

UCH-FC
MAG-B
R 741
C. 1

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DIVERSIDAD DE UNA COMUNIDAD
FÚNGICA EXPERIMENTAL SOBRE EL ÉXITO DE UN INVASOR Y DE LAS
CONSECUENCIAS DEL INVASOR SOBRE LAS ESTRUCTURAS
GENÉTICAS Y METABÓLICAS DE LA COMUNIDAD RECEPTORA”**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Facultad de Ciencias

Por

ENRIQUE IGNACIO ROJAS GONZÁLEZ

ENERO, 2016

Directores de Tesis:
DRA. MARGARITA CARÚ
DRA. JULIETA ORLANDO



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias
que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

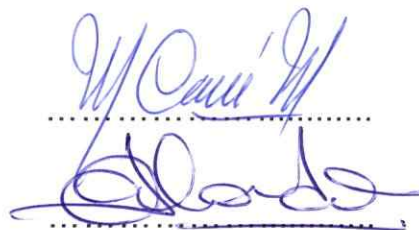
ENRIQUE IGNACIO ROJAS GONZÁLEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como
requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en
el examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de Enero de 2016

Directores de Tesis:

Dr. Margarita Carú

Dra. Julieta Orlando



Two handwritten signatures in blue ink, one above the other, each on a dotted line. The top signature is 'M. Carú' and the bottom one is 'J. Orlando'.

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Francisco Chávez

Dr. Marcelo Baeza



Two handwritten signatures in blue ink, one above the other, each on a dotted line. The top signature is 'F. Chávez' and the bottom one is 'M. Baeza'.

Dedicado a mi familia por todo su apoyo en este largo camino.....

RESUMEN BIOGRÁFICO



Mi nombre es Enrique Ignacio Rojas González, nacido en la comuna de San Miguel de Santiago en Marzo de 1987, aunque mi infancia la realicé en varios lugares, siempre estuve muy apegado a mi familia que siempre me ha brindado todo su apoyo y cariño.

Mis estudios de básica los realicé en una humilde escuela de San Miguel, para luego realizar la enseñanza media en mi querido Liceo Manuel Barros Borgoño de Santiago, donde no solo me formé académicamente, sino que también adquirí nuevas experiencias y valores que me fueron formando en mi futuro.

Posteriormente ingresé a estudiar Licenciatura en Biología en la Universidad de Chile el año 2006, para luego cambiarme a estudiar Ingeniería en Biotecnología molecular en el año 2009. En el duro camino universitario me forme en el área de las ciencias donde aprendí de los mejores maestros, y donde también pude conocer a grandes amigos con los que aún paso muy buenos momentos.

Mi tesis de pregrado y la presente tesis de Magister las desarrollé en el laboratorio de Ecología Microbiana, donde siempre conté con el apoyo de mis tutoras Margarita Carú y Julieta Orlando, y en el que pude desarrollarme en mi área de interés que era la microbiología y donde también tuve la oportunidad de conocer y compartir con grandes personas.

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos van dedicados a todas las personas que de alguna u otra forma fueron parte de este proceso, que comenzó desde mis primeros años en la educación básica hasta este momento en el que termino mi postgrado. Quiero comenzar agradeciendo a mi familia por ser mi principal soporte, apoyándome siempre en los momentos más difíciles. Sin ellos nunca hubiera llegado hasta este punto. También quiero agradecer a la "profe" Margarita Carú por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar mi tesis de pregrado y de magister, y por la confianza que me entregó para mi desarrollo académico. Además agradezco mucho a Julieta por todo el tiempo que dedicó con el desarrollo de mi tesis, apoyándome en todo momento cuando más lo necesitaba. También le doy gracias a todos los integrantes del laboratorio de Ecología Microbiana con los que compartí muy lindos cuatro años, partiendo por la Juanita que siempre me ayudó en todo, y a mis actuales y antiguos compañeros con los que pasé muy buenos momentos y que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, y a los que siempre los recordaré en mi nuevo camino.

Esta tesis de Magister fue realizada gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT 1120508.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Invasiones biológicas	1
1.2. Invasiones microbianas	5
1.3. Comunidades fúngicas experimentales	7
1.4. <i>Trichoderma cf. harzianum</i> como modelo de invasor biológico	9
1.5. Relación diversidad-invasibilidad en hongos	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Obtención del hongo invasor y de los hongos de la comunidad receptora	15
2.2. Diseño de ensayo de microcosmos	16
2.3. Inoculación del invasor	17
2.4. Muestreo de los microcosmos	18
2.5. Extracción de DNA de los microcosmos	18
2.6. Determinación de la tasa de crecimiento de <i>T. cf. harzianum</i> en los microcosmos mediante qPCR	19

2.7. Efecto del invasor sobre la estructura genética de las comunidades receptoras	21
2.8. Efecto del invasor sobre la estructura metabólica de las comunidades receptoras	23
<hr/>	
3. RESULTADOS	26
3.1. Determinar la tasa de crecimiento del hongo invasor en comunidades fúngicas receptoras con diferentes niveles de diversidad.	26
3.2. Efecto del invasor sobre la estructura genética de las comunidades fúngicas receptoras.	27
3.3. Efecto del invasor sobre la estructura metabólica de las comunidades fúngicas receptoras.	34
3.4. Análisis de correlación entre la colonización de <i>T. cf. harzianum</i> y la diversidad genética y metabólica de las comunidades receptoras.	38
<hr/>	
4. DISCUSIÓN	40
4.1. Invasiones microbianas	40
4.2. Comunidades fúngicas experimentales como modelo de estudio de invasiones biológicas.	42
4.3. Colonización del invasor en comunidades con distinta equidad	45
4.4. Efecto del invasor sobre la estructura genética y metabólica comunitaria	46
4.5. Relación diversidad-invasibilidad	50
4.6. Importancia del estudio de las invasiones microbianas	52
<hr/>	
5. CONCLUSIONES	55
6. BIBLIOGRAFÍA	56
<hr/>	
ANEXO	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonización de <i>T. cf. harzianum</i> expresado como el Log ₁₀ del número de copias del marcador SCAR por nanogramo de DNA genómico de las comunidades a los distintos días post invasión (dpi).	26
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la región del marcador molecular ITS utilizadas para el DGGE.	27
Figura 3. Perfil de DGGE de comunidades invadidas y control con J=0,75. En el panel derecho se muestran las comunidades en los tiempos 10 y 30 dpi. En el panel izquierdo se muestra la cuantificación con el software "ImageJ" de las bandas de los carriles marcados con flechas blancas en el gel.	28
Figura 4. Abundancia relativa de los componentes fúngicos de las comunidades invadidas con <i>T. cf. harzianum</i> (C+I) y las comunidades controles sin invasor (C) calculadas de los perfiles de DGGE.	30
Figura 5. Análisis de componentes principales basado en los perfiles genéticos obtenidos por DGGE de las comunidades con distintos índices de equidad iniciales a diferentes tiempos de incubación.	31
Figura 6. Análisis de agrupamiento de las comunidades utilizando los perfiles genéticos obtenidos por DGGE, basado en la distancia Euclídeana.	32
Figura 7. Heatmap basado en los perfiles metabólicos de las comunidades con distintos índices de equidad iniciales en los distintos tiempos post invasión.	34
Figura 8. Análisis de componentes principales basado en los perfiles metabólicos obtenidos con el test FF MicroPlate de las comunidades con distintos índices de equidad iniciales a diferentes tiempos de incubación.	35
Figura 9. Análisis de agrupamiento de las comunidades utilizando los datos metabólicos obtenidos con el test FF MicroPlate, basado en la distancia Euclídeana.	36
Figura 10. Análisis de correlación entre la colonización de <i>T. cf. harzianum</i> , medida por el Log del número de copias del marcador SCAR y los índices de equidad J obtenidos en el DGGE (panel izquierdo) y en el test metabólico FF MicroPlate (panel derecho).	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Analysis of variance (análisis de la varianza)

Ct: threshold Cycle (Ciclo umbral)

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante)

DNA: DeoxyriboNucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)

dNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate (desoxirribonucleótido trifosfato)

Dpi: Días post invasión

GC: Nucleótidos guanina y citosina

gDNA: DNA genómico

Índice H: Índice de diversidad de Shannon-Weaver

Índice J: Índice de equidad de Pielou

ITS: Internal Transcribed Spacer (espaciador transcrito interno)

pb: Pares de bases

PCA: Principal component analysis (análisis de componentes principales)

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

SCAR: Sequence Characterized Amplified Region (regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas)

RESUMEN

Las invasiones biológicas ocurren cuando una especie denominada invasora alcanza, sobrevive y se reproduce en un hábitat que está más allá de su rango de distribución natural. Las invasiones conllevan efectos negativos ya que representan una seria amenaza para la biodiversidad local y para el funcionamiento de los ecosistemas, aunque procesos beneficiosos tales como el biocontrol, entre otros, también están basados en este fenómeno. Se han propuesto varias hipótesis que buscan explicar los mecanismos detrás de una invasión biológica, dentro de las cuales se tiene la propuesta por Elton, la cual explica que aquellos ecosistemas que poseen una mayor diversidad de especies son menos propensos al fenómeno de la invasión, resultando así en una relación negativa entre la diversidad y el éxito del invasor. En este trabajo se propuso abordar las invasiones biológicas utilizando como modelo comunidades fúngicas, debido principalmente a su importancia ecológica y a los escasos estudios relacionados con las invasiones de este tipo de microorganismos. En particular, se puso a prueba la hipótesis de Elton, para lo cual se diseñaron comunidades fúngicas experimentales con cuatro índices de equidad diferentes, de modo de modificar la diversidad inicial de las comunidades. Las comunidades luego se invadieron con el hongo *Trichoderma* cf. *harzianum*, el cual posee varias características, de crecimiento y antagónicas, que lo hacen un buen modelo de invasor. El éxito del invasor se determinó evaluando su colonización en los distintos tipos de comunidades

mediante qPCR usando un marcador molecular SCAR específico para la cepa de *T. cf. harzianum* utilizada. El invasor se detectó en todos los tipos de comunidades, mostrando una tendencia a aumentar su número de copias en el tiempo, aunque en general no se observó una relación aparente entre su colonización y el índice de equidad de las comunidades receptoras. Además se determinó el efecto del invasor sobre la estructura genética de las comunidades receptoras mediante DGGE, observando que en general el establecimiento del invasor no provoca un cambio en la estructura comunitaria. Por otra parte, el efecto del invasor sobre la estructura metabólica de las comunidades se evaluó mediante el test FF MicroPlate observando que las comunidades diversificaban sus perfiles metabólicos ante la presencia de *T. cf. harzianum*. Finalmente, se realizó un análisis de correlación entre la colonización del invasor, determinado mediante la cuantificación del número de copias del marcador molecular SCAR, y la diversidad genética y metabólica de las comunidades, obtenida a partir de los índices de equidad calculados experimentalmente con el DGGE y el test FF MicroPlate, respectivamente. Se encontró una correlación negativa entre la colonización del invasor y la diversidad genética de las comunidades, y una correlación positiva con la diversidad metabólica de ellas; resultados que se condicen con la hipótesis de Elton, siendo probablemente la competencia por recursos el factor que explicaría la relación negativa entre la diversidad de la comunidad y el éxito del invasor.

ABSTRACT

Biological invasions occur when a species called invasive reached, survive and reproduce in a habitat that is beyond its natural range. Invasions involve negative effects because they represent a serious threat to local biodiversity and the functioning of ecosystems, although beneficial processes such as biocontrol, among others, are also based on this phenomenon. Several hypotheses have been proposed which attempt to explain the mechanisms behind biological invasion, among which is the one proposed by Elton, which explains that those ecosystems that have a higher diversity of species are less prone to the invasion phenomenon, resulting then in a negative relationship between diversity and success of the invader. In this work it was proposed to address biological invasions using as a model fungal communities, mainly due to their ecological importance and the few studies related to the invasions of such microorganisms. In particular, the Elton's hypothesis was tested, for which experimental fungal communities with four different evenness indices were designed, in order to modify the initial diversity of the communities. Then, communities were invaded by the fungus *Trichoderma cf. harzianum*, which has several characteristics, of growth and antagonism, making it a good model of invasive species. The success of the invader was determined by assessing their colonization in the different types of communities by qPCR using a SCAR molecular marker specific for the used *T. cf. harzianum* strain. The invader was

detected in all the types of communities, showing a tendency to increase its copy numbers over time, although generally no apparent relationship between its colonization and the evenness index of host communities was observed. Moreover, the effect of the invader on the genetic structure of host communities was determined by DGGE, noticing that in general the establishment of the invader does not cause a change in the community structure. On the other hand, the effect of the invader on the metabolic structure of communities was assessed by the FF MicroPlate assay, noting that communities diversified their metabolic profiles in the presence of *T. cf. harzianum*. Finally, a correlation analysis between the colonization of the invader, determined by quantifying the number of copies of the SCAR molecular marker, and the metabolic and genetic diversity of the communities, obtained from the evenness indices calculated experimentally from the DGGE and the FF MicroPlate assay, respectively, was performed. A negative correlation between the colonization of the invader and the genetic diversity of the communities, and a positive correlation with the metabolic diversity of these were found; results that are consistent with the hypothesis of Elton, being probably the competition for resources the factor explaining the negative relationship between diversity of the community and success of the invader.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Invasiones biológicas

La invasión biológica es un fenómeno que ocurre cuando especies, denominadas invasoras, alcanzan un nuevo territorio que está más allá de su rango de distribución natural (Richardson y col. 2000), propagándose por él, alterando la estructura y funcionamiento de los ecosistemas receptores, y provocando daños ecológicos y también socioeconómicos (Mooney & Hobbs, 2000). A pesar de que el movimiento de especies entre regiones contiguas es una característica natural de nuestro planeta, en las últimas décadas la tasa y la escala de esos movimientos se han incrementado en todos los tipos de ecosistemas debido principalmente a factores antropogénicos (Sousa y col. 2011). Las invasiones biológicas son consideradas como uno de los cambios globales que afectan al planeta, y representan una amenaza a la biodiversidad y al funcionamiento de los ecosistemas (Simberloff y col. 2013). Por esta razón, el número de investigaciones relacionadas a las invasiones biológicas se ha incrementado enormemente atrayendo gran interés científico (Pejchar & Mooney 2009).

La invasión es un fenómeno estructurado en etapas que son percibidas como barreras o filtros ecológicos que los invasores deben superar, aunque el nombre y definición de estas etapas varía entre los autores (Colautti & MacIsaac 2004; Mitchell y col. 2006). En una revisión de Cattford y col. 2009, se

identificaron como consenso seis etapas: (i) el transporte, que consiste en el movimiento de los invasores o sus propágulos al nuevo hábitat; (ii) la introducción, que consiste en la llegada del invasor o de sus propágulos al nuevo hábitat; (iii) la colonización, que implica la supervivencia del invasor en la nueva área geográfica; (iv) la naturalización, que implica la supervivencia y reproducción del invasor; (v) la dispersión, que le permite propagar sus propágulos a otras áreas; y (vi) el impacto, que consiste en las consecuencias ecológicas y socioeconómicas que conlleva el invasor. En esta misma revisión, se reconoce que las especies no nativas logran una invasión exitosa cuando éstas tienen la capacidad de alcanzar la etapa de dispersión. La etapa de impacto es subjetiva y está basada en la percepción de los humanos, ya que se ha encontrado que en algunos casos las especies invasoras proveen beneficios económicos (Galil 2007), y pueden proporcionar beneficios ecosistémicos deseables de conservación y de funcionamiento (Schlaepfer y col. 2011).

Por otra parte, Catford y col. 2009, también reconocen la existencia de 29 hipótesis, generadas a partir de estudios realizados con plantas y animales, que fueron propuestas para explicar los mecanismos detrás de una invasión biológica exitosa, encontrando que muchas de ellas se superponen o comparten argumentos entre sí, detectando un alto grado de redundancia. Varias de las hipótesis tienen en común tres factores esenciales, que son: la presión de propágulos, las características abióticas del ecosistema invadido, y las características bióticas tanto de las especies invasoras como de la comunidad receptora o receptora. El grado y la intensidad de la invasión están

determinados por estos tres factores, aunque la influencia de cada uno no es igual y con frecuencia están mediados por la intervención de los seres humanos (Wilson y col. 2007).

La *presión de propágulos* es una medida que estima el número de individuos no nativos liberados en una región, tomando en cuenta tanto el número total de individuos liberados en cada invasión (tamaño del propágulo), como el número de eventos de liberación (número de propágulos) (Lockwood y col. 2005). Al incrementarse cualquiera de estos componentes se aumenta la presión de propágulos, y a la vez el éxito de la invasión, ya que se aumenta la variabilidad genética de la población invasora y así las probabilidades de sobrevivida y adaptación a las condiciones del nuevo ambiente (Lockwood y col. 2005). Los *factores abióticos* se relacionan con las características del ambiente al que se enfrenta el invasor. Dentro de los más importantes se encuentra la disponibilidad de recursos, y varias hipótesis atribuyen el éxito de la invasión a este factor (Davis y col. 2000). Al existir una mayor disponibilidad de recursos, aumenta la probabilidad de éxito de la invasión. A la vez, esa disponibilidad está directamente relacionada con eventos de perturbación, ya sea de origen antropogénico o natural (Sher & Hyatt 1999), debido a que los invasores, al igual que el resto de especies, requieren de espacios para obtener sus recursos. Así, cualquier fenómeno que genere un aumento en la disponibilidad de espacios, como las perturbaciones, generará un aumento en los recursos disponibles, reduciendo la competencia entre especies nativas e invasoras y

permitiendo así una mayor probabilidad de éxito en la invasión (Hood & Naiman 2000).

Entre los *factores bióticos* destacan las características propias del invasor, también conocido como invasividad, y las características de la comunidad receptora, también denominado como invasibilidad (Alpert y col. 2000). El éxito de muchos invasores se ha relacionado con la invasibilidad de los ecosistemas receptores, lo cual está dado por su vulnerabilidad o susceptibilidad a la invasión, que son resultado de propiedades intrínsecas de las comunidades receptoras (Bonanomi y col. 2014).

En el contexto de la invasibilidad, una hipótesis clásica postulada por Elton (1958), predice que ecosistemas con mayor diversidad de especies son menos propensos a la invasión de especies foráneas. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar esta relación negativa entre la diversidad de la comunidad receptora y su invasibilidad, entre los que destacan los propuestos por Tilman (1999). El modelo de Tilman (1999) propone que en comunidades más diversas, existen menos recursos disponibles debido a que éstos son utilizados de forma más completa. Esto, sumado al menor número de nichos ecológicos y a la presencia de especies nativas que compiten por esos recursos, limita el establecimiento de los invasores. Por otra parte, las especies invasoras poseen un nivel de recursos necesarios denominado R^* , bajo el cual, éstas no podrían sobrevivir (Tilman 1982). La disponibilidad de recursos limitantes junto al nivel R^* de los invasores definen un valor de diversidad comunitaria N^* , sobre el cual, en promedio la especies invasoras no podrían

invadir (Tilman 1999). Adicionalmente, se ha observado la existencia de un efecto de complementariedad de nichos, que consiste en que a mayor diversidad, las comunidades son más estables ya que poseen un mayor rango de estrategias funcionales, teniendo una menor sobreposición de nichos y por consiguiente utilizando con mayor eficiencia una gama más amplia de recursos, en comparación a comunidades menos diversas (Granado 2007; Dukes 2002). Finalmente, también se ha visto que en comunidades más diversas hay una mayor probabilidad de que en ellas existan competidores superiores, los cuales son especies dominantes en términos de utilización de recursos. La existencia de estos competidores superiores conlleva a una mejor productividad en los ecosistemas y a una menor cantidad de recursos disponibles sin consumir (Tilman 1999).

1.2. Invasiones microbianas

Tradicionalmente, los estudios de invasiones biológicas se han centrado principalmente en los componentes más conspicuos de los ecosistemas, es decir, en invasores animales y vegetales, pero muy pocos han abordado a las invasiones microbianas (Van der Putten y col. 2007). De hecho, según una revisión de Lowry y col. (2013), casi el 75% del total de estudios sobre invasiones biológicas se han enfocado en invasores que son productores primarios (no microbianos) y menos de un 10% fueron realizados con animales herbívoros, mientras que animales depredadores, omnívoros y filtradores han recibido menos atención. En comparación a éstos, solo un pequeño número de

estudios se han realizado con microorganismos, enfocándose en patógenos, parásitos y descomponedores (Lowry y col. 2013). Sin embargo, dado la importancia de los microorganismos en los ecosistemas, donde cumplen funciones claves, las invasiones microbianas pueden tener un impacto mayor sobre éstos, pudiendo llegar a afectar su apariencia y funcionamiento (Van der Putten y col. 2007; Jules y col. 2002; Niwa y col. 2004).

La limitada atención a las invasiones microbianas ha sido dirigida principalmente a aquellos cuyo efecto es más visible, como lo son por ejemplo los patógenos bacterianos, debido a su destructivo impacto fácilmente perceptible (Bonanomi y col. 2014; Van Elsas y col. 2012; Matos y col. 2005). Por otra parte, la relación de diversidad-invasibilidad de Elton ha sido estudiada principalmente en comunidades de plantas, en los cuales se pudo confirmar que en general una disminución en la diversidad comunitaria facilitaba la invasión (Hector y col. 2001; Pokorny y col. 2005). Sin embargo, existen pocos estudios en la literatura que aborden la relación diversidad-invasibilidad en un contexto microbiano. Entre ellos, al trabajo de Dillon y col. (2005) que fue consistente con la predicción de la hipótesis de Elton en la que comunidades bacterianas con mayor riqueza de especies fueron más resistentes a la invasión de una bacteria patógena que comunidades con menor riqueza. Resultados similares fueron obtenidos por Hodgson y col. (2002), que usando como invasor a *Pseudomonas fluorescens* encontró una relación negativa entre la diversidad y la invasibilidad, asociado a la alta productividad de las comunidades bacterianas más diversas. Los estudios de van Elsas y col. (2012), enfocados también en un invasor

bacteriano patógeno, encontraron también una relación diversidad-invasibilidad negativa, atribuyendo como factor principal de ésta a la competencia por recursos. Por el contrario, otros estudios como el de Jiang & Morin (2004) usando comunidades microbianas acuáticas consistentes de protozoos y rotíferos depredadores de bacterias y nanoflagelados, encontraron una relación positiva entre la diversidad y la invasibilidad.

Por otra parte, el estudio de las invasiones microbianas no solo es importante por los posibles impactos negativos en los ecosistemas que pueden tener, sino que también hay que tomar en cuenta que muchos procesos beneficiosos para los humanos, como lo son el biocontrol de organismos dañinos, la biorremediación de contaminantes, la micorrización de plantas y las fermentaciones industriales están basados también en invasiones microbianas (Menge 1983; Vogel 1996; Leroy & Vuyst 2004; Knudsen & Dundurend 2014).

1.3. Comunidades fúngicas experimentales

La ecología busca comprender aspectos tales como la diversidad, la distribución y la abundancia de los organismos presentes en los distintos hábitats, donde forman comunidades y establecen una red de interacciones dinámica y compleja. Los estudios ecológicos se han basado principalmente en aproximaciones que consisten en modelos matemáticos, observaciones de sistemas naturales y manipulaciones a nivel de campo (Jessup y col. 2005). Otra herramienta de estudio ha consistido en el uso de sistemas experimentales a nivel de laboratorio, donde los microorganismos han tomado una gran

importancia para explorar procesos ecológicos. Estos sistemas llamados comunidades microbianas experimentales permiten abordar procesos tales como la generación y mantención de la diversidad, las interacciones ecológicas o las respuestas frente a perturbaciones, entre otros (Jessup y col. 2005). A pesar de que algunos principios claves de la ecología, tales como los modelos de competencia e interacción predador-presa de Gause (1934) fueron abordados mediante el uso de comunidades microbianas experimentales, el uso de estos sistemas ha sido limitado (Jessup y col. 2005). Sin embargo, con el creciente auge de la ecología microbiana, el uso de las comunidades experimentales ha ido en aumento, principalmente debido a las ventajas que éstas poseen, tales como el alto grado de control experimental que ofrecen y su pequeño tamaño que facilita su manipulación, sumado al corto tiempo generacional de los microorganismos y a la abundante información genética y fisiológica disponible sobre ellos. Estas ventajas permiten el diseño de experimentos que buscan reducir la complejidad de los sistemas naturales para abordarlos por medio de sus componentes por separado, siendo éste el principal objetivo de este tipo de sistemas (Jessup y col. 2004). Por otra parte, las comunidades experimentales han recibido ciertas críticas relacionadas principalmente con su simplicidad estructural y taxonómica, y con su potencial pérdida de heterogeneidad espacial y temporal (Carpenter 1996), debidas a las restricciones experimentales asociadas. Sin embargo, estos aspectos no son significativos si las comunidades microbianas experimentales son vistas solo como una parte importante de una gran red de posibles aproximaciones

interrelacionadas que permiten abordar de mejor manera estudios relevantes de la ecología (Lawton 1995).

En este trabajo se propuso abordar el estudio de las invasiones biológicas utilizando una comunidad experimental fúngica como modelo de estudio. Los hongos son organismos eucariontes pertenecientes al reino Fungi, que pueden ser unicelulares, conocidos como levaduras, o multicelulares, conocidos como hongos filamentosos (Mc Laughlin y col. 2009). Los hongos son organismos quimioheterotróficos, ya que utilizan una fuente química de energía, y sustratos orgánicos como principal fuente de carbono (Stainer y col. 1992). Por otra parte, poseen variadas estrategias de vida, encontrándose hongos saprofitos, parásitos y simbioses, lo que los convierte en componentes importantes de los ecosistemas (Piontelli-Laforet 2011). Por lo tanto, tomando en cuenta su importancia ecológica, resulta relevante abordar el fenómeno de las invasiones biológicas al nivel de este tipo de microorganismos.

1.4. *Trichoderma harzianum* como modelo de invasor biológico

Como modelo de invasor biológico en este trabajo también se seleccionó un organismo fúngico, *Trichoderma harzianum*. *Trichoderma* es un género muy común de hongos filamentosos saprofitos pertenecientes a la división Ascomycota, encontrados con frecuencia en suelos y una gran variedad de sustratos, siendo considerado un hongo oportunista y con una gran adaptabilidad a varias condiciones ecológicas (Druzhinina y col. 2011). Los hongos del género *Trichoderma* han sido extensamente estudiados y utilizados

por su capacidad de biocontrolar a otros hongos causantes de daños a las plantas, conocidos como fitopatógenos (Elad y col. 1980). Dentro del género, la especie más comúnmente estudiada y utilizada como biocontrolador es *Trichoderma harzianum* (Benítez y col. 2004). El éxito de *T. harzianum* como hongo biocontrolador se basa en características tales como su alta tasa reproductiva, su habilidad para crecer bajo condiciones desfavorables, su capacidad de modificar la rizosfera, su capacidad de promover el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa, su eficiencia en la utilización de nutrientes que lo hacen un gran competidor de recursos, y por último la fuerte agresividad que muestra contra otros hongos debido a su capacidad de parasitarlos, lo que también se conoce como micoparasitismo (Benítez y col. 2004). Dentro de estas características, se considera como principales en su éxito como hongo biocontrolador al micoparasitismo y a la competencia por recursos (Harman 2006). El micoparasitismo de *T. harzianum* consiste en un complejo proceso de eventos secuenciales en que *T. harzianum* reconoce, ataca, penetra y mata al hongo hospedero (Druzhinina y col. 2011). Este micoparasitismo se debe principalmente a la capacidad de *T. harzianum* de producir una variedad de enzimas degradadoras de pared celular, en su mayoría quitinasas y glucanasas (Reis Almeida y col. 2007). Por otra parte, la habilidad competitiva por recursos de *T. harzianum* está dada en parte por su gran capacidad de producir sideróforos altamente eficientes, que facilitan la captación del hierro presente en suelos otorgándole una ventaja frente a otros hongos (Chet & Inbar. 1994). Además, *T. harzianum* es un gran competidor por

su capacidad superior de conseguir desde el suelo energía a partir del metabolismo de una variedad de polímeros de glucosa, tales como la celulosa o la quitina, entre otros (Benítez y col. 2004). Además, su alta eficiencia en este tipo de metabolismo se debe a sus proteínas transportadoras de membrana de alta afinidad por glucosa, las cuales son claves en condiciones en las que este azúcar se encuentra en baja concentración en el ambiente (Delgado-Jarana y col. 2003). Estas proteínas de membrana le permiten a *T. harzianum* transportar de forma más rápida la glucosa al interior de sus células, lo que le confiere una ventaja competitiva frente a otros hongos.

Las características de buen biocontrolador de *T. harzianum*, sumado a la existencia de cepas muy agresivas, también ha representado un problema debido a que se ha reportado que *T. harzianum* es capaz de invadir y colonizar campos de cultivo del hongo comercial *Agaricus bisporus*, en un fenómeno conocido como "infestación del moho verde", provocando graves pérdidas económicas en Irlanda, Inglaterra, Francia y Estados Unidos (Williams y col. 2003). De este modo, con los antecedentes mencionados se tiene que *T. harzianum* representa un buen modelo de invasor fúngico para este trabajo.

1.5. Relación diversidad-invasibilidad en hongos

Dado que las comunidades microbianas experimentales proveen de una gran herramienta para abordar estudios de relevancia en ecología, sumado a la importancia de los hongos en los ecosistemas, este trabajo propone estudiar el fenómeno de las invasiones biológicas con énfasis en la hipótesis de Elton

(1958), analizando el efecto de la diversidad de una comunidad fúngica receptora en el éxito del invasor *T. harzianum*, y además ver el efecto que éste podría tener en la estructura genética y metabólica de dicha comunidad.

En ecología la diversidad se define como la variedad de especies de una comunidad y hace referencia a la importancia relativa de estas especies en el ecosistema (Atlas y Bartha 2001). Los dos principales componentes de la diversidad son la riqueza de especies o variedad, y la equidad o uniformidad de especies en la comunidad. La riqueza es una medida del número de especies de una comunidad, pero no representa cuántos individuos existen de una especie concreta. Por otra parte, la equidad es una medida de la proporción de individuos dentro de una especie en la comunidad, y a la vez indica si existen especies dominantes (Atlas y Bartha 2001). Para medir la diversidad existen índices matemáticos, donde uno de los más utilizados en ecología microbiana es el índice de Shannon-Weaver, también conocido simplemente como índice de Shannon o H (Shannon y Weaver 1963), el cual es sensible tanto a la riqueza como a la abundancia relativa de especies. El índice de equidad de una comunidad, también llamado índice de Pielou o J , puede ser calculado a partir del índice de Shannon, donde puede tener un valor que va desde 0 hasta 1 para las comunidades con equidad máxima, es decir, una comunidad en que todas sus especies se encuentran en la misma proporción (Pielou 1966). Tanto la riqueza de especies como la equidad influyen en la biodiversidad y en el funcionamiento y estabilidad de los ecosistemas, de modo que alteraciones en cualquiera de estos factores conlleva a la vez a modificaciones en la diversidad

(Wittebolle y col. 2009). En este trabajo en particular, para poner a prueba la hipótesis de Elton (1958), se modificará la diversidad de las comunidades fúngicas experimentales modificando su equidad y manteniendo constante su riqueza de especies. De este modo se analizará el éxito invasivo de *T. harzianum* en microcosmos con comunidades fúngicas experimentales con diferentes índices de equidad J.

Hipótesis

En el marco de la hipótesis de diversidad-resistencia a la invasión propuesta por Elton, la especie invasora *Trichoderma harzianum* será más exitosa cuando invade una comunidad fúngica receptora menos diversa, con una menor equidad, comparada con una comunidad fúngica más diversa, la cual sería más resistente al invasor. Como consecuencia de una invasión exitosa, el invasor modificará la estructura genética y el potencial metabólico de la comunidad fúngica invadida.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la diversidad de la comunidad fúngica experimental sobre el éxito invasor de *Trichoderma harzianum* y determinar sus efectos sobre la estructura genética y el potencial metabólico de las comunidades fúngicas invadidas.

Objetivos específicos

- 1- Determinar la tasa de crecimiento del hongo invasor en comunidades fúngicas receptoras con diferentes diversidades.
- 2- Analizar el efecto del invasor sobre la estructura genética de las comunidades fúngicas receptoras.
- 3- Analizar el efecto del invasor sobre el perfil metabólico de las comunidades fúngicas receptoras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención del hongo invasor y de los hongos de la comunidad receptora

Las especies fúngicas utilizadas en la construcción de las comunidades experimentales receptoras, se obtuvieron mediante un aislamiento por cultivo de hongos filamentosos a partir de una muestra de suelo semiárido del matorral esclerófilo de la localidad de El Romeral (33°48'S, 70°14'E), Cajón del Maipo, Región Metropolitana, Chile. Del total de hongos aislados y caracterizados morfológicamente y molecularmente (Rojas 2013), se seleccionaron cinco especies fúngicas para constituir las comunidades receptoras: *Penicillium canescens* (MR-13), *Aspergillus wentii* (MR-3), *Paecilomyces variotii* (MR-9), *Talaromyces flavus* (MR-25) y *Cladosporium cladosporoides* (MR-12). El criterio de selección de los cinco hongos que conforman la comunidad receptora fue el patrón de bandeo obtenido mediante la técnica del DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) del marcador molecular ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de todos los hongos de la colección disponibles, con lo cual se eligió aquellos hongos con un patrón distintivo que facilitara su correcta identificación en los ensayos de microcosmos posteriores. Como especie invasora se utilizó la cepa BpT10a del hongo *Trichoderma cf. harzianum*, aislada y caracterizada por Castillo (2009). Por otra parte, los hongos seleccionados de la comunidad receptora no poseen una relación filogenética cercana con *T. cf. harzianum* por

lo cual se esperaba que no existiera una resistencia por parte de la comunidad hacia el invasor provocada por este factor (Morales y col. 2016).

2.2. Diseño de ensayo de microcosmos

Con el objetivo de evaluar el efecto de la diversidad de las comunidades fúngicas receptoras sobre el éxito del invasor, y el efecto que este tendría en la estructura genética y metabólica de las comunidades, se realizaron ensayos de microcosmos con diferente diversidad de las comunidades receptoras. Para ello, los microcosmos se diseñaron, por duplicado, con distintas combinaciones de los cinco hongos, inoculando sus esporas en distintas proporciones para obtener cuatro valores iniciales de índices de equidad (J) en las comunidades receptoras (J=0,25, J=0,50, J=0,75 y J=1,00) (Tabla 1).

Los microcosmos se montaron en frascos de 20 ml, y se usó como sustrato 0,3 g de lana de roca estéril, enriquecido hasta alcanzar un 60% de la capacidad de retención de agua con medio de cultivo Vogel 1X suplementado con dextrosa al 0,5% p/v, y extracto de levadura al 0,5% p/v y cloranfenicol a una concentración de 30 µg/ml para inhibir el crecimiento bacteriano. Los microcosmos inoculados se mantuvieron en incubación por 3 días a 24°C para permitir el establecimiento de los componentes fúngicos de la comunidad receptora.

Tabla 1. Cantidad de esporas inoculadas de cada hongo en cada réplica de los respectivos microcosmos con distintos índices J iniciales.

Comunidad J = 0,25			Comunidad J = 0,50	
Réplica 1	Réplica 2	Esporas	Réplicas 1 y 2	Esporas
MR-13	MR-9	9,2x10 ⁴	MR-13	7,5x10 ⁴
MR-3	MR-25	2,0x10 ³	MR-3	1,7x10 ⁴
MR-9	MR-13	2,0x10 ³	MR-9	3,0x10 ³
MR-25	MR-12	2,0x10 ³	MR-25	3,0x10 ³
MR-12	MR-3	2,0x10 ³	MR-12	2,0x10 ³
Comunidad J = 0,75			Comunidad J = 1,00	
Réplica 1	Réplica 2	Esporas	Réplicas 1 y 2	Esporas
MR-13	MR-9	5,5x10 ⁴	MR-13	2,0x10 ⁴
MR-3	MR-12	2,5x10 ⁴	MR-3	2,0x10 ⁴
MR-9	MR-13	1,0x10 ⁴	MR-9	2,0x10 ⁴
MR-25	MR-3	5,0x10 ³	MR-25	2,0x10 ⁴
MR-12	MR-25	5,0x10 ³	MR-12	2,0x10 ⁴

2.3. Inoculación del invasor

Luego de los 3 días de incubación a 24°C, los microcosmos con las comunidades fúngicas receptoras con distintos índices J iniciales, se inocularon con 2×10^4 esporas del hongo invasor *T. cf. harzianum*. Además, se mantuvieron microcosmos sin inocular con *T. cf. harzianum*, los cuales se usaron como control de la invasión. De esta forma se generaron microcosmos invadidos (designados como: CJ0.25 +I; CJ0.50 +I; CJ0.75 +I; CJ1.00 +I) y microcosmos no invadidos (designados como: CJ0.25; CJ0.50; CJ0.75; CJ1.00).

2.4. Muestreo de los microcosmos

En cada uno de los microcosmos invadidos y no invadidos se realizaron muestreos destructivos el mismo día de la invasión (día 0), y a los 3, 7, 10 y 30 días post invasión (dpi). El muestreo consistió en extraer la totalidad del contenido de los tubos en los que se incubaron los microcosmos, depositarlo en placas Petri estériles y resuspenderlo con medio Vogel 1X. Cada muestra homogeneizada se dividió equitativamente, una fracción se utilizó para realizar la extracción de DNA que se usó posteriormente para medir la tasa de crecimiento del invasor y obtener los perfiles genéticos de DGGE de las comunidades, y la otra se utilizó para inocular el test FF MicroPlate y así obtener los perfiles metabólicos de utilización de las fuentes de carbono contenidas en las placas por parte de la comunidad fúngica.

2.5. Extracción de DNA de los microcosmos

El DNA genómico de los hongos que componen las comunidades en los microcosmos se obtuvo desde cada muestra utilizando el kit "PowerSoil DNA Isolation" (MoBio Laboratories, Inc). El DNA extraído se almacenó a -20°C en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM [pH 8,0]) hasta su utilización. La concentración y calidad del DNA se midieron utilizando un equipo espectrofotómetro de multiplaca "Epoch" (Biotek).

2.6. Determinación de la tasa de crecimiento de *T. cf. harzianum* en los microcosmos mediante qPCR

El éxito del invasor *T. cf. harzianum* se evaluó mediante la medición de su tasa de crecimiento. Para esto se utilizó un marcador molecular SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) específico para la cepa de *T. cf. harzianum* BpT10a (Pérez y col. 2014) y se determinó el número de copias de ese marcador en los microcosmos mediante la técnica de qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). Los partidores usados para amplificar el marcador SCAR se muestran en la Tabla 1. Las reacciones se realizaron en un equipo "Mx3000P Real-time PCR System" (Stratagene) utilizando el kit "GoTaq qPCR Master Mix" (Promega). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 20 μ l, con 0,3 μ M de cada partidor y 1 μ l de DNA extraído de las muestras de los microcosmos como molde. El programa de ciclos térmicos del qPCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min, seguida de 40 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 15 s, luego una hibridación a 64°C durante 1 min y una fase de extensión a 72°C durante 1 min.

Los resultados del qPCR se analizaron con el programa "MxPro QPCR". Para cuantificar el número de copias del marcador SCAR de los microcosmos, se realizaron curvas standard usando diluciones decimales seriadas de una mezcla equimolar (mix) consistente en DNA genómico de los cinco hongos seleccionados para formar parte de la comunidad receptora y DNA genómico de *T. cf. harzianum*. A partir de los datos de amplificación obtenidos usando como

molde el mix, se graficó el ciclo umbral (Ct) obtenido para cada dilución versus el número de copias del marcador SCAR en ellas, y posteriormente, usando un análisis de regresión lineal, se obtuvo el valor de la pendiente de la recta y el coeficiente de determinación (R²). El porcentaje de eficiencia de las reacciones se calculó mediante la ecuación: Eficiencia = $(10^{(-1/pendiente)} - 1) * 100$. El número de copias del marcador SCAR en cada uno de los microcosmos se obtuvo interpolando los valores de Ct obtenidos en la ecuación de la recta y los resultados se expresaron como el logaritmo decimal del número de copias del marcador SCAR relativo a los nanogramos de DNA genómico en los respectivos microcosmos (Log₍₁₀₎ copias SCAR/ng gDNA). Para analizar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de tratamiento en el tiempo, se realizó un ANOVA de dos vías y un post test de Bonferroni con el programa GraphPad Prism v5.01.

Tabla 1- Partidores utilizados para la amplificación de los marcadores moleculares SCAR (2F2-2R2) e ITS (ITS3GC-ITS4).

Partidor	Secuencia (5'-3')	Referencia
2F2	TGGCTCGTCGTAGTTCGGAGAAG	Pérez y col. (2014)
2R2	CCAGATCGGCCACCGAAGAAAC	
ITS3GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGGCCCGCCGC CCCCGCCCGCATCGATGAAGAACGCAGC	May y col. (2001)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White y col. (1990)

2.7. Efecto del invasor sobre la estructura genética de las comunidades receptoras

Para evaluar el efecto del invasor *T. cf. harzianum* sobre la estructura genética de las comunidades receptoras en el tiempo, se utilizó la técnica del DGGE. Para ello, utilizando como molde el DNA genómico extraído de los microcosmos, se realizó un PCR utilizando los partidores ITS3GC e ITS4 (Tabla 1) para amplificar una región del marcador molecular ITS, que fue analizado mediante DGGE. El partidor ITS3GC posee una cola de nucleótidos GC, que aumenta la estabilidad de los amplicones impidiendo que se separen completamente en el gel con gradiente desnaturizante, para evitar la migración de mono-hebras de DNA. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 µl usando el kit "GoTaq Green Master Mix" (GoTaq® DNA polimerasa en buffer de reacción Green GoTaq® [pH 8,5], 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM) (Promega) con 0,8 µM de cada partidor y 2 ng de DNA obtenido desde los microcosmos como molde. El tamaño esperado del producto de amplificación de aproximadamente 370 pb (Nikolcheva y col. 2005) se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,2 % p/v en amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA [pH 8,0]) y teñidos con GelRed™ (Biotium).

Posteriormente, los amplicones se analizaron mediante DGGE con el equipo "DCode Mutation Detection System" (Biorad). Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 8% p/v con un gradiente desnaturizante de 45 a

60%, donde el 100% de desnaturalizante correspondió a 40% de formamida y 7M de urea. Los geles se corrieron en buffer TAE a 50 V y a una temperatura de 60°C durante 16 h, y se tiñeron con GelStar (Lonza). Los geles se fotografiaron bajo luz UV y las imágenes se analizaron con el programa "ImageJ". Las bandas del DGGE, que corresponden a cada uno de los hongos constituyentes de las comunidades en los microcosmos, se normalizaron y luego se cuantificaron con respecto a un mix de DNA genómico de los cinco hongos receptores y del invasor, todos a una concentración de 1 ng/μl, el cual se utilizó como molde para un PCR con los partidores ITS3GC e ITS4, y que también se analizó mediante DGGE. La cuantificación de las bandas de los DGGE de cada microcosmos permitió determinar la abundancia relativa de cada hongo, en las respectivas comunidades. Para comparar las diferencias entre las estructuras genéticas de los microcosmos invadidos y no invadidos con distintos índices de equidad inicial, se estimó la diversidad comunitaria mediante el calculo del índice de diversidad de Shannon-Weaver, que es sensible a la riqueza y a la abundancia relativa de las especies que componen la comunidad (Shannon & Weaver 1963). El indice de diversidad se calculó utilizando la ecuación $H' = \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$, donde H' es el indice de diversidad, S es la riqueza (número de especies de la comunidad) y p_i es la abundancia relativa de cada especie. También se determinó el valor del indice de equidad J de las comunidades mediante el programa "Past" (Hammer y col. 2001). Para visualizar las diferencias entre las comunidades invadidas y control a nivel

genético a partir de los resultados obtenidos mediante DGGE, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el programa "Past".

2.8. Efecto del invasor sobre la estructura metabólica de las comunidades receptoras

Con el objetivo de evaluar el efecto de *T. cf. harzianum* sobre la estructura metabólica de las comunidades receptoras se utilizó el test metabólico FF MicroPlate (Biolog), que consiste en placas de 96 pocillos con 95 fuentes de carbono distintas y un pocillo sin fuente de carbono como control. Cada pocillo posee yodo-nitro-tetrazolio (INT), que sirve como un indicador redox para medir colorimétricamente la oxidación de las fuentes de carbono metabolizadas por la comunidad. La oxidación de las fuentes de carbono ensayadas provoca que el INT sea reducido de forma irreversible a un compuesto de color rojo llamado formazán, que posee su máxima absorbancia a 490 nm (Papaspyridi y col. 2010).

La fracción del contenido de los microcosmos separada y homogenizada para el ensayo a nivel metabólico se sometió a agitación en un vórtex horizontal por 1 h para desprender los micelios contenidos en ella. Luego, se tomó una alícuota de 150 µl de sobrenadante y se resuspendió en 15 ml de la solución "FF Fluid" (Biolog), que se utilizó para inocular las placas FF MicroPlate. Se inocularon 100 µl de esta solución en cada pocillo de las placas FF MicroPlate, las que posteriormente se incubaron a 24°C hasta 96 h. Se midió la absorbancia a 490 y 750 nm en cada pocillo con un espectrofotómetro

multiplaca "Epoch" (Biotek) cada 24 h. La lectura a 750 nm es una medida del crecimiento micelial de los hongos. El espectro de absorbancia del micelio es esencialmente similar en el rango de 490 a 750 nm, por lo cual un valor "redox" corregido es obtenido restándole la absorbancia medida a 750 nm a la de 490 nm ($Abs_{490nm} - Abs_{750nm}$). Esto permite cuantificar la producción de formazán atribuible solo a la actividad metabólica (Kubicek y col. 2003). Posteriormente, a los valores de absorbancia corregidos se les restó las absorbancias medidas a los 0 días de incubación. Una vez procesados los datos como se describió anteriormente, solo se tomaron en cuenta aquellos cuyo valor de absorbancia resultante fue igual o mayor a 0,1 que indican un consumo positivo de la fuente de carbono del test (Dobranic & Zak 1999).

La absorbancia de cada pocillo de las placas se midió cada 24 h incluyendo una lectura el mismo día de su inoculación (0 h). Para elegir cuál tiempo de lectura iba a ser el utilizado para los posteriores análisis, se calculó el AWCD (*Average Well Colour Development*) de los datos procesados para cada tiempo, que consiste en el promedio de todas las absorbancias de la placa (Garland 1999). Dado que el desarrollo de color de los pocillos de las placas típicamente sigue una tendencia a una curva sigmoideal, los datos de AWCD se usaron para realizar un análisis cinético ajustándolos a la ecuación de Gompertz modificada (Zwietering y col. 1990) utilizando el programa "Origin". Este análisis cinético permitió identificar en cuál de los tiempos de lectura de absorbancia el consumo de fuentes de carbono de la comunidad se encontraba en la fase exponencial, el cual fue el elegido para los análisis posteriores. Para

visualizar el efecto de *T. cf. harzianum* en la estructura metabólica de las comunidades, los valores de absorbancia de las lecturas seleccionadas se promediaron entre replicas y se graficaron en un "heat-map" utilizando el programa "Past". Para analizar las diferencias entre las comunidades invadidas y control a nivel metabólico se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el programa "Past". A partir de éstos datos fueron calculados tanto el índice de diversidad como el índice de equidad metabólico de las comunidades.

3. RESULTADOS

3.1. Determinar la tasa de crecimiento del hongo invasor en comunidades fúngicas receptoras con diferentes niveles de diversidad.

El crecimiento de *T. cf. harzianum* en las comunidades con diferentes índices de equidad J iniciales fue monitoreado mediante la técnica del qPCR utilizando un marcador SCAR específico de la cepa invasora utilizada (Pérez y col. 2014). La colonización del invasor se expresó como el logaritmo decimal del número de copias del marcador SCAR por nanogramo de DNA genómico contenido en los microcosmos. Los resultados del qPCR muestran que *T. cf. harzianum* se detectó solo en las comunidades invadidas a partir de los 3 dpi (días post invasión de los microcosmos), excepto en la comunidad con índice $J=1,0$ en el que se detectó a los 0 dpi. El número de copias de *T. cf. harzianum* mostró una tendencia a aumentar con el tiempo para cada tipo de tratamiento, alcanzando los mayores valores en los tiempos finales de incubación. Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los microcosmos con la comunidad con índice $J=1,0$ y los microcosmos con índices de equidad menores (Figura 1).

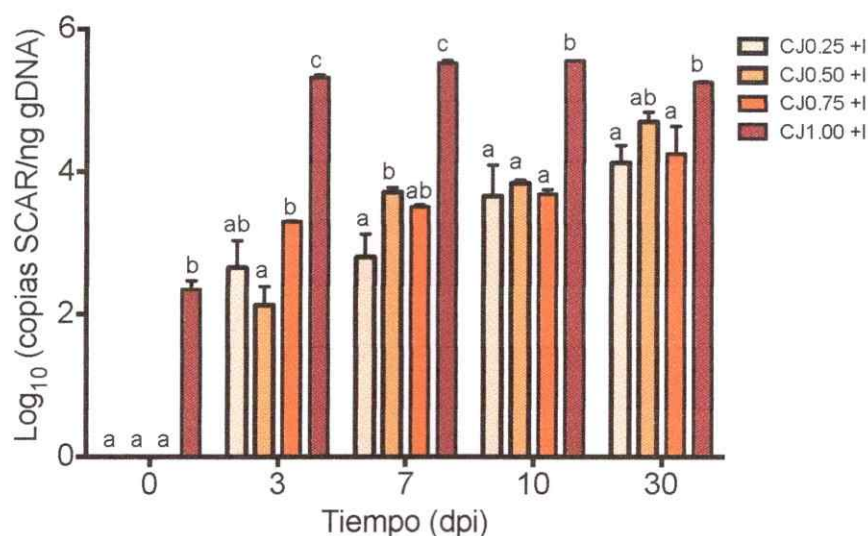


Figura 1. Colonización de *T. cf. harzianum* expresado como el Log_{10} del número de copias del marcador SCAR por nanogramos de DNA genómico de las comunidades a los distintos días post invasión (dpi). CJ0,25+I, CJ0,5+I, CJ0,75+I y CJ1,00+I son las comunidades invadidas con índices de equidad iniciales iguales a 0,25; 0,5; 0,75 y 1,0, respectivamente. Las letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos para cada tiempo de incubación según el post-test de Bonferroni ($P \leq 0,001$).

3.2. Efecto del invasor sobre la estructura genética de las comunidades fúngicas receptoras.

La estructura genética de las comunidades receptoras en los distintos tiempos post invasión de *T. cf. harzianum* se determinó a partir de los perfiles obtenidos con la técnica del DGGE, utilizando para esto una región del marcador molecular ITS. La amplificación de este marcador y su tamaño esperado de 370 pb se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa (Figura 2).

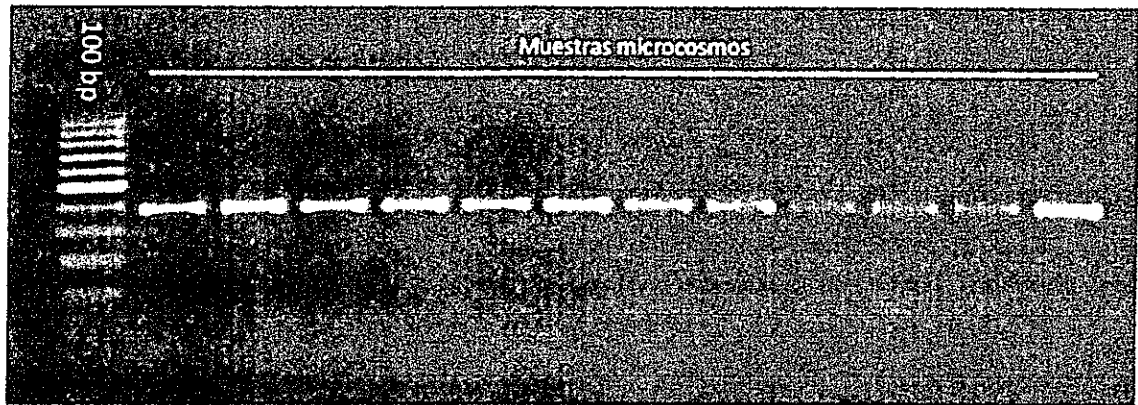


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la región del marcador molecular ITS utilizadas para el DGGE. Primer carril muestra el marcador molecular 100 bp.

Los patrones de bandas obtenidos en los DGGE de las comunidades invadidas y de las comunidades control se compararon con los obtenidos para una mezcla equimolar de DNA genómico de concentraciones conocidas de los cinco hongos de la comunidad receptora y de *T. cf. harzianum*. Esta mezcla permitió evaluar el posible sesgo de una amplificación diferencial en el PCR del marcador ITS de los distintos hongos constituyentes de las comunidades. Para ello, las imágenes de los geles de DGGE obtenidos se analizaron con el software "ImageJ" y los perfiles genéticos se normalizaron usando como referencia el perfil de DGGE obtenido para la mezcla de DNA genómico de los aislados fúngicos (Figura 3). Una vez normalizados los perfiles, se calculó la abundancia relativa de cada hongo de la comunidad, incluyendo al invasor *T. cf. harzianum* en los casos en que fue detectado, para cada tipo de microcosmos y para cada tiempo de incubación.

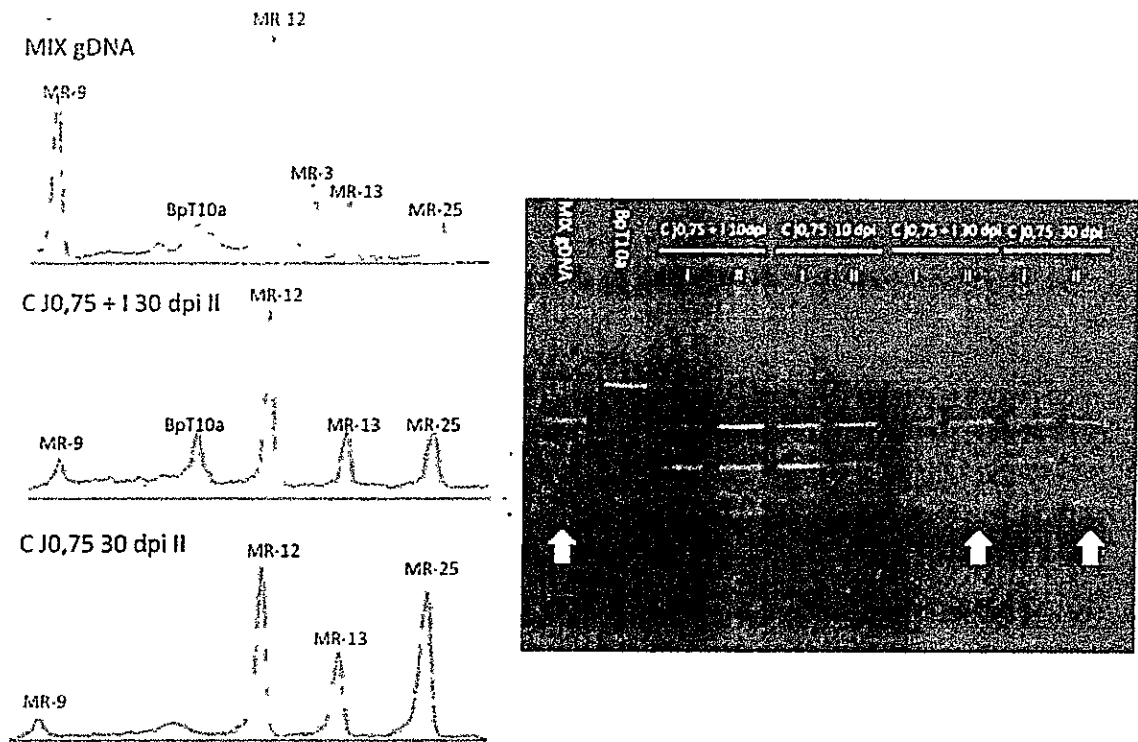


Figura 3. Perfil de DGGE de comunidades invadidas y control con $J=0,75$. En el panel derecho se muestran las comunidades en los tiempos 10 y 30 dpi. El primer carril del gel corresponde al mix de DNA genómico equimolar de los 6 aislados fúngicos de la comunidad, y en el siguiente carril se muestra la banda de *T. cf. harzianum*. Los carriles siguientes muestran los patrones de bandas obtenidos en las comunidades invadidas y controles. En el panel izquierdo se muestra la cuantificación con el software "ImageJ" de las bandas de los carriles marcados con flechas blancas en el gel. +I indica las comunidades invadidas.

Conociendo las abundancias relativas de cada hongo de la comunidad receptora, fue posible calcular el índice de diversidad de Shannon (H') y el índice de equidad J de cada comunidad en cada tiempo de incubación. Para esto no se tomó en cuenta la abundancia relativa del invasor, ya que se quería visualizar el efecto que éste tenía en la diversidad de las comunidades receptoras. Los resultados obtenidos mostraron que las comunidades

receptoras no conservan el índice de equidad inicial con el que fueron construidas, encontrando que luego de tres días de incubación (tiempo 0 dpi) se produce un cambio en la abundancia relativa de los componentes fúngicos receptores debido probablemente a interacciones que se establecen entre ellos más que por un efecto del invasor, ya que esto también fue observado en las comunidades control (Figura 4). Los perfiles de abundancia relativa, calculado a partir de los perfiles de DGGE, mostraron que existen cambios en la estructura genética de las distintas comunidades en el tiempo, detectándose como especie dominante principalmente a *Cladosporium cladosporoides* (MR-12), aunque en las comunidades con índice de equidad inicial $J=1,0$ se observó una dominancia de *Talaromyces flavus* (MR-25). Al comparar estadísticamente mediante un ANOVA los perfiles genéticos de las comunidades invadidas y de los controles para cada tiempo de incubación obtenidos con el DGGE, se pudo observar que, en general, no existen mayores diferencias entre ellas, por lo cual la presencia del invasor parece no afectar mayormente la estructura genética de las comunidades receptoras.

Para analizar las diferencias entre las estructuras genéticas de las comunidades invadidas y control, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a partir de los datos de abundancia relativa obtenidos del DGGE. Este análisis indicó que las comunidades con y sin invasor son muy similares, diferenciándose en la mayoría de los casos solo en el tiempo final de incubación (30 dpi) (Figura 5). Esto indica que el invasor lograría modificar la estructura genética comunitaria después de varios días de incubación.

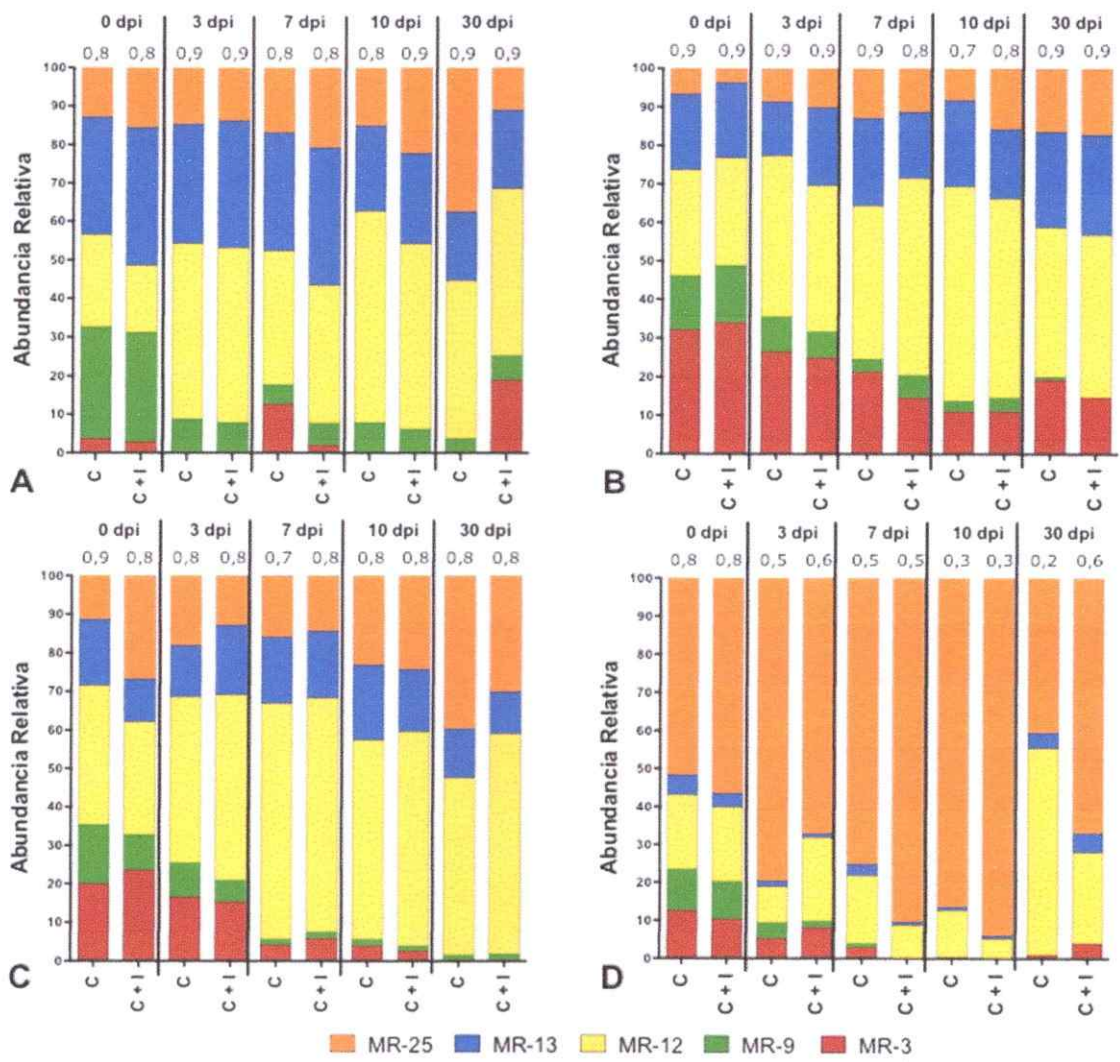


Figura 4. Abundancia relativa de los componentes fúngicos de las comunidades invadidas con *T. cf. harzianum* (C+I) y las comunidades controles sin invasor (C) calculadas de los perfiles de DGGE. En A, B C y D se muestran los perfiles de los microcosmos diseñados con J iniciales de 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 respectivamente. Sobre cada barra de los gráficos se muestran los índices de equidad (J) calculados para cada tiempo. MR-25: *Talaromyces Flavus*; MR-13: *Penicillium canescens*; MR-12: *Cladosporium cladosporioides*; MR-9: *Paecilomyces variotii*; MR-3 *Aspergillus wentii*.

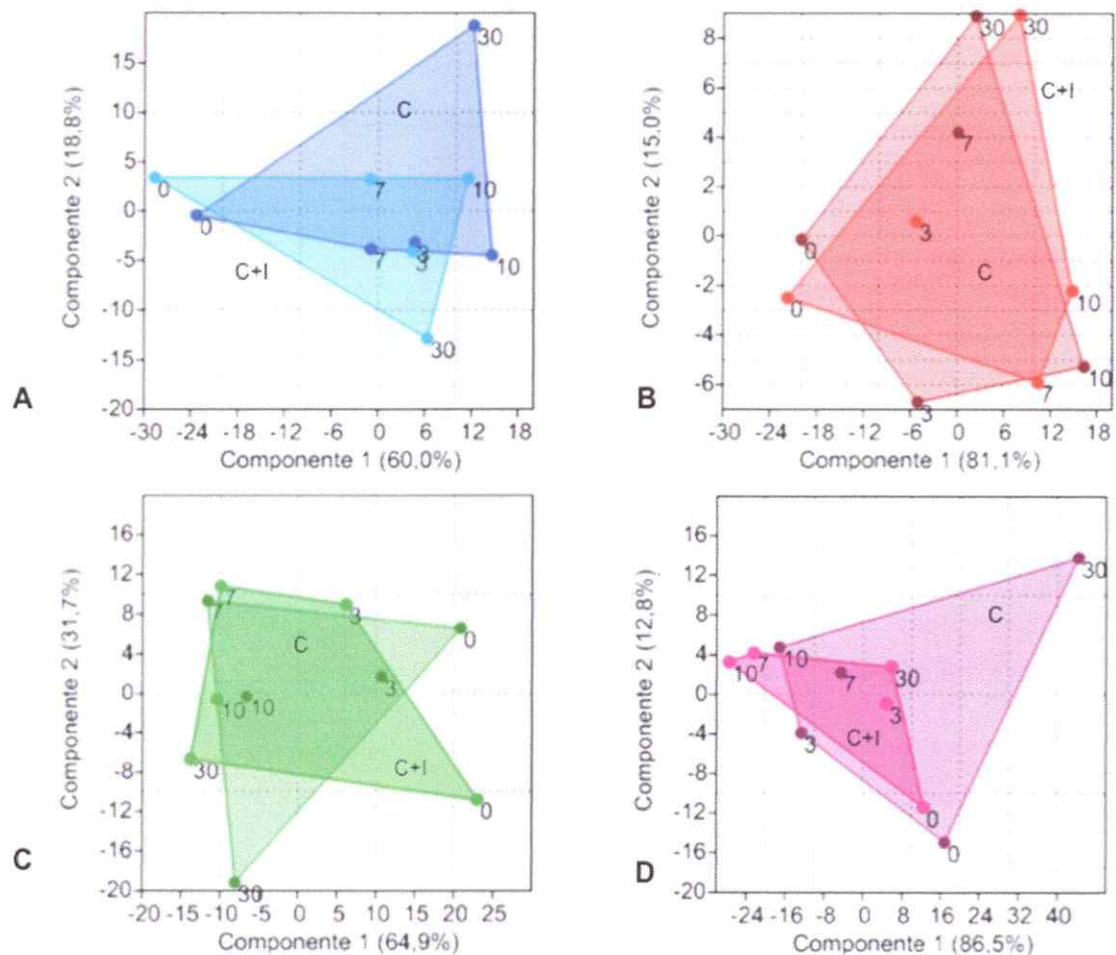


Figura 5. Figura 5. Análisis de componentes principales basado en los perfiles genéticos obtenidos por DGGE de las comunidades con distintos índices de equidad iniciales a diferentes tiempos de incubación. A: comunidades con índice $J=0,25$ (CJ0,25 en azul oscuro y CJ0,25+I en azul claro). B: comunidades con índice $J=0,50$ (CJ0,50 en rojo oscuro y CJ0,50+I en rojo claro). C: comunidades con índice $J=0,75$ (CJ0,75 en verde oscuro y CJ0,75+I en verde claro). D: comunidades con índice $J=1,00$ (CJ1,00 en rosado oscuro y CJ1,00+I en rosado claro). 0, 3, 7, 10 y 30 indican los días post invasión (dpi) respectivamente. +I indica las comunidades invadidas con *T. cf. harzianum*.

Por otra parte, con los datos de los perfiles genéticos obtenidos con el DGGE, se realizó un análisis de agrupamiento calculando la distancia Euclídeana. Este análisis indica que las comunidades se agrupan de acuerdo a su índice de equidad y no por un efecto del invasor (Figura 6). Además, las comunidades con índice de equidad igual a uno se agruparon por separado del resto.

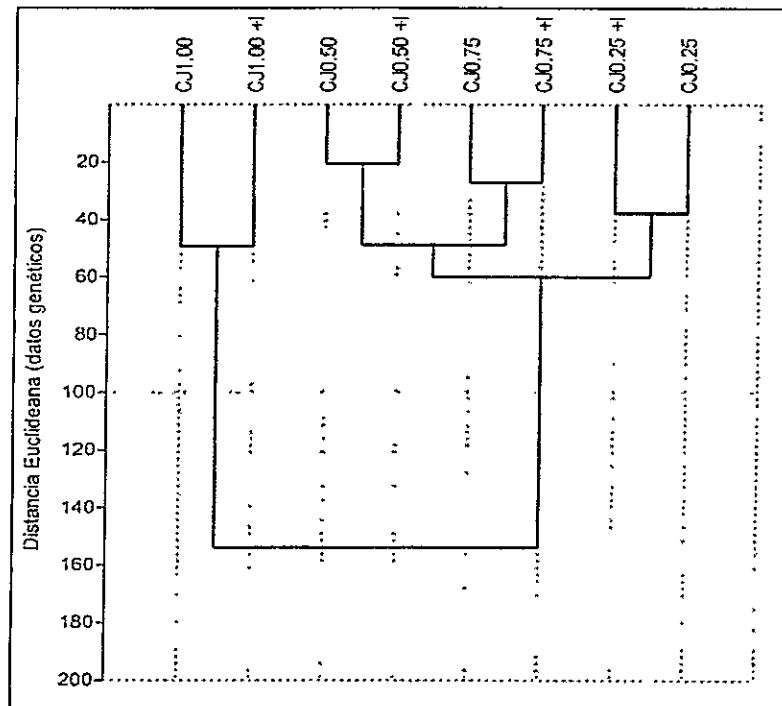


Figura 6. Análisis de agrupamiento de las comunidades utilizando los perfiles genéticos obtenidos por DGGE, basado en la distancia Euclídeana. CJ0,25: comunidad con equidad inicial igual a 0,25. CJ0,50: comunidad con equidad inicial igual a 0,50. CJ0,75: comunidad con equidad inicial igual a 0,75. CJ1,00: comunidad con equidad inicial igual a 1,00. +I indica las comunidades que fueron invadidas con *T. cf. harzianum*.

3.3. Efecto del invasor sobre la estructura metabólica de las comunidades fúngicas receptoras.

El efecto de *T. cf. harzianum* sobre la estructura metabólica de las comunidades receptoras se determinó mediante el uso del test FF MicroPlate (Biolog), que consistió en el consumo diferencial por parte de las distintas comunidades de 95 fuentes de carbono. Los patrones metabólicos obtenidos del test se representaron gráficamente en un "heat-map" (Figura 7). En este gráfico el consumo de las 95 fuentes de carbono del test para cada tipo de comunidad y para cada tiempo de incubación se representan por columnas. El nivel de consumo de las fuentes de carbono está representado por un gradiente de color, que va desde azul para la ausencia de consumo, hasta rojo para un consumo máximo. En el gráfico se puede observar que las comunidades variaron sus perfiles metabólicos con el tiempo, además de que éstos se ven modificados por la presencia *T. cf. harzianum*, siendo las comunidades invadidas más activas en el consumo de las fuentes de carbono del test que los controles.

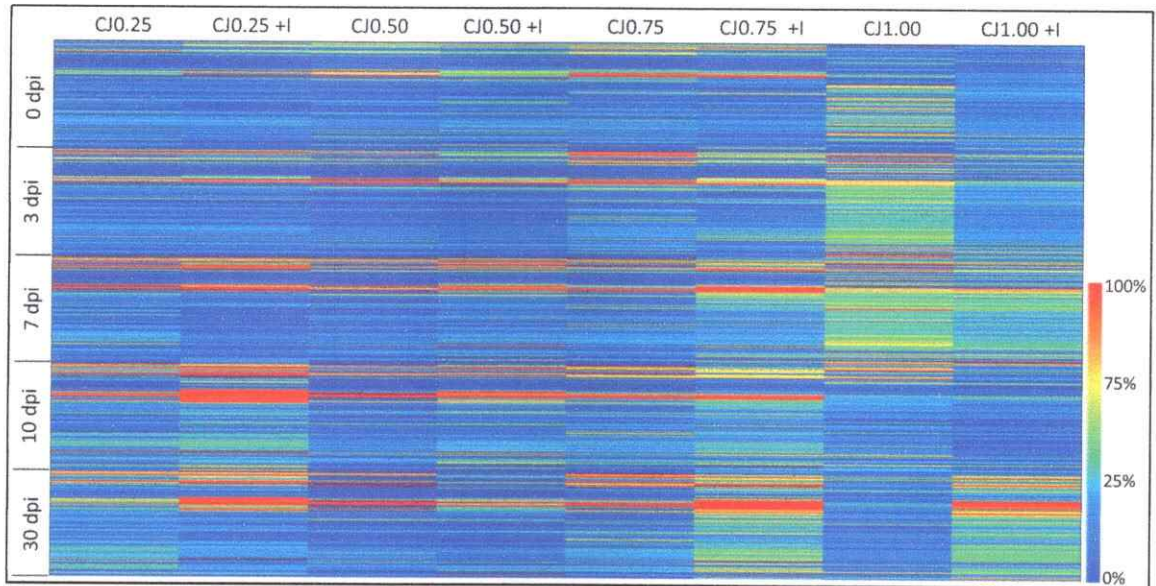


Figura 7. Heatmap basado en los perfiles metabólicos de las comunidades con distintos índices de equidad iniciales en los distintos tiempos post invasión (dpi: días post-invasión). CJ0,25: comunidad con equidad inicial igual a 0,25. CJ0,50: comunidad con equidad inicial igual a 0,50. CJ0,75: comunidad con equidad inicial igual a 0,75. CJ1,00: comunidad con equidad inicial igual a 1,00. +I indica las comunidades que fueron invadidas. El nivel máximo de la escala representa todos los valores de absorbancia obtenidos del test FF MicroPlate mayores o iguales a 0,8.

Para comparar las comunidades invadidas y controles a nivel metabólico, se realizó un PCA a partir de los perfiles metabólicos obtenidos del test FF MicroPlate (Figura 8). En comparación a los resultados obtenidos del PCA de los perfiles genéticos, el PCA de los perfiles metabólicos mostró una diferenciación mayor de las comunidades invadidas y de las controles, sobre todo a mayores tiempos de incubación.

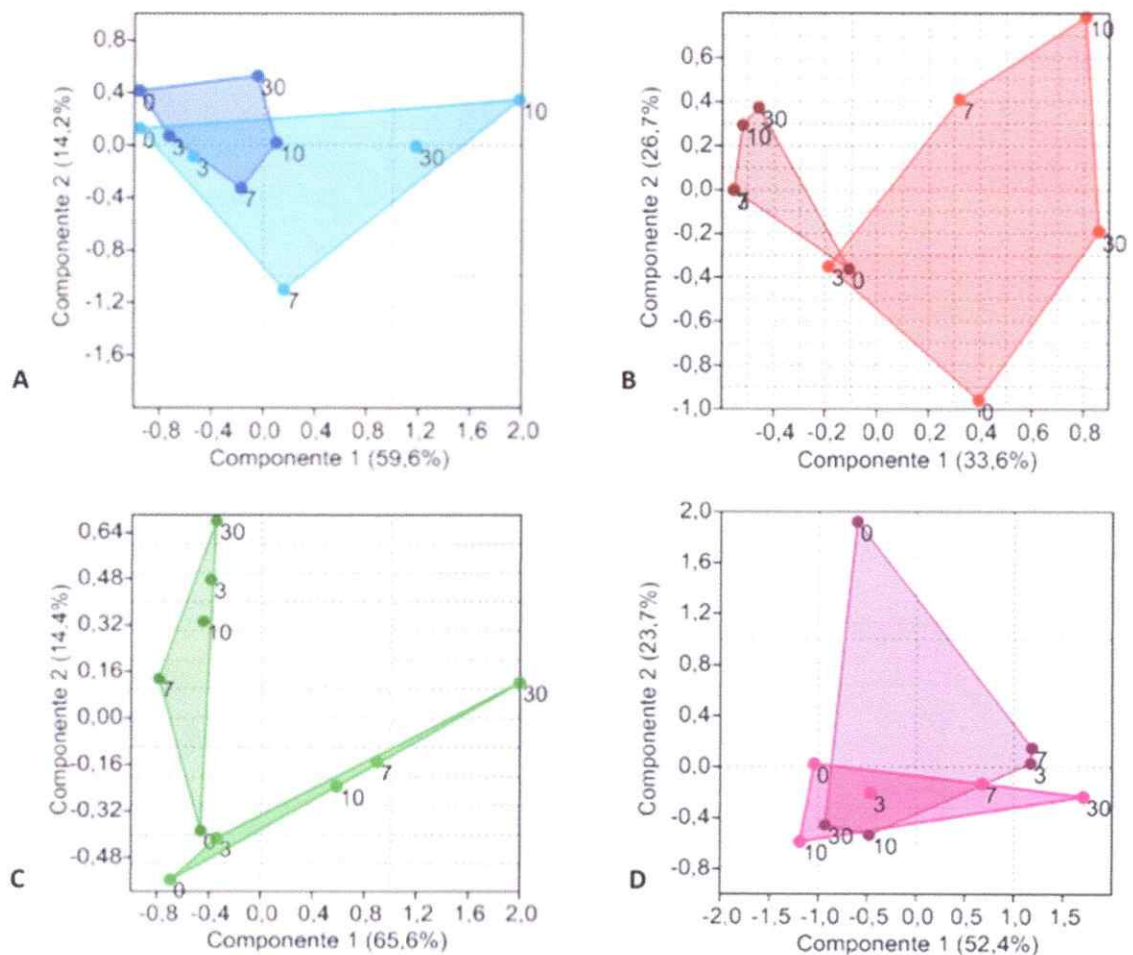


Figura 8. Análisis de componentes principales basado en los perfiles metabólicos obtenidos con el test FF MicroPlate de las comunidades con distintos índices de equidad iniciales a diferentes tiempos de incubación. A: comunidades con índice $J=0,25$ (CJ0,25 en azul oscuro y CJ0,25+I en azul claro). B: comunidades con índice $J=0,50$ (CJ0.50 en rojo oscuro y CJ0.50+I en rojo claro). C: comunidades con índice $J=0,75$ (CJ0,75 en verde oscuro y CJ0,75+I en verde claro). D: comunidades con índice $J=1,00$ (CJ1,00 en rosado oscuro y CJ1,00+I en rosado claro). 0, 3, 7, 10 y 30 indican los días post invasión (dpi) respectivamente. +I indica las comunidades invadidas con *T. cf. harzianum*. +I indica las comunidades invadidas con *T. cf. harzianum*.

Con los datos de perfiles metabólicos obtenidos con el test FF MicroPlate se realizó un análisis de agrupamiento basado en la distancia Euclídeana (Figura 9). A diferencia de lo obtenido con los datos genéticos, las comunidades no se agrupan de acuerdo a su índice de equidad inicial, a excepción de la comunidad CJ1,00, dando cuenta de una mayor variabilidad de estas comunidades a nivel metabólico.

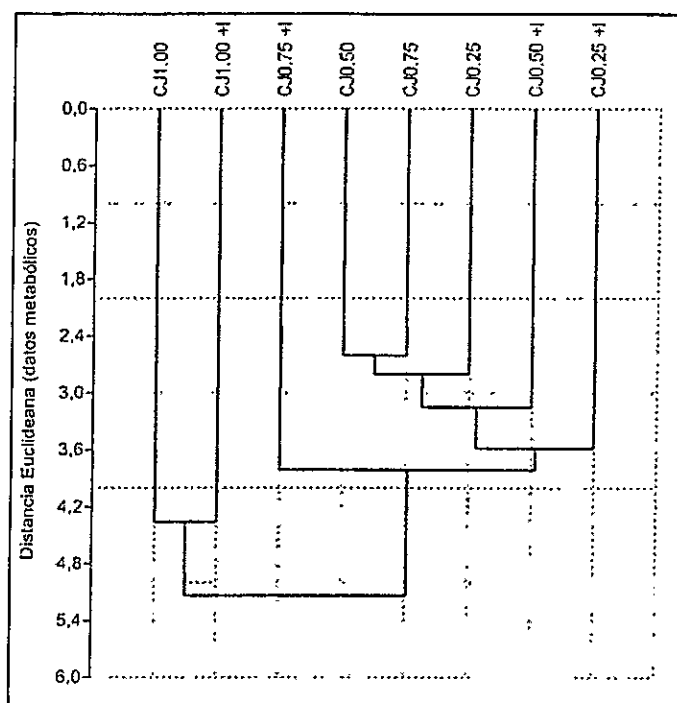


Figura 9. Análisis de agrupamiento de las comunidades utilizando los datos metabólicos obtenidos con el test FF MicroPlate, basado en la distancia Euclídeana. CJ0,25: comunidad con equidad inicial igual a 0,25. CJ0,50: comunidad con equidad inicial igual a 0,50. CJ0,75: comunidad con equidad inicial igual a 0,75. CJ1,00: comunidad con equidad inicial igual a 1,00. +I indica las comunidades que fueron invadidas con *T. cf. harzianum*.

3.4. Análisis de correlación entre la colonización de *T. cf. harzianum* y la diversidad genética y metabólica de las comunidades receptoras.

Los resultados obtenidos de los perfiles genéticos (DGGE), muestran que las comunidades experimentales no conservaron el índice de equidad inicial con el que fueron diseñadas y construidas. Por esta razón, y para relacionar los resultados obtenidos con la hipótesis de diversidad-invasibilidad propuesta en este trabajo, se realizó un análisis de correlación entre el nivel de colonización del invasor, medido previamente con la técnica del qPCR usando el marcador molecular SCAR, con los índices de equidad calculados a partir de los datos de los perfiles genéticos del DGGE. Además, se calculó el índice de equidad de cada comunidad a partir de los datos metabólicos obtenidos con el test FF MicroPlate, los que también se correlacionaron con el nivel de colonización del invasor. Los resultados indican que existió una correlación negativa entre la colonización del invasor *T. cf. harzianum* y el índice de equidad de las comunidades a nivel genético ($r: -0,70$; $p: 0,0026$) (Figura 10). Por otra parte, existió una correlación positiva entre la colonización del invasor *T. cf. harzianum* y el índice de equidad de las comunidades a nivel metabólico ($r: 0,81$; $p: 0,0001$) (Figura 10). Estos resultados apoyan la hipótesis de Elton estudiada en este trabajo, observándose una relación negativa entre la invasibilidad de los microcosmos por parte de *T. cf. harzianum*, y la diversidad de éstas. Además, esto se relaciona con que, debido a la presencia del invasor, las comunidades diversifican en mayor medida sus perfiles metabólicos.

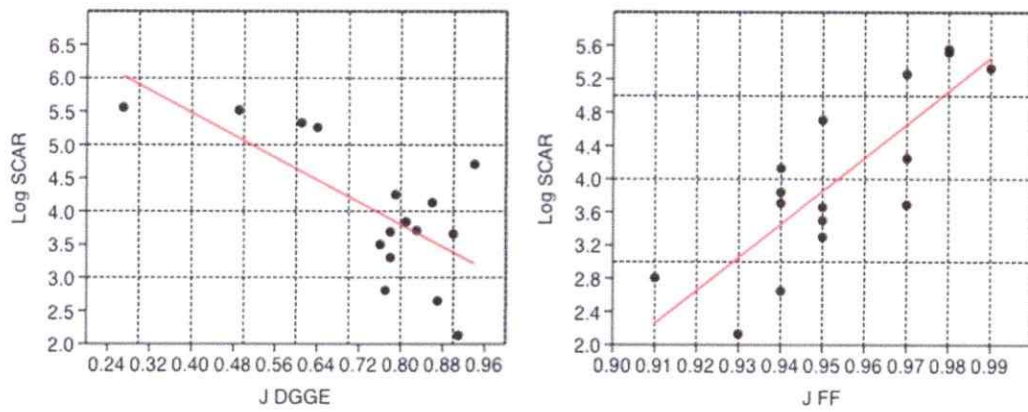


Figura 10. Análisis de correlación entre la colonización de *T. cf. harzianum*, medida por el Log del número de copias del marcador SCAR y los índices de equidad J obtenidos en el DGGE (panel izquierdo) y en el test metabólico FF MicroPlate (panel derecho).



4. DISCUSIÓN

4.1. Invasiones microbianas

El estudio de las invasiones microbianas ha sido muy escaso, en comparación a lo realizado en animales y plantas, sin embargo esta biota "invisible" puede tener incluso mayores impactos en los ecosistemas, afectando su apariencia y funcionamiento (Bonanomi y col. 2014). La escasez de estudios relacionados a las invasiones microbianas ha estado relacionada en parte a la naturaleza microscópica de ellos, pero también a la escasa información de su biogeografía y distribución (Green y col. 2008). La escasa información disponible de la biogeografía microbiana se debe en parte a que los microorganismos han sido vistos comúnmente como organismos cosmopolitas (Finlay 2002), razón por la cual sería difícil hablar de especies microbianas invasoras. Sin embargo, ha surgido creciente evidencia de comunidades microbianas adaptadas a ambientes específicos, incluyendo endemismo de algunas especies microbianas (Souza y col. 2008; Hanson y col. 2012), por lo cual, las comunidades microbianas nativas también pueden ser susceptibles a invasiones. Los pocos estudios relacionados a invasiones microbianas han sido dirigidos principalmente a aquellos en los que su impacto es fácilmente detectable, como es el caso de los microorganismos patógenos, ya sea de plantas o animales (Bonanomi y col. 2014).

En cuanto al efecto que tienen las invasiones biológicas sobre las comunidades microbianas, los estudios se han enfocado principalmente en cómo plantas invasoras afectan la estructura comunitaria residente (Kourtev y col. 2002), y cómo la presencia de ciertos tipos de poblaciones microbianas puede aumentar el éxito de la invasión por parte de plantas (Richardson y col. 2000; Callaway y col. 2001, 2004). Por otra parte, los estudios enfocados en invasores microbianos se han relacionado principalmente a aquellos que co-invaden en conjunto con plantas invasoras, como es el caso de plantas que invaden asociadas a sus fitopatógenos (Mitchell & Power 2003), y también en la importancia de los hongos micorrizicos (van der Heijden y col. 1998) o las bacterias fijadoras de nitrógeno (Vitousek & Walker 1989) en la determinación de la biodiversidad y el funcionamiento ecosistémico de las plantas. Sin embargo, estos estudios no entregan información del efecto que tienen estos invasores microbianos sobre la estructura genética y funcional de las comunidades microbianas receptoras invadidas, lo cual constituye el foco de estudio en este trabajo.

En esta tesis se propuso abordar el estudio de las comunidades microbianas en el marco de la hipótesis de Elton, la cual predice una relación negativa entre la diversidad de una comunidad y la invasibilidad de ésta. La riqueza de especies y la abundancia relativa de éstas o equidad, son los dos componentes fundamentales de la diversidad, por lo cual ésta puede ser modificada alterando cualquiera de esos dos parámetros. La gran mayoría de los trabajos relacionados con el estudio de la relación diversidad-invasibilidad

han sido abordados usando como factor a modificar la riqueza de especies y muy rara vez se ha considerado la equidad (Mattingly y col. 2007). Sin embargo, se ha visto que una modificación en la equidad sería interesante de estudiar debido a que ante perturbaciones, las que son un factor clave en la invasibilidad, las comunidades naturales ven afectada la abundancia relativa en la que se encuentran las especies que las constituyen, es decir su equidad, mas que una alteración del número absoluto de ellas (Chapin y col. 2000). Además, se ha visto que una mayor equidad es fundamental para la mantención de la funcionalidad y estabilidad de los ecosistemas, observándose que las comunidades equitativas son capaces de responder rápidamente a perturbaciones en comparación a comunidades con baja equidad, donde solo se tiene la dominancia de unas pocas especies (Wittebolle y col. 2009).

4.2. Comunidades fúngicas experimentales como modelo de estudio de invasiones biológicas.

Los hongos son importantes componentes de los ecosistemas, ya sea en términos de biodiversidad, aportando una alta diversidad de especies (Hawksworth 2001), como también por su participación en procesos de gran importancia ecológica, como lo son los ciclos biogeoquímicos, aportando en la recuperación de elementos clave como el carbono, el nitrógeno y el fósforo (Bardgett y col. 2008; Govindarajulu y col. 2005; Harrison & Van Buuren 1995). Además, se ha visto que en los suelos semiáridos, el rol ecológico de los hongos es aun mas importante, ya que se ha descrito que en ese tipo de

ambientes los hongos son capaces de establecer una red denominada "fungal loop" que permite la comunicación e integración de la macrobiota y la microbiota, optimizando el flujo de elementos como el carbono y el nitrógeno entre ellas (Collins y col. 2008), lo que mejora la resistencia a la desecación, la mantención de la humedad, y la fertilidad de estos suelos (Green y col. 2008). Sin embargo, a pesar de su importancia ecológica, las invasiones biológicas no han sido extensamente estudiadas en hongos en comparación a los otros grupos de organismos invasores (Pyšek y col. 2008). Aunque algunos trabajos se han enfocado en invasiones fúngicas, la mayoría no menciona a los hongos o solo los considera brevemente. De hecho, en los datos de la GISD (Global Invasive Species Database) solo 11 especies fúngicas están incluidas en su lista de especies invasoras, y el "DAISIE Project" ha compilado 84 especies de hongos en Europa (Desprez-Loustau y col. 2010). Esta baja representación de los hongos en las bases de datos de especies invasoras puede ser explicada principalmente por el poco conocimiento científico de su biodiversidad y ecología (Desprez-Loustau y col. 2007).

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó como modelo a las comunidades experimentales, que permiten un alto grado de manejo y control experimental, simplificando y que facilitan el estudio de procesos ecológicos complejos como las invasiones biológicas (De Roy y col. 2014). Todos los hongos utilizados para el ensamblaje de estas comunidades fueron aislados desde un suelo de tipo semiárido y desde la misma localidad, ya que se espera que al provenir del mismo ambiente, estén mejor adaptados a crecer juntos

permitiendo que las comunidades experimentales resultantes sean más parecidas a las naturales. Esto debido a que una de las críticas comúnmente realizadas a este tipo de sistemas es su pérdida de realismo con respecto a un sistema natural (Jessup y col. 2005). Por otra parte, como criterio de selección de los cinco hongos utilizados para el diseño de las comunidades receptoras, se analizó la cercanía filogenética entre éstos y *T. cf. harzianum*, de manera de seleccionar a aquellos hongos que no estuvieran cercanamente relacionados con el invasor. Esto fue realizado para evitar un posible sesgo debido a una resistencia por parte de los hongos de la comunidad receptora al invasor provocado por este factor. Esto porque otra hipótesis relacionada con el éxito de la invasión propuesta por Charles Darwin (1859), llamada *hipótesis de naturalización*, sugiere que un invasor tendrá un menor éxito cuando invade ecosistemas habitados por especies muy relacionadas filogenéticamente con éste, debido a que ellos poseen nichos ecológicos similares generándose una competencia por la utilización de sus recursos, y disminuyendo así su colonización. Datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el invasor *T. cf. harzianum* no fue capaz de colonizar exitosamente una comunidad fúngica compuesta por hongos relacionados filogenéticamente con el invasor (Pérez y col. 2014; Morales y col. 2016). Por otra parte, además de no poseer una relación filogenética cercana con el invasor, los cinco hongos de la comunidad receptora no presentan un perfil metabólico similar al del invasor, lo cual fue corroborado con el test FF MicroPlate realizado a cada hongo de forma individual (Figura A1) y con un análisis de agrupamiento basado en estos datos

metabólicos (Figura A2), lo cual da cuenta de que tampoco existiría una resistencia al invasor debido a la similitud fisiológica de éste con los hongos receptores.

Por otra parte, el hongo *T. cf. harzianum* fue seleccionado como modelo de invasor biológico por sus características de colonizador, entre las que se destacan su capacidad de atacar y parasitar a otros hongos (Druzhinina y col. 2011) como también su gran habilidad para competir por recursos (Wardle y col. 1993), factor muy importante en el éxito invasivo. Además, *T. cf. harzianum* no fue detectado en la localidad donde fueron aislados los hongos de la comunidad receptora (Orlando y col. 2015), indicando que este hongo cumple con las propiedades necesarias de un modelo de invasor fúngico para este trabajo.

4.3. Colonización del invasor en comunidades con distinta equidad

En este trabajo se analizó el éxito de *T. cf. harzianum* para invadir y colonizar comunidades fúngicas experimentales con índices de equidad crecientes. Una alternativa para evaluar el éxito del invasor, es realizar un recuento de sus colonias a partir de los microcosmos, sin embargo, a pesar de que *T. cf. harzianum* es distinguible en medios de cultivo axénicos, su identificación en estos ensamblajes microbianos sería más compleja, ya que la caracterización morfológica de los hongos muchas veces presenta dificultades (Marinach-Patrice y col 2009), la que se vería aumentada en una mezcla de hongos. Por esta razón, para llevar a cabo este estudio se utilizaron marcadores moleculares (Hawksworth 2012), como el marcador SCAR

(*Sequence Characterized Amplified Region*) específico para la cepa de *T. cf. harzianum* (Pérez y col. 2014), que permitió hacer un seguimiento del invasor mediante qPCR. Al hacer la analogía con las etapas de la invasión descritas por Cattford y col. (2009), los resultados obtenidos indicarían que *T. cf. harzianum* logra sobrellevar las etapas necesarias para alcanzar su naturalización en las comunidades experimentales montadas en este trabajo, es decir, que es capaz de sobrevivir y reproducirse en el nuevo hábitat donde fue introducido (Cattford y col. 2009). Sin embargo, y a pesar de que se lograron observar algunas diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, los resultados no mostraron una relación aparente entre el nivel de colonización del invasor con los índices de equidad iniciales con que fueron construidas las comunidades receptoras, a excepción de lo observado para las comunidades con índice de equidad de $J=1$ en los que en general se detectó un mayor número de copias del invasor en comparación a los otros tratamientos.

4.4. Efecto del invasor sobre la estructura genética y metabólica comunitaria

En cuanto al efecto que tuvo el establecimiento de *T. cf. harzianum* sobre las comunidades experimentales, los perfiles de DGGE muestran que el invasor no modifica mayormente la estructura de la comunidad receptora. Sólo en algunos casos se observaron diferencias mediante el análisis de componentes principales, entre los perfiles de las comunidades con y sin invasor a los 30 días de incubación.

Por otra parte, los perfiles de DGGE también permitieron observar que las comunidades experimentales no conservaron los índices de equidad con las que fueron inicialmente construidas, observándose que con tres días de crecimiento (correspondiente al tiempo 0 dpi), las abundancias relativas de los componentes fúngicos de las comunidades receptoras cambiaron. Estos resultados indican que se establecerían interacciones entre ellos que podrían modificar la velocidad de crecimiento de cada uno de los componentes fúngicos comparado a cuando crecen individualmente. Estas interacciones pueden ser negativas, como la competencia, o pueden ser positivas como la sinergia, producida por ejemplo por una relación sintrófica que favorecería el crecimiento de aquellas poblaciones capaces de metabolizar un mayor número de nutrientes (Atlas & Bartha 2001). Por lo tanto, las interacciones existentes entre los hongos de la comunidad podrían explicar las diferencias en la abundancia relativa de los hongos, y por consiguiente, de la equidad de la comunidad encontrada con el DGGE.

Los perfiles de DGGE también muestran que se producen cambios en la estructura comunitaria con el tiempo tanto en las comunidades invadidas como en los controles. Esto indica que los cambios en la estructura comunitaria serían producidos por una sucesión microbiana (Fierer y col. 2010), más que por un efecto del invasor. Dentro de esos cambios en la estructura comunitaria, el hongo MR-12, identificado como *Cladosporium cladosporioides*, fue uno de los componentes dominantes en los distintos microcosmos en el tiempo. Este hongo ha sido descrito como una especie muy común, cosmopolita y saprófita,

que actúa como invasor secundario sobre restos necróticos de diferentes plantas (Bensch y col. 2010), siendo uno de los primeros colonizadores en sucesiones sobre ese tipo de sustratos (Frankland 1998).

En ensayos de enfrentamientos en placas, en los que se dispuso a *T. cf. harzianum* creciendo a la par con cada uno de los hongos de la comunidad receptora individualmente, se observó que el invasor poseía una velocidad de crecimiento superior al resto, logrando cubrir, y en algunos casos, reducir a la colonia del otro hongo. Esto se condice con las propiedades de *T. cf. harzianum* de ser un biocontrolador capaz de parasitar a otros hongos (Benítez y col. 2004). Además, los microcosmos fueron suplementados con un medio pobre en nutrientes, lo cual, tomando en cuenta la habilidad competitiva por recursos de *T. cf. harzianum*, también favorecería el éxito del invasor en las comunidades experimentales. Estos antecedentes podrían sugerir que en los ensayos de microcosmos *T. cf. harzianum* además de establecerse en las comunidades podría afectar su estructura compitiendo por los recursos disponibles. Sin embargo, los resultados muestran que aunque, *T. cf. harzianum* logra colonizar y crecer en la comunidad, no afecta la estructura de la comunidad receptora y tampoco logra ser dominante en ellas, manteniéndose siempre con una abundancia relativamente baja. Esto se puede relacionar con el análisis de los perfiles metabólicos de las comunidades. Los resultados obtenidos con el test FF MicroPlate mostraron que las comunidades receptoras diversifican sus perfiles metabólicos ante la presencia de *T. cf. harzianum*, aumentando el

número y nivel de fuentes de carbono del test consumidas, efecto que se hace más notorio a mayores tiempos de incubación.

Esta diversificación del perfil comunitario puede deberse al aporte metabólico de *T. cf. harzianum* al consumo total de las fuentes de carbono disponibles. Sin embargo, este efecto también podría ser causado como parte de una respuesta de la comunidad receptora hacia el invasor, ya que al diversificar su perfil metabólico ésta se hace más competitiva por el consumo de recursos (Mallon y col. 2015). Por otra parte, resultados previos obtenidos a partir de la comparación de los perfiles metabólicos con el test FF MicroPlate de cinco hongos, sugieren que hay una mayor diversidad de utilización de fuentes de carbono cuando se encuentran en comunidad a cuando crecen individualmente, sugiriendo la existencia de sintrofia entre esos hongos (Rojas 2013). Estos resultados se relacionan con el hecho de que los hongos creciendo en comunidad son capaces de establecer interacciones que les permite tener crecimientos diferenciales en comparación a su comportamiento individual, tal como se pudo observar en los perfiles genéticos obtenidos mediante DGGE.

Finalmente, se debe tener en cuenta que existen otros dos factores además de las características bióticas de la comunidad receptora, tales como la presión de propágulos, relacionado con la cantidad de esporas del invasor inoculadas en las comunidades, y también las condiciones abióticas del sistema, los cuales a pesar de no haber sido modificados en el diseño

experimental de este trabajo, también podrían haber influido en el éxito de *T. cf. harzianum*.

4.5. Relación diversidad-invasibilidad

Con el propósito de determinar si existe una relación entre diversidad e invasibilidad, se analizaron los resultados en conjunto utilizando los valores de equidad (J) experimentales obtenidos. Para ello se realizó un análisis de correlación de Pearson entre el nivel de colonización del invasor, correspondiente al número de copias del marcador SCAR, y la equidad genética y metabólica de los microcosmos, calculadas con los datos obtenidos del DGGE y del test FF Microplate. Para esto se usaron los datos recopilados luego de tres días post invasión de los microcosmos. Se encontró una correlación negativa entre la diversidad genética de las comunidades receptoras y la colonización de *T. cf. harzianum*, lo cual se condice con la hipótesis de diversidad-invasibilidad de Elton (1958), que indica que comunidades más diversas son más resistentes a la invasión.

Además, se encontró una correlación positiva entre la diversidad metabólica de las comunidades y la colonización del invasor. Esto indica que las comunidades, al ser invadidas por *T. cf. harzianum*, como respuesta diversifican sus perfiles metabólicos generándose una mayor habilidad competitiva en éstas, razón por la cual *T. cf. harzianum* sería menos exitoso en su colonización. Este resultado también se condice con la hipótesis de diversidad-invasibilidad, ya que uno de los mecanismos centrales detrás de esta

hipótesis, es la competencia por recursos limitantes (Tilman 1999; van Elsas y col. 2012). Además, las comunidades más diversas tienden a cumplir con la complementariedad de nichos, que implica que las comunidades se vuelven más eficientes en el uso de recursos, ya que aumentan su rango de estrategias funcionales y utilizan con más eficiencia una mayor variedad de recursos (Fargione & Tilman 2005). Esto también se relacionaría con la diversificación de los perfiles metabólicos de las comunidades obtenidos del test FF MicroPlate, que explicaría el hecho de que *T. cf. harzianum*, a pesar de establecerse en los microcosmos, no logra afectar mayormente la estructura de las comunidades, ya que éstas logran, producto de la competencia, mantener limitado su crecimiento. Resultados similares fueron obtenidos por De Roy y col. (2013), en el que también se estudió la relación diversidad-invasibilidad modificando la equidad de microcosmos bacterianos. Utilizando un test metabólico similar al usado en este trabajo, se encontró que las comunidades más equitativas presentaban una mayor superposición en el consumo de fuentes de carbono entre la comunidad receptora y el invasor, en comparación a las comunidades con menor equidad donde la invasión resultó favorecida. Esto también indica que el índice de equidad, como componente de la diversidad comunitaria, es un factor clave en la resistencia a las invasiones microbianas (De Roy y col. 2013). Por otra parte, las esporas fúngicas pueden ser clasificadas como esporas nutriente-dependientes o independientes, donde se ha descrito que las dependientes son de menor tamaño y no almacenan una gran cantidad de nutrientes, por lo cual requieren recursos exógenos para su germinación. Las

esporas nutriente-independientes son de mayor tamaño y no requieren recursos exógenos para su germinación. Además, se ha descrito que en fenómenos tales como la fungistasis, que es la resistencia natural de los suelos a la germinación de hongos en ellos producto de la existencia de compuestos antagónicos y de la competencia por recursos limitantes (Lockwood 1977), el tamaño de las esporas fúngicas también es un factor limitante de este proceso. Esporas de menor tamaño como las de hongos del género *Trichoderma*, las cuales son nutriente-dependientes, son más susceptibles a la fungistasis debido a su mayor necesidad de recursos para su germinación (Lockwood 1977).

El mecanismo de competencia podría explicar el hecho de que *T. cf. harzianum* pueda establecerse en los microcosmos pero no afectar la estructura genética de la comunidad receptora. Se ha descrito que *T. cf. harzianum* es capaz de biocontrolar a otros hongos de forma directa por micoparasitismo o de forma indirecta por medio de la competencia por recursos, la cual es más efectiva cuando las esporas de los hongos patógenos necesitan de los recursos exógenos para poder germinar (Blakeman 1993). Sin embargo, en este caso *T. cf. harzianum* se enfrentó a una comunidad ya establecida por lo cual su capacidad competitiva podría verse disminuida.

4.6. Importancia del estudio de las invasiones microbianas

El concepto tradicional de las invasiones biológicas ha implicado un impacto negativo. Esto es debido a que los estudios en invasiones microbianas se han dirigido principalmente a aquellos patógenos causantes de

enfermedades y que tienen efectos notorios a nivel ecológico, económico y social. Entre éstos se tienen por ejemplo a los fitopatógenos, donde se ha estimado que entre el 65-85% de ellos son especies exóticas (Desprez-Loustau y col. 2007). En el caso particular de los hongos, se tiene como ejemplo a especies del género *Phytophthora*, causantes de varias enfermedades en cultivos agrícolas, con graves daños ecológicos y económicos (Birch & Whisson 2001; Hardham 2005). Debido a que los hongos son un componente esencial de los ecosistemas por su biodiversidad y por las funciones que cumplen en ellos, los estudios de invasiones no deberían enfocarse solamente en una fracción de ellos como lo son los patógenos. Sin embargo el impacto que tienen los invasores fúngicos en los ecosistemas, como también el impacto que tienen los invasores sobre las comunidades fúngicas nativas, no han sido extensamente estudiados ni cuantificados, a excepción de los escasos ejemplos de patógenos mencionados. La cuantificación de los impactos de las invasiones en general es difícil debido a la falta de datos ecológicos de referencia sobre los ecosistemas invadidos, lo que en comparación a plantas y animales es especialmente evidente para las comunidades fúngicas de muchos ecosistemas (Desprez-Loustau y col. 2007).

Por otra parte, existen otros casos en que las invasiones microbianas tienen un impacto positivo, como es el caso de los biocontroladores, proceso que también está basado en una invasión biológica (Walsh y col. 2001). Los biocontroladores tienen la capacidad de invadir un ambiente y reducir, gracias a sus propiedades antagónicas, la tasa de crecimiento de los patógenos contra

los que se utilizan (Cunniffe & Gilligan 2011). Entre los hongos biocontroladores destaca el uso de especies del ya mencionado género *Trichoderma* y también *Gliocladium*, los que tienen la capacidad de colonizar y reducir la población de fitopatógenos fúngicos (Papavizas 1985). Otros casos de invasiones microbianas con impacto positivo son la micorrización y la bioaumentación utilizada en procesos de biorremediación de compuestos contaminantes, ya que en ambos casos los microorganismos inoculados deben resistir a diferentes condiciones ambientales y sobrevivir en presencia de otros microorganismos (Menge 1983; Mrozik & Piotrowska-Seget 2010).

De este modo, tener un mejor conocimiento de los factores detrás de las invasiones biológicas, con el caso particular de los hongos, sería de gran importancia tanto para entender e intentar prevenir sus potenciales impactos negativos, como también, para intentar mejorar aquellos procesos beneficiosos en los cuales la invasión pueda estar involucrada. Además, los estudios en invasiones fúngicas pueden aportar conocimiento de aspectos relevantes de las invasiones biológicas en general.

5. CONCLUSIONES

El invasor *T. cf. harzianum* es capaz de establecerse y aumentar su población en todos los tipos de comunidades fúngicas receptoras diseñadas en este trabajo.

T. cf. harzianum no afecta mayormente la estructura genética de los distintos tipos de comunidades receptoras. Además, las comunidades no conservaron el índice de equidad con el que fueron construidas, a causa de las interacciones existentes entre sus hongos constituyentes.

El perfil metabólico de las comunidades fue modificado como efecto de la presencia de *T. cf. harzianum*, encontrando que las comunidades invadidas diversificaron su consumo de las fuentes de carbono disponibles.

Se encontró una correlación negativa entre la colonización del invasor *T. cf. harzianum* y la diversidad genética de las comunidades, y una correlación positiva con la diversidad metabólica. Estos resultados apoyan la hipótesis de diversidad-invasibilidad de Elton abordada en este trabajo, siendo la competencia por recursos el factor que explicaría la relación negativa entre la invasibilidad y la diversidad de las comunidades.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alpert P., Bone E., Holzappel C. (2000). Invasiveness, invasibility and the role of environmental stress in the spread of non-native plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3: 52-66.
- Atlas R., Bartha R. (2001). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Cuarta edición. Editorial Pearson Educación, S.A. Madrid.
- Bardgett R., Freeman C., Ostle N. (2008). Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 2: 805-814.
- Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C., Codón A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Bensch K., Groenewald J.Z., Dijksterhuis J., Starink-Willemse M., Andersen B., Summerell B., Shin H., Dugan F., Schroers H., Braun U., Crous, P.W. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology* 67: 1-94.
- Birch P.R.J. Whisson, S.C. (2001). *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Molecular Plant Pathology* 2: 257-263.
- Blakeman J.P. (1993). Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathology* 42: 479-493.
- Bonanomi G., Capodilupo M., Incerti G, Gaglione S., Scala F. (2014). Fungal diversity increases soil fungistasis and resistance to microbial invasion by a non-resident species. *Biological Control* 72: 38-45.
- Bonanomi G., Capodilupo M., Incerti G., Gaglione S., Scala F. (2014). Fungal diversity increases soil fungistasis and resistance to microbial invasion by a non resident species. *Biological Control* 72: 38-45.
- Callaway R.M., Newingham B., Zabinski C.A., Mahall B.E. (2001). Compensatory growth and competitive ability of an invasive weed are enhanced by soil fungi and native neighbors. *Ecological Letters* 4: 1-5.
- Callaway R.M., Ridenour W.M. (2004). Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2: 436-443.
- Carpenter S. (1996). Microcosm experiments have limited relevance for community ecosystem ecology. *Ecology* 77: 677-680.

- Castillo, P. (2009). Aislamiento e identificación de cepas de *Trichoderma* sp. nativas de Chile. Evaluación de antagonismo in vitro contra *Botrytis* sp. Tesis de Biólogo. Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- Catford J.A., Jansson R., Nilsson C. (2009). Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. *Diversity and Distributions* 15: 22-40.
- Chapin F., Zavaleta E., Eviner V., Naylor R., Vitousek P., Reynolds H., Hooper D., Lavorel S., Sala O., Hobbie S., Mack M., Díaz S. (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405: 234-242.
- Chet I., Inbar J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48: 37-43.
- Colautti, R.I., MacIsaac, H.J. (2004). A neutral terminology to define 'invasive' species. *Diversity and Distributions*, 10: 134-141.
- Collins S., Sinsabaugh R., Crenshaw C., Green L., Porrás-Alfaro A., Stursova M., Zeglin L. (2008). Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. *Journal of Ecology* 96: 413-420.
- Cunniffe N.J., Gilligan C.A. (2011). A theoretical framework for biological control of soil-borne plant pathogens: Identifying effective strategies. *Journal of Theoretical Biology* 278: 32-43.
- Davis M.A., Grime J.P. Thompson K. (2000). Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *Journal of Ecology* 88: 528-534.
- Delgado-Jarana J., Moreno-Mateos M. Á., Benítez T. (2003). Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of gtt1. *Eukaryotic Cell* 2: 708-717.
- De Roy K., Marzorati M., Van den Abbeele P., Van de Wiele T., Boon N. (2014). Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environmental microbiology*, 16: 1472-1481.
- De Roy K., Marzorati M., Negróni A., Thas O., Ballo A., Fava F., Verstraete W., Daffonchio D., Boon N. (2013). Environmental conditions and community evenness determine the outcome of biological invasion. *Nature Communications*, 4: 1383.
- Desprez-Loustau M.L., Courtecuisse R., Robin C., Husson C., Moreau P.A., Blancard D., Selosse M.A. (2010). Species diversity and drivers of spread of alien fungi (sensu lato) in Europe with a particular focus on France. *Biological Invasions* 12: 157-172.
- Desprez-Loustau M.L., Robin C., Buée M., Courtecuisse R., Garbaye J., Suffert F., Satche I., Rizzo D. (2007). The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 472-480.

- Dillon R.J., Vennard C.T., Buckling A., Charnley A.K. (2005). Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters* 8: 1291-1298.
- Dobranic J., Zak J. (1999). A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. *Microbiology Ecology* 42: 1-14.
- Druzhinina I.S., Seild-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* 9: 749-759.
- Dukes J.S. (2002). Species composition and diversity affect grassland susceptibility and response to invasion. *Ecological Applications* 12: 602-617.
- Elad Y., Chet I., Katan J. (1980). *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119-121.
- Elton C.S. (1958). *The ecology of invasions by animals and plants*. Methuen, London.
- Fargione J. E., Tilman D. (2005). Diversity decreases invasion via both sampling and complementarity effects. *Ecology Letters* 8: 604-611.
- Fierer N., Nemergut D., Knight R., Craine J.M. (2010). Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology* 161: 635-642.
- Finlay B.J. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061-1063.
- Frankland J.C. (1998). Fungal succession-unravelling the unpredictable. *Mycological Research*, 102: 1-15.
- Galil B.S. (2007) Loss or gain? Invasive aliens and biodiversity in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 55: 314-322
- Garland J.L. (1999). Potential and limitations of BIOLOG for microbial community analysis. *En: Microbial biosystems: New frontiers. proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology* (pp. 1-7). Halifax: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.
- Gause G. (1934). *The struggle for existence*. Dover, New York, NY.
- Govindarajulu M., Pfeffer P., Jin H., Abubaker J., Douuds D., Allen J., Bücking H., Lammers P., Shachar-Hill Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819-823.
- Granado C. (2007). *Avances en ecología: hacia un mejor conocimiento de la naturaleza*. Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

- Green L., Porras-Alfaro A., Sinsabaugh R. (2008). Translocation of nitrogen and carbon integrates biotic crust and grass production in desert grassland. *Journal of Ecology* 96: 1076-1085.
- Green, J.L., Bohannan, B.J., Whitaker, R.J. (2008). Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* 320: 1039-1043.
- Green, S.J., Leigh, M.B. and Neufeld, J.D. (2010). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. *En: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. (Timmis K., Ed.), Springer: Berlin, Heidelberg. pp 4137-4158.
- Hammer Ø, Harper D, y Ryan P. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontology Electronica* 4: 9.
- Hanson C.A., Fuhrman J.A., Horner-Devine M.C., Martiny J.B. (2012). Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology*, 10: 497-506.
- Hardham A.R. (2005). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6: 589-604.
- Harman G. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194.
- Harrison M., Van Buuren M. (1995). A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626-629.
- Hawksworth D. (2012). Integrating morphological and molecular data in fungal systematics. *En: Systematics and evolution of fungi* (Misra J., Tewari J., Deshmukh S.). Science Publishers. USA.
- Hawksworth D. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432.
- Hector A., Dobson K., Minns A., Bazeley-White E., Lawton J.H. (2001). Community diversity and invasion resistance: An experimental test in a grassland ecosystem and a review of comparable studies. *Ecological Research* 16: 819-831.
- Hodgson D.J., Rainey P.B., Buckling A. (2002). Mechanisms linking diversity, productivity and invasibility in experimental bacterial communities. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269: 2277-2283.
- Hood W.G., Naiman R.J. (2000). Vulnerability of riparian zones to invasion by exotic vascular plants. *Plant Ecology* 148: 105-114.
- Jessup C., Forde S., Bohannan B. (2005). Microbial experimental systems in Ecology. *Advances in Ecological Research* 37: 273-300.

- Jessup C., Kassen R., Forde S., Kerr B., Buckling A., Rainey P., Bohannan J. (2004). Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 189-197.
- Jessup C., Forde S., Bohannan B. (2005). Microbial experimental systems in Ecology. *Advances in Ecological Research* 37: 273-300.
- Jiang L., Morin P.J. (2004). Productivity gradients cause positive diversity-invasibility relationships in microbial communities. *Ecology Letters* 7: 1047-1057.
- Jules E.S., Kauffman M.J., Ritts W.D., Carroll A.L. (2002). Spread of an invasive pathogen over a variable landscape: a nonnative root rot on Port Orford cedar. *Ecology* 83: 3167-3181.
- Knudsen G. R., Dandurand, L. M. (2014). Ecological complexity and the success of fungal biological control agents. *Advances in Agriculture* 542703:1-11.
- Kourtev P.S., Ehrenfeld J.G., Håggblom M. (2002). Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology* 83: 3152-3166.
- Kubicek C., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C., Szakacs G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian Fungal Genetics and Biology 38: 310-319.
- Leroy F., De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 67-78.
- Lawton J.H. (1995). Ecological experiments with model systems. *Science* 269: 328-331.
- Lockwood J. L. (1977). Fungistasis in soils. *Biological Reviews* 52: 1-43.
- Lockwood J.L., Cassey P. Blackburn T. (2005). The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 223-228.
- Lowry E., Rollinson E.J., Laybourn A.J., Scott T.E., Aiello-Lammens M.E., Gray S.M., Mickley J., Gurevitch, J. (2013). Biological invasions: a field synopsis, systematic review, and database of the literature. *Ecology and evolution* 3: 182-196.
- Marinach-Patrice C., Lethuillier A., Marly A., Brossas J., Gené J., Symoens F., Datry A., Guarro J., Mazier D., Hennequin C. (2009). Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 634-642.
- Mallon C. A., van Elsas J. D., Salles J. F. (2015). Microbial Invasions: The Process, Patterns, and Mechanisms. *Trends in microbiology*, 23: 719-729.

- Matos A., Kerkhof, L., Garland, J. L. (2005). Effects of microbial community diversity on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the wheat rhizosphere. *Microbial Ecology* 49: 257-264.
- Mattingly W., Hewlate R., Reynolds H. (2007). Species evenness and invasion resistance of experimental grassland communities. *Oikos* 116: 1164-1170.
- May L.A., Smiley B., Schmidt M.G. (2001). Comparative denaturing gradient gel electrophoresis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 829-841.
- Mc Laughlin D., Hibbett D., Lutzoni F., Spatafora J., Vilgalys R. (2009). The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology* 17: 488-497.
- Menge, J.A. (1983). Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. *Canadian Journal of Botany* 61: 1015-1024.
- Mitchell C.E., Power A.G. (2003). Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature* 421: 625-628.
- Mitchell, C.E., Agrawal, A.A., Bever, J.D., Gilbert, G.S., Hufbauer, R.A., Klironomos, J.N., Maron, J.L., Morris, W.F., Parker, I.M., Power, A.G., Seabloom, E.W., Torchin, M.E., Vázquez, D.P. (2006). Biotic interactions and plant invasions. *Ecology Letters* 9: 726-740.
- Mooney HA, Hobbs R. (2000). *Invasive species in a changing world*. Island Press, Washington.
- Morales C., Verdejo V., Orlando J., M. Carú. 2016. Testing Darwin's naturalization hypothesis in fungal experimental communities. *Research in Microbiology* 167:126-132.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research* 165: 363-375.
- Nikolcheva, L., Bourque T., Barlocher F. (2005). Fungal diversity during initial stages of leaf decomposition in a stream. *Mycological Research* 109: 246-253.
- Niwa S., Iwano H., Asada S., Matsumura M., Goka K. (2004). A microsporidian pathogen isolated from a colony of the European bumblebee, *Bombus terrestris*, and infectivity on Japanese bumblebee. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 48: 60-64.
- Orlando J., Rojas E., Farías F., Munoz R., Carú M. (2015). Fungal diversity in a semiarid soil from the Chilean matorral assessed by culture dependent and independent approaches. *Manuscrito enviado a Journal of Arid Environments*.
- Papaspyridi L., Katapodis P., Gonou-Zagou Z., Kapsanaki-Gotsi E., Christakopoulos P. (2010). Optimization of biomass production with

- enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal* 50: 131-138.
- Papavizas G.C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54.
- Pielou E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* 13: 131-144.
- Pejchar L., Mooney H.A. (2009). Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 497-504.
- Pérez G, Verdejo V, Godim-Porto C, Orlando J, Carú M. (2014). Designing a SCAR molecular marker for monitoring *Trichoderma cf. harzianum* in experimental communities. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 15: 966-978.
- Piontelli-Laforet E. (2011). Manual de microhongos filamentosos comunes I. Editado por El autor. Valparaíso, Chile.
- Pokorny M.L., Sheley R.L., Zabinski C.A., Engel R.E., Svejcar T.J., Borkowski J.J. (2005). Plant functional group diversity as a mechanism for invasion resistance. *Restoration Ecology* 13: 448-459.
- Pyšek P., Richardson D.M., Pergl J., Jarošík V., Sixtovà Z., Weber E. (2008). Geographical and taxonomic biases in invasion ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 237-244.
- Reis Almeida F.B., Cerqueira F.M., do Nascimento Silva R., Ulhoa, C.J., Lima A.L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 29: 1189-1193.
- Richardson D.M., Allsopp N., D'Antonio C.M., Milton S.J., Rejmánek M. (2000). Plant invasions - the role of mutualisms. *Biological Reviews* 75: 65-93.
- Richardson, D.M., Pysek, P., Rejmánek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D., West, C.J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* 6: 93 -107.
- Rojas, E. (2013). Isolation and identification of fungi from a semiarid soil for the construction of experimental fungal communities. Thesis, Universidad de Chile, Chile.
- Schlaepfer M.A., Sax D. F., Olden J. D. (2011). The potential conservation value of nonnative species. *Conservation Biology* 25: 428-437.
- Shannon, C., Weaver W. (1963). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

- Sher A., Hyatt L.A. (1999). The disturbed resource-flux invasion matrix: a new framework for patterns of plant invasion. *Biological Invasions* 1: 107-114.
- Simberloff D, Martin J.L., Genovesi P., Maris V., Wardle D.A., Aronson J., Courchamp F., Galil B., Garcia-Berthou E., Pascal M., Pysek P., Ronaldo S., Tabacchi E., Vilà M. (2013). Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution* 28: 58-66.
- Sousa R., Morais P., Dias E., Antunes C. (2011). Biological invasions and ecosystem functioning: time to merge. *Biological Invasions* 13: 1055-1058.
- Souza V., Eguiarte L.E., Siefert J., Elser J.J. (2008). Microbial endemism: does phosphorus limitation enhance speciation? *Journal of Ecology* 96: 1076-1085.
- Stainer R., Ingraham J., Wheelis M., Painter R. (1992). *Microbiología*. Segunda edición. Editorial Reverté. Barcelona, España.
- Tilman D. (1982). Resource competition and community structure. *Monographs in Population Biology*, Princeton University Press, Princeton; New Jersey, USA.
- Tilman D. (1999). The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology* 80: 1455-1474.
- van der Heijden M.G.A., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 72-75.
- Van der Putten W.H., Klironomos J.N., Wardle D.A. (2007). Microbial ecology of biological invasions. *The ISME Journal* 1: 28-37.
- van Elsas J.D., Chiurazzi M., Mallon C.A., Elhottová D., Křišťůfek V., Salles J. F. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 1159-1164.
- Vitousek P.M., Walker L.R. (1989). Biological invasion by *Myrica faya* in Hawaii - plant demography, nitrogen fixation, ecosystem effects. *Ecological Monographs* 59: 247-265.
- Vogel T. M. (1996). Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 311-316.
- Walsh, U. F., Morrissey, J. P., & O'Gara, F. (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 289-295.
- Wardle D., Parkinson D., Waller J. (1993). Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia* 94: 165-172.

- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *En: PCR protocols: a guide to methods and applications.* (Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T.; Eds.), Academic Press, New York, USA, p.315-322.
- Williams J., Clarkson J. M., Mills P. R., Cooper, R. M. (2003). Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4192-4199.
- Wilson J.R.U., Richardson D.M., Rouget M., Proche S., Amis M.A., Henderson L., Thuiller W. (2007). Residence time and potential range: crucial considerations in modelling plant invasions. *Diversity and Distributions* 13: 11-22.
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos P., Verstraete W., Boon, N. (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 458: 623-626.
- Zwietering M., Jongenburger J., Rombouts F., van't Riet K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1875-1881.

ANEXO

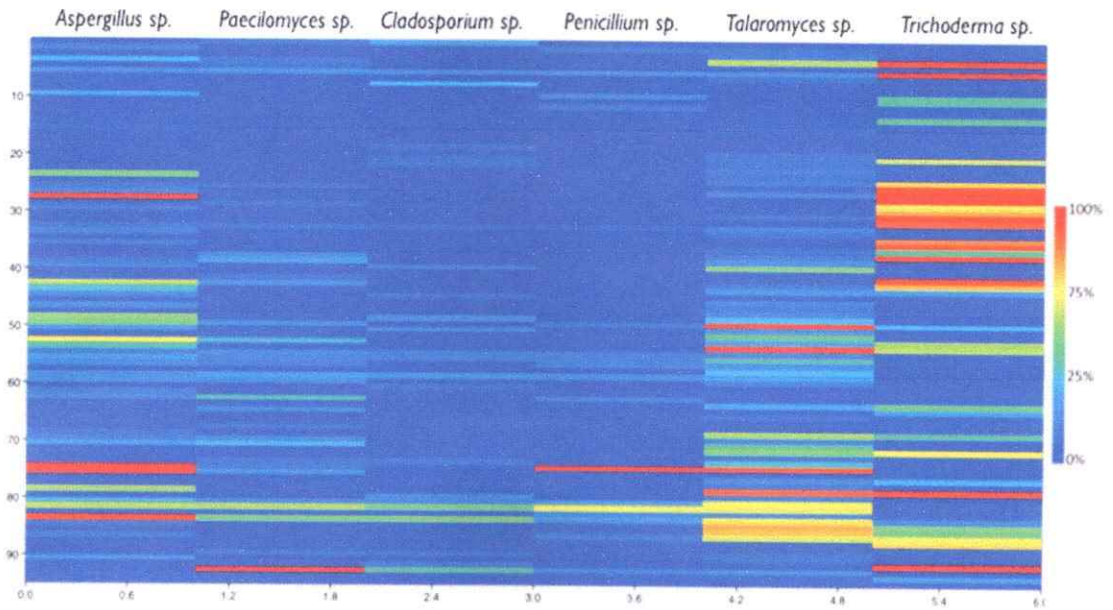


Figura A1. Heatmap basado en los perfiles metabólicos de los aislados fúngicos incluyendo al invasor *Trichoderma cf. harzianum* obtenidos con el test FF MicroPlate. El nivel máximo de la escala representa todos los valores de absorbancia obtenidos del test FF MicroPlate mayores o iguales a 0,8.

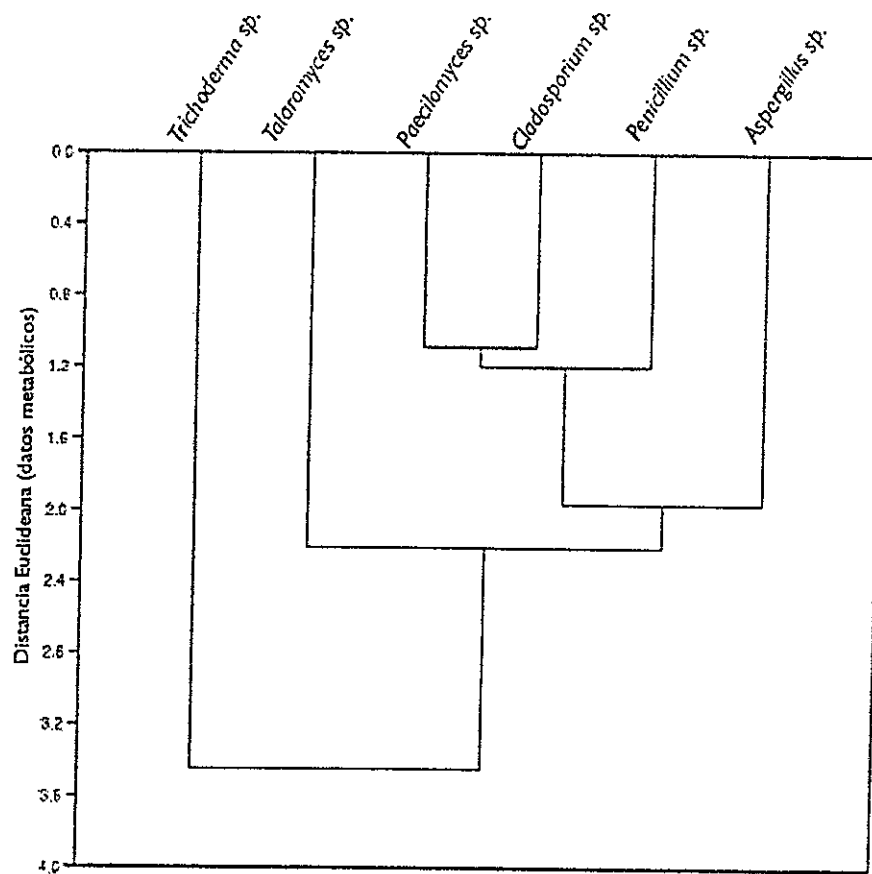


Figura A2. Análisis de agrupamiento de los perfiles metabólicos obtenidos con el test FF MicroPlate de los hongos aislados, incluyendo *Trichoderma* cf. *harzianum*, basado en la distancia Euclídeana.