UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza

Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza

COFILOGENIA DE HONGOS FORMADORES DE ECTOMICORRIZAS DEL GÉNERO *Austropaxillus* Bresinsky & Jarosch 1999 Y SUS HUÉSPEDES, ESPECIES DEL GÉNERO *Nothofagus* Blume 1850: IMPLICANCIAS EN CONSERVACIÓN

Proyecto para
optar al grado de Magíster
en Áreas Silvestres y
Conservación de la
Naturaleza.

Juan Pablo Tejena Vergara

Santiago, Chile

2014

Proyecto de grado presentado como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza.

Coordinador de Programa

Profesor(a) Nombre: Juan Caldentey Pont

Firma _____

Profesor(a) Guía/Patrocinante Nombre: Rosa Scherson

Nota _____

Firma _____

Comité de Proyecto de Grado

Profesor(a) Consejero(a) Marco Méndez

Nota _____

Firma _____

Profesor(a) Consejero(o) Álvaro Promis

Nota _____

Firma _____

Agradecimiento

A la Dra. Rosa Scherson, docente de la Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, de la Universidad de Chile, por su brillante asesoría académica, paciencia, amistad, y confianza depositada en mí durante la realización de este trabajo.

Al Laboratorio de Sistemática y Evolución de Plantas del Departamento de Silvicultura y Conservación de la Naturaleza, Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, de la Universidad de Chile, por el amplio espacio brindado para efectos de este proyecto.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) con sede en Ecuador, por el financiamiento académico durante los estudios en el programa de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile.

A la Universidad de Chile, y en especial al personal docente del Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza, quienes compartieron sus conocimientos y experiencias de orden académico en las aulas de clase.

Índice

1. Introducción……1
2. Revisión Bibliográfica…….....2
   2.1. Simbiosis ectomicorrícica……2
   2.2. Historia coevolutiva hongo-planta……..3
   2.3. Cofilogenia……6
   2.4. Historia biogeográfica del hemisferio sur……10
   2.5. Biogeografía de *Nothofagus*……12
   2.6. Biogeografía de *Austropaxillus*……14
   2.7. Asociación simbiótica entre hongos formadores de ectomicorrizas del género *Austropaxillus*, y sus huéspedes especies del género *Nothofagus*…….....15
   2.8. Asociaciones ectomicorrícicas y conservación……..16
3. Hipótesis y objetivos…….....18
4. Material y Método……18
   4.1. Área de estudio…….....18
   4.2. Taxa utilizados en el análisis cofilogenético……..19
   4.3. Análisis filogenético de *Nothofagus*……21
   4.4. Análisis filogenético *Austropaxillus*……..22
   4.5. Análisis de la estimación del tiempo de divergencia para *Nothofagus*……..23
   4.6. Análisis de la estimación del tiempo de divergencia para *Austropaxillus*……24
   4.7. Asociaciones simbióticas entre *Nothofagus* y *Austropaxillus*……25
   4.8. Análisis Cofilogenético……...25
   4.9. Análisis sobre las implicancias de la información cofilogenética en la conservación de la simbiosis ectomicorrícica entre *Nothofagus* y *Austropaxillus*……25
5. Resultados y Discusión……..26
   5.1. Filogenias del huésped y simbionte……26
      5.1.1. Filogenia de *Nothofagus*…….....26
      5.1.2. Filogenia de *Austropaxillus*…….....28
   5.2. Estimación del tiempo de divergencia……29
      5.2.1. Estimación del tiempo de divergencia para *Nothofagus*……29
      5.2.2. Estimación del tiempo de divergencia para *Austropaxillus*……31
   5.3. Historia Biogeográfica de *Nothofagus y Austropaxillus*……33
   5.4. Asociación hongo-planta……...36
   5.5. Cofilogenia……...37

5.5.1. Análisis cofilogenético entre hongos formadores de ectomicorrizas del género *Austropaxillus*, y sus huéspedes, especies del género *Nothofagus*……37
5.5.2. Cofilogenia entre *Austropaxillus* y *Nothofagus*: escenario hipotético……..38
5.6. Implicancias de la información cofilogenética en la conservación de la simbiosis ectomicorrícica……44
6. Conclusión…….....49
7. Referencias……49
8. Apéndices……..64

Lista de Figuras

Figura 1. Escala de tiempo geológico, 550 millones de años antes del presente……6
Figura 2. Patrones cofilogenéticos……...9
Figura 3. Diagrama hipotético de la ruptura de Gondwana oriental……11
Figura 4. Distribución general del género *Nothofagus* en el hemisferio sur……...13
Figura 5. Distribución de la simbiosis ectomicorrícica entre *Nothofagus* y *Austropaxillus*……...19
Figura 6. Filogenia de *Nothofagus*……...27
Figura 7. Filogenia de *Austropaxillus*……...28
Figura 8. Cronograma hipotético de los eventos de divergencia en *Nothofagus*……..31
Figura 9. Cronograma hipotético de los eventos de divergencia en *Austropaxillus*……..33
Figura 10. Relaciones simbióticas entre *Nothofagus* y *Austropaxillus*……37
Figura 11. Reconstrucciones cofilogenéticas hipotéticas entre *Austropaxillus* y *Nothofagus*….44

Lista de Tablas

Tabla 1. Especies de *Austropaxillus*, y sus potenciales huéspedes, en relación a su distribución geográfica……..20

Tabla 2. Resultados: soporte de ramas (probabilidad posterior >0.95), edad media de los nodos, y los valores de intervalos de la densidad posterior más alta (95%) (HPD por sus siglas en inglés) para *Nothofagus*……30

Tabla 3. Resultados: soporte de ramas (probabilidad posterior >0.95), edad media de los nodos, y los valores de intervalos de la densidad posterior más alta (95%) (HPD por sus siglas en inglés) para *Austropaxillus*……...32

Resumen

La actual crisis global de la biodiversidad, requiere que los científicos desarrollen modos estratégicos para destinar los esfuerzos de conservación de manera eficiente. Uno de ellos, radica en integrar la información sobre las relaciones coevolutivas entre distintas especies, dentro de las prioridades para la conservación biológica. En este sentido, la información cofilogenética, es decir, los patrones evolutivos que coinciden entre grupos ecológicamente asociados, se ha estado utilizando cada vez más en ecología de comunidades, para comprender los procesos que han conducido a su formación. Sin embargo los enfoques basados en dichos procesos rara vez se han considerado en los programas de conservación biológica, a pesar de las implicancias que supone esta alternativa, especialmente para aquellas asociaciones ecológicas que se establecen en la naturaleza (e.g., parasitismo, mutualismo, simbiosis).

Generalmente se acepta que la evolución de los hongos simbióticos está ligada íntimamente a la evolución de sus huéspedes. La asociación biotrófica obligada entre las especies de hongos ectomicorrícicos del género *Austropaxillus* y sus huéspedes, las plantas en el género *Nothofagus*, ha sido últimamente mencionada como un ejemplo de codivergencia, al compartir ambos grupos una historia biogeográfica en común.

En este estudio se utilizaron datos moleculares para examinar la hipótesis cofilogenética y biogeográfica de 6 especies del género *Austropaxillus* y sus huéspedes, 11 especies del género *Nothofagus* (subgéneros *Lophozonia* y *Nothofagus*). Los resultados indican una estructura cofilogenética general altamente significativa ($P < 0.0001$), a pesar que las asociaciones hongo-huésped no corresponden a una sencilla relación uno a uno. La hipótesis que se plantea, apoya la teoría de dispersión a larga distancia entre Australasia y el sur de Sudamérica, ya que el origen de *Austropaxillus* [23.78 Ma (millones de años)] se muestra como un evento posterior a la ruptura de Gondwana (90-80 Ma). Por otro lado el tiempo de divergencia estimado entre las especies *A. muelleri* de Australia, y *A. macnabbii* de Nueva Zelanda (15.65 Ma), coincide con la de sus huéspedes, *Nothofagus moorei* de Australia y *Nothofagus menziesii* de Nueva Zelanda (20.4 Ma) respectivamente.

Considerando la relación histórica entre *Austropaxillus* y *Nothofagus*, una combinación de los eventos de vicarianza y dispersión a larga distancia es necesario para explicar los actuales patrones de distribución de estos grupos. Así, la historia de estos organismos no sólo es un reflejo de la desintegración de Gondwana, sino también de otros acontecimientos que han contribuido a la distribución de muchas otras plantas y hongos del hemisferio sur. Estos hallazgos

corroboran los patrones descritos en otras asociaciones ecológicas con *Nothofagus*, representando una aproximación preliminar al uso de la investigación cofilogenética en las estrategias de conservación biológica, resaltando su implicancia en la preservarción de los procesos coevolutivos que involucra la relación hongo-planta.

Palabras clave: cofilogenia, ectomicorriza, *Austropaxillus*, *Nothofagus*, conservación.

Abstract

The ongoing global biodiversity crisis requires that scientists develop ways to strategically allocate conservation efforts. Among these is the proposal to directly integrate information on the evolutionary relationships between species into the biodiversity conservation priorities. Thus, cophylogenetic studies (i.e. matching evolutionary patterns among ecologically associated groups), has been increasingly used in community ecology to understand the underlying mechanisms that create, maintain, and determine the fate of biological communities. However, this approach has rarely been considered in conservation strategies, although the important implications that involve using this alternative, especially for ecological associations established in nature (e.g. parasitism, mutualism, symbiosis).

It is generally thought that the evolution of symbiotic fungi is intimately linked to the evolution of their hosts. The obligate, biotrophic association among species of the fungal genus *Austropaxillus* and their hosts in the plant genus *Nothofagus* has recently been cited as an example of cophylogeny, due to the common current geographic distribution of both taxa.

In this study, molecular data has been used to examine hypotheses regarding the cophylogeny and biogeography of the 6 species of *Austropaxillus* and their hosts, the 11 species of *Nothofagus*, (subgenera *Lophozonia* and *Nothofagus*). Our results indicate highly significant overall cophylogenetic structure ($P < 0.0001$), despite the fact that the associations between species of *Austropaxillus* and *Nothofagus* usually do not correspond to a simple one to one relationship. Our hypothesis may support the transoceanic long distance hypothesis for the trans-Antarctic distribution between Australasian and South American species of *Austropaxillus* species hosted by genus *Nothofagus*, due to the fact that the origin of *Austropaxillus* [23.78 Mya (million years ago)] is shown as a subsequent event to the rupture of Gondwana (90-80 Mya). On the other hand, the divergence between *A. muelleri* from Australia and *A. macnabbi* from New Zealand is estimated to have occurred 15.65 Mya. Interestingly, the same recent divergence between species from New Zealand and Australia, have also been found for *Nothofagus*.

Considering the historical association of *Austropaxillus* and *Nothofagus*, a combination of long distance dispersal and vicariance events is needed to explain the present patterns of distribution of these taxa. Thus the history of these organisms is not only a reflection of the breakup of Gondwana but also of other events that have contributed to the distributions of many other southern hemisphere plants and fungi. These results support the patterns described in other studies with *Nothofagus* and its ecological associations. This study is shown as a preliminary approach to provide useful information for future conservation efforts, highlighting its implication in preserving coevolutionary processes of symbiotic plant-fungi associations.

Key words: Cophylogeny, Ectomycorrhiza, *Austropaxillus*, *Nothofagus*, conservation.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de la información cofilogenética permite una comprensión más clara de la historia evolutiva de especies involucradas en las relaciones ecológicas. En este sentido, tanto la edad (diversificación de los taxa), como las limitaciones ecológicas (espacio geográfico, disponibilidad de recursos, y competencia entre las especies), son necesarias para explicar la diversidad actual y su variación entre clados y regiones (Morlon et al. 2010, Rabosky 2009), permitiendo priorizar esfuerzos en la conservación de los procesos evolutivos que subyacen detrás de estas relaciones.

La relación simbiótica establecida entre las especies del género de hongo ectomicorrícico *Austropaxillus*, y especies de plantas del género *Nothofagus* ha sido escasamente estudiada, a pesar de los aportes que puede entregar su estudio a la reconstrucción biogeográfica del hemisferio sur, y a las hipótesis que se han desarrollado alrededor de ello. Otras asociaciones como la ampliamente documentada relación entre los hongos parásitos del género *Cyttaria* y sus huéspedes en el género *Nothofagus,* han permitido que se asienten nuevas bases en el estudio de las relaciones entre hongos y plantas en el hemisferio sur, incorporando el componente evolutivo (Peterson et al. 2010).

La historia evolutiva de *Nothofagus* es considerada una pieza clave en la investigación sobre la biogeografía del hemisferio meridional (Moreira 2004, Van Steenis 1971), esto se debe particularmente a que este género de plantas produce altas cantidades de polen, el cual tiene un carácter distintivo, fosilizándose fácilmente (Cracraft 1975, Darlington 1965, Peterson et al. 2010, Steenis 1971). La evidencia más temprana que se tiene del género se remonta al Cretácico Tardío (83.5 Ma) (Dettmann et al. 1990). Los fósiles encontrados y ampliamente extendidos en el hemisferio sur, indican que *Nothofagus* estuvo presente en gran parte del sur de Gondwana antes de la ruptura continental (Dettmann et al. 1990, Peterson et al. 2010).

Hasta el momento se sabe que los hongos ectomicorrícicos del género *Austropaxillus*, muestran una asociación simbiótica restringida a las especies de *Nothofagus,* exclusivamente a dos de sus subgéneros*, Lophozonia* y *Nothofagus*, distribuidos en el sur de Sudamérica (Argentina y Chile), y sureste de Australasia (sureste de Australia, incluida Tasmania, y Nueva Zelanda) (Bresinsky et al. 1999, Skrede et al. 2011). Esta disyunta distribución transantártica, caracterizada por áreas de endemismo, tradicionalmente marca la hipótesis sobre la ocurrencia de posibles eventos de vicarianza y dispersión a larga distancia, permitiendo explicar la actual localización de ambos

grupos (Bresinsky et al. 1999, Dettmann et al. 1990, Hill et al. 1999, Linder y Crisp 1995, Peterson et al. 2010, Skrede et al. 2011, Swenson et al. 2001).

Se acepta generalmente que Nueva Zelanda fue la primera en separarse de Gondwana, hace 80 Ma, y que América del Sur y Australia estuvieron conectadas por la Antártida hasta hace 35 Ma (McLoughlin 2001). Entonces la filogenia de *Nothofagus* debería mostrar que las especies de Australia y América del Sur están más relacionadas que con las especies de Nueva Zelanda. Sin embargo los estudios taxonómicos y filogenéticos de *Nothofagus* han inferido una relación más estrecha entre especies de Australia y Nueva Zelanda (Dettmann et al. 1990, Heenan y Smissen 2013, Hill y Jordan 1993, Hill y Read 1991, Linder y Crisp 1995, Manos 1997, Martin y Dowd 1993, Peterson et al. 2010, Sauquet et al. 2012, Setoguchi et al. 1997).

Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de estudios que consideren análisis integrados de taxa relacionados, que muestren un patrón similar de disyunción transpacífica, para lograr una reconstrucción coherente de la biogeografía austral. En este trabajo se realizó un análisis cofilogenético entre *Austropaxillus* y *Nothofagus*, con el fin de establecer una hipótesis biogeográfica y coevolutiva sobre la distribución actual de esta asociación ectomicorrícica (hongo-huésped) en el hemisferio sur, destacando las implicancias de esta información en el campo de la conservación biológica.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Simbiosis ectomicorrícica

Una vasta cantidad de observaciones y evidencias experimentales, han demostrado que la simbiosis micorrícica está presente en la totalidad de comunidades vegetales existentes, convirtiéndose en un componente ecológicamente indispensable para la estabilidad de los ecosistemas (Allen 1991, Boucher 1985). El principal beneficio que esta simbiosis brinda a las plantas huéspedes, radica en que las hifas extraradicales del hongo promueven la absorción de iones poco móviles del suelo, los cuales son transferidos al huésped (Smith y Read 2009).

Desde la descripción y definición de micorrizas por parte de Frank durante la década de 1880 (Frank 1885, 1887), numerosos estudios sobre la interacción simbiótica entre el fotobionte y micobionte han sido publicados (e.g., Newman y Reddell 1987, Smith y Read 2009, Tedersoo et al. 2010). Estos estudios han abarcado varios ecosistemas en todos los continentes (Brundrett 2009, Trappe 1962, Wang y Qiu 2006).

A pesar que las endomicorrizas son más comunes en los ecosistemas terrestres, las ectomicorrizas, representadas mayoritariamente por hongos basidiomicetos y ascomicetos, son más frecuentes en regiones temperadas, boreales, y australes, donde se encuentran asociadas con un rango estrecho de familias de plantas huéspedes (Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, y Nothofagaceae) (Smith y Read 2009), constituidas por especies forestales ecológica y económicamente importantes (Tedersoo et al. 2010). Se estima en la actualidad que un 86% de las especies de plantas terrestres adquieren sus nutrientes minerales a través de la asociación micorrícica (Brundrett 2009), y que aproximadamente 6.000 especies de plantas en el mundo están ectomicorrizadas, por las casi 25.000 especies de hongos ectomicorrícicos identificadas hasta la actualidad (Brundrett 2009, Hawksworth et al. 1995, Miller 1983, Molina et al. 1992, Rinaldi et al. 2008).

Un gran número de evidencias sugieren que las ectomicorrizas tienen diferentes habilidades para explorar y explotar el suelo, las cuales podrían mejorar las habilidades competitivas de las plantas huéspedes (Bending y Read 1995, Finlay et al. 1992). A pesar del número relativamente pequeño de plantas ectomicorrizadas (aproximadamente el 3% alrededor del mundo) (Tedersoo et al. 2010), las especies de árboles que establecen la simbiosis con los hongos, ocupan extensas áreas de bosques en los extremos de los hemisferios norte y sur (Barbour y Billings 2000).

En general las ectomicorrizas mejoran la absorción de nutrimentos inorgánicos, permiten el uso de nutrientes orgánicos y protegen a las plantas de altas concentraciones de metales pesados y patógenos (Halling 2001, Halling et al. 2008, Smith y Read 2009). Por otro lado los hongos obtienen de las plantas azúcares simples que llegan a constituir hasta el 30% de la productividad primaria neta, en el caso de plántulas (Smith y Read 2009, Tedersoo et al. 2010). Por lo tanto, las ectomicorrizas juegan un rol importante en el establecimiento de plántulas y crecimiento de árboles en los ecosistemas terrestres donde se ha registrado su presencia.

Actualmente la integración de herramientas de identificación molecular, ha permitido constatar que los hongos ectomicorrícicos son filogenéticamente muy diversos (Tedersoo et al. 2010). Lo anterior está facilitando el diseño de los estudios biogeográficos, mejorando la comprensión sobre la estructura filogenética de las comunidades de hongos ectomicorrícicos, y ayudando a dilucidar las interrogantes alrededor de su distribución actual, y el porqué de las asociaciones con sus potenciales huéspedes.

2.2. Historia coevolutiva hongo-planta

La datación molecular permite relacionar la evolución de los organismos vivos a los eventos de tipo ecológico y geológico (Skrede et al. 2011). La combinación de fósiles que correlacionan los eventos de divergencia en filogenia y los modelos de evolución molecular cada vez más realistas, ha incrementado la precisión de la datación molecular (Berbee y Taylor 2010). Además la datación de eventos geográficos y ecológicos, así como las edades estimadas de los patrones simbióticos han sido también usadas (Allwood et al. 2010, Berbee y Taylor 1993), ya sea en combinación con la calibración fósil, o como la mejor alternativa cuando no existen fósiles disponibles. Desafortunadamente los fósiles registrados para hongos son escasos (Berbee y Taylor 2010). A pesar de esto, en los últimos años, los árboles de vida de hongos han sido extensamente rediseñados por métodos de filogenia molecular. Esto a su vez ha mejorado nuestro entendimiento de cómo las diferentes estrategias de nutrición en hongos han ido evolucionando (Binder y Hibbett 2002, Hibbett 2006).

Es así que una gran cantidad de estudios paleobotánicos, morfoanatómicos y filogenéticos basados en técnicas moleculares han evidenciado que la coevolución mantenida entre hongos micorrícicos y plantas se remonta al Paleozoico, hace más de 400 Ma, con el origen de las primeras plantas terrestres (Figura 1) (Honrubia 2009). Las exigentes condiciones ambientales, así como la coincidencia en tiempo y espacio de micobiontes y fotobiontes, respaldan la hipótesis de que la simbiosis micorrícica representó un mecanismo crucial de colonización de los paleoambientes terrestres por parte de las plantas (Selosse y Le Tacon 1998).

Para aquel periodo, los micobiontes probablemente ya habrían desarrollado una alta capacidad de prospección tridimensional para la captación de los todavía muy escasos nutrientes disponibles en los sustratos emergentes, mientras que los fotobiontes estarían ya adaptados a la captación de fotones, su conversión en azúcares, y sobretodo preadaptados al intercambio gaseoso (Selosse 2005). La relación trófica se establecería a nivel de los órganos de fijación del fotobionte. La eficiencia de esta asociación ha permitido a las plantas hacerse dominantes en casi la totalidad de los biomas terrestres, perdurando esta relación de mutuo beneficio más de 400 Ma, sin apenas cambios en el componente fúngico.

Los primeros datos acerca del desarrollo de estructuras simbióticas en los paleoecosistemas confirmaron la presencia de arbúsculos (estructuras características de las endomicorrizas vesículo-arbusculares, las cuales aseguran una gran superficie de contacto entre el fotobionte y micobionte), con su tronco basal y ramificaciones bien conservados, en el interior de células parenquimáticas de rizomas de *Rhynia major* del Devónico temprano (Remy et al. 1994, Taylor et al. 1995, 2004). Incluso parece existir unanimidad en considerar la existencia de

Glomeromycota (precursores de las actuales micorrizas arbusculares), desde al menos el Ordovícico (Redecker et al. 2000). Sin embargo no es hasta el Devónico que las primitivas micorrizas arbusculares desarrollaron sus estructuras funcionales (Berbee y Taylor 2007). Esto confirmaría la hipótesis acerca de la importancia transcendental en el proceso de terrestrialización de la endosimbiosis micorrícica hongo-planta (Pirozynski y Malloch 1975).

Otro evento importante que pone de manifiesto aún más la historia coevolutiva hongo-planta, se remonta al Cretácico (146-65 Ma), conocido como el periodo de expansión y diversificación de las angiospermas. Concretamente, es en el Cretácico Superior, hace tan sólo 130 Ma aproximadamente, cuando parecen haber surgido la mayoría de las familias de plantas con flores actuales (Qiu et al. 2005). Las angiospermas primitivas mantienen la estrategia trófica de la micorriza arbuscular, como había ocurrido desde el inicio del proceso de terrestrialización con todos los grupos vegetales aparecidos hasta el Cretácico. De hecho, la gran mayoría de las plantas con flores, especialmente las de los trópicos, mantienen dicho mutualismo hoy en día (Honrubia 2009).

Las gimnospermas de inicio del periodo Cretácico, son igualmente simbiontes con los Glomeromycota formadores de las micorrizas arbusculares. Sin embargo, a lo largo del periodo, en los biomas de climas más exigentes, con mayores oscilaciones climáticas de temperatura y precipitaciones, surgen elementos, principalmente arbóreos, de la vegetación (tanto en angiospermas como en gimnospermas), con innovadoras estructuras radicales que les aseguran un éxito adaptativo en tales ecosistemas (Honrubia 2009). Sus sistemas radicales incorporan un novedoso tipo de raíz secundaria y con crecimiento limitado, que puede ser colonizada por hongos que se especializaron en el intercambio de nutrientes con las plantas que los acogen, estas son las ectomicorrizas (Honrubia 2009).

Algunos autores (Cairney 2000, Pirozynski 1980) estiman que el origen de las ectomicorrizas fue hace unos 200 Ma, a mediados del Mesozoico, coincidiendo con la aparición de sus plantas hospedantes. Las pináceas debieron de surgir a finales del Triásico y con toda seguridad en el Jurásico, pero será el Cretácico el periodo de su diversificación (Malloch et al. 1980). Concretamente, el género *Pinus* debió haberse originado entre el Jurásico y el Cretácico Inferior, mientras que otros géneros de las actuales pináceas habrían divergido de sus predecesores hacia el Cretácico Superior e incluso en el Terciario (Nan 1995). Paralelamente, las familias más importantes de angiospermas ectomicorrizadas (Fagáceas, Salicáceas, Betuláceas) tuvieron también su origen durante el Cretácico (Ding 1995, Li 1996, Malloch et al. 1980).

La aparición de las ectomicorrizas parece obedecer a la necesidad de adaptación a ambientes inhóspitos por parte de diferentes grupos vegetales arbóreos con gran desarrollo aéreo, y por tanto, con elevados requerimientos nutricionales, cuyos sistemas radicales habrían ido evolucionando hacia formas jerárquicamente bien ramificadas (Honrubia 2009).

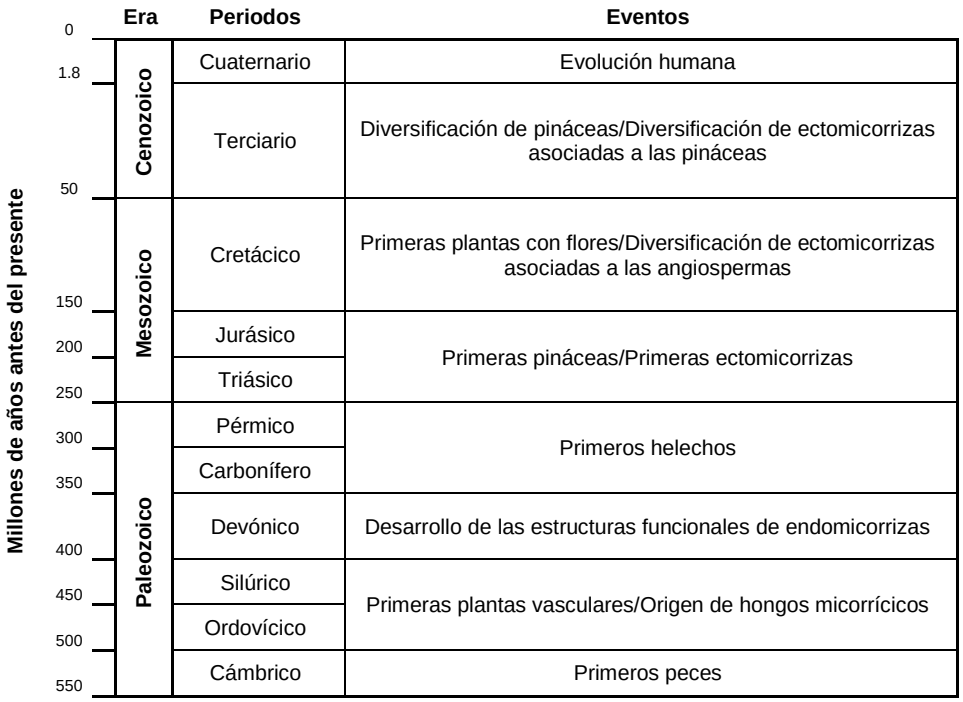

Figura 1. Escala de tiempo geológico, 550 millones de años antes del presente. Adaptado de Honrubia (2009).

2.3. Cofilogenia

El interés por la influencia recíproca entre huéspedes y hongos simbiontes, y los patrones evolutivos involucrados en la simbiosis, ha incrementado recientemente. Esto se atribuye a la necesidad por ejemplo de identificar y desarrollar agentes de biocontrol contra pestes invasivas, para mejorar la producción agrícola y forestal, y además para descifrar los procesos de diversificación en los organismos que están involucrados en la asociación (De Vienne et al. 2013, Page 1990, Poulin y Morand 2004, Smith et al. 2008).

En general se acepta que la evolución de los hongos simbióticos, que se encuentran asociados a un número limitado de huéspedes, debe estar estrechamente vinculada a la evolución de sus potenciales anfitriones (Klassen 1992). La comparación de historias evolutivas entre huéspedes

y sus simbiontes asociados se conoce como estudio cofilogenético, coevolutivo, o de codivergencia (Paterson y Banks 2001). Un objetivo fundamental de este tipo de estudios, es determinar los hechos evolutivos coincidentes que han generado la actual distribución de las especies simbióticas asociadas, además de hallar una explicación coherente de cómo los simbiontes (en este caso los hongos) se han asociado a sus huéspedes (Brooks y McLennan 2003, De Vienne et al. 2013).

Dos grandes paradigmas se consideran para explicar las asociaciones actuales entre un hongo simbiótico y su huésped: el primero se refiere a que una especie de hongo ha colonizado un nuevo huésped o anfitrión, es decir a un nuevo linaje, lo que se conoce como asociación por colonización; el segundo se refiere a que la especie huésped ha heredado la asociación simbiótica de su antepasado más reciente, a esto se conoce como asociación por descendencia (Brooks y McLennan 2003, De Vienne et al. 2013, Kliks 1990).

La asociación por colonización propone que la presencia de un hongo simbiótico en un huésped se debe al cambio o traspaso del simbionte de un anfitrión a otro (Brooks y McLennan 2003), esto sugiere que el hongo debió experimentar un evento de especiación después del aislamiento de su población ancestral, seguida por la colonización al nuevo huésped, siendo análoga esta especiación, a la dispersión hacia nuevas áreas por parte de los organismos de vida libre. Por otro lado, la asociación por descendencia sugiere que el hongo simbiótico ha sido heredado del ancestro más reciente del huésped. Esto indica que la especiación por parte del simbionte se producirá cuando el huésped también experimente un cambio evolutivo, lo cual es análogo a la especiación del organismo de vida libre, después de un evento de vicarianza (Brooks y McLennan 2003, Ronquist 2003).

El carácter heterótrofo de los hongos ectomicorrícicos, los convierten en un grupo idóneo para llevar a cabo estudios cofilogenéticos. Al establecer una asociación biotrófica obligada con las plantas, tienen usualmente una movilidad limitada, basándose principalmente de la transición de un huésped hacia otro, para obtener sus recursos energéticos (Smith y Read 2009). Esto significa que la asociación simbiótica entre planta-hongo, podría ser usada en los análisis de asociación por descendencia o coespeciación entre dos linajes, es decir cuando la especiación en un linaje es precedido por la especiación del otro.

En este tipo de análisis pueden observarse varios patrones, que no siempre evidencian una bifurcación simultánea del linaje del huésped y del simbionte asociado (Figura 2a) es decir, la obligada y especializada interacción entre huéspedes y simbiontes (De Vienne et al. 2013,

Paterson y Banks 2001). Los análisis cofilogenéticos son capaces de reconocer algunos otros tipos de eventos, tales como: la coespeciación diacrónica (Figura 2b, 2c), referida a la especiación del simbionte inicialmente sin la especiación del huésped o viceversa, produciéndose así, una posterior especiación del otro (Agosta et al. 2010, Giraud et al. 2010); pérdida del huésped, en este caso el simbionte está ausente de la población huésped original, es decir colonizando a una nueva especie huésped; duplicación (especiación independiente); conmutaciones (colonización de un nuevo linaje); y las extinciones (Figura 2d) (De Vienne et al. 2013, Paterson y Banks 2001). En efecto, la consideración de este tipo de sucesos hipotéticos, ha permitido dar más fundamento a los eventos de codivergencia entre huéspedes y sus organismos asociados (Page 1990).

Un riguroso estudio cofilogenético debe incorporar cuatro etapas fundamentales: Primero, una robusta taxonomía, del huésped y el simbionte; segundo, la construcción de las filogenias de ambos grupos (huésped-simbionte); tercero, una comparación cuantitativa de las filogenias de ambos grupos (huésped-simbionte); y cuarto, una prueba estadística para analizar las incongruencias entre ambas filogenias (Clayton et al. 1996).

Actualmente existen muchos software bioinformáticos que incorporan los diferentes métodos de análisis cofilogenético. El método utilizado en este estudio permitió el análisis de los aspectos filogenéticos de la coevolución huésped-simbionte (Legendre et al. 2002), entre los hongos ectomicorrícicos del género *Austropaxillus* y sus huéspedes, especies del género *Nothofagus*. .

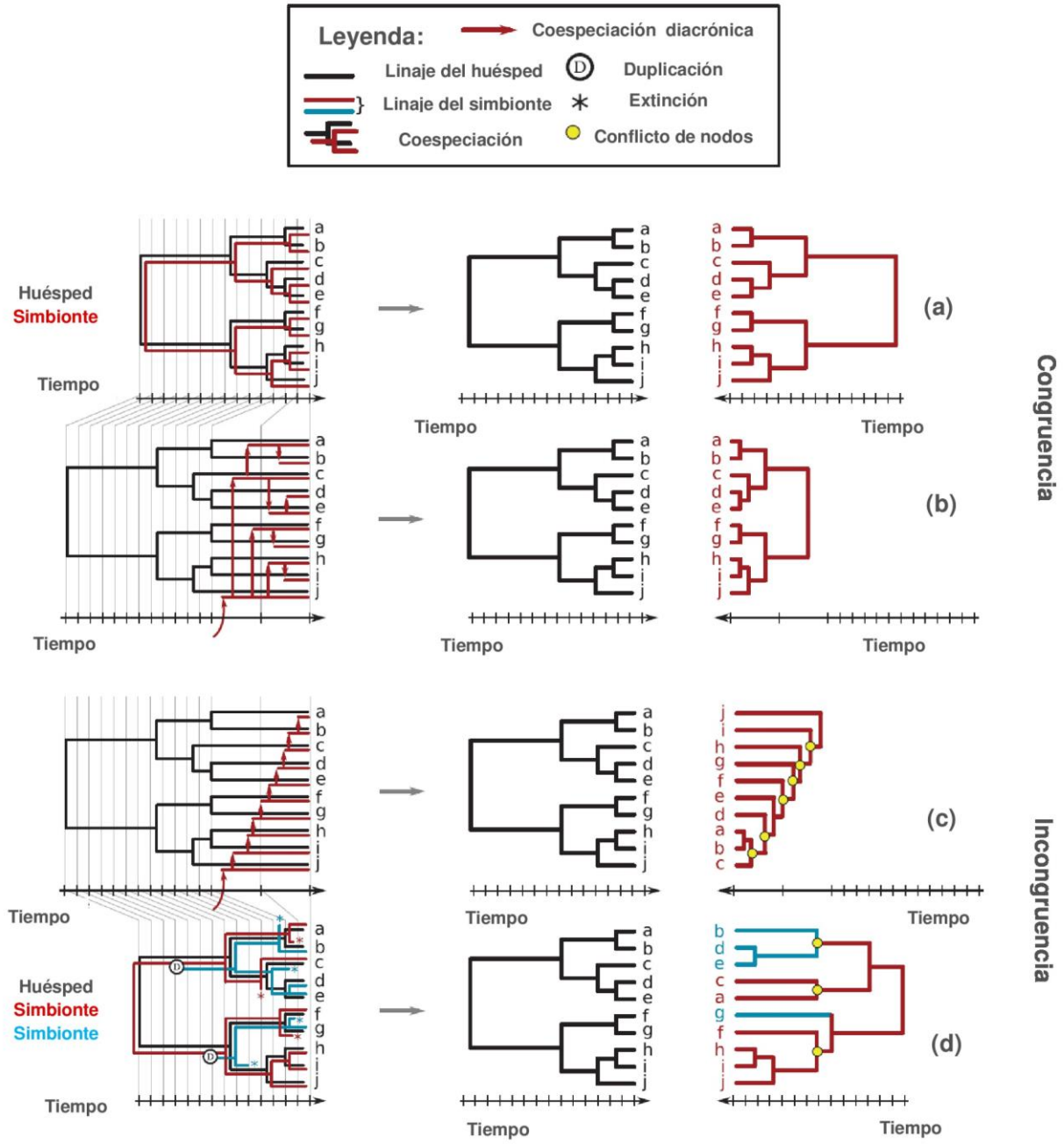

Figura 2. Patrones cofilogenéticos resultantes de diferentes tipos de especificación simbiótica. Las líneas negras representan el linaje del huésped; las líneas rojas y azules representan los linajes del simbionte. (a) Coespeciación, resultante en filogenias congruentes. (b) Coespeciación diacrónica, resultante en filogenias congruentes, pero con ramas cortas en los linajes del simbionte. (c) Duplicación, resultante en filogenias incongruentes. (d) Coespeciación ocurriendo a la vez con la especiación independiente, conmutacione, y extinciones, resultantes en filogenias incongruentes con pocas coincidencias entre los huéspedes y sus simbiontes. Adaptado de De Vienne et al. (2013).

2.4. Historia biogeográfica del hemisferio sur

El hemisferio sur ha sido tradicionalmente considerado una clave para los estudios biogeográficos, lo que se atribuye principalmente a su histórica vicarianza, considerada responsable en gran medida de la distribución de su biota. La historia biogeográfica del hemisferio sur es considerada un primer ejemplo del escenario de vicarianza. Conceptualmente esto se resume en la distribución disyunta transpacífica resultante de la secuencial ruptura de Gondwana durante los últimos 165 Ma (Figura 3), causando la división vicariante de su historia ancestral (Brundin 1966, Raven y Axelrod 1972). Así, la dispersión a larga distancia es usualmente descartada como una primera explicación causal de los patrones biogeográficos del hemisferio sur (Sanmartín y Ronquist 2004).

A pesar de lo anterior, las reconstrucciones paleográficas indican que las historia biogeográfica del hemisferio sur, no puede ser enteramente explicada por una secuencia de eventos de vicarianza (Pigram y Davies 1987). A pesar que recientes estimaciones moleculares, indican que la ruptura de Gondwana en el Cretácico fue un importante mecanismo de diversificación de aves y mamíferos (Cracraft 2001, Eizirik et al. 2001), estudios moleculares de otros grupos (e.g., hongos y plantas), indican que la dispersión ha jugado un rol más importante en el desarrollo de la biota en el hemisferio sur de lo que se asumía (Peterson et al. 2010, Skrede et al. 2011). Estudios biogeográficos recientes, basados en estimaciones moleculares y reconstrucciones paleogeográficas más exactas, indicarían que la dispersión a larga distancia puede haber sido más importante de lo que tradicionalmente se asume (Sanmartín y Ronquist 2004). A partir de esto, los estudios cofilogenéticos estarían jugando un rol esencial para dar soporte a las diferentes hipótesis que giran alrededor de la historia biogeográfica del hemisferio austral.

Los patrones de distribución disyunta pueden ser explicados tanto por fragmentación de un ancestro generalizado (eventos de vicarianza o aislamiento), o por dispersión a través de una barrera preexistente (Sanmartín y Ronquist 2004). Los métodos actuales de análisis biogeográfico se basan principalmente en el modelo de vicarianza, debido a que según algunos autores, casi cualquier patrón de distribución podría ser explicado por la dispersión (Morrone y Crisci 1995).

Es importante recalcar que las hipótesis de vicarianza y dispersión a larga distancia, pueden ser probadas por la concordancia entre los patrones filogenéticos y de distribución de los diferentes

organismos. Por lo tanto, los taxa que muestran el mismo patrón filogenético y de distribución, tales como el caso del género de hongo ectomicorrícico *Austropaxillus*, y sus huéspedes *Nothofagus*, son considerados como grupos que comparten una historia en común de eventos geológicos de aislamiento y dispersión (Bresinsky et al. 1999, Garrido 1988, Jarosch 2001, Skrede et al. 2011).

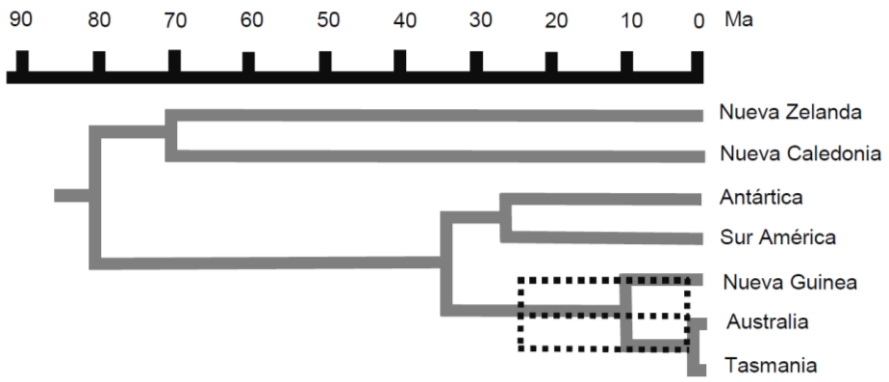

Figura 3. Árbol que muestra la hipótesis de la ruptura de Gondwana oriental, con una escala de tiempo en millones de años. El tiempo de divergencia entre Australia y Nueva Guinea no está resuelto. Adaptado de Swenson et al. (2001).

Estimaciones de tiempos de divergencia, muestran que muchos grupos gondwánicos clásicos, combinan un antiguo patrón de vicarianza con eventos de dispersión a larga distancia relativamente recientes (Cooper et al. 2001). Existen grupos que se originaron después de la ruptura continental, por lo tanto su distribución puede ser explicada sólo por la dispersión a larga distancia a través de barreras oceánicas (Buckley et al. 2002). Por ejemplo La Flora de Nueva Zelanda y Nueva Caledonia han sido consideradas un relicto de la flora gondwánica del Cretácico Tardío, aislada a través del proceso de vicarianza. Sin embargo, de acuerdo a Pole (1994), los registros paleobotánicos indicarían que la mayoría de la flora presente de Nueva Zelanda es producto de la dispersión a larga distancia desde Australia, durante el Terciario Tardío después que el resto de conexiones del antiguo bloque continental se separaran.

La dispersión a larga distancia, a través de las corrientes de vientos procedentes del oeste en el hemisferio sur, es frecuentemente un argumento utilizado para explicar las estrechas relaciones existentes entre los diversos grupos de plantas australes (e.g., *Nothofagus*), un patrón que converge con la aceptada ruptura secuencial de Gondwana (Linder y Crisp 1995). Coincidentemente, estos patrones también han entrado en conflicto en las hipótesis de la distribución actual de hongos asociados a las plantas que presentan el mismo patrón

biogeográfico (e.g., *Austropaxillus*, *Cyttaria*) (Bresinsky et al. 1999, Jarosch 2001, Peterson et al. 2010, Skrede et al. 2011).

Es por esto, que a pesar de los numerosos estudios de grupos individuales (e.g., *Nothofagus*), aún persisten muchas preguntas fundamentales de esta disyuntiva. Por lo tanto, para lograr una comprensión más clara de los patrones biogeográficos del hemisferio sur, es necesario un estudio que integre más grupos relacionados entre ellos (e.g., asociaciones parásitas, simbióticas, y mutualistas). Las deficiencias de los estudios basados en grupos individuales, como fenómenos aislados, y la necesidad de grandes cantidades de datos sobre los patrones biogeográficos de distribución son ampliamente reconocidos (Linder y Crisp, 1995, Sanmartín et al. 2001, Seberg 1991). Al mismo tiempo, los avances metodológicos recientes han hecho posible el estudio de los patrones biogeográficos complejos con muchos más detalles que antes, incluyendo nuevas herramientas de análisis (e.g., análisis cofilogenéticos). Con lo anterior, se ha logrado establecer estudios que integran más de un grupo taxonómico, considerando así las relaciones ecológicas establecidas entre estos (Peterson et al. 2010), hallándose explicaciones más coherentes sobre la historia biogeográfica del hemisferio sur.

2.5. Biogeografía de *Nothofagus*

Desde que el inglés J.D. Hooker visitó el hemisferio sur, el origen de su biota terrestre principalmente, se ha convertido en un clásico caso de investigación para los biogeógrafos (Raven y Axelrod 1972). Uno de los vínculos más estrechos entre América del Sur y Australasia es la evidente distribución disyunta del género *Nothofagus* (Nothofagaceae).

De acuerdo a los análisis morfológicos y moleculares realizados por Heenan y Smissen (2013) y otros autores (Dettmann et al. 1990, Hill y Jordan 1993, Hill y Read 1991, Manos 1997, Martin y Dowd 1993, Setoguchi et al. 1997), el género *Nothofagus* comprende 42 especies, dividas en cuatro subgéneros. *Trisyngyne* con 25 especies, distribuidas en Nueva Caledonia, Nueva Guinea e Indonesia; *Fucospora* con seis especies, distribuidas en Nueva Zelanda, el sur de Sudamérica y Australia; *Lophozonia* con seis especies, distribuidas en Nueva Zelanda, el sur de Sudamérica y Australia; y *Nothofagus* con cinco especies, distribuidas en el sur de Sudamérica (Figura 4). Junto con la Antártica, estas áreas estuvieron unidas formando el antiguo bloque continental de Gondwana (90-80 Ma) (Swenson et al. 2001).

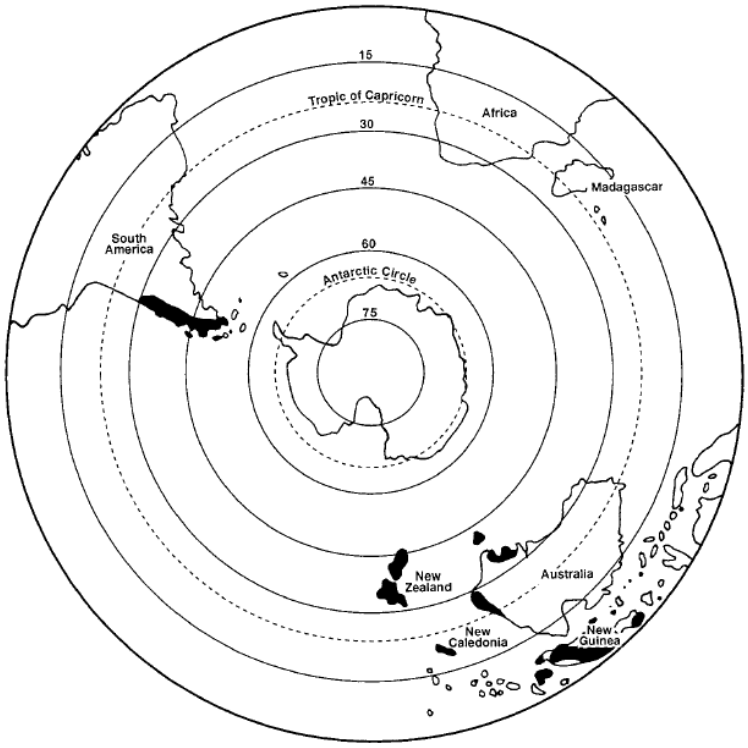

Figura 4. Las sombras de color negro indican la distribución general del género *Nothofagus* en el hemisferio sur (Humphries 1981, Manos 1997).

Un extenso registro fósil, indica que *Nothofagus* fue un importante componente de la vegetación en estas masas de tierras durante el Cretácico Tardío y el Cenozoico (Dettmann et al. 1990, Hill et al. 1999, Swenson et al. 2001). Además, fósiles de *Nothofagus* no han sido registrados en África, Madagascar o india, lo que junto a la separación estimada de Gondwana de estas masas continentales (105 Ma), sugieren que el origen del género sucedió posterior a estos eventos (80 Ma) (Barron 1987).

Los esfuerzos por evaluar la biogeografía austral basada en métodos filogenéticos, de dispersión y de vicarianza han mejorado ampliamente nuestro entendimiento del origen de los patrones de disyunción (Crisci et al. 1991, Humphries y Parenti 1999, Linder y Crisp 1995, Seberg 1991). Las posibles incongruencias en estos análisis, podrían verse resueltas cuando se realizan estudios que consideran las asociaciones establecidas en la naturaleza, entre *Nothofagus* y sus organismos parásitos, simbiontes o mutualistas asociados (Page 1994, Peterson et al. 2010, Swenson et al. 2001). Se acepta por lo general que estos organismos (e.g., *Cyttaria*, *Austropaxillus*) pueden experimentar procesos de especiación muy ligados a los de sus

potenciales huéspedes (e.g., *Nothofagus*), dando por tanto, más soporte a las hipótesis biogeográficas que se plantean en torno a un taxón u otro.

2.6. Biogeografía de *Austropaxillus*

En la actualidad los análisis de secuencias moleculares, mediante métodos bioinformáticos, son esenciales para dilucidar las relaciones filogenéticas entre los diferentes organismos vivientes. El estudio de la distribución de los hongos en un contexto evolutivo es relativamente nuevo (Lumbsch et al. 2008, O'Donnell et al. 2011, Peay et al. 2010, Peterson et al. 2010, Skrede et al. 2011), y puede ser muy complejo, por el hecho que las especies suelen ser cripticas (Skrede et al. 2011). Así, los enfoques filogenéticos moleculares han probado ser fundamentales para la identificación de linajes únicos con distribución restringida (Taylor et al. 2006), quedando claro que los huéspedes en el caso de los hongos simbióticos y parásitos imponen algunas restricciones en su distribución, aumentando la especificidad de estos con el aislamiento (Martin et al. 2002, Taylor et al. 2006, Parrent et al. 2004).

La obligada relación biotrófica entre especies del género ectomicorrícico *Austropaxillus* (Basidiomycota, Agaricomycetes) y sus huéspedes, plantas del género *Nothofagus* (Nothofagaceae) ha captado la atención últimamente de investigadores interesados en el estudio de patrones evolutivos, al presentar ambos grupos una distribución disyunta ampliamente ligada (Figura 5) (Bresinsky et al. 1999, Jarosch 2001, Skrede et al. 2011). De acuerdo a los análisis morfológicos y moleculares realizados por Bresinsky et al. (1999), el género *Austropaxillus*, comprende 9 especies, todas distribuidas en los ecosistemas temperados del hemisferio sur: *Austropaxillus macnabbii,* distribuido en Nueva Zelanda; *A. boletinoides*, distribuido en Argentina y Chile; *A. chilensis*, distribuido en Chile; *A. contulmensis*, distribuido en Chile; *A. infundibuliformis*, distribuido en Australia; *A. muelleri*, distribuido en Australia; *A. nothofagi*, distribuido en Nueva Zelanda; *A. squarrosus*, distribuido en Nueva Zelanda; y *A. statuum,* distribuido en Argentina y Chile (Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Jarosch 2001, Skrede et al. 2011).

Al igual que con *Nothofagus*, se han barajado algunas hipótesis acerca de la divergencia inicial del género *Austropaxillus*. Una de las más aceptadas es la dispersión a larga distancia, la cual se refiere a la dispersión transoceánica desde un continente a otro por aire o mar; la segunda explicación guarda relación con el proceso de vicarianza, es decir, a la interposición de la barrera oceánica como la causa de la fragmentación de una biota original, situada inicialmente en un continente único, Gondwana, fragmentado después, según la teoría de la tectónica de placas

(De Queiroz 2005, Lumbsch et al. 2008, Peay et al. 2010, Skrede et al. 2011, Wiley 1988). Sin embargo hay pocas evidencias sobre la distribución de *Austropaxillus* en el antiguo bloque meridional de Pangea (Skrede et al. 2011).

En general la hipótesis acerca de los eventos de divergencia coincide para *Austropaxillus* y *Nothofagus* (Cook y Crisp 2005, Cracraft 1975, Crisp et al. 1999, Darlington 1965, Dettmann et al. 1990, Jarosch 2001, McLoughlin 2001, Sanmartín y Ronquist 2004, Skrede et al. 2011, Steenis 1971, Upchurch 2008). Por lo tanto la asociación simbiótica entre las especies del género de hongo micorrícico *Austropaxillus*, y sus huéspedes, especies del género de plantas, *Nothofagus* (Bresinsky et al. 1999), podría considerarse un nuevo ejemplo de cofilogenia, y la distribución del género *Austropaxillus* podría ser usado para efectos de análisis biogeográficos en hongos.

2.7. Asociación simbiótica entre hongos formadores de ectomicorrizas del género *Austropaxillus*, y sus huéspedes especies del género *Nothofagus*

Las tendencias fitogeográficas son complejas y su análisis requiere considerar todos los componentes del sistema (factores bióticos y abióticos), por ejemplo tanto árboles de angiospermas (en el caso del género *Nothofagus*) como de gimnospermas (en el caso de la familia Pinaceae) con hongos ectomicorrícicos, se vuelven dominantes en algunas regiones del hemisferio sur (Brundrett 2002). Factores climáticos y del suelo son importantes de considerar, ya que generalmente en los climas más fríos y suelos con mayor cantidad de materia orgánica las ectomicorrizas tienden a ser dominantes (Brundrett 1991).

Las afinidades taxonómicas de los organismos que forman estas asociaciones simbióticas han sido evaluadas, haciéndose hincapié en la distribución geográfica de las plantas en relación con los hongos formadores de ectomicorrizas. Read et al. (2004) sugieren que la coevolución de las plantas con las asociaciones de micorrizas, y la adaptación a las condiciones climáticas han sido uno de los rasgos definitorios de los ecosistemas del hemisferio sur.

La evidencia de la estrecha relación de hongos ectomicorrícicos con plantas ha sido reportada en ambos hemisferios (Brundrett 2002, Skrede et al. 2011). En el hemisferio norte, las ectomicorrizas son muy importantes en brezales y biomas de bosques boreales, que en conjunto cubren gran parte de su biomasa (Read et al. 2004). Una indiscutible asociación entre hongos ectomicorrízicos del género *Austropaxillus* y plantas del género *Nothofagus*, ha sido reportada también en bosques de *Nothofagus* y *Eucalyptus* en el hemisferio meridional (Bresinsky et al. 1999, Skrede et al. 2011). Esta asociación se vuelve común, tanto en los bosques del sur de

Nueva Zelanda, Australia, y el sur de Sudamérica (Bresinsky et al. 1999, Gamundi y Horak 1995, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Jarosch 2001, Skrede et al. 2011).

Son pocos los hongos que están restringidos a una fuerte especificidad por la planta hospedera. Los casos más conocidos son *Alpovo diplopholoeus*, supuestamente restringido al género *Alnus*, *Leccnum auratiacum*, asociado a *Populus tremula*, y *Suillus grevillei*, simbionte de distintas especies de *Larix*, aunque también se ha descrito en asociación con otras coniferas (Grubisha et al. 2012, Linnemann 1971, Trappe 1962). Se ha documentado que *Austropaxillus* forma ectomicorrízas con raíces de *Nothofagus,* con las cuales guarda una fuerte relación (Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Skrede et al. 2011), encontrándose restringido al hemisferio meridional templado (sur de Sudamérica, Australia y Nueva zelanda). Sin embargo, a pesar de conocerse la estrecha relación entre *Austropaxillus* y *Nothofagus*, ha sido muy difícil estudiar su especificidad, ya que las especies del hongo se encuentran mezcladas en los bosques (muchas veces también mixtos) de *Nothofagus* (Bresinsky et al. 1999).

2.8. Asociaciones ectomicorrícicas y conservación

En la actualidad se acepta que los hongos ectomicorrícicos forman una asociación simbiótica obligada con una gran cantidad de plantas. En estudios controlados, ha sido bien documentado que las plantas en general reciben beneficios de los hongos, principalmente mejorando el estado nutricional, e incrementando la tolerancia al estrés hídrico. A cambio, la planta le provee al hongo los carbohidratos procedentes de la fotosíntesis (Smith y Read 2009).

Estos beneficios a su vez, tienen el potencial de alterar el resultado de la competición intraespecífica de plantas (Chen et al. 2000, Fitter 1977, Grime et al. 1987, Hartnett et al. 1993), e influyen en la sucesión vegetal de las comunidades naturales (Allen y Allen 1990, Gange et al. 1993, Hartnett y Wilson 1999, Smith et al. 1998). Miller y Jastrow (1992) sugieren que las micorrizas probablemente previenen el estancamiento en el desarrollo de comunidades vegetales, y consecuentemente podrían jugar un importante rol en la rehabilitación ecológica.

Relativamente pocos estudios han documentado los efectos de la micorrizas en restauración ecológica. Esto se debe principalmente a la dificultosa y cara inoculación de grandes áreas con hongos micorrícicos (Jasper 1994). Algunos estudios a pequeña escala han demostrado que podrían tener efectos beneficiosos para los sitios restaurados. Johnson (1998) encontró que la inoculación con hongos micorrícicos incrementó el crecimiento de un pasto nativo (*Panicum virgatum*), en suelos con residuos mineros, y bajos niveles de fósforo. En sitios de similares

condiciones Noyd et al. (1995, 1996) y otros autores (Smith et al. 1998, White et al. 2008), han encontrado que la inoculación de micorrizas resulta en un incremento altamente significativo de la cobertura vegetal. La contribución de los escasos estudios de la utilización de hongos ectomicorrízicos en el campo de la conservación ecológica ha sido alta (Bassani et al. 2013, Miller y Jastrow 1992, Smith y Read 1997), sin embargo el uso de esta alternativa no ha sido considerada en la mayoría de proyectos de conservación.

Muchas especies del género *Nothofagus* en los bosques y matorrales de Australasia y Sudamérica, como muchas otras especies en su entorno natural en todo el mundo, han sufrido importantes disturbios derivados de la ocupación humana y de las actividades de uso intensivo y extensivo (Laclau 1997, Veblen et al. 2003). Esto, unido a la importancia de este género en los bosques australes, aumenta la necesidad del establecimiento de regeneración natural y restauración de los sistemas ecológicos. Por esta razón en el campo de la conservación biológica, los programas de restauración forestal se han implementado, requiriendo el uso de plantas de semilleros de alta calidad que puedan sobrevivir en condiciones adversas (Bassani et al. 2013).

Para muchas especies del género *Nothofagus* en el hemisferio sur, es claro que el crecimiento y la supervivencia, comúnmente dependen de la colonización por hongos ectomicorrícicos, es así que forman asociaciones obligadas con estos hongos. Los bosques nativos alterados pierden sus inóculos de hongos ectomicorrícicos debido a la degradación, y las actividades de deforestación, por tal motivo los proyectos de conservación, deberían contemplar entre sus objetivos introducirlos y/o restablecerlos (Pera y Parladé 2005, Valenzuela 1993). El momento más oportuno y apropiado suele ser el inocular los hongos ectomicorrícicos durante la producción de las plantas en los viveros, por tal motivo, conocer qué tipo de especies de hongos ectomicorrícicos están asociados a estas plantas es fundamental para lograr los resultados esperados en conservación. Los estudios cofilogenéticos pueden ser importantes al ayudar a reconocer las especies que podrían representar los posibles candidatos al plantear un manejo para su potencial propagación.

Actualmente existe un desconocimiento de la totalidad de hongos ectomicorrícicos asociados a los árboles del género *Nothofagus*, a pesar que algunos estudios han revelado el alto potencial de estos hongos en programas de conservación para especies de este género, y otras especies forestales del hemisferio austral (Barroetaveña et al. 2005, Barroetaveña y Rajchenberg 2003, Bassani et al. 2013, Smith y Read 2009).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En este trabajo se buscó resolver la hipótesis cofilogenética entre hongo-planta, poniendo a prueba la hipótesis alternativa de historias evolutivas dependientes. El objetivo general del estudio fue realizar un análisis cofilogenético entre hongos formadores de ectomicorrizas del género *Austropaxillus* y árboles del género *Nothofagus*, con énfasis en las implicancias de la información evolutiva sobre la asociación entre estos grupos, en el campo de la conservación. Como objetivos específicos se planteó: (1) construir las filogenias de los hongos formadores de ectomicorrizas del género *Austropaxillus*, y del género *Nothofagus*, utilizando secuencias disponibles en las bases de datos; (2) Desarrollar un escenario hipotético de las relaciones filogenéticas del género de hongo ectomicorrícico *Austropaxillus* y sus huéspedes especies del género *Nothofagus* (asociación simbiótica mutualista), y su relación con la aparente distribución restringida al hemisferio meridional. (3) A partir de lo anterior, analizar las implicancias de la información cofilogenética en la conservación de la asociación simbiótico entre ambos taxa.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Área de estudio

Nothofagus es un componente importante de la flora arbórea en el hemisferio sur, e integra 42 especies distribuidas en América del Sur, Nueva Zelanda, Australia (incluyendo Tasmania), Nueva Caledonia y Nueva Guinea (Bremer et al. 2009, Darlington 1965, Dettmann et al. 1990, Heenan y Smissen 2013, Hill y Jordan 1993, Hill y Read 1991, Manos 1997, Martin y Dowd 1993, Setoguchi et al. 1997, Tanai 1986, Van Steenis 1971). En este estudio sólo se consideró la zona de distribución de las especies de *Nothofagus* que han sido reportadas como huéspedes de los hongos ectomicorrícicos del género *Austropaxillus* (Figura 5) (Binder et al. 2010, Binder y Hibbett 2002, 2006, Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Horak 1979, 1980, Jarosch 2001, Singer 1964, Skrede et al. 2011, Teasdale et al. 2013, Valenzuela et al. 1998).

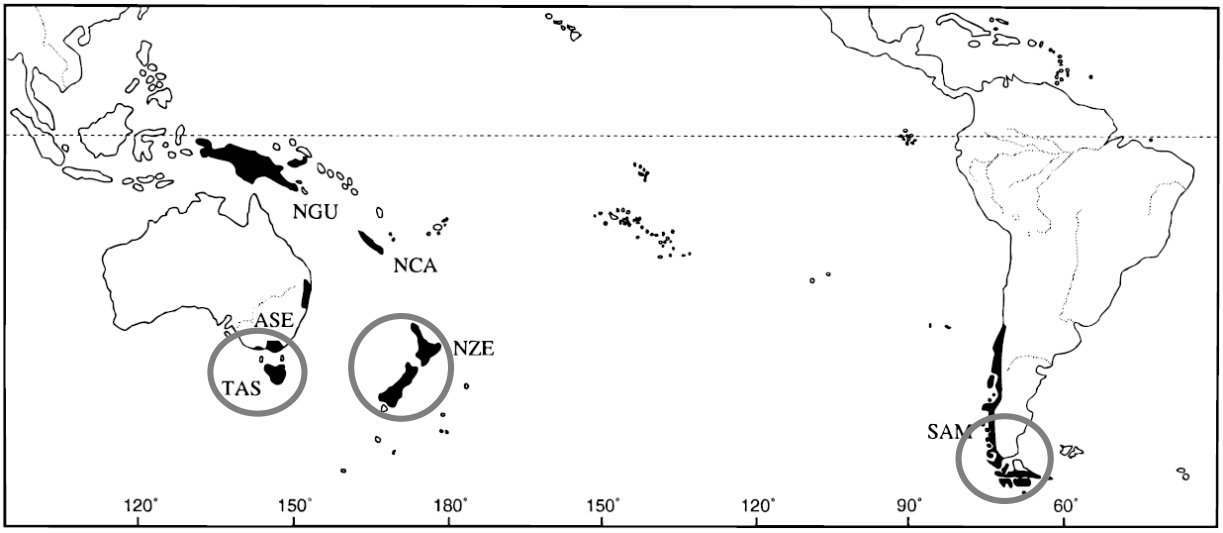

Figura 5. Distribución de las especies existentes de *Nothofagus*, representadas en el área del Pacífico Sur. Sudeste de Australia (ASE), Nueva Caledonia (NCA), Nueva Guinea (NGU), Nueva Zelanda (NZE), Sudamérica (SAM), Tasmania (TAS) (Swenson et al. 2001). Las sombras oscuras representan la distribución actual del género *Nothofagus*. Los círculos en gris representan la distribución actual de las especies de *Nothofagus* que han sido reportadas como huéspedes de los hongos ectomicorrícicos del género *Austropaxillus*

4.2. Taxa utilizados en el análisis cofilogenético

De acuerdo a estudios filogenéticos anteriores, los clados utilizados en este trabajo (clados de los géneros *Nothofagus* y *Austropaxillus*), se encuentran bien definidos en las filogenias existentes para ambos grupos (Bresinsky et al. 1999, Heenan y Smissen 2013, Manos 1997, Sauquet et al. 2012, Skrede et al. 2011).

Para efectos del análisis cofilogenético, sólo se consideraron las especies de *Nothofagus* que han sido reportadas en la bibliografía como huéspedes de los hongos ectomicorrícicos *Austropaxillus* (Tabla 1). En el caso de *Austropaxillus*, se consideraron las especies que cuentan con información molecular en GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), asegurándose que estén representadas en Sudamérica, Australia, y Nueva Zelanda (Tabla 1), sitios donde se ha reportado las asociaciones simbióticas establecidas entre ambos taxa (Binder et al. 2010, Binder y Hibbett 2002, 2006, Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Horak 1979, 1980, Jarosch 2001, Singer 1964, Skrede et al. 2011, Teasdale et al. 2013, Valenzuela et al. 1998). Lo anterior para inferir de manera coherente, sobre la hipótesis cofilogenética, y estrecha distribución disyunta en ambos grupos. Además se utilizó la información depositada en las diferentes bases de datos, tales como: GenBank, Global Biodiversity Information Facility (http://data.gbif.org/welcome.htm), y MycoBank (Crous et al.

2004; Robert et al. 2005) (http://www.mycobank.org/), para verificar la información sobre las asociaciones simbióticas registradas hasta la actualidad entre *Nothofagus* y *Austropaxillus.*

Austropaxillus **(simbionte)**	**Año de la publicación**	***Nothofagus*** **(huésped)**	**Subgénero del huésped**	**Distribución geográfica**
Austropaxillus boletinoides (Singer) Bresinsky & Jarosch	1999	*Nothofagus alpina* (Poeppl. & Endl.) Oerst.	*Lophozonia*	Sudamérica
		Nothofagus antarctica (Forst) Oerst.	*Nothofagus*	Sudamérica
		Nothofagus dombeyi (Mirb.) Oerst.	*Nothofagus*	Sudamérica
		Nothofagus glauca (Phil.) Krasser.	*Lophozonia*	Sudamérica
		Nothofagus pumilio (Poeppl. & Endl.) Krasser.	*Nothofagus*	Sudamérica
		Nothofagus obliqua (Mirb.) Oerst.	*Lophozonia*	Sudamérica
		Nothofagus betuloides (Mirb.) Oerst.	*Nothofagus*	Sudamérica
		Nothofagus nítida (Phil.) Krasser.	*Nothofagus*	Sudamérica
Austropaxillus chilensis (Garrido) Bresinsky & Jarosch	1999	*Nothofagus alpina (Poeppl. & Endl.) Oerst.*	*Lophozonia*	Sudamérica
		Nothofagus dombeyi (Mirb.) Oerst.	*Nothofagus*	Sudamérica
Austropaxillus contulmensis (Garrido) Bresinsky	1999	*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.	*Lophozonia*	Sudamérica
Austropaxillus statuum (Speg.) Bresinsky & Jarosch	1999	*Nothofagus antarctica* (Forst) Oerst.	*Nothofagus*	Sudamérica
		Nothofagus dombeyi (Mirb.) Oerst.	*Nothofagus*	Sudamérica
		Nothofagus betuloides (Mirb.) Oerst.	*Nothofagus*	Sudamérica
		Nothofagus pumilio (Poeppl. & Endl.) Krasser.	*Nothofagus*	Sudamérica
		Nothofagus nítida (Phil.) Krasser.	*Nothofagus*	Sudamérica
Austropaxillus infundibuliformis (Cleland) Bresinsky & Jarosch	1999	*Nothofagus cunninghamii* (Hook.) Oerst.	*Lophozonia*	Australia
Austropaxillus macnabbii (Singer, J. García & L.D. Gómez) Jarosch	2001	*Nothofagus menziesii* (Hook.) Oerst.	*Lophozonia*	Nueva Zelanda
Austropaxillus muelleri (Berk.) Bresinsky & Jarosch	1999	*Nothofagus moorei* (Muell.) Krasser.	*Lophozonia*	Australia
Austropaxillus nothofagi (McNabb) Bresinsky & Jarosch	1999	*Nothofagus menziesii* (Hook.) Oerst.	*Lophozonia*	Nueva Zelanda
Austropaxillus squarrosus (McNabb) Bresinsky & Jarosch	1999	*Nothofagus menziesii* (Hook.) Oerst.	*Lophozonia*	Nueva Zelanda

Tabla 1. Especies de *Austropaxillus*, y sus potenciales huéspedes, en relación a su distribución geográfica. Fuente: GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/); Global Biodiversity Information Facility (http://data.gbif.org/welcome.htm); MycoBank (Crous et al. 2004; Robert et al. 2005) (http://www.mycobank.org/); Binder et al. (2010); Binder y Hibbett (2002, 2006); Bresinsky et al. (1999); Garrido (1981, 1985, 1988); Garrido y Bresinsky (1985); Horak (1979, 1980); Jarosch (2001); Singer (1964); Skrede et al. (2011); Teasdale et al. (2013); y Valenzuela et al. (1998). Las combinaciones (simbionte-huésped) marcadas con letras de color gris no fueron incluidas en el análisis por falta de datos moleculares.

4.3. Análisis filogenético de *Nothofagus*

Actualmente existen varios estudios donde se ha construido la filogenia del género *Nothofagus* (Dettmann et al. 1990, Heenan y Smissen 2013, Manos 1997, Martin y Dowd 1993, Sauquet et al. 2012, Setoguchi et al. 1997). Sin embargo, para efectos de este estudio se volvió a construir una filogenia, necesaria para posteriores análisis (estimación de tiempo de los principales eventos de divergencia, y análisis cofilogenético).

Para el análisis filogenético del género se utilizaron secuencias de ADN obtenidas de GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/): Los marcadores moleculares que se utilizaron fueron las secuencias nucleares ITS1, 5,8S, ITS2 y sus espaciadores transcritos no codificantes (Manos 1997), y las siguientes secuencias del cloroplasto: dos genes codificantes de proteínas (atpB y rbcL) (Sauquet et al. 2012) y tres regiones no codificantes (el espaciador intergénico atpB-rbcL, el gen trnL y el espaciador intergénico trnL-trnF) (Martin y Dowd 1993, Setoguchi et al. 1997). Todas estas secuencias habían sido previamente utilizadas en filogenia de *Nothofagus*, por lo que su poder de resolución estaba estudiado.

Veintisiete especies del género *Nothofagus* fueron utilizadas como un grupo interno (ingroup en inglés) para construir su filogenia. Adicionalmente se incluyó un grupo externo (outgroup en inglés) para enraizar el árbol filogenético, consistente en un miembro del orden Fagales, *Fagus* St.- Lag. (1880) (Fagaceae) (Soltis et al. 2007, Wang et al. 2009, Moore et al. 2010), especie que no está ni muy cercana, ni muy lejana filogenéticamente relacionada al género *Nothofagus* (Burleigh et al. 2009). La identifación y los números de acceso a la información molecular para todas las especies utilizadas en el análisis, están enlistados en el apéndice 1.

Para poder comparar sitios homólogos, las secuencias moleculares de cada uno de los genes se alinearon utilizando el programa ClustalX versión 2.0. (Higgins et al. 1994, Thompson et al. 1997, Chenna et al. 2003, Larkin et al. 2007) y luego se editaron manualmente con BioEdit v.7.0.1 (Hall 1999). Un modelo de sustitución de nucleótidos (modelo de evolución), fue seleccionado a partir de la ejecución del programa MrModeltest 2.3. (Posada y Crandall 1998, 2001, Nylander 2004). *The General Time Reversible plus Gamma* (GTR + I + G) (Rodríguez et al. 1990, Yang et al. 1994), fue el modelo de sustitución de nucleótidos seleccionado para el análisis de los datos genéticos, basado en el criterio de información de Akaike (Posada y Crandall 1998, 2001).

Un análisis bayesiano usando el programa Mr. Bayes 3.2.2. (Ronquist y Huelsenbeck 2003), se llevó a cabo con las secuencias alineadas, las cuales consistieron en 5.444 pares de bases. Se ejecutó una corrida de 6.000.000 de generaciones, guardando los árboles cada 1.000, con cuatro

cadenas. Para constatar si las cadenas de Markov convergían, se monitoreó la desviación estándar de la frecuencia de ruptura (SDSF, por sus siglas en inglés), descartándose todos los árboles previos a la estabilidad, cuando la SDSF cayó por debajo de 0.01. El soporte estadístico de los nodos se infirió a partir de las probabilidades posteriores entregadas por el análisis bayesiano. Finalmente el árbol filogenético resultante de la inferencia bayesiana, fue analizado, y además editado para una mejor presentación de los resultados, mediante el uso del programa FigTree v.1.4.0. (Rambaut 2008).

4.4. Análisis filogenético de *Austropaxillus*

Para el análisis filogenético del género *Austropaxillus* se utilizaron las siguientes secuencias nucleares obtenidas de GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/): LSU (por sus siglas en inglés Large SubUnit, que codifica para la región 25-28S del ARN ribosomal); SSU (por sus siglas en inglés Small SubUnit, que codifica para la región 18S del ARN ribosomal), además de la subunidad 5,8S, y los genes rpb2 y tef 1 (Binder et al. 2010, Bresinsky et al. 1999, Huckfeldt et al. 2011, Jarosch 2001, Kauserud et al. 2006, Maurice 2011, Skrede et al. 2011). Todas estas secuencias habían sido previamente utilizadas en filogenia de *Austropaxillus*, por lo que su poder de resolución estaba estudiado.

Seis especies del género *Austropaxillus* fueron utilizadas como un grupo interno (ingroup en inglés) para construir su filogenia. Adicionalmente se incluyó un grupo externo (outgroup en inglés) para enraizar el árbol filogenético, consistente en varios miembros del orden Boletales, de los géneros: *Serpula* (Serpulaceae); *Tapinella* (Tapinellaceae); *Suillus* (Suillaceae); y *Boletus* (Boletaceae) (Skrede et al. 2011), grupos que no están ni muy cercana, ni muy lejana filogenéticamente relacionados al género *Austropaxillus* (Bresinsky et al. 1999, Skrede et al. 2011). Los números de acceso de Genbank para todas las especies utilizadas en el análisis, están enlistados en el apéndice 2.

Para poder comparar sitios homólogos, las secuencias moleculares de cada uno de los genes se alinearon utilizando el programa ClustalX versión 2.0. (Higgins et al. 1994, Thompson et al. 1997, Chenna et al. 2003, Larkin et al. 2007) y luego se editaron manualmente con BioEdit v.7.0.1 (Hall 1999); y. Un modelo de sustitución de nucleótidos (modelo de evolución), fue seleccionado a partir de la ejecución del programa MrModeltest 2.3. (Posada y Crandall 1998, 2001, Nylander 2004). *The General Time Reversible plus Gamma* (GTR + I + G) (Rodríguez et al. 1990, Yang et al. 1994), fue el modelo de sustitución de nucleótidos seleccionado para el análisis de los datos genéticos, basado en el criterio de información de Akaike (Posada y Crandall

1998, 2001).Todo con base en los alineamientos de las secuencias del ADN nuclear realizadas para *Austropaxillus,* obtenidas de las distintas publicaciones, cuyo objetivo principal haya sido el análisis filogenético del grupo (Binder et al. 2010, Bresinsky et al. 1999, Huckfeldt et al. 2011, Jarosch 2001, Kauserud et al. 2006, Maurice 2011, Skrede et al. 2011).

Un análisis bayesiano usando el programa Mr. Bayes 3.2.2. (Ronquist y Huelsenbeck 2003), se llevó a cabo con las secuencias alineadas, las cuales consistieron en 6.122 pares de bases. Se ejecutó una corrida de 6.000.000 de generaciones, guardando los árboles cada 1.000, con cuatro cadenas. Para constatar si las cadenas de Markov convergían, se monitoreó la desviación estándar de la frecuencia de ruptura (SDSF, por sus siglas en inglés), descartándose todos los árboles previos a la estabilidad, cuando la SDSF cayó por debajo de 0.01. El soporte estadístico de los nodos se infirió a partir de las probabilidades posteriores entregadas por el análisis bayesiano. Finalmente el árbol filogenético resultante de la inferencia bayesiana, fue analizado, y además editado para una mejor presentación de los resultados, mediante el uso del programa FigTree v.1.4.0. (Rambaut 2008).

4.5. Análisis de la estimación del tiempo de divergencia para *Nothofagus*

Se utilizó la base de datos obtenida de la publicación original de Sauquet et al. (2012), quienes usaron al género *Nothofagus* para inferir los tiempos de divergencias en los cuatro subgéneros del grupo. El tiempo de divergencia fue estimado usando el software *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees* (BEAST) v. 1.7.5. (Berbee y Taylor 2010, Drummond et al. 2006, Drummond y Rambaut 2007).

Los archivos Xml para el análisis en BEAST fueron construidos usando BEAUti 1.7.5. (Paquete de BEAST) (Drummond y Rambaut 2007). Se analizaron los datos bajo el tratamiento propuesto por Sauquet et al. (2012), usado para inferir en los tiempos de divergencia de *Nothofagus* [*Clock Models: uncorrelated lognormal relaxed* (UCLD)]. En la corrida se utilizó como criterio el árbol previo de Yule (Yule 1925), el cual asume una constante tasa de especiación para cada rama en el árbol (Gernhard 2008, Gernhard y Tylor 2010). Una distribución *lognormal* fue usada previamente en toda la calibración de los nodos. Este criterio permitió fijar la edad promedio, mínima, y máxima estimada para los nodos del árbol filogenético.

La convergencia de cada cadena a la distribución destino se evaluó usando Tracer 1.5 (Drummond et al. 2006, Drummond y Rambaut 2007). Después de la convergencia, las cadenas fueron muestreadas cada 1.000 pasos hasta obtener 10.000 muestras. El modelo fijado de los

modelos de ecuanimidad (UCLN) fue evaluado con factores Bayes, usando Tracer 1.5 (Drummond et al. 2006, Drummond y Rambaut 2007).

Para calibrar la divergencia entre los grupos se utilizó el fósil conocido más antiguo (Sauquet et al. 2012), *Nothofagidites lachlaniae* (Couper 1954) Pocknall y Mildenhall 1984 (Dettmann y Thomson 1987) de la isla James Ross, en la Antártida. Los fósiles datan del Campaniano tardío al Maastrichtiano (Crame et al. 2004). De acuerdo a la escala de tiempo genealógica (Gradstein et al. 2004), la edad mínima estimada para este fósil sería de 65,5 millones de años (Sauquet et al. 2012).

4.6. Análisis de la estimación del tiempo de divergencia para *Austropaxillus*

Para la estimación del tiempo de divergencia de *Austropaxillus,* se utilizó el método empleado por Peterson et al. (2010) en la cofilogenia de los hongos parásitos del género *Cyttaria* y sus huéspedes *Nothofagus* teniendo como base el trabajo realizado por Skrede et al. (2011) para la familia Serpulaceae. Se usó el conjunto de datos de la filogenia, y el programa computacional *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees* (BEAST) v. 1.7.5. (Berbee y Taylor 2010, Drummond et al. 2006, Drummond y Rambaut 2007,).

Los archivos Xml para el análisis en BEAST fueron construidos usando BEAUti 1.7.5. (Paquete de BEAST) (Drummond y Rambaut 2007). Se analizaron los datos bajo el tratamiento propuesto por Skrede et al. (2011), usado para inferir los tiempos de divergencia de la familia Serpulaceae [*Clock Models: uncorrelated lognormal relaxed* (UCLD)]. En la corrida se utilizó como criterio el árbol previó de Yule (Yule 1925), el cual asume una constante tasa de especiación para cada rama en el árbol (Gernhard 2008, Gernhard y Tylor 2010). Una distribución *lognormal* fue usada previamente en toda la calibración de los nodos, este criterio permitió fijar la edad promedio, mínima, y máxima estimada para los nodos del árbol filogenético.

La convergencia de cada cadena a la distribución destino se evaluó usando Tracer 1.5 (Drummond et al. 2006, Drummond y Rambaut 2007). Después de la convergencia, las cadenas fueron muestreadas cada 1.000 pasos hasta obtener 50.000 muestras. El modelo fijado de los modelos de ecuanimidad (UCLN) fue evaluado con factores Bayes, usando Tracer 1.5 (Drummond et al. 2006, Drummond y Rambaut 2007).

Dado que no existen fósiles conocidos para el género *Austropaxillus*, ni para la familia Serpulaceae, se procedió a calibrar el análisis del tiempo de divergencia del género, mediante la edad estimada de los antepasados más reciente de sus potenciales huéspedes (Sauquet et

al. 2012). Se tomó como criterio el ejemplo de Drummond y Rambaut (2007), quiénes realizaron un estudio con virus.

4.7. Asociaciones simbióticas entre *Nothofagus* y *Austropaxillus*

La información de las relaciones simbióticas hongo-planta, utilizadas para inferir en la hipótesis cofilogenética, fueron tomadas de la bibliografía disponible (Binder et al. 2010, Binder y Hibbett 2002, 2006, Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Horak 1979, 1980, Jarosch 2001, Singer 1964, Skrede et al. 2011, Teasdale et al. 2013, Valenzuela et al. 1998). Además, se utilizaron las siguientes bases de datos: GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), MycoBank (Crous et al. 2004; Robert et al. 2005) (http://www.mycobank.org/), y Global Biodiversity Information Facility (http://data.gbif.org/welcome.htm) (Tabla 1).

4.8. Análisis Cofilogenético

Para el análisis cofilogenético se utilizó el método de distancia, implementado en el software COPYCAT (Meier-Kolthoff et al. 2007), que es una envoltura o interfaz para ParaFit (Legendre et al. 2002). Este software evalúa la hipótesis nula de asociación aleatoria entre los hongos y los huéspedes. Los árboles del huésped y el hongo, incluyendo longitudes de rama, además de un archivo de asociación representando las posibles combinaciones hongo-hospedador (la mayoría de los hongos del género *Austropaxillus* están asociados con más de un huésped y viceversa) se introdujeron en COPYCAT. Las pruebas de asociación al azar se realizaron con 9999 permutaciones globales, a través de las dos filogenias para cada asociación huésped-parásito (Legendre et al. 2002). En ambas filogenias, para cada asociación huésped-hongo, la significancia se valuó con un valor de $P = 0.05$. A diferencia de otros métodos, como el basado en el árbol filogenético, que valúa solamente relaciones simbióticas entre un simbionte y un huésped, el método de distancia es capaz de adaptarse a cualquier tipo de asociación huésped-simbionte (Lengendre et al. 2002), incluyendo simbiontes generalizados (así como árboles con politomías), condición que ha sido reportada para *Austropaxillus* por Bresinsky et al. (1999). Los eventos hipotéticos (escenario) acorde a los resultados del análisis, y considerando los tiempos de divergencia en las filogenias de ambos taxa, fueron expresados en un gráfico con los criterios cofilogenéticos descritos por De Vienne et al. (2013) (Figura 2).

4.9. Análisis sobre las implicancias de la información cofilogenética en la conservación de la simbiosis ectomicorrícica

Con los resultados obtenidos del análisis cofilogenético, y en concordancia con la bibliografía existente (Jasper 1994, Noyd et al. 1995, 1996, Johnson 1998, Smith et al. 1998, White et al. 2008, Bassani et al. 2013), se analizaron las implicancias de la información cofilogenética en la conservación de las relaciones simbióticas entre las especies de *Nothofagus* con los hongos ectomicorrícicos estudiados (Barrett et al. 2010, Otero y Flanagan 2005, Rasmussen y Whigham 1998, Rasmussen y Rasmussen 2009, Tremblay et al. 2005, Waterman y Bidartondo 2008). Este tipo de estudios se plantea como herramienta adicional a las estrategias de conservación ya conocidas (Barroetaveña et al. 2005, Barroetaveña y Rajchenberg 2003, Bassani et al. 2013, Smith y Read 2009), considerando la historia evolutiva de las asociación ectomicorrícica para su ejecución.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Filogenias del huésped y simbionte

5.1.1. Filogenia de *Nothofagus*

El análisis filogenético de los datos moleculares arrojó una filogenia totalmente resuelta, y bien sustentada, que sirve como marco para la interpretación de la biogeografía histórica de *Nothofagus.* El árbol resultante del consenso de mayoría (50%) de 6.001 árboles, con el soporte para cada clado, estimado mediante un análisis bayesiano se muestra en la Figura 6. El análisis encontró un fuerte soporte para los cuatro grupos monofiléticos del género *Nothofagus* (Tabla 1). La relación entre éstos también está fuertemente soportada, y es consistente con estudios previos sobre la filogenia del género (Martin y Dowd 1993, Manos 1997, Setoguchi et al. 1997, Jordan y Hill 1999, Cook y Crisp 2005, Knapp et al. 2005, Sauquet et al. 2012, Heenan y Smissen 2013). Como se ha indicado en previos estudios, los dos subgéneros huéspedes de *Austropaxillus*, *Lophozonia* y *Nothofagus*, son individualmente monofiléticos pero no forman un clado conjunto (Manos 1997, Peterson at al. 2010, Sauquet et al. 2012, y Heenan y Smissen 2013). El clado *Lophozonia* (Australia, incluyendo Tasmania, Nueva Zelanda y América del Sur) aparece en la base del grupo, como hermano del resto de los subgéneros. Por su parte, en este y en estudios anteriores (Manos 1997, Peterson at al. 2010, Sauquet et al. 2012, y Heenan y Smissen 2013), se muestra que el subgénero *Fuscospora* (Australia incluida Tasmania, Nueva Zelanda y América del Sur), es hermano del clado formado por los subgéneros *Trisyngyne* (Nueva Caledonia y Nueva Guinea); y *Nothofagus* (América del Sur). Al igual que las filogenias moleculares anteriores, esta filogenia muestra tres clados con distribución transantártica: *Fuscospora* y *Lophozonia* con distribuciones en Sudamérica, Australia y Nueva Zelanda, y el

clado *Trisyngyne* – *Nothofagus*, distribuido en Sudamérica, Nueva Caledonia y Nueva Guinea. Estos patrones de distribución fueron predichos por Hill (2001), y han sido corroborados en estudios más recientes usando datos moleculares (Manos 1997, Martin y Dowd 1993, Sauquet et al. 2012). Lo anterior además se sustenta con la información sobre la distribución pasada de *Nothofagus*. Los datos sobre el polen fósil asignado a los tipos polínicos actuales, son compatibles con la distribución ancestral continúa para los cuatro grupos modernos, abarcando desde América del Sur a Australia, antes de la separación de los bloques continentales (90-80 Ma) (Dettman et al. 1990).

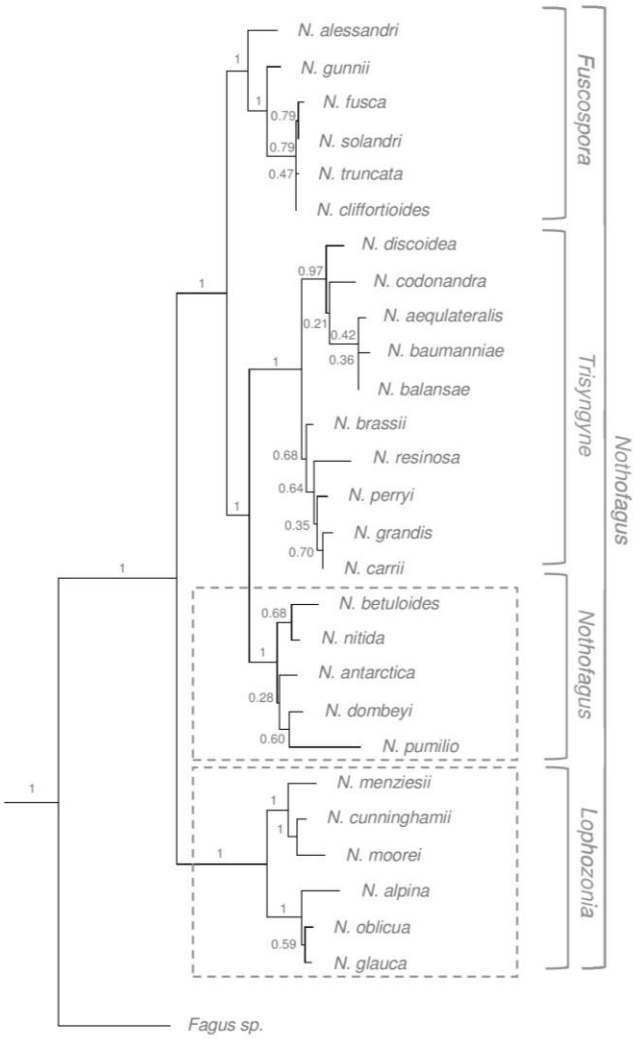

Figura 6. Filogenia resultante del consenso de mayoría (50%) de 6.001 árboles para el género arbóreo *Nothofagus* a partir de un análisis bayesiano. El árbol filogenético se construyó a partir de un conjunto de datos que consistió en 5.444 pares de bases que incluyeron las secuencias nucleares ITS1, 5,8S, ITS2 y sus espaciadores transcritos no codificantes, y las secuencias del cloroplasto, dos genes codificantes de proteínas (atpB y rbcL) y tres regiones no codificantes (el espaciador intergénico atpB-rbcL, el gen trnL y el espaciador intergénico trnL-trnF). Los números en las ramas muestran su soporte (probabilidad posterior >0.95). Los subgéneros asociados a hongos ectomicorrícicos del género *Austropaxillus* están encerrados en cuadros de líneas punteadas.

5.1.2. Filogenia de *Austropaxillus*

El análisis filogenético de los datos moleculares produjo una filogenia resuelta, y bien sustentada, lo cual también sirve como marco para la interpretación de la biogeografía histórica de *Austropaxillus*. El árbol resultante del consenso de mayoría (50%) de 6.001 árboles, con sus probabilidades posteriores, estimado mediante un análisis bayesiano se muestra en la Figura 7. El análisis encontró un fuerte soporte de dos grupos para *Austropaxillus* de las seis especies de hongos consideradas para el estudio (Tabla 2). El primero es el clado "A", formado por los subclados *A. boletinoides* (Sudamérica), *A. squarrosus* (Nueva Zelanda) y *A. infudibuliformis* (Australis), *A. statuum* (Sudamérica). El segundo, es el clado "B", que está formado por la especie sudamericana *A. macnabii*; y la australiana *A. muelleri*. La especies *A. chilensis, A. nothofagi, y A. contulmensis* no fueron incluidas en el análisis por falta de datos moleculares. Los resultados en este análisis filogenético son consistentes con los estudios de Bresinsky et al. (1999) y Skrede et al. (2011), quienes han propuesto a través de análisis moleculares y morfológicos la monofilia de *Austropaxillus* (Figura 7). En cuanto a la topología, esta resultó muy similar a las combinaciones presentadas como árbol de consenso en el trabajo de Skrede et al. (2011), para este último caso dentro del análisis filogenético de la familia Serpulaceae (familia del género *Austropaxillus*).

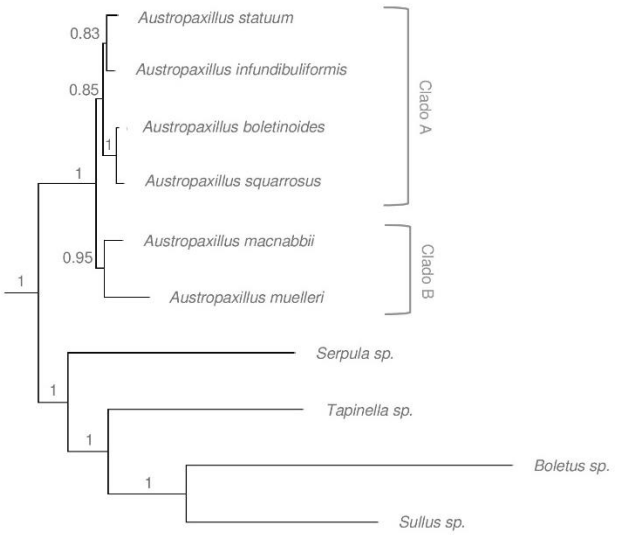

Figura 7. Filogenia resultante del consenso de mayoría (50%) de 6.001 árboles para el género ectomicorrícico *Austropaxillus* a partir de un análisis bayesiano. El árbol filogenético se construyó a partir de un conjunto de datos que consistió en 6.122 pares de bases que incluyeron las secuencias nucleares LSU (por sus siglas en inglés Large SubUnit, que codifica para la región 25-28S); SSU (por sus siglas en inglés Small SubUnit, que codifica para la región 18S), además de las subunidades 5,8S, rpb2 y tef 1. Los números en las ramas muestran su soporte (probabilidad posterior >0.95).

5.2. Estimación del tiempo de divergencia

5.2.1. Estimación del tiempo de divergencia para *Nothofagus*

Las fechas estimadas para el linaje de *Nothofagus* (Tabla 2), incluyen el origen de *Nothofagus*, estimado en una media de 72.1 Ma. La divergencia del subgénero *Nothofagus* y *Trisyngyne* se estima en una media de 42.2 Ma, mientras que el origen del subgénero *Nothofagus* se estima en una media de 24.4 Ma. La media de la data de separación entre *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* se estima en 19.7 Ma, con la posterior separación de *N. dombeyi* y *N. pumilio* (media 13.2 Ma). La divergencia entre *N. betuloides* y *N. nitida* se estima en una fecha media más próxima, 10 Ma. El origen del subgénero *Lophozonia* se estima en edad media de 42 Ma. La separación de *N. menziesii* de *N. cunninghamii* y *N. moorei* se estima en una media de 20.4 Ma, seguido de la divergencia entre *N. cunninghamii* y *N. moorei* (media 10.5 Ma) (Figura 8). Estos valores son consistentes con estudios previos (Sauquet et al. 2012). La divergencia entre algunos grupos, muestra valores posteriores a los eventos geológicos de la ruptura de Gondwana, y valores posteriores al término de la ruptura, lo que podría sustentar la hipótesis combinada de vicarianza y dispersión a larga distancia, esta última para los grupos más jóvenes. Estos datos son consistentes con lo propuesto por algunos autores sobre las teorías que explican la actual distribución de *Nothofagus* (Barron 1987, Crisci et al. 1991, Dettmann et al. 1990, Hill 2001, Humphries y Parenti, Linder y Crisp 1995, Page 1994, Peterson et al. 2010, 1999, Seberg 1991, Swenson et al. 2001), quienes atribuyen estas divergencias a los eventos de radiación en relación a la separación del antiguo supercontinente Pangea, y posterior Gondwana, en combinación con recientes eventos de dispersión a larga distancia.

Clado *Nothofagus*	MR. BAYES	BEAST	
	Soporte de ramas [1]	Edad de los nodos *lognormal* [2]	95% HPD *lognormal*
Eventos			
Origen de *Nothofagus*	1	72.1	(53.4-93.2)
Origen del subgénero *Lophozonia*	1	42	(31.5-59.3)
Divergencia entre *N. menziesii* , *N. cunninghamii,* y *N. moorei*	1	20.4	(5.3-38.2)
Divergencia entre *N. cunninghamii, y N. moorei*	1	10.5	(1.8-23.2)
Divergencia entre *N. alpina*, *N. glauca, y N. oblicua*	1	14.8	(7.56-17.4)
Divergencia entre *N. glauca, y N. oblicua*	0.59	6.6	(2.1-11.4)
Divergencia entre subgéneros *Fuscospora, Nothofagus, y Trisyngyne*	1	52.8	(36.5-70.6)
Origen del subgénero *Fuscospora*	1	30	(10.9-49.5)
Divergencia entre *N. gunnii, N. cliffortioides*, *N. truncata*, *N. fusca,* y *N. solandri*	0.97	16.1	(4.6-30.0)
Divergencia entre Subgenéros *Nothofagus* y *Trisyngyne*	1	42.2	(31.5-56.4)
Origen del subgénero *Nothofagus*	1	24.4	(11.1-39.8)
Divergencia entre *N. betuloides*, y *N. nitida*	0.78	10	(7.5-15.2)
Divergencia entre *N. antarctica, N. dombeyi*, y *N pumilio*	0.28	19.7	(9.8-28.7)
Divergencia entre *N. dombeyi, y N pumilio*	0.6	13.2	(5.6-19.7)
Origen del subgénero *Trisyngyne*	1	26.1	(13.9-38.9)
Divergencia entre *N. brassii, N. resinosa*, *N. carrii, N. grandis*, y *N. perryi*	0.69	18.8	(7.2-32.0)

Tabla 2. Estimación de tiempo (Ma) para los principales eventos de divergencia en *Nothofagus*. Resultado de varios análisis de las secuencias alineadas: el soporte de ramas fue calculado utilizando el software MR. BAYES; la edad media de los nodos, y los valores de intervalos de la densidad posterior más alta (95%) (HPD por sus siglas en inglés) fueron calculados utilizando el software BEAST.

1. Probabilidad posterior bayesiana.
2. Estimación del tiempo de divergencia (eventos) en millones de años antes del presente.

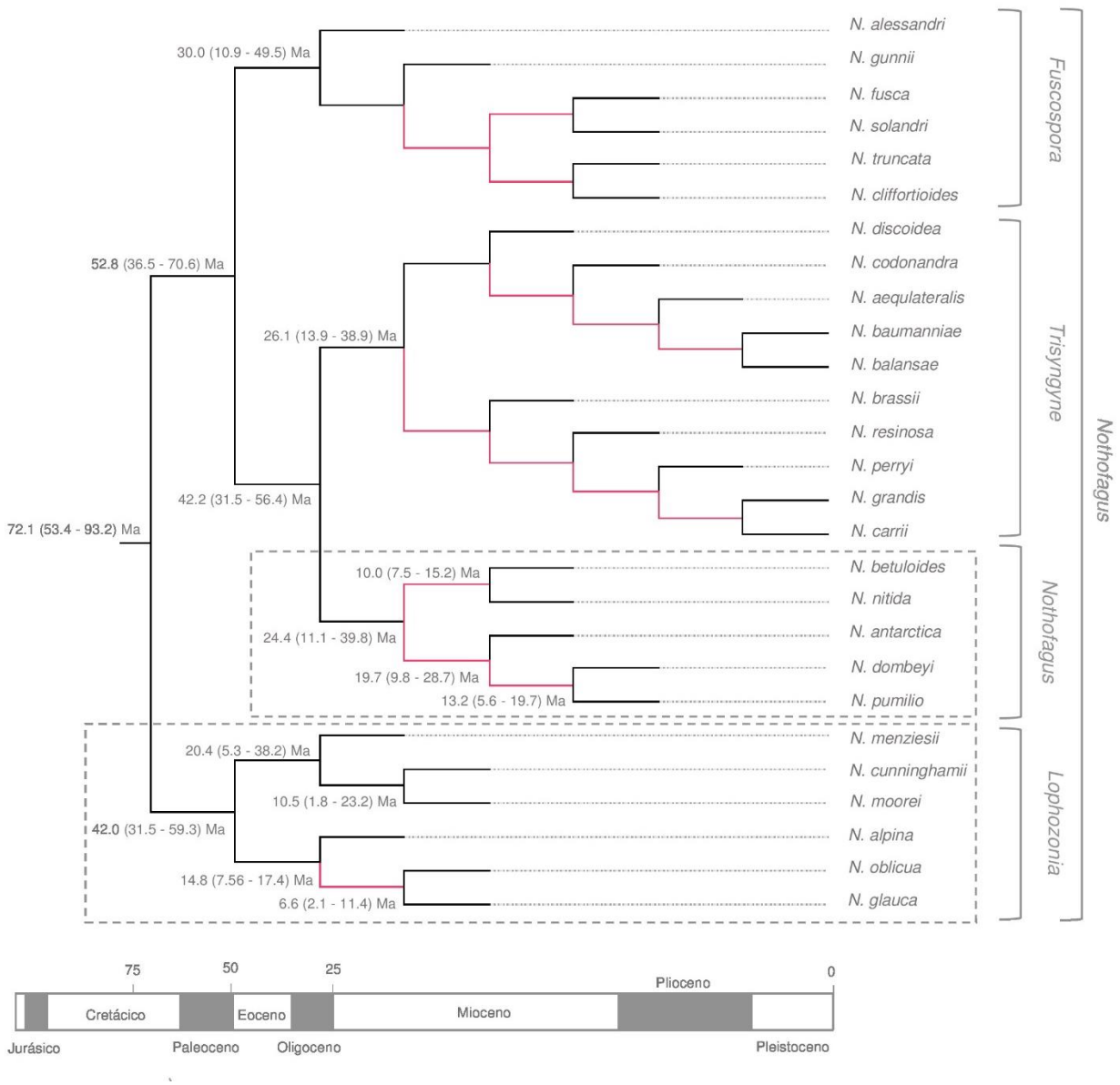

Figura 8. Análisis de datación molecular. Cronograma hipotético de los eventos de divergencia en *Nothofagus*, obtenido de la estimación del tiempo de divergencia usando BEAST. Los intervalos muestran la densidad posterior más alta (HPD por sus siglas en inglés) (95%), de la probabilidad posterior en la edad de los nodos. Ramas de color negro están bien soportadas (probabilidad posterior >0.95), ramas de color rosado mostraron una probabilidad posterior menor a 0.95. Números en la escala representan millones de años antes del presente. Los subgéneros asociados a hongos ectomicorrícicos del género *Austropaxillus* están encerrados en cuadros de líneas punteadas.

5.2.2. Estimación del tiempo de divergencia para *Austropaxillus*

Las fechas estimadas para el linaje de *Austropaxillus* (Tabla 3), incluyen el origen de *Autropaxillus* (divergencia entre el clado A y B), estimado en 22.78 Ma. Los tiempos de divergencia entre las distintas especies de la filogenia se muestran en la figura 9, al igual que *Nothofagus*, los clados tienen especies de distintos sitios geográficos. Estos resultados son

consistentes con los análisis realizados por Skrede et al. (2011) sobre la familia Serpulaceae, sin embargo no corresponde con los resultados obtenidos por Eastwood et al. (2011), quienes reportaron una separación más reciente entre los géneros *Serpula* y *Austropaxillus* (15 Ma). Esto podría ser explicado por las diferentes cantidades de datos moleculares utilizadas en el análisis

Por otro lado, la divergencia entre estos grupos muestra valores posteriores a los eventos geológicos de la ruptura de Gondwana, que podrían explicar, y sustentar la hipótesis de dispersión transoceánica. Estos resultados apoyan lo sugerido por Skrede et al. (2011), quienes atribuyen estas divergencias a los eventos de dispersión a larga distancia entre las diferentes placas continentales a través del aire y agua. Además esto también da soporte a la hipótesis de cofilogenia, ya que aparentemente el origen de *Nothofagus* y en especial de los subgéneros asociados a este hongo, es precedido por el simbionte (Cook y Crisp 2005). De acuerdo a Cook y Crisp (2005), el origen de estos subgéneros se dio hace aproximadamente 55-40 Ma, lo que coincide con los datos obtenidos en este estudio (Tabla 2).

	MR. BAYES	**BEAST**	
Clado *Austropaxillus*	Soporte de ramas [1]	Edad de los nodos *lognormal* [2]	95% HPD *lognormal*
Eventos			
Divergencia entre los géneros *Austropaxillus* y *Serpula*	1	54.32	(52.35 - 56.3)
Origen de Austropaxillus	1	22.78	(20.1-23.9)
Origen del Clado A	0.85	13,83	(12.4 - 18.9)
Divergencia entre A. statuum, y *A. infundibuliformis*	0.83	12.27	(4.6 - 13,6)
Divergencia entre A. boletinoides, y *A. squarrosus*	1	3.07	(5.9 - 8.7)
Origen del Clado B Divergencia entre *A. muelleri, y A. macnabbii*	0.95	15.65	(8.1 - 18.4)

Tabla 3. Estimación de tiempo (Ma) para los principales eventos de divergencia. Resultado de varios análisis las secuencias alineadas: el soporte de ramas fue calculado utilizando el software MR. BAYES; la edad media de los nodos, y los valores de intervalos de la densidad posterior más alta (95%) (HPD por sus siglas en inglés) fueron calculados utilizando el software BEAST.

1. Probabilidad posterior bayesiana.
2. Estimación del tiempo de divergencia (eventos) en millones de años antes del presente.

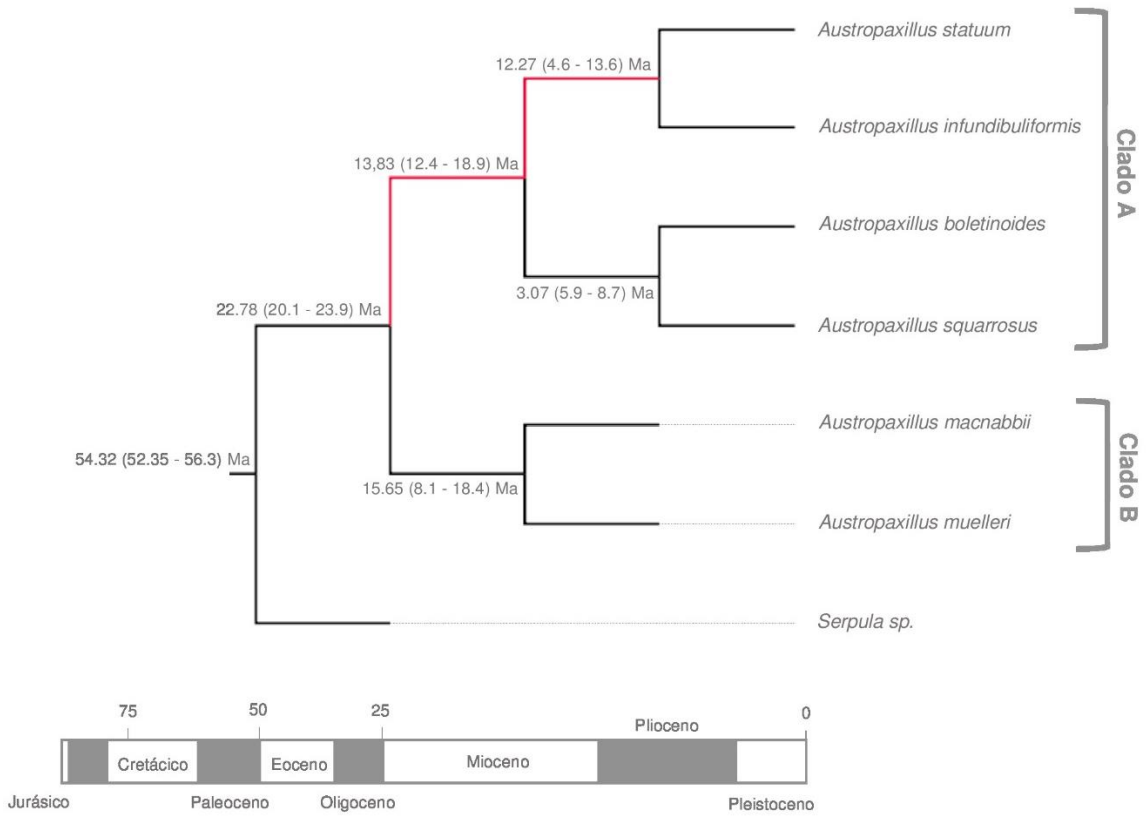

Figura 9. Análisis de datación molecular. Cronograma hipotético de los eventos de divergencia en *Austropaxillus*, obtenido de la estimación del tiempo de divergencia usando BEAST. Los intervalos muestran la densidad posterior más alta (HPD por sus siglas en inglés) (95%), de la probabilidad posterior en la edad de los nodos. Ramas de color negro están bien soportadas (probabilidad posterior >0.95), ramas de color rosado mostraron una probabilidad posterior menor a 0.95. Números en la escala representan millones de años antes del presente.

5.3. Historia biogeográfica de *Nothofagus y Austropaxillus*

Dada la evidencia fósil, de que los cuatro subgéneros existentes del género *Nothofagus* estuvieron ampliamente distribuidos en la Antártida, Australia y América del Sur antes de la deriva continental (Dettmann et al. 1990), la vicarianza, resultante de la ruptura de Gondwana, constituye una hipótesis plausible para explicar la distribución transantártica exhibida por *Nothofagus* (Figura 4). Sin embargo los resultados de Knapp et al. (2005) de la divergencia entre las especies de Australasia y América del Sur del subgénero *Lophozonia* muestran poco sustento a dicha hipótesis (38-21 Ma). Con estos resultados la dispersión a larga distancia entre estas especies resulta una explicación más coherente, al constatarse un origen posterior a la ruptura de Gondwana (Swenson et al. 2001).

Nuestros resultados y estimaciones del tiempo de divergencia entre las especies de Australasia y Sudamérica del subgénero *Lophozonia* (59.3-31.5 Ma), son consistentes con las estimaciones

de Knapp et al. (2005), poniendo de manifiesto la necesidad de considerar ambas hipótesis para explicar la distribución actual del género *Nothofagus*. En un estudio similar Cook y Crisp (2005), mediante sus resultados ponen a prueba ambas hipótesis, para explicar la divergencia entre las especies de Australasia y América del Sur del subgénero *Fuscospora*, y *Lophozonia* (45-30 Ma), así como también entre el subgénero australiano *Trisyngyne* y el subgénero suramericano *Nothofagus* (45-30 Ma).

El registro fósil sugiere que varias especies de *Nothofagus* viajaron desde Australia a Nueva Zelanda a través de la dispersión a larga distancia transoceánica (Hill 2001, Pole 1994, 2001). Aunque todos los tipos de polen estaban presentes en algún momento, en Nueva Zelanda, un solo tipo de polen, *Nothofagus*, ahora extinto, estaba presente antes de que Nueva Zelanda se separara de Australia y Sudamérica, y los representantes del subgénero *Lophozonia*, huéspedes de *Austropaxillus*, no aparecieron en Nueva Zelanda hasta el Eoceno temprano (Dettmann et al. 1990), dando esto más sustento a los eventos de dispersión, posteriores a la separación de estas masas continentales.

La divergencia inicial de *Austropaxillus* en un clado principalmente sudamericano, y uno de Australia y Nueva Zelanda, se estimó en nuestro análisis del tiempo de divergencia en 22.78 Ma aproximadamente, lo cual debe de representar un reciente evento de dispersión a larga distancia, siendo esto consistente con lo mencionado por Skrede et al. (2011), sobre la biogeografía de la distribución actual del hongo. Es probable que la relativamente reciente separación entre América del Sur y Australia (35 Ma) (McLoughlin 2001), de los taxones más primitivos de la familia Serpulaceae (Skrede et al. 2011) no soporten una antigua distribución de *Austropaxillus* en el antiguo bloque continental Gondwana. Otro hecho que soporta la reciente dispersión a larga distancia del género, es que las condiciones climáticas de la época de ruptura de Gondwana no eran probablemente las propicias para la sobrevivencia de los hongos (Upchurch 2008). En torno a lo anterior se han sugerido hasta puentes de paso entre la Antártida y Australia de hace aproximadamente 28 Ma (Crisp 1999, McLoughlin 2001, Sanmartín y Ronquist 2004), productos de una glaciación, sin embargo esto también demuestra las condiciones climáticas adversas en las cuales los hongos no podrían haber prosperado.

Considerando la asociación histórica de *Nothofagus* con otros hongos (e.g., *Cyttaria*), la reconstrucción cofilogenética puede dar soporte a la hipótesis de vicarianza para la distribución transantártica entre Australasia y Sudamérica del subgénero *Lophozonia* (Peterson et al. 2010). Sin embargo, para *Austropaxillus*, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de considerar la hipótesis de dispersión a larga distancia, en la distribución transantártica de algunos

taxa en Australasia y Sudamérica, en este caso de *Nothofagus*. Por ejemplo, la divergencia entre *Austropaxillus macnabbii* de Nueva Zelanda y *A. muelleri* de Australia (18.4-8.1 Ma) (Tabla 3, Figura 9), debe haber resultado de un reciente evento de dispersión a larga distancia, al separarse Nueva Zelanda de Sudamérica y Australia hace aproximadamente 80 Ma (McLoughlin 2001), esto es aproximadamente 60 Ma antes del origen del género *Austropaxillus* (22.78 Ma). Coincidentemente la misma divergencia que se muestra para *Austropaxillus*, es reportada en la reciente divergencia entre las especies del género *Nothofagus* de Nueva Zelanda y Australia (asociadas a estas especies) (5.3-38.2 Ma) (Tabla 2, Figura 8). Esto es consistente con los registros de otros autores sobre los tiempos de divergencia de este género arbóreo (Cook y Crisp 2005, Sauquet et al. 2012, Peterson et al. 2010).

La dispersión a larga distancia también es sugerida para explicar la divergencia entre *Austropaxillus infundibuliformis* de Tasmania, y *A. statuum* del sur de Sudamérica (Tabla 3, Figura 9). Sin embargo la relación entre ambas especies está débilmente soportada, se necesitarían por lo tanto más datos para aceptar o rechazar esta hipótesis. Por otro lado, nuestros resultados muestran un reciente evento de divergencia entre *Austropaxillus boletinoides* del sur de Sudamérica, y *A. squarrosus* de Nueva Zelanda, poniendo de manifiesto una vez más, la hipótesis de una posible dispersión a larga distancia del género neozelandés, siguiendo a sus potenciales huéspedes (Skrede et al. 2011). Adicionalmente, para las disyunciones entre hongos que resultan muy jóvenes para ser explicadas por la ruptura de Gondwana, se acepta la dispersión a larga distancia como un evento coherente para dilucidar las causas de su actual distribución y asociación con otros organismos en sus hábitats (Hibbett 2001, 2006, 2007, Hosaka et al. 2008, Moncalvo y Buchanan 2008).

En cuanto al tiempo de divergencia entre *Austropaxillus* (hongo ectomicorrícico) y su género hermano *Serpula* (hongo saprofito) (56.3-52.35 Ma) (Figura 9), es consistente con los resultados de Skrede et al. (2011), confirmando una vez más el posible paso de vida saprófita a ectomicorrícica del género *Austropaxillus* a partir de este evento de divergencia. Lo anterior da sustento a lo mencionado por Tedersoo et al. (2010), quienes sugieren que la transición de un modo nutricional saprófito hacia uno ectomicorrícico es una transición ecológica muy común en hongos. El ancestro de *Austropaxillus* de acuerdo a nuestro análisis habría divergido de un clado saprofito (género *Serpula*) hace aproximadamente 54.32 Ma. Es muy probable que la disminución de la temperatura y un clima más seco a finales del Eoceno e inicios del Oligoceno hayan promovido esta transición de vida saprofita a ectomicorrícica (Skrede et al. 2011, Tedersoo et al. 2010), concluyendo este proceso con el establecimiento de su relación ecológica con

Nothofagus, y su posterior diversificación y expansión en Australia, Nueva Zelanda y América del Sur.

Este trabajo demuestra, cómo el estudio de la obligada asociación simbiótica entre *Nothofagus* y *Austropaxillus*, puede brindar algunas claves sobre la actual distribución de estos taxa y el porqué de estas asociaciones existentes. Por lo tanto, de acuerdo a nuestro resultados y en concordancia con otros autores (Peterson et al. 2010, Swenson et al. 2001, Sanmartín y Ronquist 2004), es posible inferir, y sugerir que una combinación de la hipótesis de dispersión a larga distancia y vicarianza, puede ser usada para explicar la distribución actual de A*ustropaxillus* y sus huéspedes *Nothofagus* en el hemisferio austral.

5.4. Asociación hongo-planta

De acuerdo a la bibliografía existente, hasta la actualidad se han descrito nueve especies del género de hongo ectomicorrícico *Austropaxillus* (Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Jarosch 2001), las cuales forman una asociación simbiótica obligada con todas las especies de *Nothofagus* de los subgéneros *Lophozonia* y *Nothofagus* (Binder et al. 2010, Binder y Hibbett 2002, 2006, Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Horak 1979, 1980, Jarosch 2001, Singer 1964, Skrede et al. 2011, Teasdale et al. 2013, Valenzuela et al. 1998). La relación entre las especies de *Austropaxillus* y *Nothofagus* podría constituir un nuevo reporte de coespeciación, constatándose evidencia de una biogeografía en común entre especies de ambos géneros. Esto a pesar que las asociaciones entre estos dos grupos usualmente no corresponden a una sencilla relación uno a uno; algunas especies de *Austropaxillus* pueden asociarse con las mismas especies de *Nothofagus*, y una sola especie de *Austropaxillus* puede asociarse con varias especies de *Nothofagus* (Figura 10).

Nothofagus es un buen modelo para este tipo de estudios, ya que cuenta con un robusto registro fósil, y una filogenia ampliamente estudiada (Jordan y Hill 1999, Martin y Dowd 1993, Manos 1997, Setoguchi et al. 1997, Sauquet et al. 2012, Heenan y Smissen 2013), siendo frecuentemente incluida en los estudios sobre biogeografía del hemisferio austral (Peterson et al. 2010).

Las relaciones simbióticas entre las especies de ambos géneros se resumen en la Figura 10. Cuatro especies de *Austropaxillus* son endémicas para América del Sur (Chile y Argentina), asociadas a los subgéneros *Lophozonia* y *Nothofagus*, y las otras cinco especies son endémicas para Australasia (Sureste de Australia y Nueva Zelanda), asociadas únicamente al subgénero

Lophozonia (Binder et al. 2010, Binder y Hibbett 2002, 2006, Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Horak 1979, 1980, Jarosch 2001, Singer 1964, Skrede et al. 2011, Teasdale et al. 2013, Valenzuela et al. 1998).

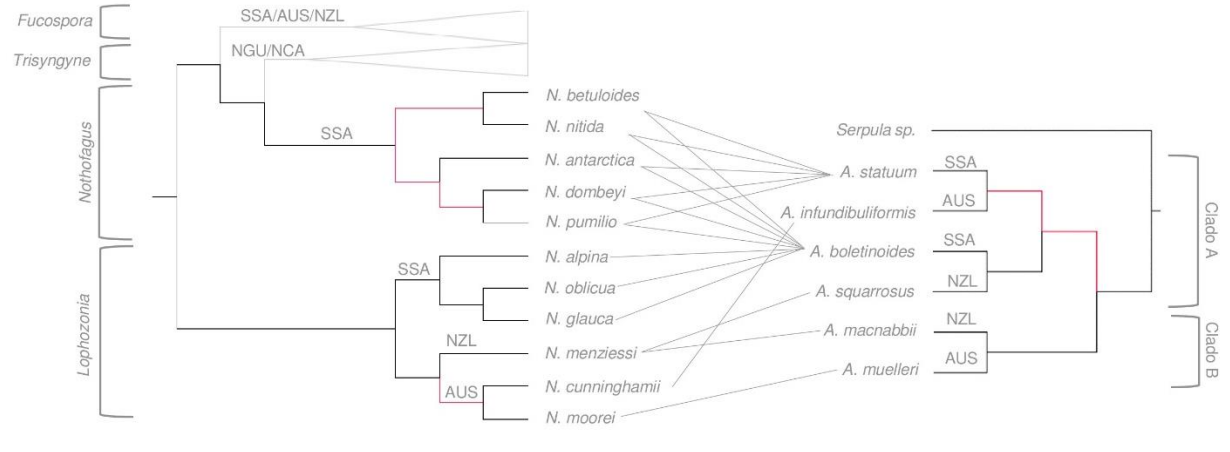

Figura 10. Relaciones entre *Nothofagus* y *Austropaxillus*. Las ramas de color negro está bien soportadas (probabilidad posterior >0.95) ramas de color rosado mostraron una probabilidad posterior menor a 0.95. Las líneas conectadas representan la asociación hongo-huésped. AUS = Australia, NZL = Nueva Zelanda, = SSA = Sur de Sudamérica, NGU = Nueva Guinea, NCA =Nueva Caledonia.

5.5. Cofilogenia

5.5.1. Análisis cofilogenético entre hongos formadores de ectomicorrizas del género *Austropaxillus*, y sus huéspedes, especies del género *Nothofagus*

El método basado en la distancia, ejecutado en el programa ParaFit (Legendre et al. 2002), encontró altamente significativa toda la estructura cofilogenética considerada en este estudio, entre el conjunto de datos de *Nothofagus* y *Austropaxillus* (P < 0.0001). Las pruebas de relaciones o enlaces individuales entre pares huésped-simbionte encontraron 17 de los 17 enlaces considerados en el análisis altamente significativos (*P values* < 0.0001) (Apéndice 3). Esto tiene relación con lo sugerido por Klassen (1992), quien hace alusión al hecho de que en general se acepta que la evolución de los hongos simbióticos, que se encuentran asociados a un número limitado de huéspedes, debe estar estrechamente vinculada a la evolución de sus potenciales anfitriones.

Los resultados sugieren que la especiación en *Nothofagus* precede a la especiación de *Austropaxillus*. El análisis cofilogenético indica que *Austropaxillus* exhibe una cofilogenia significativamente alta con sus huéspedes *Nothofagus*, aun cuando las asociaciones entre especies de *Austropaxillus* y *Nothofagus* usualmente no corresponde a una simple relación uno a uno. ParaFit no provee de representaciones gráficas de los probables eventos cofilogenéticos,

pero dado que la prueba global e individual detectó una cofilogenia altamente significativa entre *ambos taxa*, se procuró reconstruir sus historias evolutivas (Figura 11). Para esto se desarrolló un escenario hipotético de las relaciones cofilogenéticas del género de hongo ectomicorrícico *Austropaxillus* y sus huéspedes especies del género *Nothofagus* (asociación simbiótica mutualista), y su relación con la aparente distribución restringida al hemisferio meridional, todo en base a los criterios cofilogenéticos propuestos por De Vienne et al. (2013) (Figura 2).

El análisis conjunto de las topologías de los árboles filogenéticos del huésped y simbionte corroboran lo indicado en la Tabla 1, es decir, que no hay asociación por descendencia, o la obligada y especializada interacción entre huéspedes y simbiontes, que produce bifurcaciones simultáneas del linaje del huésped y el simbionte asociado (De Vienne et al. 2013). Este tipo de asociaciones cofilogenéticas son más complejas y pueden ser explicadas por otros eventos que han sido reconocidos en los análisis cofilogenéticos (De Vienne et al. 2013, Paterson y Banks 2001).

5.5.2. Cofilogenia entre *Austropaxillus* y *Nothofagus*: escenario hipotético

El clado “A” de *Austropaxillus* está confinado a ambos subgéneros de *Nothofagus* (*Lophozonia* y *Nothofagus*), mientras que el clado “B” lo está tan sólo a un subgénero de *Nothofagus* (*Lophozonia*). Esta especificidad cuenta con al menos un incidente de codivergencia. En este caso es notable que la aparición y posterior especiación del simbionte va precedida del huésped. En la actualidad se acepta que los eventos de coespeciación pueden tener un carácter diacrónico (De Vienne et al. 2013). En el estudio se revela que el origen de los potenciales huéspedes, especies del género *Nothofagus*, se produce inicialmente sin la aparente especiación del simbionte asociado, sin embargo se asume una posterior especiación que viene acompañada de las posibles demandas nutricionales que ambos grupos enfrentan en su medio (Agosta et al. 2010, Giraud et al. 2010) (Figura 11).

Existen otros eventos cofilogenéticos que podrían influir en los patrones observados en este estudio, y que incluyen pérdida del simbionte, eventos de duplicación (especiación independiente), y las extinciones (De Vienne et al. 2013, Paterson y Banks 2001). Todas estas consideraciones se traducen en esta aparente incongruencia mencionada anteriormente, en la que no se verifica la relación 1:1 entre las especiaciones ocurridas en ambos grupos.

Es importante destacar que la condición de asociación ectomicorrícica entre hongos del género *Austropaxillus* y las raíces de sus huéspedes *Nothofagus*, sólo ha sido observada en bosques temperados del hemisferio meridional. Aquí los patrones climáticos pueden haber jugado un

papel importante en los eventos de especiación del simbionte que sigue a *Nothofagus* en sus hábitats (Binder et al. 2010, Binder y Hibbett 2002, 2006, Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Horak 1979, 1980, Jarosch 2001, Singer 1964, Skrede et al. 2011, Teasdale et al. 2013, Valenzuela et al. 1998).

Otro hecho importante de mencionar, es que de acuerdo a Skrede et al. (2011), las especies de *Austropaxillus* han seguido un ritmo constante de especiación después de su paso de la vida saprofita a la simbiótica (56.3-52.35 Ma), probablemente producto de las presiones ambientales que han enfrentado en sus hábitats (Upchurch 2008, Skrede et al. 2011), con eventos evolutivos muy análogos a los de su potenciales huéspedes (Dettmann et al. 1990). A pesar del soporte de estas estimaciones, no hemos podido incluir a las nueve especies de *Austropaxillus* que han sido reportadas como simbiontes de *Nothofagus* en nuestro análisis, por lo que estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de incluir más estudios moleculares, que consideren la extracción de ADN y su posterior secuenciación.

Sin embargo se propone una serie de eventos hipotéticos con base en los resultados obtenidos del análisis cofilogenético, los tiempos de divergencia, y los criterios establecidos por De Vienne et al. (2013). La mayoría de los incidentes se pueden resumir así (Figura 11):

(1) Divergencia temprana de *Nothofagus* en aproximadamente 72.1 (93.2-53.4) Ma, da origen al ancestro común de los subgéneros *Fuscospora*, *Nothofagus,* y *Trisyngyne* (70.6-36.5 Ma), y al ancestro común que daría origen a las especies del actual subgénero *Lophozonia* (59.3-31.5 Ma). Hasta la actualidad, la ocurrencia más antigua que se conoce del género comprende la presencia de los cuatro tipos actuales de polen (tipos brassii, fusca A, fusca B, menziesii) en depósitos del Cretácico Superior en la Antártica (83 Ma) y de Sudamérica (70 Ma) (Dettmann et al. 1990), siendo consistente con los resultados del origen del género en este trabajo (93.2-53.4 Ma). También se han encontrado los cuatro tipos de polen en depósitos más modernos de Australia, Tasmania y Nueva Zelanda, lo que sugiere una distribución ancestral continua para los cuatro subgéneros, desde Sudamérica hasta Australasia a través de la Antártica (Hill y Dettmann 1996);

(2) Divergencia que separó al subgénero *Fuscospora*, de sus subgéneros hermanos, *Nothofagus* y *Trisyngyne* (70.6-36.5 Ma);

(3) Divergencia que separó a los subgéneros *Nothofagus* y *Trisyngyne* (56.4-31.5 Ma). Como los cuatro mayores linajes (subgéneros) ya existían en el Cretácico tardío (80 Ma), antes del desmembramiento total de Gondwana, muchos taxa actuales deben haber sufrido un proceso de

especiación simpátrica en un rango geográfico en ese entonces continuo, las posibilidades de hibridación entre especies actuales sustentan esta hipótesis (Swenson et al. 2001). Los posteriores eventos de fragmentación de la biota no harían más que acentuar el proceso de especiación, y el patrón actual disyunto estaría dado principalmente por las extinciones (Manos 1997, Swenson et al. 2001). Los fósiles encontrados en depósitos oligocénicos de Australia, demuestran la presencia y posterior extinción de este grupo en Australasia (Hill y Read 1991). También el registro fósil muestra la extinción de especies de *Trisyngyne* en Sudamérica, Antártica y Nueva Zelanda, y de especies del subgénero *Nothofagus* en Antártica, Australia y Nueva Zelanda (Manos 1997). Por otro lado, Swenson et al. (2001) considerando este enfoque y sobre la base de la filogenia de Manos (1997), proponen tres eventos de vicarianza: uno en el subgénero *Lophozonia* ocurrido en el Eoceno (35 Ma), que corresponde a la separación entre Antártica/Sudamérica y Australia; otro en *Fuscospora* ocurrido en el Cretácico (80 Ma), que corresponde a la separación entre Nueva Zelanda/Nueva Caledonia y el resto de Gondwana; y un evento que habría separado también tempranamente (Cretácico, 80 Ma) los dos clados del subgénero *Trisyngyne* entre Nueva Caledonia y Nueva Guinea;

(4) Divergencia temprana del género *Lophozonia* (59.3-31.5 Ma), entre el ancestro común de las especies actuales de Sudamérica (*N. alpina*, *N. glauca*, y *N. obliqua*), y el ancestro común de las especies actuales de Australia y Nueva Zelanda (*N. menziesii*, *N. cunninghamii*, y *N. moorei*);

(5) Transición de *Austropaxillus*, de vida saprofita a ectomicorrícica al separarse de su género hermano *Serpula* (56.3-52.35 Ma), evento que se muestra relativamente paralelo a la divergencia temprana del subgénero *Lophozonia*, lo anterior con base en lo sugerido por Skrede et al. (2011), en el estudio biogeográfico y filogenético de la familia Serpulaceae;

(6) Divergencia inicial del subgénero sudamericano *Nothofagus* (39.8-11.1 Ma), da origen al ancestro común de las especies *N. betuloides* y *N. nítida*, y al ancestro común de las especies *N. antarctica*, *N. dombeyi*, y *N. pumilio*;

(7) Divergencia del subgénero *Lophozonia* que da origen al ancestro común de las especies australianas (*N. cunninghamii* y *N. moorei*), y a la neozelandesa *N. menziesii* (38.2-5.3 Ma), se presenta paralela a la divergencia entre *Austropaxillus macnabbii* de Nueva Zelanda y *A. muelleri* de Australia (18.4-8.1 Ma), posiblemente como resultado de un reciente evento de dispersión a larga distancia, teniendo en cuenta que Nueva Zelanda se separó de Sur América y Australia hace aproximadamente 80 Ma (McLoughlin 2001), constituyendo un posible evento de codivergencia entre estas especies, principalmente debido a la coincidencia en los tiempos de

divergencia (Skrede et al. 2011). Las interpretaciones que explican disyunciones transcontinentales mediante dispersión de larga distancia han resurgido con fuerza, debido a que las dataciones evolutivas mediante relojes moleculares, aplicadas a los taxa australes, arrojan resultados mucho más jóvenes que los eventos tectónicos de fragmentación del continente Gondwana (Crisp et al. 2004). No obstante, hay que considerar que las técnicas de datación molecular no están exentas de supuestos e incertidumbres (Heads 2004);

(8) Divergencia entre el ancestro común de la especie sudamericana *A. boletinoides*; y neozelandesa *A. squarrosus*; y del ancestro común de la australiana *A. infudibuliformis*; y sudamericana *A. statuum* (18.9-12.4 Ma). Este evento sin embargo no estaría 100% sustentado debido a que las ramas no mostraron un buen soporte durante el análisis (probabilidad posterior <0.95), poniendo de manifiesto la necesidad de estudios moleculares y morfológicos con las especies que no fueron incluidas en este trabajo para futuros análisis;

(9) Un evento de conmutación (cambio de huésped) en *Austropaxillus* (13.6-4.6 Ma), que dio origen a *A. statuum* de Sudamérica asociada a las especies de *Nothofagus* sudamericanas (subgénero *Nothofagus*), y *A. infundibuliformis* simbionte de *N. cunninghamii* de Australia; y otro evento de conmutación en *Austropaxillus* (8.7-5.9 Ma), que dio origen a *A. boletinoides* de Sudamérica asociada a las especies de *Nothofagus* sudamericanas (subgéneros *Lophozonia* y *Nothofagus*), y *A. squarrosus* simbionte de *N. mensiessi* de Nueva Zelanda. Exploramos esta posibilidad como un mecanismo alternativo, que puede permitir incongruencia de tipo topológico entre las filogenias del huésped y simbionte, principalmente por el cambio del hongo hacia un nuevo clado del huésped (De Vienne et al. 2013, Paterson y Banks 2001, Peterson et al. 2010). Una radiación adaptativa de un simbionte en una amplia gama de especies hospedadoras ha sido propuesta por algunos autores en casos similares (Hafner y Nadler 1988, Hafner et al. 1994, Page 1996, Peterson et al. 2010, Roy 2001). Esta hipótesis propone además que una conmutación siempre va seguida de la especiación (De Vienne et al. 2007), eventos evidenciados en los sitios de ocurrencia actual de la simbiosis en estudio;

(10) La ausencia de *Austropaxillus* en los subgéneros *Trisyngyne* y *Fucospora* en este escenario es explicada por eventos de extinción o pérdida del simbionte, donde las condiciones climáticas en los hábitats de estas especies de *Nothofagus*, podrían no ser idóneas para el crecimiento, desarrollo y reproducción de los hongos, estos eventos han sido sugeridos como la explicación más plausible cuando el simbionte está ausente en ciertos especies huépedes del clado asociado (De Vienne et al. 2013, Peterson et al. 2010). En sus trabajos, Hill (2001), y Swenson et al. (2001) ya discuten el enigma de la presencia de subgénero *Trisyngyne* en Nueva Caledonia y Nueva

Guinea, y su ausencia en los otros lugares de ocurrencia del género (Heads 2006). En cuanto a su relación con *Austropaxillus*, el enigma radica en: ¿por qué está presente en los subgéneros *Lophozonia* y *Nothofagus*, pero ausente en los subgéneros *Trisyngyne* y *Fuscospora*? De hecho, los dos subgéneros huéspedes de *Austropaxillus* no son taxones hermanos (Figura 6). Por otra parte, a pesar que la actual distribución de subgénero *Trisyngyne* se limita a latitudes tropicales de Nueva Caledonia y Nueva Guinea, las especies estuvieron alguna vez distribuidas de manera más generalizadas, constatando su presencia en la Antártida, Australia y América del Sur (Dettmann et al. 1990). El subgénero *Fuscospora*, cuyas especies existentes co-ocurren con anfitriones de *Austropaxillus* en los otros dos subgéneros, también estuvo distribuido de manera más generalizada, en la Antártida, Australia y América del Sur (Dettmann et al. 1990). De hecho, los cuatro subgéneros existentes estuvieron distribuidos ampliamente en Australasia, Antártida y América del Sur hasta mediados del Eoceno (Dettmann et al. 1990). Todo lo anterior pone de manifiesto la gran incógnita que existe detrás de la ausencia de *Austropaxillus* en los subgéneros *Trisyngyne* y *Fuscospora*. Se desconoce si los antepasados de los subgéneros *Trisyngyne* y *Fuscospora* simplemente escaparon de la colonización por *Austropaxillus*, o si las especies de *Austropaxillus* se extinguieron en los antepasados de estos subgéneros. No hay fósiles para *Austropaxillus* que ayuden a resolver de manera más exacta estas hipótesis (Skrede et al. 2011), pero si el extenso registro fósil de *Nothofagus*, que estaría indicando lo que podría haber sucedido con *Austropaxillus*, en donde las extinciones reportadas para el género *Nothofagus* en los distintos bloques continentales probablemente contribuyeron a la actual distribución de *Austropaxillus*. Las reconstrucciones biogeográficas de Linder y Crisp (1995) y Swenson et al. (2001), que predicen linajes extintos dentro de tres principales linajes de *Nothofagus* (*Fuscospora*, *Lophozonia* y *Trisyngyne-Nothofagus*), han demuestrado el efecto de la extinción en la interpretación de los patrones biogeográficos observados de las especies existentes (Manos 1997);

(11) Eventos de duplicación, posibles divergencias independientes de las especies sudamericanas de *Nothofagus* de ambos subgéneros (*Lophozonia* y *Nothofagus*), podrían explicar la asociación generalizada de *Austropaxillus* con las especies de *Nothofagus* en América del Sur. En este sentido y de acuerdo De Vienne et al. (2007), pareciera intuitivo pensar que los simbiontes pueden colonizar fácilmente los huéspedes más estrechamente relacionados, compartiendo propiedades ecológicas, fisiológicas y químicas generales, sin sufrir cambio o especiación alguna, capaces de permanecer generalistas por mucho tiempo (lenta especiación). Sin duda alguna en este caso no se trataría de coespeciación propiamente dicha. A pesar de

estos resultados, no es posible desvincular las estrechas relaciones entre las historias evolutivas de ambos taxa (De Vienne et al. 2013).

En concordancia con estudios biogeográficos, filogenéticos y taxonómicos de *Nothofagus* (Cook y Crisp 2005, Dettmann et al. 1990, Heenan y Smissen 2013, Hill y Jordan 1993, Hill y Lee 1991, Knapp et al. 2005 , Linder y Crisp 1995 , Manos 1997 , Martin y Dowd 1993, Sauquet et al. 2012) y *Austropaxillus* (Binder et al. 2010, Binder y Hibbett 2002, 2006, Bresinsky et al. 1999, Garrido 1981, 1985, 1988, Garrido y Bresinsky 1985, Horak 1979, 1980, Jarosch 2001, Singer 1964, Skrede et al. 2011, Teasdale et al. 2013, Valenzuela et al. 1998), en este trabajo se encontró una relación más estrecha entre las especies de *Austropaxillus* de Australia y Nueva Zelanda, asociadas al subgénero *Lophozonia,* al constatarse una bifurcación paralela en la filogenia de ambos taxa (Figura 11). Algunos autores sugieren que este patrón común, podría ser resultado de propágulos (para ambos taxa) que fueron llevados a través del viento procedente del oeste, comenzando con la corriente circumpolar antártica (28-35 Ma), los cuales podrían ser los responsables de la dispersión a larga distancia de ambos grupos, a través de la gran extensión del mar de Tasmania (Sanmartín et al. 2007, Skrede et al. 2011, Winkworth et al. 2002).

A raíz de esto, se deben considerar nuevos estudios de tipo molecular y morfológico, incluyendo a todas las especies de *Austropaxillus*, con el objetivo de evitar incongruencias topológicas entre las filogenias de ambos grupos. A pesar de lo anterior, de acuerdo a los resultados del análisis cofilogenético, existe una altamente significativa estructura cofilogenética entre el simbionte y huésped, donde una combinación de los eventos hipotéticos de vicarianza y dispersión a larga distancia podrían explicar la distribución y asociación actual entre estos taxa.

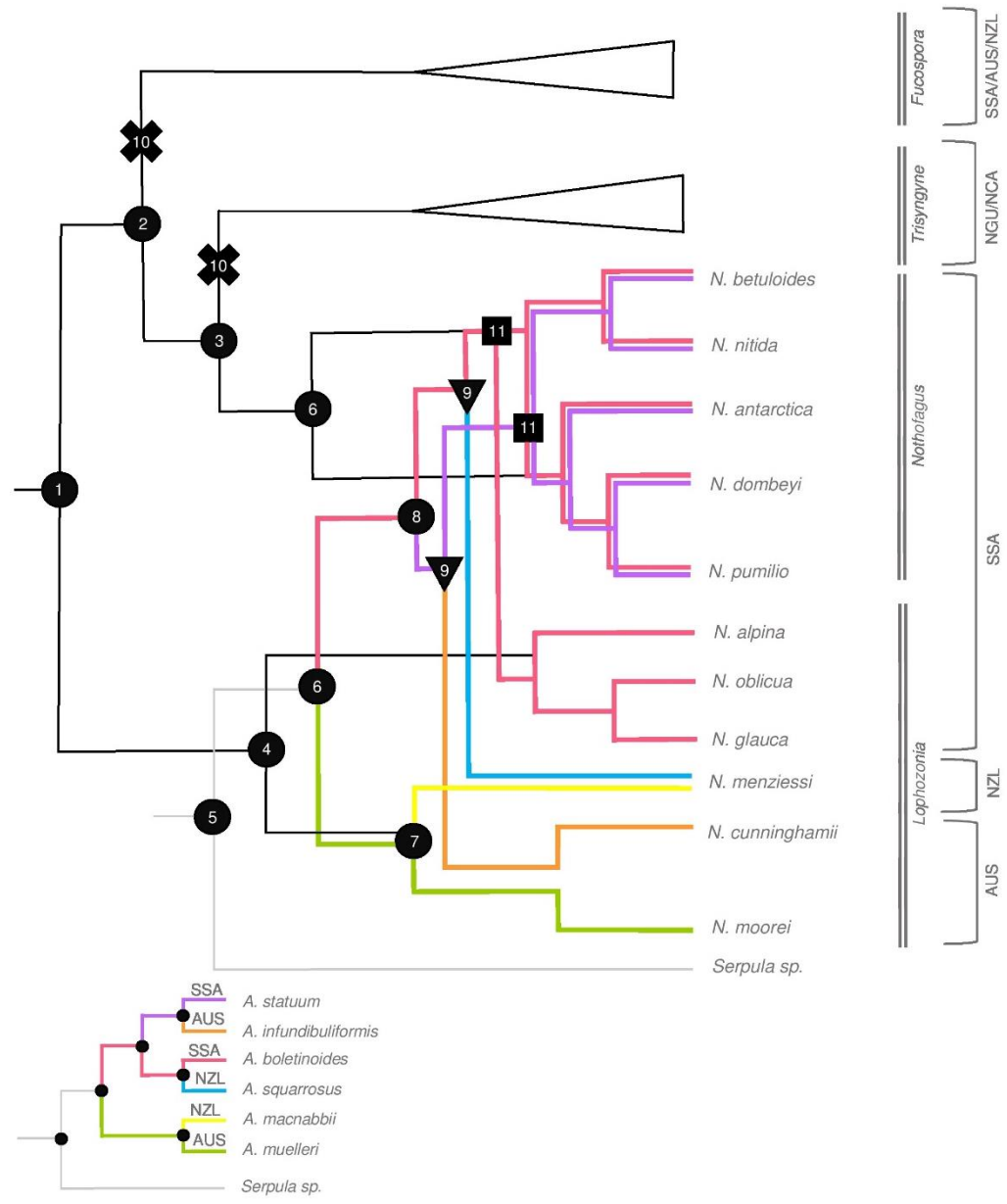

Figura 11. Reconstrucciones cofilogenéticas hipotéticas del taxa *Austropaxillus* y sus huéspedes *Nothofagus* representando los principales eventos evolutivos en ambas filogenias. Eventos (1-11): los círculos representan los eventos de divergencia y codivergencia; los cuadros representan los eventos de duplicación; los triángulos representan los eventos de conmutación; y las equis representan las extinciones y pérdidas del simbionte. Cada color corresponde a una especie diferente de *Austropaxillus* y la trayectoria hipotética hasta llegar a su actual asociación con *Nothofagus*. En la base del lado izquierdo de la figura se muestra un cladograma del género *Austropaxillus*. AUS= Australia, NCA= Nueva Caledonia, NGU= Nueva Caledonia, NZL= Nueva Zelanda, SSA= Sur de Sudamérica.

5.6. Implicancias de la información cofilogenética en la conservación de la simbiosis ectomicorrícica

Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios integradores, donde se consideren las relaciones ecológicas en la naturaleza, para hallar explicaciones más exhaustivas acerca de los patrones evolutivos y de distribución de la biota en el hemisferio meridional. En el campo de la biología de la conservación, este análisis cofilogenético está vinculado directamente con su primer principio fundamental, establecido por Meffe y Carroll (1994): “La evolución es el único mecanismo capaz de explicar los patrones de biodiversidad, por lo que las respuestas a los problemas de conservación deben generarse dentro del marco evolutivo”.

Una de las aproximaciones del estudio, está dada por la identificación de una posible especificidad de este género de hongo ectomicorrícico con las especies del género *Nothofagus*. Las implicancias de esta condición en la conservación, distribución y tamaño de la población de especies involucradas en la asociación simbiótica han sido identificadas en otros estudios (Barrett et al. 2010, Otero y Flanagan 2005, Rasmussen y Whigham 1998, Rasmussen y Rasmussen 2009, Tremblay et al. 2005, Waterman y Bidartondo 2008). Barret et al (2010), a través de un estudio cofilogenético entre *Corallorhiza striata* y los hongos ectomicorrícicos asociados del género *Tomentella*, sugirió una fuerte especificidad entre estas especies a partir de los resultados de la significancia en la estructura cofilogenética, constatando que a pesar de la aparición de estos organismos en una diversidad de ecosistemas forestales (abarcando desde México hasta Canadá), *C. Striata* mantiene una extrema especificidad con sus micobiontes. Lo anterior proporcionó información fundamental para futuros esfuerzos en la conservación de ambos taxa en las poblaciones de esta orquidia y sus hongos asociados a lo largo de su distribución geográfica actual (Barrett et al. 2010).

Por otro lado Otero y Flanagan (2005), sugieren que una alta especificidad entre las ectomicorrizas y las plantas ayudaría a impulsar la diversidad indirectamente, mediante la determinación de los patrones de distribución de las mismas. Una distribución irregular de los hongos con una alta especificidad de micorrizas podrían ser responsables de las poblaciones hiper-dispersas de algunas plantas (Otero y Flanagan 2005), esto se ve impulsado además por las pequeñas distancias de dispersión que generalmente muchas plantas enfrentan. Lo anterior podría dar lugar a pequeños tamaños efectivos de poblaciones y al flujo de genes reducido, creando las condiciones ideales para que se produzca especiación en periodos más cortos de tiempo (Tremblay et al. 2005). De esta manera, la relación restringida entre hongos ectomicorrícicos y plantas del género *Nothofagus*, podría aumentar el potencial para la

especiación de las mismas, un punto a favor para la diversidad, cuando se la considera una medida de estabilidad en los ecosistemas.

En el campo de la restauración ecológica esto tiene especial importancia en la selección y uso de hongos ectomicorrícicos específicos asociados a *Nothofagus*, los cuales deberían ser inoculados en las plantas desde los viveros forestales, antes que sean trasladadas a los sitios de reforestación, ya que las ectomicorrizas requieren un desarrollo planta (raíz)-hongo (micelio) sincronizado, pues las hifas fúngicas generalmente suelen colonizar solo raíces jóvenes (Smith y Read 2009).

Además se debe considerar el potencial de selección de hongos ectomicorrícicos antes y después de la germinación de las plantas. Realizar análisis de los potenciales hongos ectomicorrícicos asociados a estas especies durante la germinación y crecimiento, ayudará a enfrentar las dificultades en los programas de restauración ecológica. El aumento del conocimiento sobre las compatibilidades entre hongos ectomicorrícicos y especies de *Nothofagus*, mediante la utilización de estudios con enfoque en los procesos evolutivos de estas asociaciones, son fundamentales para un mejor resultado en conservación biológica (Tedersoo et al. 2009).

En cuanto al estado de conservación, la asociación con un conjunto limitado de hongos ectomicorrícicos, se puede ver como una restricción adicional a la amplitud del nicho de estas especies. Las investigaciones futuras deberán centrarse en si la ausencia de *Nothofagus* (lugares donde se reportó su presencia antes) en una localidad en particular se debe estrictamente a la ausencia de hongos adecuados, o si estos hongos ectomicorrícicos también están comúnmente presentes en los sitios, a pesar que las especies de plantas no lo estén.

Otro aspecto potencialmente importante y que no se aborda comúnmente en los estudios de ectomicorrizas, es averiguar si existe variación temporal en las asociaciones de hongos durante todo el ciclo de vida de *Nothofagus*. Por lo tanto, una historia de vida que implique el cambio de hongos podría añadir otra capa de complejidad a las consideraciones de conservación en estas especies (Dearnaley 2007). Por ejemplo, Illyés et al. (2010), encontraron que la diversidad de hongos ectomicorrícicos asociados a ciertas orquídeas puede variar de acuerdo a la edad del organismo, y también en función de los diferentes hábitats en los cuales se estén desarrollando. Estos resultados contrastan con lo sugerido por otros autores sobre la fuerte especificidad de los hongos con su huésped, la cual se mantiene a pesar de los cambios ambientales que enfrenten (Barrett et al. 2010, Otero y Flanagan 2005). Mediante pruebas controladas de laboratorio y

posterior análisis cofilogenético de las especies involucradas en la simbiosis, Illyés et al. (2010), llegaron a inferir, que la variación de simbiontes en sus huéspedes se debe probablemente a los requerimientos del huésped, y la presión que ejercen las condiciones ambientales. En este caso, los organismos fueron sometidos a diferentes condiciones de estrés hídrico. En otros estudios se podría investigar incluyendo más factores como el pH del suelo, salinidad, déficit de nutrientes, o efectos combinados. Estas investigaciones podrían aportar información más detallada de los tipos de hongos ectomicorrícicos que se deben inocular en las plantas de *Nothofagus* de acuerdo a las condiciones ambientales que enfrentan en sus hábitats.

La simbiosis ectomicorrícica es una estrategia nutricional importante, en particular para la utilización de fuentes orgánicas e inorgánicas en suelos pobres de nutrientes (Smith y Read 2009). Las plantas de *Nothofagus* por lo tanto dependen de esta asociación para la captura de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Lindahl et al. 2002, Tedersoo et al. 2003). La adquisición de hongos ectomicorrícicos por parte de la planta se hace ya sea de micelio derivado de esporas, o de raíces de los árboles maduros ectomicorrizados que penetran el suelo (Tedersoo et al. 2008), por lo que mantener un buen estado de los bosques es esencial para facilitar la asociación ectomicorrícica. A partir de esto será importante investigar cuáles son las adaptaciones evolutivas de los hongos al momento de colonizar una planta de *Nothofagus*, y qué linajes podrían mejorar la dispersión, capacidad de germinación, y otras ventajas competitivas en las plántulas jóvenes, con déficit de carbono (Tedersoo et al. 2008). Esto mismo hace importante estimar la riqueza de hongos ectomicorrícicos que colonizan plantas de *Nothofagus* en las diferentes condiciones ambientales de sus hábitats.

La falta de nutrientes ha sido reportada en muchos árboles de *Nothofagus* (González et al. 1996), e incluso a pesar que existan en el suelo circundante, no pueden ser absorbidos por falta de hongos ectomicorrícicos (Smith y Read 2009). El micelio del hongo actúa a su vez como reservorio de nutrientes y agua. Puede almacenar substancias nocivas para las plantas y evitar su toxicidad (Wilkins 1991). Este aspecto es interesante para plantas que viven en suelos contaminados por metales pesados. Otro punto crucial es la posibilidad que tiene el hongo de prospectar el suelo mediante la minúscula red que forma el micelio, mucho más amplia y extensa que cualquier sistema de raíces, buscando nuevos nutrientes y mayormente agua (Smith y Read 2009).

La posición del hongo en las raíces es otro punto importante de considerar. Esta posición privilegiada en la llamada rizosfera, implica todo un conjunto de efectos originados por substancias relacionadas con el metabolismo fúngico, que protegen las raíces del resto de los

habitantes del suelo, algunos potencialmente peligrosos para la planta y facilitan la supervivencia de aquellos que son beneficiosos (Duchesne et al. 1989).

Muchas veces, los viveros forestales emplean como substrato suelos de bosque o de áreas vecinas. Estos aportan esporas de hongos ectomicorrícicos, y fragmentos de raíces ectomicorrizadas, que actúan como inóculos de las nuevas plantas. En estos casos, la aparición de micorrizas suele ser errática y sin ningún control. Por otro lado, el empleo de suelos no esterilizados suele significar la aparición de enfermedades para las raíces. Estas suelen convertirse en plagas difíciles de erradicar, reduciendo notablemente el número de plantas del vivero (Duchesne et al. 1989). Y en el caso que se empleen substratos esterilizados, con ausencia absoluta de ectomicorrizas, deberá apoyarse a los árboles continuamente con fertilizantes (Marx 1991), lo cual trae consecuencias desfavorables para sus organismos beneficiosos asociados (e.g., hongos, bacterias).

Actualmente las herramientas biotecnológicas han permitido estudiar y seleccionar las especies fúngicas que proporcionen el máximo rendimiento a las plantas. A partir de nuestros resultados se propone inocular a las plántulas de *Nothofagus*, aquellas especies que guardan una relación evolutiva más fuerte en torno a los análisis del estudio, complementando esta información con futuras investigaciones que incluyan la mayor cantidad posible de hongos ectomicorrícicos en los análisis. Lo anterior básicamente con el fin de conservar las relaciones evolutivas que involucra la simbiosis, ya que de acuerdo a otros estudios (Barrett et al. 2010, Otero y Flanagan 2005, Rasmussen y Whigham 1998, Rasmussen y Rasmussen 2009, Tremblay et al. 2005, Waterman y Bidartondo 2008), la alta especificidad entre estos organismos supone probablemente una estrategia de supervivencia en el medio, donde la similitud de requerimientos ambientales ha permitido conservar la complementariedad funcional entre *Nothofagus* y *Austropaxillus* durante millones de años, contribuyendo a mantener los procesos de especiación constantes en relación a los cambios ambientales que experimentan sus hábitats.

Este estudio de cofilogenia entre hongos ectomicorrícicos y especies arbóreas de *Nothofagus* brinda información adicional sobre la especificidad de algunos hongos respecto al hospedero, destacando su fuerte relación con estudios ecológicos. Queremos resaltar, que a pesar de su gran utilidad, no hay manera simple de aplicar información cofilogenética en biología de la conservación, tal y como se muestra en los enfoques de este trabajo. Esta información también debe ser utilizada con pleno conocimiento de los supuestos e incertidumbres que subyacen en ella. Existe el peligro real de que con la creciente facilidad de obtener información cofilogenética, los profesionales de la conservación se olviden de que las cofilogenias son hipótesis a ser

probadas. Dicho esto, creemos realmente que ningún estudio ecológico puede dejar de beneficiarse de algún modo de la comprensión sobre las relaciones cofilogenéticas de los taxa asociados. Ecólogos y biólogos de la conservación, que utilizan este tipo de información deben seguir participando en una discusión que seguramente va a enriquecer y a priorizar su uso en las prácticas de conservación biológica.

6. CONCLUSIÓN

Debido a que *Nothofagus* estaba ampliamente extendida en el sur de Gondwana antes de la deriva de Australia, Nueva Zelanda y América del Sur, este refleja los acontecimientos más importantes que ocurrieron durante la formación de la biota actual de estas regiones, incluyendo una combinación de vicarianza y dispersión transoceánica a larga distancia. Este estudio demuestra cómo, a su vez, ha obligado a sus organismos asociados como *Austropaxillus* a seguir un patrón similar de cambios evolutivos. Esta información finalmente puede ser utilizada para resolver problemas taxonómicos, ecológicos y biogeográficos en torno a las especies asociadas, ofreciendo las claves para actuar objetivamente en la conservación de la simbiosis ectomicorrícica establecida entre ambos taxa.

7. REFERENCIAS

AGOSTA, S.J., JANZ, N., BROOKS, D.R. 2010. How specialists can be generalists: resolving the “Parasite paradox” and implications for emerging infectious disease. Zoologia 27(2): 151-162.

ALLEN, M.F. 1991. The Ecology of Mycorrhizae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

ALLEN, E.B., ALLEN, M.F. 1990. The mediation of competition by mycorrhizae in successional and patchy environments. In: Grace J.B., Tilman D., eds. Perspectives on plant competition. San Diego, California: Academic Press p: 367-389.

ALLWOOD, J., GLEESON, D., MAYER, G., DANIELS, S., BEGGS, J.R., BUCKLEY, T.R. 2010. Support for vicariant origins of the New Zealand *Onychophora***.** Journal of Biogeography 37(4): 669-681.

BARBOUR, M.G., BILLINGS, W.D. 2000. North American Terrestrial Vegetation. 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

BARRON, E.J. 1987. Cretaceous plate tectonic reconstructions. Palaeogeography, Palaeoclimatology, & Palaeoecology 59(1): 3-29.

BARROETAVEÑA, C., RAJCHENBERG, M. 2003. Las micorrizas y la producción de plántulas de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina. Bosque 24(1): 17-33.

BARROETAVEÑA, C., RAJCHENBERG, M., CÁZARES, M. 2005. Mycorrhizal fungi in *Pinus ponderosa* introduced in Central Patagonia (Argentina). Nova Hedwigia 80(3): 453-464.

BARRETT, C., FREUDENSTEIN, J.V., TAYLOR, L.D., KÕLJALG, U. 2010. Range wide analysis of fungal associations in the fully mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* complex (Orchidaceae) reveals extreme specificity on ectomycorrhizal *Tomentella* (Thelephoraceae) across North America. American Journal of Botany 97(4): 628-643.

BASSANI, V.N., BARROETAVEÑA, C., RAJCHENBERG, M. 2013. Spores of ectomycorrhizal fungi as inoculants for *Nothofagus pumilio* and exotic conifer seedlings in Patagonia, Argentina: their activity and conservation. New Forests 44(4): 471-485.

BENDING, G. D., READ, D.J. 1995. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. V. Foraging behavior and translocation of nutrients from exploited litter. New Phytologist 130(3): 401-409.

BERBEE, M.L., TAYLOR, J.W. 1993. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. Canadian Journal of Botany 71(8): 1114-1127.

BERBEE, M.L., TAYLOR, J.W., 2007. *Rhynia chert*: a window into a lost world of complex plant-fungus interactions. New Phytologist 174(3): 475-479.

BERBEE, M.L., TAYLOR, J.W. 2010. Dating the molecular clock in fungi-how close are we? Fungal Biology Reviews 24(1-2): 1-16.

BINDER, M., HIBBETT, D.S. 2002. Higher-level phylogenetic relationships of Homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. Molecular Phylogenetics and Evolution 22(6): 76-90.

BINDER, M., HIBBETT, D.S. 2006. Molecular systematics and biological diversification of Boletales. Mycologia 98(6): 971-981.

BINDER, M., LARSSON, K.H., MATHENY, P.B., AND HIBBETT, D.S. 2010. Amylocorticiales ord. nov. and Jaapiales ord. nov.: early divergin clades of agaricomycetidae dominated by corticioid forms. Mycologia 102 (4): 865-880.

BOUCHER, D. H. 1985. The Biology of Mutualism, Ecology, and Evolution. Oxford University Press, New York.

BREMER, B., BREMER, K., CHASE, M., FAY, M., REVEAL, J., SOLTIS, D., SOLTIS, P., STEVENS, P. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 161(2): 105-121.

BRESINSKY. A., JAROSCH, M., FISCHER, M., SCHÖNBERGER, I., WITTMANN-BRESINSKY, B. 1999. Phylogenetic relationships within *Paxillus* s.l. (Basidiomycetes, Boletales): Separation of a Southern Hemisphere Genus. Plant Biology 1(3): 327-333.

BROOKS, D.R., MCLENNAN, D.A. 2003. Extending phylogenetic studies of coevolution: secondary Brooks parsimony analysis, parasites, and the Great Apes. Cladistics 19(2): 104-119.

BRUNDIN, L. 1966. Transantarctic relationships and their significance, as evidenced by chironomid midges with a monograph of the subfamilies Podonominae and Aphroteniinae and the austral Heptagynae. K. Sven. Vetenskapsakad. Handl. 11(1): 1-472.

BRUNDRETT, M.C. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. In Begon, M., Fitter, A. H., & Macfadyen, A. (Eds.). Advances in Ecological Research 21(1): 171-313.

BRUNDRETT, M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytologist 154(2): 275-304.

BRUNDRETT, M.C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. Plant Soil 320(1-2): 37-77.

BUCKLEY, T. R., ARENSBURGER, C.P., SIMON, CHAMBERS, G. K. 2002. Combined data, Bayesian phylogenetics, and the origin of the New Zealand *Cicada* genera. Systematic Biology 51(1): 4-18.

BURLEIGH, J.G., HILU, K., SOLTIS, D. 2009. Inferring phylogenies with incomplete data sets: a 5-gene, 567-taxon analysis of angiosperms. BMC Evolutionary Biology 9:61.

CAIRNEY, J.W. 2000. Evolution of mycorrhiza systems. Naturwissenschaften 87(11): 467- 475.

CHENNA, R., SUGAWARA, H., KOIKE, T., LOPEZ, R., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G., THOMPSON, J.D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Research 31(13): 3497-3500.

CLAYTON, D.H., PRICE, R.D., PAGE, R.D.M. 1996. Revision of *Dennyus* (Collodennyus) lice (Phthiraptera: Menoponidae) from swift lets, with descriptions of new taxa and a comparison of host-parasite relationships. Systematic Entomology 21(3): 179-204.

CHEN, Y.L., BRUNDRETT, M.C., DELL, B. 2000. Effects of ectomycorrhizas and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone and in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. New Phytologist 146(3): 545-556.

COOK, L.G., CRISP, M.D. 2005. Not so ancient: the extant crown group of *Nothofagus* represents a post-Gondwanan radiation. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 272(1): 2535-2544.

COOPER, A., LALUEZA-FOX, C., ANDERSON, S., RAMBAUT, A., AUSTIN, J., WARD, R. 2001. Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. Nature 409(1): 704-707.

CRACRAFT, J. 1975. Historical biogeography and Earth history-perspectives for a future synthesis. Annals of the Missouri Botanical Garden 62(2): 227-250.

CRACRAFT, J. 2001. Avian evolution, Gondwana biogeography and the Cretaceous–Tertiary mass extinction event. Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences 268(1466): 459-469.

CRAME, J.A., FRANCIS, J.E., CANTRILL, D.J., PIRRIE, D. 2004. Maastrichtian stratigraphy of Antarctica. Cretaceous Research 25(3): 411-423.

CRISCI, J. V., CIGLIANO, M. M., MORRONE, J.J., ROIG-JUFENT, S. 1991. Historical biogeography of southern South America. Systematic Biology 40(2): 152-171.

CRISP, M., COOK, L., STEAN, D. 2004. Radiation of the Australian flora: what can comparisons of molecular phylogenies across multiple taxa tell us about the evolution of diversity in present-day communities? Philosophical Transactions: Biological Sciences 359(1450): 1551-1571.

CRISP, M.D., WEST, J.G., LINDER, H.P. 1999. Biogeography of the terrestrial flora. Introduction. (Eds A. E. Orchard & H. S. Thompson.) 2ª ed. CSIRO: Melbourne 1(2): 321-367.

CROUS, P.W., GAMS, W., STALPERS, J.A., ROBERT, V., STEGEHUIS, G. 2004. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. Studies in Mycology 50(1): 19-22.

DARLINGTON, P.J. 1965. Biogeography of the southern end of the world; distribution and history of far-southern life and land, with an assessment of continental drift. Cambridge, Massachusetts: Harvard Univ. Press p: 236.

DE QUEIROZ, A. 2005. The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. Trends in Ecology & Evolution 20(2): 68-73.

DEARNALEY, J. D. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. Mycorrhiza 17(6): 475-486.

DETTMANN, M.E., POCKNALL, D.T., ROMERO, E.J., ZAMALOA, M.C. 1990. *Nothofagidites* Erdtman and Potonié, 1960: a catalogue of species with notes on the paleogeographic distribution of *Nothofagus* Bl. (southern beech). New Zealand Geological Survey Paleontological Bulletin 60(1): 1-79.

DETTMANN, M.E., THOMSON, M.R.A. 1987. Cretaceous palynomorphs from the James Ross Island area, Antarctica - a pilot study. British Antarctic Survey Bulletin 77(1):13-59.

DE VIENNE, D. M., REFRÉGIER, G., LÓPEZ-VILLAVICENCIO, M., TELLIER, A., HOOD, M. E., GIRAUD, T. 2013. Cospeciation vs host-shift speciation: methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. New Phytologist 198(2): 347-385.

DING, T.Y. 1995. Origin, divergence and geographical distribution of Salicaceae. Acta Botanica Yunnanica 17(3): 277-290.

DRUMMOND, A.J., HO, S.Y.W., PHILLIPS, M.J., RAMBAUT, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biology 4(5): e88.

DRUMMOND A.J., RAMBAUT A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology 7:214.

DUCHESNE, L.C. ELLIS, B., PETERSON, R. L. 1989. Disease Suppressin by The Ectomycorrhizal Fungus *Paxillus involutus*: contribution of oxalic acid. Canadian Journal of Botany 67(9): 2726-2730.

EIZIRIK, E., MURPHY, W.J., O'BRIEN, S.J. 2001. Molecular dating and biogeography of the early placental mammal radiation. Journal of Heredity 92(2): 212–219.

EASTWOOD, D., FLOUDAS, D., BINDER, M., MAJCHERCZYK, A., SCHNEIDER, P., AERTS, A., ASIEGBU, F.O., BAKER, S.E., BARRY, K., BENDIKSBY, M., BLUMENTRITT, M., COUTINHO, P.M., CULLEN, D., DE VRIES, R.P., GATHMAN, A., GOODELL, B., HENRISSAT, B., IHMARK, K., KAUSERUD, H., KOHLER, A., LABUTTI, K., LAPIDUS, J.L., LEE, Y.H., LINDQUIST E, LILLY, W., LUCAS, S., MORIN, E., MURAT, C., OGUIZA, J.A., PARK, J., PISABARRO, A., RILEY, R., ROSLING, A., SALAMOV, A., SCHMIDT, O., SKREDE, I., STENLID, J., WIEBENGA, A., XIE, X., KÜES, U., HIBBET, D., HOFFMEISTER, D., HÖGBERG, N., MARTIN, F., GRIGORIEV, I., WATKINSON, S. 2011. The plant cell wall decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. Science 333 (6043): 762-765.

FINLAY, R. D., FROSTEGARD, A., SONNERFELDT, A. M. 1992. Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. Ex Loud. New Phytologist 120(1): 105-115.

FITTER, A.H. 1977. Influence of mycorrhizal infection on competition for phosphorus and potassium by two grasses. New Phytologist 79(1): 119-125.

FRANK, B.1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewiser Bäume durch unterirdishe Pilze. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 3(1): 128-145.

FRANK, B. 1887. Ueber neue Mycorhiza-Formen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 5(1): 395-409.

GAMUNDI, I., HORAK, E. 1995. Fungi of the Andean-Patagonian forests. Buenos Aires: Vazquez Mazzini Editores p: 82.

GANGE, A.C., BROWN, V.K., SINCLAIR, G.S. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: a determinant of plant community structure in early succession. Functional Ecology 7(5): 616-622.

GARRIDO, N. 1981. Contribución al conocimiento de los Agaricales (Mycota-Basidiomycetes) en plantaciones de *Pinus radiata* D. Don en la Octava Región de Chile. Tesis, Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Chile.

GARRIDO, N. 1985. Index *Agaricalium chilensis*. Biblioth. Mycologia 99, J. Cramer, 339 pp.

GARRIDO, N. 1988. Agaricales s.l. und ihre mykorrhizen in den *Nothofagus*-Wäldern mittelchiles. Biblioth. Mycologia 120, J. Cramer, 528 pp.

GARRIDO, N., BRESINSKY, A. 1985. "*Amanita merxmuelleri* (Agaricales), eine neue Artr aus *Nothofagus*-Wäldern Chiles". Botanische Jahrbücher fur Systematik 107: 521-540.

GERNHARD, T. 2008. The conditioned reconstructed process. Journal of Theoretical Biology 253: 769-778.

GERNHARD, M.L., TAYLOR, J.W. 2010. Dating the molecular clock in fungi-how close are we? Fungal Biology Reviews 24(1-2): 1-16.

GIRAUD, T., GLADIEUX, P., GAVRILETS, S. 2010. Linking emerging fungal plant diseases and ecological speciation. Trends in Ecology & Evolution 25(7): 387–395.

GONZÁLEZ, M.E., DONOSO, C., ESCOBAR, B. 1996. Effect of different conditioning regimes over the growth of 1-0 bare-rooted rauli (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl) Oerst.) plants. BOSQUE 17(1): 29-41

GRADSTEIN, F.M., OGG, J.G., SMITH, A.G., AGTERBERG, F.P., BLEEKER, W., COOPER, R.A., DAVYDOV, V., GIBBARD, P., HINNOV, L., HOUSE, M.R., LOURENS, L., LUTERBACHER, H.P., MCARTHUR, J., MELCHIN, M.J., ROBB, L.J., SHERGOLD, J., VILLENEUVE, M., WARDLAW, B.R., ALI, J., BRINKHUIS, H., HILGEN, F.J., HOOKER, J., HOWARTH, R.J., KNOLL, A.H., LASKAR, J., MONECHI, S., POWELL, J., PLUMB, K.A., RAFFI, I., R'OHL, U., SANFILIPPO, A., SCHMITZ, B., SHACKLETON, N.J., SHIELDS, G.A., STRAUSS, H., DAM, J.V., VEIZER, J., KOLFSCHOTEN, T.V., WILSON, D. 2004. A geologic time scale 2004. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

GRIME, J.P., MACKEY, J.M.L., HILLIER, S.H., READ, D.J. 1987. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. Nature 328: 420-422.

GRUBISHA, L. C., LEVSEN, N., OLSON, M. S., LEE TAYLOR, D. 2012. Intercontinental divergence in the *Populus*-associated ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma populinum*. The New Phytologist 194(2): 548-60.

HAFNER, M.S., NADLER, S.A. 1988. Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. Nature 332(6161): 258-259.

HAFNER, M.S., SUDMAN, P.D., VILLABLANCA, F.X., SPRADLING, T.A., DEMASTES, J.W., NADLER, S.A. 1994. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. Science 265(5175): 1087-1090.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

HALLING, R. 2001. Ectomycorrhizae: Co-Evolution, Significance, and Biogeography. Annals of the Missouri Botanical Garden 88(1): 5-13.

HALLING, R.E., OSMUNDSON, T.W., NEVES, M. 2008. Pacific boletes: Implications for biogeographic relationships. Mycological Research 112(4): 437-447.

HARTNETT, D.C., HETRICK, B.A.D., WILSON, G.W.T., GIBSON, D.J. 1993. Mycorrhizal influence of intra- and interspecific neighbor interactions among co-occurring prairie grasses. Journal of Ecology 81(1): 787-795.

HARTNETT, D.C., WILSON, G.W.T. 1999. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tall grass prairie. Ecology 80(4): 1187-1195.

HAWKSWORTH, D. L., KIRK, P. M., SUTTON, B. C., PEGLER, D. N. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th edn. CAB International, Wallingford.

HEENAN, P. B., SMISSEN, R.D. 2013. Revised circumscription of *Nothofagus* and recognition of the segregate genera *Fuscospora, Lophozonia*, and *Trisyngyne* (Nothofagaceae). Phytotaxa 146 (1): 1-31.

HIBBETT, D. 2001. Shiitake mushrooms and molecular clocks: historical biogeography of Lentinula. Journal of Biogeography 28(1): 231-241.

HIBBETT, D. 2006. A Phylogenetic overview of the Agaricomycotina. Mycologia 98(6): 917-925.

HIBBETT, D.S. 2007. After the gold rush, or before the flood? Evolutionary morphology of mushroom-forming fungi (Agaricomycetes) in the early 21st century. Mycological Research 111(9): 1001-1018.

HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON T., THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22(22): 4673-4680.

HILL, R.S. 2001. Biogeography, evolution and palaeoecology of *Nothofagus* (Nothofagaceae): the contribution of the fossil record. Australian Journal of Botany 49(3): 321–332.

HILL, R.S., DETTMANN, M.E. 1996. Origin and Diversification of the Genus *Nothofagus* in: Veblen T.T., Hill, R.S., Read, J. (Eds.). The Ecology and Biogeography of *Nothofagus* Forests, p: 11-24.

HILL, R. S., JORDAN, G.J. 1993. The evolutionary history of *Nothofagus* (Nothofagaceae). Australian Systematic Botany 6(2): 111-126.

HILL, R.S., READ, J. 1991. A revised infrageneric classification of *Nothofagus* (Fagaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 105(1): 37-72.

HILL, R.S., TRUSWELL, E.M., MCLOUGHLIN, S., DETTMANN, M.E. 1999. Evolution of the Australian flora. Fossil Evidence. In: Orchard, E.A, Thompson, H.S., eds. Flora of Australia, Vol. 1 Introduction, 2nd edn. Melbourne, Australia: CSIRO/ABRS 1(2): 105-124.

HONRUBIA, M. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. Anales del Jardín Botánico de Madrid 66(1): 133-144.

HORAK, E. 1979. Fungi Basidiomycetes. Agaricales y Gasteromycetes Secotioides. In Guarrera S. A., Gamundi de Amos I. y Rabinovich de Halperin D. (eds.). Flora criptogámica de Tierra del Fuego. CONICET-FECIC. Buenos Aires. p: 528.

HORAK, E. 1980. Flora criptogámica de Tierra del Fuego. Orden Agaricales. Tomo 11(6): 1-524. Ed. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura, Buenos Aires, Argentina p: 524.

HOSAKA, K., CASTELLANO, M.A., SPATAFORA, J.W. 2008. Biogeography of Hysterangiales (Phallomycetidae, Basidiomycota). Mycological Research 112(4): 448-462.

HUCKFELDT, T., DILL, I., STEEGHS-ALCER, K., SCHMIDT, O. 2011. Morphological and molecular characterization of the indoor wood-decay fungus *Leucogyrophana pulverulenta*.

Hamburg University, IWood Biology, Leuschnerstrasse 91D, D - 21031 Hamburg, Germany. Z. Mykol 77(1): 45-60.

HUMPHRIES, C. J. 1981. Biogeographical methods and the southern beeches (Fagaceae: *Nothofagus*). In Funk, V. A. Brooks, D. R. [eds.], Advances in cladistics: Proceedings of the first meeting of the Hennigian Societ 1: 177-207. New York Botanical Garden, Bronx, NY.

HUMPHRIES, C.J. PARENTI, L.R. 1999. Cladistic biogeography. Interpreting patterns of plant and animal distribution. Oxford.

ILLYÉS, Z., HALÁSZ, K., RUDNÓY, S., OUANPHANIVANH, N., GARAY, T., BRATEK, Z. 2010. Changes in the diversity of the mycorrhizal fungi of orchids as a function of the water supply of the habitat. Journal of Applied Botany and Food Quality 83(1): 28-36

JAROSCH, M. 2001. Zur Molekularen Systematik der Boletales: Coniophorineae, Paxillineae und Suillineae. Berlin-Stuttgart: J. Cramer: p: 191.

JASPER, D.A. 1994. Bioremediation of agricultural and forestry soils with symbiotic microorganisms. Australian Journal of Soil Research 32(6): 1301-1319.

JOHNSON, N.C. 1998. Responses of *Salsola kali* and *Panicum virgatum* to mycorrhizal fungi, phosphorus and soil organic matter: implications for reclamation. Journal of Applied Ecology 35(1): 86-94.

JORDAN, G.J., HILL, R.S. 1999. The phylogenetic affinities of *Nothofagus* (Nothofagaceae) leaf fossils based on combined molecular and morphological data. International Journal of Plant Sciences 160(6): 1177-1188.

KAUSERUD, H., STENSRUD, O., DECOCK, C., SHALCHIAN-TABRIZI, K., SCHUMACHER, T. 2006. Multiple gene genealogies and AFLPs suggest cryptic speciation and long-distance dispersal in the basidiomycete *Serpula himantioides* (Boletales. Kauserud H., Biology, University of Oslo, P.O. Box 1066, Blindern, N-0316 Oslo, NORWAY. Molecular Ecology 15 (2):421-431.

KLASSEN, G.J. 1992. Coevolution: a history of the macroevolutionary approach to studying host-parasite association. The Journal of Parasitology 78(4): 573-587.

KLIKS, M.M. 1990. Helminths as heirlooms and souvenirs: a review of new world paleoparasitology. Parasitology Today 6(4): 93-100.

KNAPP, M., STOCKLER, K., HAVELL, D., DELSUC, F., SEBASTIANI, F., LOCKHART, P.J. 2005. Relaxed molecular clock provides evidence for long-distance dispersal of *Nothofagus* (southern beech). PLoS Biology 3(1): 38-43.

LACLAU, P. 1997. Los Ecosistemas Forestales y el Hombre en el Sur de Chile y Argentina. Fundación Vida Silvestre Argentina, Boletín Técnico Nº 34.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23(21): 2947-2948.

LEGENDRE, P., DESDEVIES, Y., BAZIN, E. 2002. A statistical test for host-parasite coevolution. Systematic Biology 51(2): 217-234.

LI, J.Q. 1996. The origin and distribution of the family Fagaceae. Acta Phytotaxonomica Sinica 34(4): 376-396.

LINDAHL, B.O., TAYLOR, A.F.S., FINLAY, R.D. 2002. Defining nutritional constraints on carbon cycling in boreal forests–towards a less phytocentric perspective. Plant & Soil 242(1): 123-135.

LINDER, H. P., CRISP, M. D. 1995. *Nothofagus* and Pacific biogeography. Cladistics 11(1): 5-32.

LINNEMANN, G. 1971. Ergänzugen zur Zycha & Siepman, Mucorales. Nova Hedwigia 19(1): 565-566.

LUMBSCH, T.H., BUCHANAN, P.K., MAY, T.W., MUELLER, G.M. 2008. Phylogeography and biogeography of fungi. Mycological Research 112(4): 423-424.

MALLOCH, D.W., PIROZYNSKI, K.A., RAVEN, P.H. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77(4): 2113-2118.

MANOS, P. 1997. Systematics of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on rDNA Spacer Sequences (ITS): Taxonomic Congruence with Morphology and Plastid Sequences. American Journal of Botany 84(8): 1137-1155.

MARTIN, F., DÍEZ, J., DELL, B., DELARUELLE, C. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. New Phytologist 153(2): 345-357.

MARTIN, P.G., DOWD, J.M. 1993. Using sequences of rbcL to study phylogeny and biogeography of *Nothofagus* species. Australian Systematic Botany 6(5): 441-447.

MARX, D.H. 1991. Production of Ectomycorrhizal Fungus Inoculum. Methods and Principles of Mycorrhizal Research. University of Florida. USA

MAURICE, S. 2011. French population of *Serpula lacrymans.* Laboratoire Universitaire de Biodiversite et Ecologie Microbienne, Universite Europeenne de Bretagne, Technopole Brest Iroise, Plouzane 29280, France.

MEIER-KOLTHOFF, J.P., AUCH, A.F., HUSON, D.H., GÖKER, M. 2007. COPYCAT: co-phylogenetic analysis tool. Bioinformatics 23(8): 898-900.

MEFFE, G.K., CARROLL, C.R. 1994. Principles of conservation biology. Sinauer, Sunderland.

MCLOUGHLIN, S. 2001. The breakup history of Gondwana and its impact on pre-Cenozoic floristic provincialism. Australian Journal of Botany 49(3): 271-300.

MILLER, O. K. 1983. Ectomycorrhizae in the Agaricales and gasteromycetes. Canadian Journal of Botany 61(3): 909-916.

MILLER, R.M., JASTROW, J.D. 1992. The application of VA mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In: Allen MF, ed. Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process. New York: Chapman and Hall p: 438-467.

MOLINA, R., MASSICOTTE, H., TRAPPE, J. M. 1992. Specificity phenomema in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In Mycorrhizal Functioning: an Integrated Plant-Fungal Process (M. F. Allen, ed.): 357-423. Chapman & Hall, London.

MONCALVO, J.M., BUCHANAN, P.K. 2008. Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). Mycological Research 112(4): 425-436.

MOORE, M.J., SOLTIS, P.S., BELL, C.D., BURLEIGH, J.G., SOLTIS, D.E. 2010. Phylogenetic analysis of 83 plastid genes further resolves the early diversification of eudicots. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(10): 4623-4628.

MOREIRA, A. 2004. *Nothofagus* Bl., pieza clave en la reconstrucción de la biogeografía del hemisferio austral. Revista Jardín Botánico Chagual 2(1): 48-56.

MORLON, H., POTTS, M.D., PLOTKIN, J. B. 2010. Inferring the dynamics of diversification: a coalescent approach. PLoS Biology 8: 9.

MORRONE, J.J., CRISCI, V. 1995. Historical biogeography: Introduction to methods. Annual Review of Ecology and Systematics 26(1): 373-401.

NAN, L. 1995. Studies on the geographic distribution, origin and dispersal of the family Pinaceae Lindl. Acta Phytotaxonomica Sinica 32(2): 105-130.

NEWMAN, E. I., REDDELL, P. 1987. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. New Phytologist 106(1): 745-751.

NOYD, R.K., PFLEGER, F.L., NORLAND, M.R., SADOWSKY, M.J. 1995. Native prairie grasses and microbial community responses to reclamation of taconite iron ore tailing. Canadian Journal of Botany 73(10): 1645-1654.

NOYD, R.K., PFLEGER, F.L., NORLAND, M.R., SADOWSKY, M.J. 1996. Field responses to added organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi and fertilizer in reclamation of taconite iron ore tailing. Plant & Soil 179(1): 89-97.

NYLANDER, J. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

O'DONNELL, K., ROONEY, A.P., MILLS, G.L., KUO, M., WEBER, N.S. 2011. Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincalism in the Holarctic. Fungal Genetics & Biology 48(3): 252-265.

OTERO, J. T., FLANAGAN N. S. 2005. Orchid diversity: Beyond deception. Trends in Ecology & Evolution 21(2): 64-65.

PAGE, R.D.M. 1990. Temporal congruence and cladistic analysis of biogeography and cospeciation. Systematic Biology 39(3): 205–226.

PAGE, R. D. M. 1994. Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms, and areas. Systematic Biology 43(1): 58-77.

PAGE, R.D.M. 1996. Temporal congruence revisited: comparison of mitochondrial DNA sequence divergence in cospeciating pocket gophers and their chewing lice. Systematic Biology 45(2): 151-167.

PARRENT, J.L., GARBELOTTO, M., GILBERT, G.S. 2004. Population genetic structure of the polypore *Datronia caperata* in fragmented mangrove forests. Mycological Research 108(4): 403-410.

PATERSON, A.M., BANKS, J.C. 2001. Analytical approaches to measuring cospeciation of host and parasites: through a glass darkly. International Journal for Parasitology 31(9): 1012-1022.

PEAY, K.G., BIDARTONDO, M.I., ARNOLD, A.E. 2010. Not every fungus is everywhere: scaling to the biogeography of fungal-plant interactions across roots, shoots and ecosystems. New Phytologist 185(4): 878-882.

PERA, J., PARLADÉ, J. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. Inves Agrar: Sist Recur For 14(3): 419-433.

PETERSON, K., PFISTER, D., BELL, C. 2010. Cophylogeny and biogeography of the fungal parasite *Cyttaria* and its host *Nothofagus*, southern beech. Mycologia 102(6): 1417-1425.

PIGRAM, C. J., DAVIES, H.L. 1987. Terranes and the accretion history of the New Guinean orogen. Bur. Miner. Resour. J. Aust. Geol. Geophys. 10(6): 193-211.

PIROZYNSKI, K.A. 1980. Interactions between fungi and plants through the ages. Canadian Journal of Botany 59(10): 1824-1827.

PIROZYNSKI, K.A., MALLOCH, D.W. 1975. The origin of land plants: amatter of mycotrophism. Biosystems 6(3): 153-164.

POLE, M. 1994. The New Zealand flora–Entirely long-distance dispersal? Journal of Biogeography 21(6): 625-635.

POLE, M. 2001. Can long-distance dispersal be inferred from the New Zealand plant fossil record? Australian Journal of Botany 49(3): 357-366.

POSADA, D., CRANDALL, K. A. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14(9): 817-818.

POSADA, D., CRANDALL, K.A. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. Systematic Biology 50(4): 580-601.

POULIN, R., MORAND, S. 2004. Parasite biodiversity. Washington, USA: Smithsonian Institution Scholarly Press.

QIU, Y., DOMBROVSKA, O., LEE, J., LI, L., WHITLOCK, B., BERNASCONI-QUADRONI, F., REST, J., SOLTIS, D.E., DAVIS, C., SAVOLAINEN, V., CANNONE, J.J., CHATROU, L.W., ZANIS, M.J., GUTELL, R.R., POWELL, M., SOLTIS, P.S., BORSCH, T., HILU, K.W., RENNER, S.S., CHASE, M.W. 2005. Phylogenetic analyses of basal angiosperms based on nine plastid, mitochondrial, and nuclear genes. International Journal of Plant Sciences 166(5): 815-842.

RABOSKY, D.L. 2009. Ecological limits and diversification rate: alternative paradigms to explain the variation in species richness among clades and regions. Ecology Letters 12(8): 735-743.

RAMBAUT, A. 2008. FigTree: tree figure drawing tool, version 1.4.0. http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/.

RASMUSSEN, H.N., WHIGHAM, D.F. 1998. The underground phase: A special challenge in studies of terrestrial orchid populations. Botanical Journal of the Linnean Society 126(1): 49-64.

RASMUSSEN, H.N., RASMUSSEN, F.N. 2009. Orchid mycorrhiza: Implications of a mycophagous life style. Oikos 118(3): 334-345.

RAVEN, P.H., AXELROD, D.I. 1972. Plate tectonics and Australasian paleobiogeography. Science 176(1): 1379-1386.

READ, D., LEAKE, J., PEREZ-MORENO, J. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. Canadian Journal of Botany 82(8): 1243-1263.

REDECKER, D., KODNER, R., GRAHAM, L.E. 2000. *Glomean* Fungi from the Ordovician. Science 289 (5486): 1920-1921.

REMY, W., TAYLOR, T.N., HASS, H., KERP, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91(25): 11841-11843.

RINALDI, A.C., COMADINI, O., KUYPER, T.W. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. Fungal Diversity 33(1): 1-45.

ROBERT, V., STEGEHUIS, G., AND STALPERS, J. 2005. The MycoBank engine and related databases. http://www.mycobank.org.

RODRÍGUEZ, F., OLIVER, J.F., MARTÍN, A., MEDINA, J.R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. Journal of Theoretical Biology 142(4): 485-501.

RONQUIST, F. 2003. Parsimony analysis of coevolving species associations. In: Tangled Trees. Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution (R. D. M. Page, ed.), p: 22-64. The University of Chicago Press, Chicago.

RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19(12): 1572-1574.

ROY, B.A. 2001. Patterns of association between crucifers and their flower-mimic pathogens: host-jumps are more common than coevolution or cospeciation. Evolution 55(1): 41-53.

SANMARTÍN, I., ENGHOFF, H., RONQUIST, F. 2001. Patterns of animal dispersal, vicariance and diversification in the Holarctic. Biological Journal of the Linnean Society 73(4): 345-390.

SANMARTÍN, I., RONQUIST, F. 2004. Southern Hemisphere Biogeography Inferred by Event-Based Models: Plant versus Animal Patterns. Systematic Biology 53(2): 216-243.

SANMARTÍN, I., WANNTORP, L., WINKWORTH, R.C. 2007. West wind drift revisited: testing for directional dispersal in the southern hemisphere using event-based tree fitting. Journal of Biogeography 34(3): 398-416.

SAUQUET, H., HO, S., GANDOLFO, M., JORDAN, G., WILF, P., CANTRILL, D., BAYLY, M., BROMHAM, L., BROWN, K., CARPENTER, R., LEE, D., MURPHY, D., SNIDERMAN, K., UDOVICIC, F. 2012. Testing the Impact of Calibration on Molecular Divergence Times Using a Fossil-Rich Group: The Case of *Nothofagus* (Fagales). Systematic Biology 61(2): 289-313.

SEBERG, O. 1991. Biogeographic congruence in the South Pacific. Australian Systematic Botany 4(1): 127-136.

SELOSSE, M.A. 2005. Are liverworts imitating mycorrhizas? New Phytologist 165(2): 345-349.

SELOSSE, M.A., LE TACON, F. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership. Tree 13(1): 15-20.

SETOGUCHI, H., ONO, M., DOI, Y., KOYAMA, H., TSUDA, M. 1997. Molecular phylogeny of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on the atpB-rbcL intergenic spacer of the chloroplast DNA. Journal of Plant Research 110(8): 469-484.

SINGER, R. 1964. "Boletes and related groups in South America (Monographs of South American Basidiomycetes, especially those of the East slope of the Andes and Brazil. VI. strobilomycetaceae)", Nova Hedwigia 7(1): 93-132.

SKREDE, I., ENGH, I.B., BINDER, M., CARLSEN, T., KAUSERUD, H., BENDIKSBY, M. 2011. Evolutionary history of Serpulaceae (Basidiomycota): molecular phylogeny, historical biogeography and evidence for a single transition of nutritional mode. BMC Evolutionary Biology 11: 230.

SMITH, M.R., CHARVAT, I., JACOBSON, R.L. 1998. Arbuscular mycorrhizae promote establishment of prairie species in a tall grass prairie restoration. Canadian Journal of Botany 76(11): 1947-1954.

SMITH, C.I., GODSOE, W.K.W., TANK, S., YODER, J.B., PELLMYR, O. 2008. Distinguishing coevolution from covicariance in anobligate pollination mutualism: asynchronous divergence in Joshua tree and its pollinators. Evolution 62(10): 2676-2687.

SMITH, S.E., READ, D.J. 1997. Mycorrhizal Symbioses. 2nd edn. Academic Press, London.

SMITH, S.E., READ, D.J. 2009. Mycorrhizal Symbioses. 3rd edn. Academic Press, Cambridge.

SOLTIS, D.E., GITZENDANNER, M.A., SOLTIS, P.S. 2007. A 567-taxon data set for angiosperms: the challenges posed by Bayesian analyses of large data sets. International Journal of Plant Sciences 168(2): 137-157.

STEENIS, C.G. 1971. *Nothofagus*, key genus of plant geography, in time and space, living and fossil, ecology and phylogeny. Blumea 19(1): 65-98.

SWENSON, U., HILL, R. S., MCLOUGHLIN, S. 2001. Biogeography of *Nothofagus* supports the sequence of Gondwana break-up. Taxon 50(4): 1-17.

TANAI, T. 1986. Phytogeographic and phylogenetic history of the genus *Nothofagus* Bl. (Fagaceae) in the southern Hemisphere. Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University 21(4): 505-582.

TEASDALE, S.E., BEULKE, A.K., GUY, P.L., ORLOVICH, D.A. 2013. Environmental barcoding of the ectomycorrhizal fungus *Cortinarius*. Fungal Diversity 58(1): 299-310.

TEDERSOO, L., GATES, G., DUNK, C., LEBEL, T., MAY, T., KÕLJALG, U., JAIRUS, T. 2009. Establishment of ectomycorrhizal fungal community on isolated *Nothofagus cunninghamii* seedlings regenerating on dead wood in Australian wet temperate forests: does fruit-body type matter? Mycorrhiza 19(6): 403-416.

TEDERSOO. L., KÕLJALG. U., HALLENBERG. N., LARSSON, K.H. 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. New Phytology 159(1): 153-165.

TEDERSOO, L., MAY, T., SMITH, M. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. Mycorrhiza 20(4): 217-263.

TEDERSOO, L., SUVI, T., JAIRUS, T., KÕLJALG, U. 2008. Forest microsite effects on community composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Picea abies* and *Betula pendula*. Environmental Microbiology 10(3): 1189-201.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25(24): 4876-4882.

TAYLOR, T.N., KLAVINS, S.D., KRINGS, M., TAYLOR, E.I., KERP, H., HASS, H. 2004. Fungi from the *Rhynia chert*: a view from the dark side. Transactions of the Royal Society of Edimburgh Earth Sciences 94(66): 457-473.

TAYLOR, T.N., REMY, W., HASS, H., KERP, H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. Mycologia 87(4): 560-573.

TAYLOR, J.W., TURNER, E., TOWNSEND, J.P., DETTMAN, J.R., JACOBSON, D. 2006. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limitation of species: examples from the kingdom fungi. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 361(1475): 1947-1963.

TRAPPE, J.M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Botanical Review 28(4): 538-606.

TREMBLAY, R. L., ACKERMAN, J. D., ZIMMERMAN, J. K., CALVO, R. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: A spasmodic journey to diversification. Biological Journal of the Linnean Society 84(1): 1-54.

UPCHURCH, P. 2008. Gondwanan break-up: legacies of a lost world? Trends in Ecology & Evolution 23(4): 229-236.

VALENZUELA, E. 1993. Estudio sistemático, corológico y ecológico de los Agaricales Sensu Lato de los bosques autóctonos de la Región de los Lagos en Chile. PhD Thesis, Universidad de Alcalá de Henares, Facultad de Ciencias, Spain.

VALENZUELA, E., G. MORENO, S. GARNICA. C. RAMÍREZ 1998. Micosociología en bosques nativos de *Nothofagus* y plantaciones de *Pinus radiata* en la X Región de Chile: diversidad y rol ecológico. Revista Chilena de Historia Natural 71(1): 133-146.

VAN STEENIS, C.G.G.J. 1971. *Nothofagus*, key genus of plant geography, in time and space, living and fossil, ecology and phylogeny. Blumea 19(1): 5-98.

VEBLEN, T.T., KITZBERGER, T., RAFFAELE, E., LORENZ, D.C. 2003. Fire history and vegetation changes in Northern Patagonia, Argentina. In: Veblen TT, Baker WL, Montenegro G, Swetnam TW (eds) Fire regimes and climatic change in temperate ecosystems of the Western Americas. Springer, Berlin, p: 259-289.

WANG, H., MOORE, M.J., SOLTIS, P.S., BELL, C.D., BROCKINGTON, S.F., ALEXANDRE, R., DAVIS, C.C., LATVIS, M., MANCHESTER, S.R., SOLTIS, D.E. 2009. Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(10): 3853-3858.

WANG, B., QIU, Y.L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza 16(5): 299-363.

WATERMAN, R. J., BIDARTONDO, M. I. 2008. Deception above, deception below: Linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. Journal of Experimental Botany 59(5): 1085-1096.

WHITE, J.A., TALLAKSEN, J., CHARVAT, I. 2008.The effects of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation at a roadside prairie restoration site. Mycologia 100(1): 6-11.

WILEY, E.O. 1988. Vicariance biogeography. Annual Review of Ecology and Systematics 19(1): 513-542.

WILKINS, D.A. 1991. The influence of sheathing (ecto-) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. Agriculture, Ecosystem & Environment 35(2-3): 245-260.

WINKWORTH, R.C., WAGSTAFF, S.J., GLENNY, D., LOCKHART, P.J. 2002. Plant dispersal NEWS from New Zealand. Trends in Ecology & Evolution 17(11): 514-520.

YANG, Z., GOLDMAN, N., FRIDAY, A. 1994. Comparison of models for nucleotide substitution used in maximum-likelihood phylogenetic estimation. Molecular Biology & Evolution 11(2): 316-324.

YULE, G. 1925. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J.C. Willis. Philosophical Transactions of the Royal Society of London: B Biological Sciences 213(1): 21-87.

8. APÉNDICES

Apéndice 1. Números de accesos a la información molecular (GenBank) para todas las secuencias usadas en la Filogenia de *Nothofagus*

Familia	Género/Subgénero	Especies	Región	*atpB*	*rbcL*	*atpB-rbcL*	*trnL* intron	*trnL-trnF*	ITS
Fagaceae									
		Fagus grandifolia		AY147105	AY935745	AY853782	AB066497	AY935784	AY232919
Nothofagaceae									
	Nothofagus/ Trisyngyne								
		Nothofagus aequilateralis	Nueva Caledonia		AF015686	AF015686			U96864
		Nothofagus balansae	Nueva Caledonia		L13344	AF015690			U96863
		Nothofagus baumanniae	Nueva Caledonia		AF015691	AF015691			
		Nothofagus brassii	Nueva Guinea		L13346				U96860
		Nothofagus carrii	Nueva Guinea		AF015693	AF015693			
		Nothofagus codonandra	Nueva Caledonia		L13347	AF015695			
		Nothofagus discoidea	Nueva Caledonia		L13349	AF015697			
		Nothofagus grandis	Nueva Guinea		L13353	AF015701			U96859
		Nothofagus perryi	Nueva Guinea		L13359				U96861
		Nothofagus resinosa	Nueva Guinea		L13361				U96862
	Nothofagus/Fuscospora								
		Nothofagus alessandri	Sudamérica	AY605509	AY605489	AF015687	AY605499	AY605519	U96854
		Nothofagus cliffortioides	Nueva Zelanda		AF015694	AF015694			
		Nothofagus fusca	Nueva Zelanda	AY605511	AY605491	AF015699	AY605501	AY605521	U96857
		Nothofagus gunnii	Australia	AY605513	AY605493	AF015702	AY605503	AY605523	U96855
		Nothofagus solandri	Nueva Zelanda	AY605517	AY605497	AF015708	AY605507	AY605527	U96856
		Nothofagus truncata	Nueva Zelanda	AY605510	AY605498	AF015709	AY605500	AY605520	U96858
	Nothofagus/Lophozonia								
		Nothofagus alpina	Sudamérica		L13342	AF015688			U96865
		Nothofagus cunninghamii	Australia	AY605518	AY605490	AF015696	AY605528	AY605528	U96868
		Nothofagus glauca	Sudamérica	AY605512	AY605492	AF015700	AY605502	AY605522	U96866
		Nothofagus menziesii	Nueva Zelanda	AY605514	AY605494	AF015703	AY605504	AY605524	U96869
		Nothofagus moorei	Australia	AY605515	AY605495	AF015704	AY605505	AY605525	U96870
		Nothofagus obliqua	Sudamérica	AY605516	AY605496	AF015706	AY605506	AY605526	U96867
	Nothofagus/Nothofagus								
		Nothofagus antarctica	Sudamérica	AY147106	AY263939	AF015689	AY147091	AY147091	U96849
		Nothofagus betuloides	Sudamérica		L13345	AF015692			U96852
		Nothofagus dombeyi	Sudamérica		L13350	AF015698			U96853
		Nothofagus nitida	Sudamérica	AY745880	AY745881	AF015705	AY745879	AY745882	U96850
		Nothofagus pumilio	Sudamérica		L13360	AF015707			U96851

Apéndice 2. Números de accesos a la información molecular (GenBank) para todas las secuencias usadas en la Filogenia de *Austropaxillus*

Familia	Especies	Región	5.8S	nuc-LSU	nuc-SSU	*rpb2*	*tef1*
Serpulaceae							
	Austropaxillus infundibuliformis	Australia	DQ534572	DQ534670	DQ534673	—	—
	Austropaxillus macnabbii	Nueva Zelanda	HM135656	HM135706	HM135787	—	HM135557
	Austropaxillus squarrosus	Nueva Zelanda	HM135657	HM135707	HM135788	—	HM135558
	Austropaxillus muelleri	Australia	HM135658	HM135708	—	—	HM135559
	Austropaxillus statuum	Sudamérica	HM135659	HM135709	HM135789	HM135764	HM135560
	Austropaxillus boletinoides	Sudamérica	HM135660	HM135710	—	HM135765	HM135561
	Boletus edulis	Alemania	AY680988	AF456816	DQ534675	GU187774	GU187682
	Bondarcevomyces taxi	China	DQ534575	DQ534672	DQ534677	—	GU187683
	Gautieria otthii	Canadá	AF377073	AF336249	AF393043	AY218486	AY883434
	Serpula lacrymans	Países Bajos	GU187542	GU187596	GU187649	GU187809	GU187752
	Serpula himantioides	Bélgica	GU187545	GU187600	GU187651	GU187808	GU187748
	Serpula himantioides	Estados Unidos	GU187547	GU187602	GU187654	GU187811	GU187750
	Serpula incrassata	Canadá	GU187541	GU187595	GU187652	—	GU187751
	Serpula similis	África	GU187546	GU187601	GU187653	GU187812	GU187724
	Serpula pulverulenta	Dinamarca	GU187543	GU187597	GU187650	—	GU187753
	Suillus bresadolae	Alemania	GU187544	GU187598	GU187648	GU187810	GU187746
	Suillus pictus	Estados Unidos	AY854069	AY684154	AY662659	AY786066	AY883429
	Tapinella atrotomentosa	Estados Unidos	GU187549	GU187603	GU187655	GU187813	GU187757
	Tapinella panuoides	Estados Unidos	GU187548	GU187604	GU187657	—	—

Apéndice 3. Análisis basado en la distancia filogenética de la cofilogenia entre *Austropaxillus* y *Nothofagus* (ParaFit)

Simbionte	Huésped	*P* value
A. boletinoides	N. alpina	0.00005
A. boletinoides	*N. antarctica*	0.00005
A. boletinoides	*N. dombeyi*	0.00004
A. boletinoides	*N. glauca*	0.00005
A. boletinoides	*N. pumilio*	0.00005
A. boletinoides	*N.obliqua*	0.00004
A. boletinoides	*N. nitida*	0.00004
A. boletinoides	*N. betuloides*	0.00002
A, statuum	*N. antarctica*	0.00002
A, statuum	*N. dombeyi*	0.00002
A, statuum	*N. pumilio*	0.00002
A, statuum	*N. nitida*	0.00002
A, statuum	*N. betuloides*	0.00002
A. infundibuliformis	*N. cunninghamii*	0.00005
A. macnabbii	*N. menziesii*	0.00004
A. muelleri	*N. moorei*	0.00003
A. squarrosus	*N. menziesii*	0.00003
Global Test	***P* =**	**3.4706E-05**