Pressler esterilizado con etanol al 70% (v/v) y flameado entre cada muestra. Las muestras se almacenaron individualmente en bolsas de plástico y se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior procesamiento, un máximo de 48 horas después.



**Fig. 1. Sitios de estudio.** A) Área de estudio en el Parque Nacional Los Alerces. Sitios de muestreo seleccionados para los muestreos definitivos. Círculos: *N. dombeyi*. Triángulos: *N. pumilio*. MS: sitio río Alerce; ME: sitio lago Menéndez; AC: sitio cerro Alto el Petiso (rodal de coihue); K: sitio lago Kruger; AL: sitio cerro Alto el Petiso (rodal de lenga); Ri: sitio cerro El Riscoso; D: sitio cerro El Dedal. Mapa creado con QGIS de código abierto y gratuito. La grilla refleja coordenadas geográficas decimales (proyección Gauss-Krüger). B) Manchones de mortalidad agrupada en algunos sitios de estudio ejemplificados con flechas rojas.

**Fig. 1. Study sites.** A) Study area in Los Alerces National Park. Sampling sites selected for final sampling. Circles: *N. dombeyi*. Triangles: *N. pumilio*. MS: Alerce river site; ME: Lake Menéndez site; CA: Alto el Petiso Mt. site (coihue stand); K: Lake Kruger site; AL: Alto el Petiso Mt. site (lenga stand); Ri: El Riscoso Mt. site; D: El Dedal Mt. site. Map created with QGIS. The grid shows decimal geographic coordinates (Gauss-Krüger projection). B) Grouped mortality patches in the study (red arrows).

### Extracción de ADN, preparación de librería y secuenciación de segunda generación

Para cada muestra se molieron aproximadamente 50 mg de madera combinando la inmersión en nitrógeno líquido y 3 minutos de agitación en un molino mezclador según la metodología de Doyle y Doyle (1990), adaptada por Dumolin *et al.* (1995).

El ADN total se extrajo con el kit DNeasy Power Plant Pro (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante después de 10 minutos de incubación a 65 °C.

La librería del espaciador interno transcrito 1 (ITS1) se preparó utilizando la estrategia de etiquetado dual en dos pasos TrueSeq. La amplificación de ITS1 se realizó utilizando el par de cebadores ITS1-F y ITS2-R (Gardes y Bruns, 1993; White *et al.*, 1990) y MyTaq™ Mix (Bioline, USA, Inc., Memphis) en un volumen total de 25  $\mu$ L por reacción con las siguientes condiciones de ciclo: 94 °C durante 5 min, 32 ciclos de 94 °C por 45 seg, 50 °C por 45 seg y 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se purificaron utilizando ExoSap-IT (USB Corporation, Cleveland, OH) siguiendo las instrucciones del fabricante y se indizaron mediante el uso de combinaciones de *barcodes* específicos de la muestra de los pares de cebadores TruSeq i5-TS-DI-5xx e i7-TS-DI-7xx (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA) con las condiciones de ciclo: 95 °C durante 3 min, 8 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se purificaron con ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y el ADN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher, Waltham, MA). Los controles negativos de PCR y extracción de ADN, así como comunidades simuladas sintéticas no biológicas *SynMock* (Palmer *et al.*, 2018) (GenScript, Piscataway, NJ) se incluyeron como muestras y también se amplificaron, se incluyeron en los conjuntos finales y se secuenciaron (Palmer *et al.*, 2018). Las muestras se agruparon en proporciones aproximadamente equimolares. Las bibliotecas de la región ITS1 se secuenciaron en las instalaciones centrales de Purdue Genomics (Universidad de Purdue, West Lafayette, IN) con un kit de reactivos MiSeq v2 de 500 ciclos en la plataforma *Illumina* MiSeq (2 x 250 pb).

### Análisis bioinformático

El procesamiento de los datos de salida del secuenciador se llevó a cabo con el programa Amplicon toolkit (AMPtk) (v1.2.4; Palmer *et al.*, 2018) que demostró ser de mejor rendimiento para el análisis de amplicones ITS fúngicos en estudios previos con comunidades simuladas (Anslan *et al.*, 2018; Nilsson *et al.*, 2019) y el flujo de trabajo (*pipeline*) más adecuado para este conjunto de datos particular según Molina (2022). El *pipeline* aplicado primero eliminó las lecturas cortas (Palmer *et al.*, 2018), luego, recortó las secuencias de los cebadores de las lecturas; luego, fusionó las lecturas de extremos emparejados mediante USEARCH (v9.2.64; Edgar, 2010) y realizó el filtrado de calidad de las lecturas ensambladas mediante el recorte de errores esperados (Edgar y Flyvbjerg, 2015). Posteriormente, constituyó las unidades taxonómicas (variantes de secuencia del amplicón: ASVs) mediante el *pipeline* DADA2 (v1.6.0; Callahan *et al.*, 2016) que adicionalmente detecta y elimina secuencias quimera; corrigió el error por etiquetado de muestra (*tag-switching*) mediante la detección de las secuencias de la comunidad *SynMock* y el cálculo del índice de contaminación lateral y realizó un curado de ASVs erróneas mediante algoritmo LULU (v0.1.0;

Frøslev *et al.*, 2017). Finalmente, el *pipeline* aplicado asignó taxonomía a las ASVs constituidas contrastando sus secuencias con la base de datos UNITE mediante un abordaje híbrido que combina alineamiento global y los algoritmos UTEX (RC Edgar, [http://drive5.com/usearch/manual9.2/cmd\\_utax.html](http://drive5.com/usearch/manual9.2/cmd_utax.html)) y SINTAX (Edgar, 2016). La información de salida del *pipeline* aplicado se curó manualmente siguiendo las recomendaciones de Brown *et al.* (2015): las ASVs representadas por menos de 10 lecturas, fueron eliminadas del conjunto de datos y se excluyeron de los análisis.

Se extrajeron del set de datos las ASVs asignadas a los órdenes Polyporales e Hymenochaetales y su taxonomía se revisó manualmente. Cada secuencia se consultó en la base de datos GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> a la que se accedió en noviembre de 2021) utilizando el algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997). La identidad del 90 al 95 % se consideró como una coincidencia a nivel de género, la identidad por encima del 97 % se consideró una coincidencia a nivel de especie. Cuando hubo conflicto entre las taxonomías de las múltiples secuencias consultadas, se asignó el último ancestro común.

### Análisis de datos

Las diferencias de riqueza por muestra entre tratamientos se testearon mediante prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las diferencias de riqueza total entre tratamientos se testearon mediante test de Chi-Cuadrado de Pearson (1900). Diferencias de estructura de comunidad se testearon mediante perMANOVA (Anderson, 2017) utilizando un modelo que incorporara todas las variables de interés aplicado sobre matriz de distancias construidas con el índice de Raup-Crick pues es más adecuado para operar con datos binarios en sets de datos con muchos ceros (Raup y Crick, 1979). Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados con el software RStudio (v1.1.456, <http://www.rstudio.com/>) con los paquetes biomformat (v1.8.0; McMurdie y Paulson, 2016), phyloseq (v1.24.2; McMurdie y Holmes, 2013), ggplot2 (v3.3.3; Wickham, 2016), vegan (v2.5.7; Oksanen *et al.*, 2020) y betapart (v1.5.6; Baselga *et al.*, 2022).

## RESULTADOS

El experimento de secuenciación resultó en 38 millones de lecturas crudas y una profundidad media de 133.855 lecturas por muestra. La curva de rarefacción se aproximó a una asíntota cuando se consideraron los datos seleccionados manualmente (datos no incluidos), lo que indica un muestreo satisfactorio.

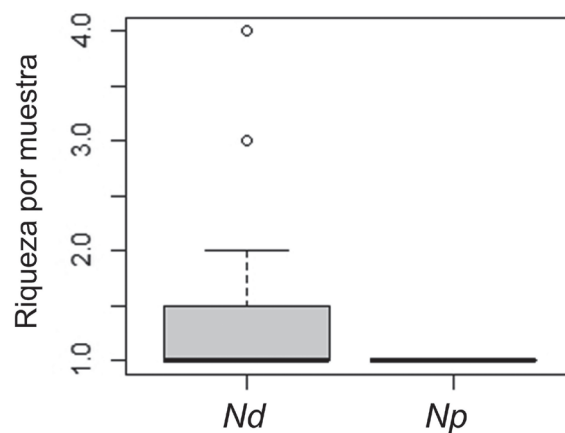
El *pipeline* aplicado arrojó 5726 ASVs informados, de los cuales se identificaron 359 (6 %) a nivel de especie, 365 (11 %) a nivel de género, 280 (5 %) a nivel de familia, 447 (8 %) a nivel de orden, 318 (6 %) a nivel de clase, 1663 (29%) a nivel de phylum y 2024 (35%) a nivel de reino. Se obtuvieron un total de 36 ASVs pertenecientes a los órdenes Polyporales e Hymenochaetales, detectados en 51 muestras de madera de *Nothofagus*. La lista de estos ASVs con sus taxonomías curadas y sus frecuencias de ocurrencia para cada variable evaluada se muestra en la Tabla 1. La riqueza por muestra fue mayor en *N. dombeyi* que en *N. pumilio* (Fig. 2).

**Tabla 1.** Taxones degradadores de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales detectados en albura de individuos vivos de *Nothofagus* y sus frecuencias de ocurrencia para cada nivel de las variables evaluadas.

**Table 1.** Degrading taxa of the orders Polyporales and Hymenochaetales detected in the sapwood of living individuals of *Nothofagus* and their frequencies of occurrence for each level of the evaluated variables.

	frec. total	<i>N. dombeyi</i>										<i>N. pumilio</i>												
		Nd	Np	St	At	St	At	F	R	O	P	AC	K	ME	MS	St	At	F	R	O	P	AL	D	Ri
<i>Postia pelliculosa</i>	11	9	2	2	9	1	8	6	3	2	7	1	1	3	4	1	1	1	1	1	1	2	-	-
Rickenellaceae_sp2	5	5	-	1	4	1	4	1	4	2	3	2	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ganoderma australe</i>	4	4	-	-	4	-	4	3	1	2	2	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hymenochaetales_sp1	4	3	1	1	3	1	2	-	3	-	3	-	2	1	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-
<i>Phlebia</i> _sp1	3	2	1	1	2	-	2	1	1	2	-	-	1	-	1	1	-	1	-	1	-	1	-	-
<i>Bjerkandera</i> _sp	2	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hymenochaetales_sp2	2	1	1	2	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	1	-	-
<i>Laetiporus</i> _sp	2	2	-	2	-	2	-	2	-	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phanerochaete sordida</i>	2	2	-	1	1	1	1	-	2	1	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phlebia</i> _sp2	2	2	-	-	2	-	2	-	2	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rickenellaceae_sp1	2	1	1	2	-	1	-	-	1	1	-	-	1	-	-	1	-	1	-	1	-	-	1	-
<i>Rigidoporus</i> _sp	2	2	-	-	2	-	2	2	-	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xenasma pruinatum</i>	2	1	1	1	1	1	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-
<i>Amyloporia stratosata</i>	1	1	-	1	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aurantiporus albidus</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	1	-
<i>Ceriporia reticulata</i>	1	1	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ceriporia viridans</i>	1	1	-	-	1	-	1	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Crustoderma dryinum</i>	1	1	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ganoderma sessile</i>	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	1	-
<i>Grifola sordulenta</i>	1	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meruliaceae_sp	1	1	-	-	1	-	1	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hyphodontia</i> _sp	1	1	-	-	1	-	1	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hypochnicium aotearoae</i>	1	1	-	-	1	-	1	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hypochnicium</i> _sp	1	1	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Junghuhnia nitida</i>	1	1	-	-	1	-	1	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nothophellinus andinopatagonicus</i>	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-
<i>Peniophorella praetermissa</i>	1	1	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phanerochaete velutina</i>	1	1	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Podoscyphaceae_sp	1	1	-	-	1	-	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Postia dissecta</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	1	-
<i>Ryvardenia cretacea</i>	1	1	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizopora</i> _sp	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-
<i>Tinctoporellus epimiltinus</i>	1	1	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xenasmataceae_sp	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	1	-
<i>Xenasmata</i> _sp	1	1	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nd: *N. dombeyi*. Np: *N. pumilio*. St: sintomático. At: asintomático. F: fuste. R: raíz. O: otoño. P: primavera. AC: sitio Cerro Alto el Petiso rodal de *N. dombeyi*. K: sitio Lago Kruger. ME: sitio Lago Menéndez. MS: sitio Río Alerce. AL: sitio Cerro Alto el Petiso rodal de *N. pumilio*. D: sitio Cerro El Dedal. Ri: sitio Cerro El Risco.



**Fig. 2.** Diferencias en la riqueza por muestra de taxones de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales detectados en muestras de albura de *N. dombeyi* (Nd) y *N. pumilio* (Np) (prueba de Kruskal-Wallis).

**Fig. 2.** Differences in the richness per sample of taxa of the orders Polyporales and Hymenochaetales detected in sapwood samples of *N. dombeyi* (Nd) and *N. pumilio* (Np) (Kruskal-Wallis test).

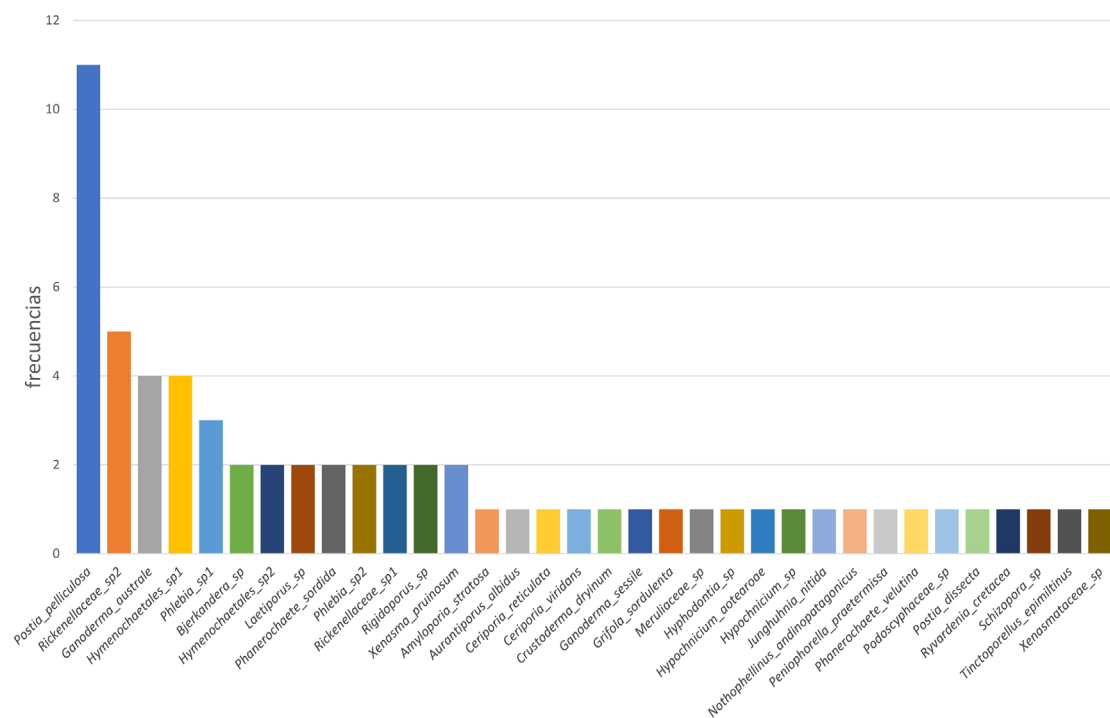


Independientemente del hospedante, el estado sanitario y el sitio, especies del género *Postia* fueron las más detectadas, seguidas por especies de *Ganoderma* y *Phlebia* (Fig. 3 y 4). El mismo patrón fue observado cuando las abundancias absolutas de lecturas fueron consideradas.

Entre todos los sitios muestreados, hubo dos rodales de *N. dombeyi* que exhibieron valores más altos de riqueza total y riqueza por muestra: Río Alerce (13 ASVs) y Lago Kruger (15 ASVs). El sitio con valores más bajos de riqueza fúngica de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales fue el rodal de *N. pumilio* en el Cerro El Dedal (1 ASV) (Tabla 2).

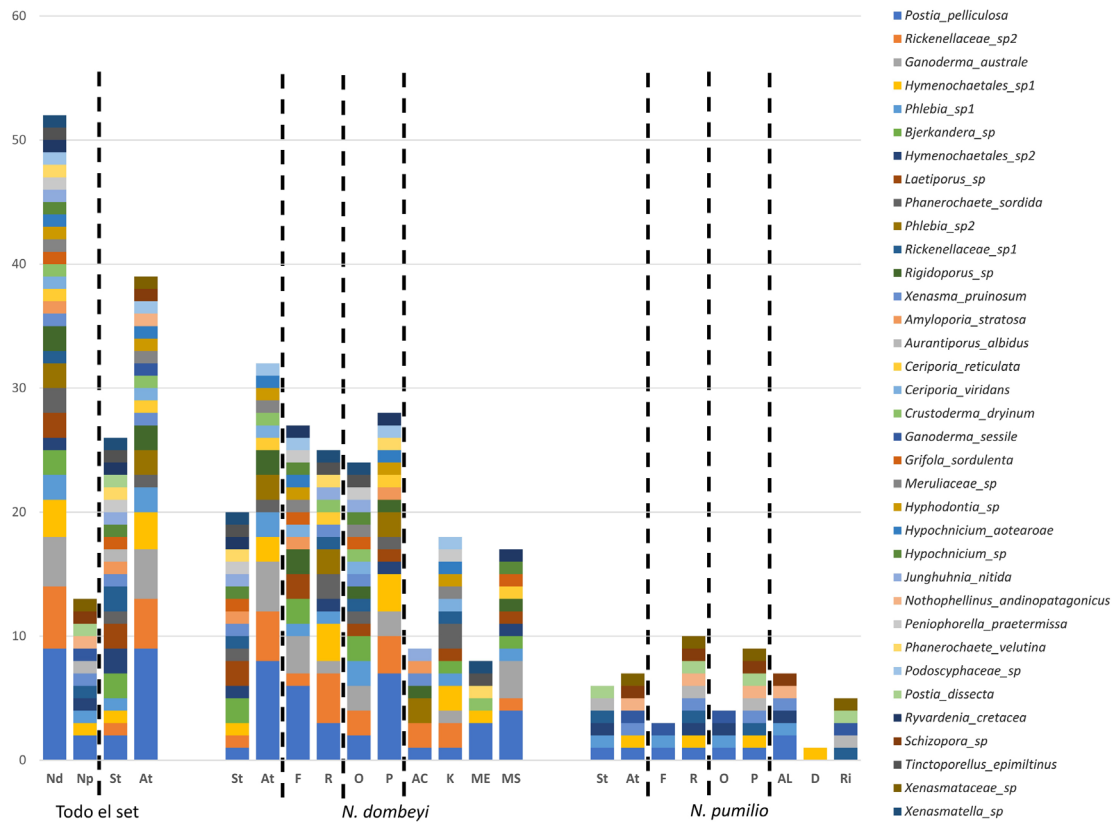
La riqueza total de ASVs resultó diferente entre las especies de *Nothofagus*, siendo *N. dombeyi* la especie más rica y que presentó, además, mayores frecuencias de ocurrencia de taxones de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales. *N. pumilio* exhibe una mayor proporción de presencias únicas que *N. dombeyi* (Tabla 2, Fig. 4).

El análisis multivariado de la comunidad fúngica para todo el conjunto de datos, permite inferir que las mayores diferencias a nivel de la estructura de la comunidad se deben al compartimento vegetal (PERMANOVA: 3,27% de la varianza) y, el estado de salud (PERMANOVA: 2,96% de la varianza) (Tabla 2, Fig. 5). Los árboles de *N. dombeyi* y de *N. pumilio* decaídos mostraron una menor frecuencia fúngica de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales que los sanos (Fig. 4) resultando en una diferencia de estructura significativa entre estados sanitarios en *N. dombeyi* (Tabla 2, Fig. 5). Las comunidades de *N. dombeyi* deterioradas se caracterizan por un conjunto



**Fig. 3.** Frecuencia de cada taxón de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales detectados en muestras de albura de *Nothofagus* vivos.

**Fig. 3.** Frequency of each taxon of the Polyporales and Hymenochaetales orders detected in sapwood samples of living *Nothofagus*.



**Fig. 4.** Frecuencias absolutas de taxones de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales determinados usando una similitud de secuencia del 97 % con secuencias de referencia en la base de datos UNITE. Comparaciones para cada nivel de las variables estudiadas (hospedador, estado sanitario, órgano, estación y sitio) para todo el set de datos y para cada especie de *Nothofagus* por separado. Nd: *N. dombeyi*. Np: *N. pumilio*. St: sintomático. At: asintomático. F: fuste. R: raíz. O: otoño. P: primavera. AC: sitio *N. dombeyi* Cerro Alto el Petiso. K: Lago Kruger. ME: Lago Menéndez. MS: Río Alerce. AL: sitio *N. pumilio* Cerro Alto el Petiso. D: Cerro El Dedal. Ri: Cerro El Riscoso.

**Fig. 4.** Absolute frequencies of taxa in the orders Polyporales and Hymenochaetales determined using 97% sequence similarity to reference sequences in the UNITE database. Comparisons for each level of the variables studied (host, health status, organ, season and site) for the entire data set and for each *Nothofagus* species separately. Nd: *N. dombeyi*. Np: *N. pumilio*. St: symptomatic. At: asymptomatic. F: stem. A: root. Or: autumn. Q: spring. AC: Alto el Petiso Mt. *N. dombeyi* site. K: Lake Kruger. ME: Lake Menéndez. MS: Alerce River. AL: Alto el Petiso Mt. *N. pumilio* site. D: El Dedal Mt. Ri: El Riscoso Mt.

de 13 taxones únicamente detectados en individuos sintomáticos, mientras que las comunidades de árboles sanos podrían caracterizarse por un conjunto de 10 taxones únicamente detectados en individuos visiblemente saludables (Tabla 2, Fig. 6).

La riqueza total de hongos degradadores en raíz fue mayor que en fuste en *N. pumilio* (Tabla 2). Las comunidades de fuste y raíz de *N. dombeyi* se diferenciaron en estructura presentando riquezas similares (Tabla 2, Fig. 5).

**Tabla 2.** Diversidad de taxones de los órdenes Polyporales e Hymanochaetales en albura de *Nothofagus* vivos. Riqueza de cada nivel de las variables estudiadas, diversidad beta entre ellos y efecto de las variables estudiadas sobre la estructura comunitaria.

**Table 2.** Diversity of taxa of the orders Polyporales and Hymanochaetales in living *Nothofagus* sapwood. Richness of each level of the variables studied, beta diversity between them and effect of the variables studied on the community structure.

		Diversidad Alfa		Diversidad Beta					
		riqueza	Chi-cuadrado p-valor	PERMANOVA p-valor	R2	Sorensen	turnover	nestedness	
hospedador	Nd	30	**		0,0184	0,707	0,500	0,207	
	Np	13							
estado sanitario	St	21			0,0296	0,707	0,700	0,007	
	At	21		*					
órgano	F	19			0,0327				
	R	22		*					
estación	O	22			0,0193				
	P	24							
<i>N. dombeyi</i>	estado sanitario	St	18		0,0497	0,758	0,733	0,024	
		At	16		*				
	órgano	F	18			0,0566	0,758	0,750	0,008
		R	17		**				
	estación	O	20			0,0285	0,657	0,625	0,032
		P	17						
	sitio	AC	7						
		K	15			0,0817			
		ME	7						
		MS	13						
<i>N. pumilio</i>	estado sanitario	St	6		0,0833	0,846	0,833	0,130	
		At	7						
	órgano	F	3	*		0,0833	0,846	0,667	0,179
		R	10						
	estacion	O	4			0,0833	0,846	0,750	0,096
		P	9						
	sitio	AL	7						
		D	1			0,1667			
	Ri	2							

Nd: *N. dombeyi*. Np: *N. pumilio*. St: sintomático. At: asintomático. F: fuste. R: raíz. O: otoño. P: primavera. AC: sitio Cerro Alto el Petiso rodal de *N. dombeyi*. K: sitio Lago Kruger. ME: sitio Lago Menéndez. MS: sitio Río Alerce. AL: sitio Cerro Alto el Petiso rodal de *N. pumilio*. D: sitio Cerro El Dedal. Ri: sitio Cerro El Riscoso.

## DISCUSIÓN

Los estudios con abordajes *metabarcoding* proliferaron las últimas dos décadas y evidenciaron la existencia de una gran diversidad oculta, aún desconocida, que podía involucrar inclusive, linajes enteros (Grossart *et al.*, 2016; Hibbett *et al.*, 2016). En los bosques templados del hemisferio sur y particularmente para Patagonia, todavía son muy escasos los estudios con estas nuevas tecnologías en hongos, además de que se sabe muy poco sobre la interacción y las funciones de dicha micobiota en el decaimiento de los bosques, la descomposición de la madera y la muerte de los árboles (Baldrian, 2016).

El presente trabajo amplía los hallazgos de estudios anteriores y aumenta nuestra comprensión de la biología de los hongos que causan la descomposición de la madera en los bosques nativos de Patagonia, Argentina. De manera más general, contribuye

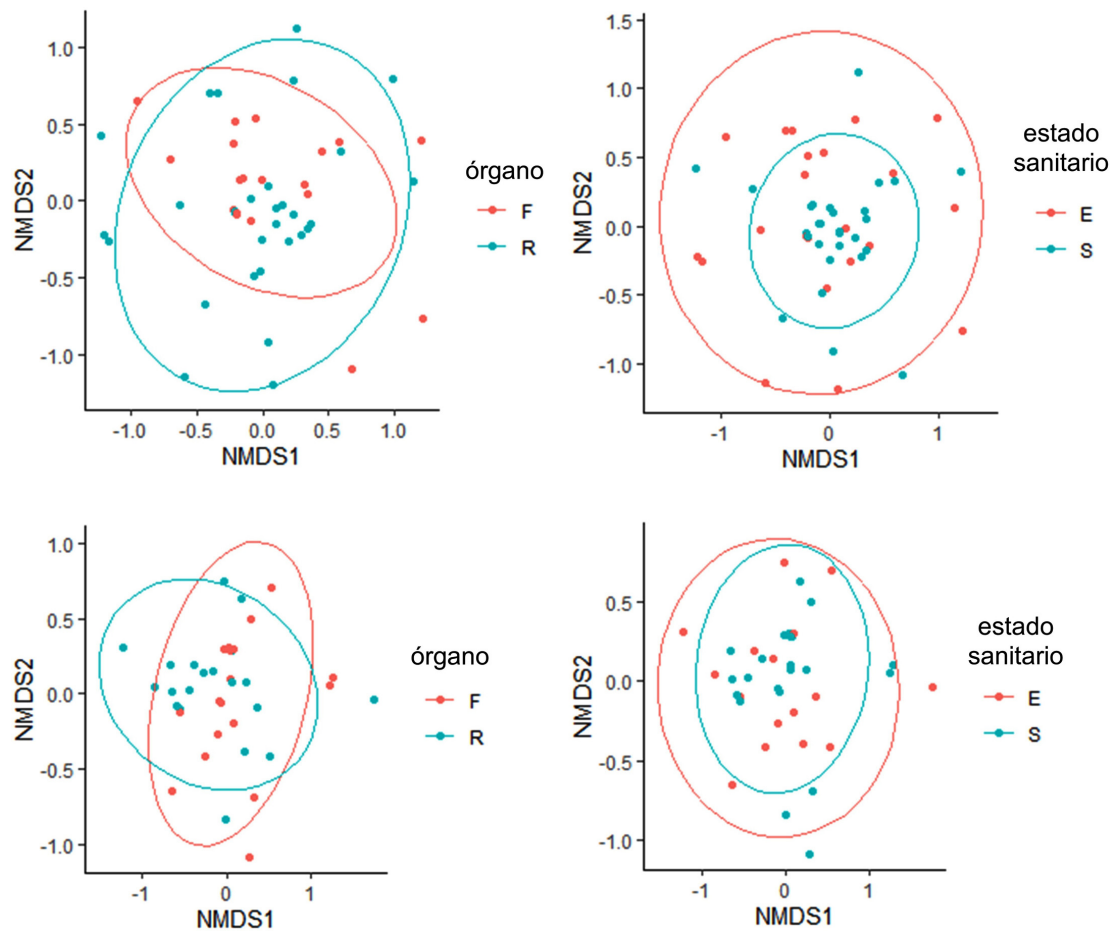


Fig. 5. Escalado dimensional no métrico (NMDS) reflejando las diferencias de estructura de las comunidades entre órganos (izq.) y estados sanitarios (der.) para todo el set de datos (arriba) y para *N. dombeyi* (abajo).

Fig. 5. Non-metric dimensional scaling (NMDS) showing differences in community structure between organs (left) and health status (right) for the entire data set (top) and for *N. dombeyi* (bottom).

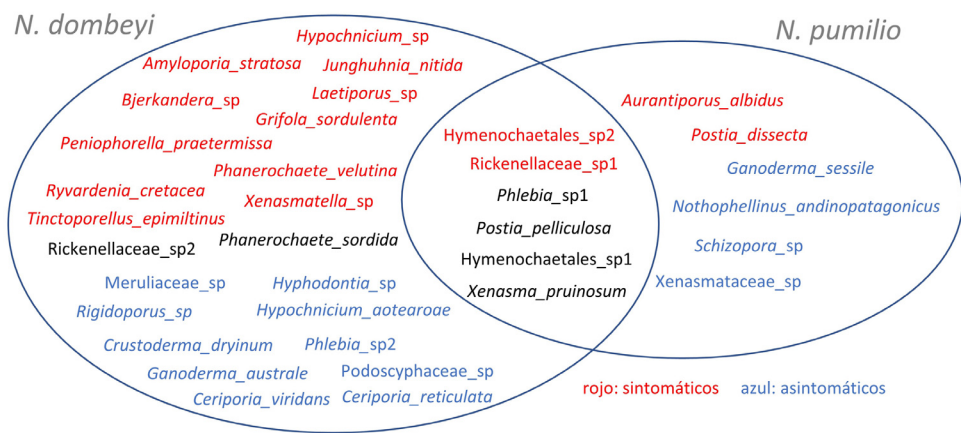


Fig. 6. Taxones de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales exclusivos (en color) y compartidos (negro) de cada especie de *Nothofagus* y de individuos sintomáticos (rojo) y asintomáticos (azul).

Fig. 6. Exclusive (in color) and shared (black) taxa of the Polyporales and Hymenochaetales orders of each *Nothofagus* species and of symptomatic (red) and asymptomatic (blue) individuals.

al conocimiento más amplio de este grupo a nivel internacional, particularmente en el hemisferio sur, donde se encuentran varias especies de basidiomicetos que no están presentes al norte del ecuador. En este estudio, describimos las comunidades de hongos causantes de pudriciones de los órdenes Polyporales e Hymenochaetales de las dos principales especies de *Nothofagus* de los bosques patagónicos andinos del norte, complementando los hallazgos basados en cultivo con resultados de enfoques libres de cultivo (Molina *et al.*, 2020). Se amplificó la región ITS1 y se envió a NGS, generando secuencias aleatoriamente. Las longitudes de lectura obtenidas fueron suficientes para discriminar unidades taxonómicas moleculares operativas en el nivel de género al nivel de similitud del 97% dentro de estos grupos fúngicos.

Hemos identificado un mayor número de géneros de hongos degradadores en *N. dombeyi* que en *N. pumilio*. El efecto del hospedante en las comunidades de hongos ha sido informado como fuerte, bajo e incluso no significativo en diferentes estudios (Bahram *et al.*, 2022; Küngas *et al.*, 2020; Rim *et al.*, 2021; U'Ren *et al.*, 2019, respectivamente). La divergencia de las comunidades fúngicas de *N. dombeyi* y *N. pumilio* se ha discutido como un reflejo de las distribuciones altitudinales no adyacentes en el norte de la Patagonia, la disponibilidad de agua y la edad del rodal (Molina *et al.*, 2020). Mientras que en Nueva Zelanda vincularon la jerarquía de similitud con las distancias filogenéticas entre las tres especies de *Nothofagus* evaluadas (Johnston *et al.*, 2012, 2017).

La composición, riqueza y diversidad de los hongos degradadores se rigen por muchos factores, tanto externos como intrínsecos. Algunos basidiomicetos son inherentemente más vigorosos y capaces de superar a otros, y las especies pueden emplear naturalmente diferentes estrategias de ocupación. La capacidad de colonización de diferentes hospedantes podría estar relacionada con propiedades particulares del duramen o la albura. Los hongos de la pudrición de la madera difieren de forma innata en su capacidad para producir enzimas capaces de desnaturalizar la celulosa y la lignina (Hood *et al.*, 2019).

Especies de *Postia* y *Ganoderma* fueron los taxones inequívocamente dominantes principalmente en árboles asintomáticos de *N. dombeyi*. *Postia*, causante de pudrición castaña, es uno de los géneros más grandes de Polyporales (Basidiomycota). *Postia pelliculosa* es una de las principales especies que pudren la madera de varias especies de *Nothofagus* en los bosques andinos patagónicos y está muy extendida en el hemisferio sur, siendo registrados también en el este de África (Ryvarden y Johansen, 1980), Camerún (Douanla-Meli, 2007), Australia (Cunningham, 1965) y Nueva Zelanda (Buchanan y Hood, 1992). *Ganoderma australe* (Polyporales) importante en ambas especies de *Nothofagus*, pero acompañada por un amplio rango de otras especies de Basidiomycetes, ha sido reportada como causante de pudrición blanca en la región (Rajchenberg, 2006). Las especies de *Ganoderma* han sido registradas como degradadores y patógenos en otras especies de *Nothofagus* en Nueva Zelanda y en muchas especies vegetales alrededor del globo (Hood *et al.*, 2019).

La estación del año fue otro factor que afectó la estructura de la comunidad. El muestreo de primavera representa el comienzo de esta temporada y refleja el efecto de los períodos más fríos, que también son los más húmedos. Por el contrario, al final de la temporada de crecimiento (muestreo de otoño), podemos observar el efecto del

período más cálido y seco siguiendo un patrón retrasado como en los suelos (Kunkel *et al.*, 2016; VoYíšková *et al.*, 2014). En primavera encontramos una mayor riqueza de taxones y una mayor abundancia absoluta que en otoño y esto ocurre principalmente en *N. pumilio*. Estos patrones, acompasados a la estacionalidad, ya se han observado para la microbiota asociada a raíces (Wang *et al.*, 2021). De esta manera, la comunidad de hongos degradadores de *N. pumilio* presentaría una mayor susceptibilidad a la estacionalidad y a los cambios de temperatura, en comparación con el microbioma de *N. dombeyi*, que se distribuye en ambientes menos extremos.

Por otro lado, la riqueza total de hongos degradadores en raíz fue mayor que en fuste en *N. pumilio*. Se conoce que la degradación en el suelo o en contacto con el suelo típicamente es más rápida, reflejando la presencia de mejores condiciones de humedad acompañada con una abundancia de organismos con diferentes capacidades de degradación de la madera. En contraste, el ambiente sobre el suelo donde se encuentra el fuste, es más desafiante, con menos organismos presentes y más seco, lo cual puede enlentecer el proceso de degradación y provocar cambios sustanciales en la estructura de las comunidades presentes (Goodell, 2020).

Reflejos de los patrones de diversidad y estructura de hongos degradadores utilizando nuevas herramientas son estudios emergentes, especialmente para bosques templados del hemisferio sur. Las especies de árboles analizadas necesitan de aportes en relación a las funciones, condiciones y procesos tomado como un holobioma en que los hongos son como ejes centrales de cambios de comunidades que repercuten en el funcionamiento del organismo. Es necesario ampliar el conocimiento sobre hongos claves en la sucesión para comprender los motores de diversidad y estructura y la colonización de tejidos de estas especies forestales.

## AGRADECIMIENTOS

A Mario Rajchenberg por haber constituido el Área de Micología y Patología Forestal del CIEFAP. Por su visión en formar un grupo de trabajo integrado por profesionales de diferentes disciplinas y abrir un abanico temático que excede su especialidad. Y por sobre todo por el cariño que supo generar en todos nosotros.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). En *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (pp. 1–15). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>
- Anslan, S., Nilsson, R. H., Wurzbacher, C., Baldrian, P., Tedersoo, L. y Bahram, M. (2018). Great differences in performance and outcome of high-throughput se-

- quencing data analysis platforms for fungal metabarcoding. *MycKeys* 39: 29-40. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.39.28109>
- Arantes, V, y Goodell, B. (2014). Current understanding of brownrot fungal biodegradation mechanisms: a review. En: Deterioration and protection of sustainable biomaterials. ACS Publications; p. 3–21.
- Bahram, M., Küngas, K., Pent, M., Pölme, S., Gohar, D. y Pöldmaa, K. (2022). Vertical stratification of microbial communities in woody plants. *Phytobiomes Journal* 6 (2): 161-168. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PBIOMES-06-21-0038-R>
- Baldrian, P. (2016). Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews* 41 (2): 109-130. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw040>
- Barroetaveña, C., Salomón, M. E. S. y Bassani, V. (2019). Rescuing the ectomycorrhizal biodiversity associated with South American Nothofagaceae forest, from the 19th century naturalists up to molecular biogeography. *Forestry: An International Journal of Forest Research* 92 (5): 500-511. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpz047>
- Baselga, A., Orme, D., Villéger, S., De Bortoli, J., Leprieur, F. y Logez, M. (2022). Partitioning beta diversity into turnover and nestedness components. En *R package version 1.5.6*. <https://cran.r-project.org/package=betapart>
- Blanchette, R. A. (1991). Delignification by Wood-Decay Fungi. *Annual Review of Phytopathology* 29 (1): 381-403. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.002121>
- Brown, S. P., Veach, A. M., Rigdon-Huss, A. R., Grond, K., Lickteig, S. K., Latham, K., Oliver, A. K. y Jumpponen, A. (2015). Scraping the bottom of the barrel: are rare high throughput sequences artifacts? *Fungal Ecology* 13: 21-225. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.006>
- Buchanan, P. K. y Hood, I. A. (1992). New species and new records of Aphyllophorales (Basidiomycetes) from New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 30 (1): 95-112. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1992.10412888>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. y Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13 (7): 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Goodell, B., Winandy, J. E., y Morrell, J. J. (2020). Fungal Degradation of Wood: Emerging Data, New Insights and Changing Perceptions *Coatings* 10 (12): 1210. <https://doi.org/10.3390/coatings10121210>
- Cunningham, G. H. (1965). Polyporaceae of New Zealand. En D. of S. y I. Research (Ed.), *Transactions*. <https://doi.org/10.2307/3756787>
- Dai, Y.-C. (2005). *Illustrations of Pathogenic Wood-Decaying Fungi in China*. Science Press.
- Daniels, L. D. y Veblen, T. T. (2004). Spatiotemporal influences of climate on altitudinal treeline in northern Patagonia. *Ecology* 85 (5): 1284-1296. <https://doi.org/10.1890/03-0092>
- de Errasti, A., de Beer, Z. W., Coetzee, M. P. A., Roux, J., Rajchenberg, M. y Wingfield, M. J. (2016). Three new species of Ophiostomatales from *Nothofagus* in Patagonia. *Mycological Progress* 15 (2): 1-17. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1158-z>

- de Errasti, A., de Beer, Z. W., Rajchenberg, M., Coetzee, M. P. A., Wingfield, M. J. y Roux, J. (2015). *Huntiella decorticans* sp. nov. (Ceratocystidaceae) associated with dying *Nothofagus* in Patagonia. *Mycologia* 107 (3): 512-521. <https://doi.org/10.3852/14-175>
- Donoso Zegers, C. (1993). Estructura, variación y dinámica de bosques templados de Chile y Argentina. Ecología Forestal. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Douanla-Meli, C. (2007). Fungi of Cameroon. Ecological diversity with emphasis on the taxonomy of Non-gilled Hymenomycetes from the Mbalmayo forest reserve. En *Bibliotheca Mycologica* (Vol. 202).
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dumolin, S., Demesure, B. y Petit, R. J. (1995). Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91 (8): 1253-1256. <https://doi.org/10.1007/BF00220937>
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26 (19): 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar, R. C. (2016). SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv* 074161. <https://doi.org/10.1101/074161>
- Edgar, R. C. y Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* 31 (21): 3476-3482. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv401>
- Frøslev, T. G., Kjøller, R., Bruun, H. H., Ejrnæs, R., Brunbjerg, A. K., Pietroni, C. y Hansen, A. J. (2017). Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. *Nature Communications* 8 (1): 1188. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01312-x>
- Gardes, M. y Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2 (2): 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Grossart, H.-P., Wurzbacher, C., James, T. Y. y Kagami, M. (2016). Discovery of dark matter fungi in aquatic ecosystems demands a reappraisal of the phylogeny and ecology of zoosporic fungi. *Fungal Ecology* 19: 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.004>
- Hatakka, A. (2005). Biodegradation of lignin . En S. Alexander (ed.), *Biopolymers Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. <https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol1005>
- Harrison, J. G. y Griffin, E. A. (2020). The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? *Environmental Microbiology* 22 (6): 2107-2123. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14968>
- Hibbett, D., Abarenkov, K., Kõljalg, U., Öpik, M., Chai, B., Cole, J., Wang, Q., Crous, P., Robert, V., Helgason, T., Herr, J. R., Kirk, P., Lueschow, S., O'Donnell, K., Nilsson, R. H., Oono, R., Schoch, C., Smyth, C., Walker, D. M., ... Geiser, D.



- M. (2016). Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia* 108 (6): 1049-1068. <https://doi.org/10.3852/16-130>
- Hood, I. A., McDougal, R. L., Somchit, C., Kimberley, M. O., Lewis, A. S. R. y Hood, J. O. L. (2019). Fungi decaying the wood of fallen beech (*Nothofagus*) trees in the South Island of New Zealand. *Canadian Journal of Forest Research* 49 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2018-0179>
- Johnston, P. R., Johansen, R. B., Williams, A. F. R., Paula Wikie, J. y Park, D. (2012). Patterns of fungal diversity in New Zealand *Nothofagus* forests. *Fungal Biology* 116 (3): 401-412. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.12.010>
- Johnston, P. R., Park, D. y Smissen, R. D. (2017). Comparing diversity of fungi from living leaves using culturing and high-throughput environmental sequencing. *Mycologia* 109 (4): 1-12. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1384712>
- Küngas, K., Bahram, M. y Pöldmaa, K. (2020). Host tree organ is the primary driver of endophytic fungal community structure in a hemiboreal forest. *FEMS Microbiology Ecology* 96 (2): 1-10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz199>
- Kunkel, V., Wells, T. y Hancock, G. R. (2016). Soil temperature dynamics at the catchment scale. *Geoderma* 273: 32-44. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.03.011>
- McMurdie, P. J. y Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8 (4): e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McMurdie, P. J. y Paulson, J. N. (2016). biomformat: An interface package for the BIOM file format. En *R/Bioconductor Package*.
- Molina, L. (2022). *Sanidad de los bosques de Nothofagus. Caracterización de sitio y organismos asociados a la muerte agrupada*. Universidad de Buenos Aires.
- Molina, L., Rajchenberg, M., de Errasti, A., Aime, M. C. y Pildain, M. B. (2020). Sapwood-inhabiting mycobiota and *Nothofagus* tree mortality in Patagonia: Diversity patterns according to tree species, plant compartment and health condition. *Forest Ecology and Management* 462: 117997. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.117997>
- Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P. y Tedersoo, L. (2019). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology* 17 (2): 95-109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E. y Wagner, H. (2020). *vegan: Community Ecology Package* (2.5.7). <https://cran.r-project.org/package=vegan>
- Palmer, J. M., Jusino, M. A., Banik, M. T. y Lindner, D. L. (2018). Non-biological synthetic spike-in controls and the AMPtk software pipeline improve mycobiome data. *PeerJ* 6 (5): e4925. <https://doi.org/10.7717/peerj.4925>
- Pearson, K. (1900). X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *The London, Edin-*

- burgh, and *Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 50 (302): 157-175. <https://doi.org/10.1080/14786440009463897>
- Pildain, M. B., Coetzee, M. P. A., Rajchenberg, M., Petersen, R. H., Wingfield, M. J. y Wingfield, B. D. (2009). Molecular phylogeny of *Armillaria* from the Patagonian Andes. *Mycological Progress* 8 (3): 181-194. <https://doi.org/10.1007/s11557-009-0590-8>
- Rajchenberg, M. (2006). *Los políporos (Basidiomycetes) de los bosques Andino Patagónicos de Argentina*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- Raup, D. M. y Crick, R. E. (1979). Measurement of faunal similarity in paleontology. *Journal of Paleontology* 53 (5): 1213-1227. <https://doi.org/https://www.jstor.org/stable/1304099>
- Riley, R., Salamov, A.A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W. y Grigoriev, I.V. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1400592111>
- Rim, S. O., Roy, M., Jeon, J., Montecillo, J. A. V., Park, S.-C. y Bae, H. (2021). Diversity and Communities of Fungal Endophytes from Four *Pinus* Species in Korea. *Forests* 12 (3): 302. <https://doi.org/10.3390/f12030302>
- Robinson, R. M., Morrison, D. J. y Jensen, G. D. (2004). Necrophylactic periderm formation in the roots of western larch and Douglas-fir trees infected with *Armillaria ostoyae*. II. The response to the pathogen. *Forest Pathology* 34 (2): 119-129. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00354.x>
- Ryvarden, L. y Johansen, I. (1980). A preliminary polypore flora of East Africa. En *A preliminary Polypore flora of East Africa*. Fungiflora.
- Tuor, U., Winterhalter, K. y Fiechter, A. (1995). Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology* 41 (1): 1-17. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00042-O](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00042-O)
- U'Ren, J. M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., Zimmerman, N. B., Carbone, I., May, G. y Arnold, A. E. (2019). Host availability drives distributions of fungal endophytes in the imperilled boreal realm. *Nature Ecology & Evolution* 3 (10): 1430-1437. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0975-2>
- VoYísková, J., Brabcová, V., Cajthaml, T. y Baldrian, P. (2014). Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytologist* 201 (1): 269-278. <https://doi.org/10.1111/nph.12481>
- Wang, H. H., Chu, H. L., Dou, Q., Feng, H., Tang, M., Zhang, S. X. y Wang, C. Y. (2021). Seasonal Changes in *Pinus tabulaeformis* Root-Associated Fungal Microbiota Drive N and P Cycling in Terrestrial Ecosystem. *Frontiers in Microbiology* 11: 526898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.526898>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En T. J. White, T. Bruns, S. J. W. T. Lee, J. Taylor, M. A. Innis, D. H. Gelfand, y J. J. Sninsky (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315-322). Academic Press.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (3.3.3; Vol. 2, Número 1, pp. 1-189). Springer-Verlag. <https://ggplot2.tidyverse.org>