

UCH-FC  
DOC-EBE  
D687  
C. 1

**DETERMINANTES HISTORICAS Y ECOLOGICAS  
EN LA ESTRUCTURACION DE COMUNIDADES  
FUNGICAS: UNA APROXIMACION  
EXPERIMENTAL**

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ecología y Biología Evolutiva**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Eduardo Patricio Donoso Cuevas**

**Septiembre, 2016**

**Director de Tesis Dr: Ramiro Bustamante  
Dra: Margarita Carú**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Eduardo Patricio Donoso Cuevas

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 12 de mayo de 2016

Director de Tesis:  
Dr. Ramiro Bustamante



Co-Director de Tesis  
Dra. Margarita Carú



Comisión de Evaluación de la Tesis

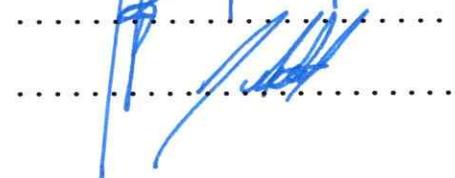
Dr. Marco Méndez



Dr. Bernardo González



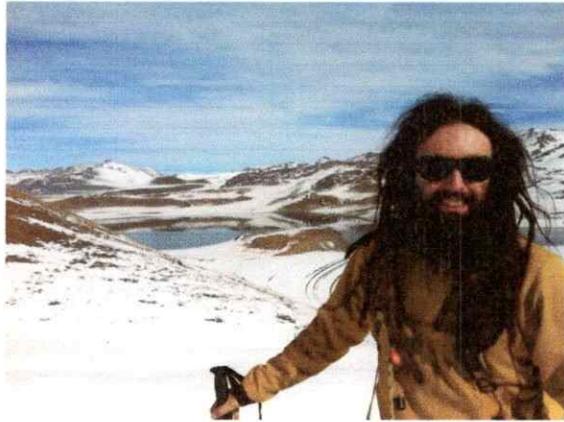
Dr. José Miguel Fariña



**DEDICATORIA: A Marce, Luciano, Nahuel, Rebe y Borja.**

*Life improves the capacity of the environment to sustain life. Life makes needed nutrients more readily available. It binds more energy into the system through the tremendous chemical interplay from organism to organism.*

*Frank Herbert*



### Eduardo Donoso

Nacido en Quillota en 1974 Agrónomo de la Universidad de Talca, donde se desempeña como investigador hasta el año 2008, para luego continuar como docente de la Universidad Católica del Maule, en la cátedra de fitopatología. Posterior a eso asume el cargo de Director de Investigación y Desarrollo de Bio Insumos Nativa SPA, empresa de la que es socio fundador, la que se constituye en el año 2002.

Desde 1998 a la fecha se ha dedicado a la investigación y desarrollo de control biológico en base a microorganismos, generando 7 productos comerciales, varias publicaciones científicas y de difusión técnica, así como capítulos de libro relacionados tanto al control biológico como a procesos de innovación y cuenta con patentes adjudicadas y en solicitud.

## **AGRADECIMIENTOS**

En este trabajo debo agradecer a los profesores del programa, Ramiro Bustamante y Margarita Caru por su constante apoyo y paciencia. A Bio Insumos Nativa, por el financiamiento de la tesis y uso de Laboratorios.

## INDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE MATERIAS	4
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	6
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
LITERATURA CITADA	14
DIVERSIDAD DE HONGOS DEL GENERO <i>TRICHODERMA</i> (HYPHOMYCETES) EN CHILE	16
RESUMEN EN ESPAÑOL	16
RESUMEN EN INGLÉS	18
INTRODUCCIÓN	19
MATERIALES Y METODOS	22
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFIA	35
ANEXO 1	35
DETERMINANTES HISTÓRICAS Y ECOLÓGICAS EN LA ESTRUCTURACIÓN DE COMUNIDADES FÚNGICAS: UNA APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL	43
RESUMEN	43
ABSTRACT	45
INTRODUCCIÓN	47
MÉTODOS	48
RESULTADOS	55
DISCUSIÓN	62
LITERATURA CITADA	68
ANEXO 2	71
ANEXO 3	72
DISCUSIÓN GENERAL	73
BIBLIOGRAFIA	75

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Abundancia (Número de cepas por punto de colecta), riqueza de especies, índices de diversidad (ecológica y filogenética) e índice de estructura filogenética comunitaria NRI (Nearest Relatedness Index), para cada uno de los puntos de colecta y el global de Chile.	28
Tabla 2 Efecto de grado de parentesco y la disponibilidad de recursos sobre la intensidad de la competencia difusa presente en las comunidades experimentales de <i>Trichoderma</i> , en un ensayo de microcosmos.	58
Tabla 3.- Efecto de grado de parentesco y la disponibilidad de recursos sobre la diversidad (Índice de Simpson) en comunidades de <i>Trichoderma</i> , en un ensayo de microcosmos	59
Tabla 4 Efecto de grado de parentesco y la disponibilidad de recursos sobre los cambios en el grado de parentesco en comunidades de <i>Trichoderma</i> , en un ensayo de microcosmos	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre similitud y evolución de rasgos y estructura filogenética de las comunidades.	10
Figura 2: Puntos de colecta de cepas del hongo <i>Trichoderma spp.</i> desde distintos puntos de Chile y Antártica.	27
Fig. 3: Correlaciones significativas, ajustadas según test parcial de Mantel: a) Riqueza de especies vs Temperatura; b) Abundancia versus temperatura.	29
Figura 4 Disposición de cepas, en placa de Petri y cultivo de controles.	53
Figura 5. Reconstrucción filogenética de las especies de <i>Trichoderma</i> y caracteres asociados a habilidad competitiva: Sustancias Difusibles (Dif.), micoparasitismo (Mic) y Jerarquía competitiva (porcentaje de inhibición que ejerce la especie sobre las otras especies, en experimentos binarios.	57
Figura 6: Efecto del grado de parentesco y riqueza de recursos sobre la intensidad de la competencia difusa en comunidades de hongos del género <i>Trichoderma</i> , en condiciones de microcosmos. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas.	58
Figura 7: Efecto del grado de parentesco y la disponibilidad de recursos sobre la diversidad (Índice de Simpson) de comunidades de <i>Trichoderma</i> , en condiciones de microcosmos.	59
Figura 8: Efecto del grado de parentesco y la disponibilidad de recursos, sobre los cambios en la estructura filogenética medido como el índice de parentesco neto (NRI), en comunidades del género <i>Trichoderma</i> , en condiciones de microcosmos.	61

## INTRODUCCION GENERAL

Las comunidades ecológicas se estructuran de acuerdo a procesos bióticos y abióticos que operan sobre una amplia gama de escalas espaciales (Ricklefs 2006; Hubbell 2001; Vellend 2010; HilleRisLambers et al. 2012). Las Inferencias con respecto a estos diferentes procesos (dispersión, competencia interespecífica, especiación) y en particular la importancia relativa de cada uno de ellos, se basan en la comparación de los patrones observados respecto a un modelo nulo en el cual la conformación de las comunidades ocurriría al azar tanto en la composición de las especies, como los rasgos funcionales que ellas poseen (Connor & Simberloff 1979; Gotelli & Graves 1996).

Darwin (1859) propuso una de las primeras hipótesis sobre la importancia de la competencia, como mecanismo estructurador de comunidades, afirmando que esta interacción es mayor entre especies estrechamente emparentadas, respecto a especies más distantemente emparentadas. Esta idea, que llamamos la hipótesis filogenética de similitud limitante (HFSL), se basa en la suposición de que sus parientes cercanos tendrían nichos similares, (Wiens & Graham, 2005; Losos 2008; Wiens et al. 2010) y que una mayor similitud de nicho entre especies se traduciría en una mayor frecuencia de exclusión competitiva. Esta idea ha tenido un impacto muy relevante en diferentes concepciones de lo que son actualmente las comunidades, desde una visión holista (Clements 1916) en que el factor histórico es muy importante hasta la visión gleasoniana, en que el componente histórico no tiene ninguna importancia y más bien es la contingencia ecológica la que determinaría la estructura de las comunidades (Gleason 1926).

Con la creciente disponibilidad de información filogenética ha habido un renacimiento del interés en la comprensión de las dimensiones evolutivas de procesos que estructuran las comunidades. De hecho, con las herramientas moleculares, actualmente es posible evaluar la estructura filogenética de cualquiera comunidad ecológica y por lo tanto tener una idea del grado de parentesco de las especies

componentes. Webb y colaboradores (2002) proporcionaron un nuevo marco conceptual (Ecología filogenética de Comunidades, EFC) en el que se utiliza, información filogenética para estudiar las fuerzas subyacentes a los patrones de diversidad biológica, lo que ha aumentado considerablemente nuestro conocimiento de las comunidades, de plantas y animales (Webb, 2000; Emerson & Gillespie, 2008; Cavender-Bares et al., 2006; B. Vamosi et al., 2009), y de microorganismos (Martin, 2002; Horner-Devine & Bohannan, 2006; Maherali & Klironomos 2007; Bryant et al., 2008; Auguet et al., 2010). Este marco utiliza la información sobre parentesco que se deriva de árboles filogenéticos y asume que el parentesco filogenético, se correlaciona con similitud ecológica de acuerdo con las premisas darwinianas. La comparación de la estructura filogenética observada, de una comunidad natural se hace respecto de comunidades generadas al azar, desde un pool regional de especies, pudiendo así separar el efecto relativo de los factores evolutivos y ecológicos que conforman las comunidades (Webb et al., 2002; Kembel & Hubbell, 2006; Cavender-Bares et al., 2006). Así, se han implementado enfoques filogenéticos para examinar varios aspectos de la ecología, tales como la distribución espacial de la diversidad filogenética (Morlon et al., 2010), la sucesión de especies invasoras en una comunidad (Cadotte et al., 2009) y los patrones de diversidad altitudinal (Bryant et al., 2008; Graham et al., 2009).

La hipótesis de Darwin ha ocupado un lugar central en el campo de la Ecología filogenética de las Comunidades; sirviendo de base para los estudios sobre las consecuencia de competencia, la exclusión competitiva de especies estrechamente emparentadas, daría lugar a una mayor frecuencia de comunidades ecológicas, con estructura filogenética sobredispersa (i.e. comunidades con una distancia o parentesco filogenético medio, menor a lo esperado por azar), un patrón que ha sido descrito ya en comunidades naturales (Cavender-Bares et al. 2009; B. Vamosi et al. de 2009). Sin embargo, también es frecuente observar el patrón opuesto a la sobre dispersión, o sea una agregación filogenética (comunidades con una distancia filogenética media, entre sus miembros, mayor a lo esperado por azar), (Cavender-Bares et al. 2009; B. Vamosi et al. 2009). Así, es difícil obtener conclusiones definitivas sobre la competencia basada en patrones de la dispersión filogenética observada en comunidades naturales, donde una variedad de factores podría confundir la relación entre parentesco y competencia. Experimentos que manipulan directamente las

relaciones filogenéticas de especies competidoras ofrecen el mejor enfoque, para comprobar si la competencia da lugar a cambios significativos en los patrones filogenéticos, pero hasta ahora esos experimentos han sido poco frecuentes (Pausas y Verdu, 2010)

Otro aspecto del marco teórico de la EFC, es la distribución de los rasgos funcionales relevantes para la competencia. Que se desprende de una visión filogenética de la hipótesis de Darwin, estos rasgos deberían ser conservados es decir, tener una fuerte señal filogenética (Prinzing et al. 2001; Wiens and Graham 2005); sin embargo, estos rasgos pueden evolucionar en forma convergente, divergente o azarosa dentro de las comunidades aun cuando exista competencia intensa (Blomberg et al 2003; Silvertown et al. 2006).

Existen dos fuerzas ecológicas que generan expectativas opuestas, acerca de la distribución de rasgos, dentro de una comunidad. Si el filtrado ambiental domina, la co-existencia de especies que compartan el mismo ambiente abiótico, deberían ser más similares en rasgos que lo esperado por azar (agregación de rasgos). Si la competencia domina, las especies co-existentes deberían ser menos parecidas a lo esperado por azar (sobredispersión de rasgos).

Cual fuerza ecológica puede ser utilizada para explicar una estructura filogenética observada, dependerá de la evolución de los rasgos relacionados: si son conservados (con señal filogenética) o convergentes (seleccionados por el ambiente). Así, en una comunidad que muestra una sobredispersión filogenética, las interacciones de competencia deberían causar la sobredispersión de rasgos conservados o el filtrado ambiental debería causar la agregación de los rasgos convergentes (Figura 1).

		Similitud de rasgos dentro de una comunidad	
		Agregación de rasgos (Generado por filtrado ambiental)	Sobredispersión de rasgos (Generado por competencia)
Evolución de los rasgos	Conservado	Agregación Filogenética	Sobredispersión Filogenética
	Convergente	Sobredispersión Filogenética	Agregación Filogenética o dispersión al azar

Figura 1. Relación entre similitud y evolución de rasgos y estructura filogenética de las comunidades. Relationship between similarity and character evolution, and community phylogenetic structure. (Tomado de Webb et al. 2002)

El uso apropiado de la información sobre la estructura filogenética de las comunidades, requiere una definición explícita de los niveles taxonómicos y escalas biogeográficas, así varios estudios han demostrado que aumentando las escalas espacial o taxonómica de los linajes, conduce a una mayor heterogeneidad ambiental y en consecuencia a una mayor importancia relativa del filtrado ambiental (es decir el ambiente va a seleccionar en una comunidad, especies con requerimientos ecológicas similares) en la estructuración de las comunidades, respecto a las interacciones biológicas (Cavender-Bares et al. 2006, 2009, Kraft et al. 2007, Emerson y Gillespie 2008, Vamosi et al. 2009)

Donde la mayor parte de los estudios muestra debilidades, es generar inferencias sobre los efectos de las interacciones biológica, en la conformación de las comunidades, en base a evidencias de exclusión competitiva y no en la medición directa de la competencia (Cavender-Bares et al. 2009; Solivieres et al. 2011), otro aspecto donde existe un vacío es la implicancia que tendrían cambios generados en las interacciones al existir gradientes ambientales, como en los estudio de Solivieres et

al. (2011), donde se observó que a medida que se generan ambientes más limitantes, las interacciones entre plantas pueden pasar de competencia a facilitación, pero sin tener evidencia cuantificable de estas interacciones, no existiendo información de otros cambios en las interacciones como serían el paso de simbioses a patógeno, como es el caso de hongos del género *Armillaria* (Agrios, 2005) o de competidores a depredador presa, en el caso de hongos del género *Trichoderma* (Cook & Baker, 1989). No existe un marco teórico que nos oriente cómo este cambio en el signo y naturaleza de las interacciones biológicas se expresa en la estructura filogenética de las comunidades.

Así, existirán comunidades en que el componente ecológico resulta mucho más importante que el histórico, como es el caso de comunidades que se organizan fundamentalmente por especies exóticas (Hobbs et al. 2009) y, por otro lado, existirán comunidades que, en función de procesos de diferenciación evolutiva local y escasa colonización desde un pool de especies regional, el componente histórico será más importante. Ambos factores, deben ser evaluados empíricamente y al menos en microorganismos una aproximación experimental de microcosmos resulta ser muy útil para dilucidar la importancia de estos factores

Varios autores han indicado que los microorganismos presentan importantes ventajas, para la puesta a prueba de estas hipótesis dado que las escalas tanto espaciales como temporales de los microorganismos son explícitas y fácilmente manejables en laboratorio (Maherali and Klironomos 20122007.), así como la posibilidad de excluir procesos estocásticos y de dispersión y colonización diferencial que también pueden ser importantes en la estructura de las comunidades (Horner-Devine and Bohannan 2006). Por otro lado, en hongos de vida libre, como los pertenecientes al género *Trichoderma*, son interesantes pues además de cumplir con diversas funciones ecológicas: simbioses de plantas (Harman et al., 2004), endófitos (Wilberforce et al., 2003), y parásitos de otros hongos, sus mecanismos en los que ejercen competencia, son ampliamente conocidos (Harman, 2004) y además las condiciones ambientales abióticas que definen su nicho (Eastburn and Butler 1988; Harman 2000)

Pese a su importancia, el estudio de los factores que afectan la diversidad de hongos, es un tema poco tratado. Las causas que estructuran estas comunidades pueden ser

diversas. Para comunidades microbianas en general, se plantean que, si no hay limitaciones a la dispersión, el ensamble de especies, que se estructura en una localidad determinada, será función directa, del pool de especies disponibles (Papke and Ward, 2004). En segundo lugar, existirían diversos filtros ambientales que seleccionarían las especies, capaces de sobrevivir y reproducirse en una localidad determinada (Keddy, 1999). Siendo importante entonces considerar en las comunidades naturales, como las limitaciones a la dispersión definen los patrones de distribución biogeográfica en muchos grupos de microorganismos, como son bacterias, hongos y micro eucariotas (Taylor et al. 2006; Fierer 2008; Peay et al. 2010), en oposición a lo que para microorganismos tradicionalmente se aceptaba el paradigma de "todo está en todas partes y el ambiente selecciona (de Wit & Bouvier, 2006).

La hipótesis básica de esta tesis doctoral es que la estructura de las comunidades obedece tanto a factores ecológicos (contingencia) e históricos (filogenia). Será clave en este caso, evaluar la importancia relativa de cada uno de estos factores. Si bien estudios comparativos de campo permiten identificar los patrones de estructuración comunitario, a lo más es posible inferir los mecanismos. Una aproximación de experimento manipulativo permitirá dilucidar la importancia relativa de los factores históricos y ecológicos.

En primer lugar, con el fin de determinar cómo la variación ambiental de gran escala conforma la estructura de estas comunidades realizamos un estudio comparativo de campo de la estructuración de comunidades de hongos del género *Trichoderma*, en varios ambientes de Chile (desde los 18° hasta los 70° S). Las comunidades fueron estudiadas en términos de su composición de especies, diversidad filogenética, y las variables climáticas que se relacionan con estos atributos de las comunidades, buscando establecer la existencia de patrones relevantes en la conformación de las comunidades, asociado a condiciones ambientales.

En segundo lugar, en base a los antecedentes generados en la primera parte de este estudio, se realizó un experimento *in vitro* manipulativo generando ensambles de los hongos obtenidos desde el primer estudio, para determinar en qué medida el grado de parentesco y la disponibilidad de recursos, afectan la estructura de las comunidades.

Para ello, se trabajó con aislados de hongos del genero *Trichoderma* con los que se construyeron ensambles de estos aislados experimentales que poseían diferentes grados de parentesco filogenético y que estén sometidos a diferentes niveles de recursos. Se evaluó en forma cuantitativa la intensidad de la competencia, los cambios en diversidad, y los cambios en los grados de parentesco de las especies. Esperando que las comunidades más emparentadas tiendan a competir más intensamente, que las menos emparentadas, y que esta interacción sea más fuerte en ambientes menos ricos.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology Editorial Elsevier Academic Press, London. 79-81
- Auguet, J-C., Barberan, A. Casamayor, E. 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. The ISME Journal 4: 182--190
- Blomberg, S. Garland, T. Ives, A. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. Evolution, 57, 717-745
- Bryant, J. Lamanna, C. Morlon, H. Kerkhoff, A. Enquist, B. Green, J. 2008. Microbes on mountainsides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 105, 11505-11511.
- Cadotte, M. Cavender-Bares, J, Tilman, O. Oakley, T. 2009. Using phylogenetic, functional and trait diversity to understand patterns of plant community productivity. PLoS ONE, 4, e5695.
- Cavender-Bares, J. Keen, A. Miles, A. 2006. Phylogenetic Structure Of Floridian Plant Communities Depends On Taxonomic And Spatial Scale. Ecology Letters 7 (87):S109-S122.
- Cavender-Bares J, Kozak Kh, Fine Pv, Kembel Sw (2009) The merging of community ecology and phylogenetic biology. Ecology Letter 12:693-715
- Clements, F. 1916. Plant succession: an analysis of the development of vegetation. Washington, Carnegie Institution of Washington pp 643.
- Connor, E. Simberloff, D. 1979. The assembly of species communities: chance or competition?, Ecology 60:1132-40
- Cook, J. Baker, K. 1989. The Nature and practice of biological control of plant pathogens II Edition. T. A. P. Society, New York
- Darwin, C. 1859. The Origin of Species by Means of Natural Selection. Murray, London
- De Wit, R. Bouvier, T. 2006. 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? Environmental Microbiology, 8, 755-758.
- Emerson, B. Gillespie, R. 2008. Phylogenetic analysis of community assembly and structure over space and time. Trends Ecol. Evol., 23, 619-630.
- Eastburn, D. Butler, E. 1988. Microhabitat characterization of *Trichoderma* in natural soil: evaluation of factors affecting population density. Soil Biology Biochemistry 20: 541-546
- Fierer, N. 2008. Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. In: Accessing Uncultivated Microorganisms: From the Environment to Organisms and Genomes and Back (ed. Zengler K) ASM Press, Washington DC
- Gleason, H. 1926. The individualistic concept of the plant association. The Bulletin of the Torrey Botanical Club
- Gotelli, N. Graves, G. 1996. Null Models in Ecology. Washington, DC: Smithsonian Inst. Press. USA
- Graham, C. Parra, J. Rahbek, C. 2009. Phylogenetic structure in tropical hummingbird communities. Proc Natl Acad Sci U S A 106 Supplementum
- Hobbs, R. Higgs, E. Harris, J. 2009. Novel ecosystems: implications for conservation and restoration. Trends in Ecology and Evolution 24(11):599-605
- Harman, G. Howell, C. Viterbo, A. Chet, I. Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2:43-56
- Hillerislambers, J. Adler, P. Harpole, W, Levine, J. Mayfield, M. 2012. Rethinking community assembly through the lens of coexistence theory. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 43, 227-248.
- Horner-Devine, M. Lage, M. Hughes, J. Bohannan, B. 2004. A taxa-area relationship for bacteria. Nature 432 (7018):750-753
- Hubbell, S. 2001. The unified neutral theory of biodiversity and Biogeography. Princeton. University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Keddy, P. Weiher, E. 1999. Introduction: the scope and goals of research on assembly rules. In: Weiher, E. Keddy, P. (ed) Ecological assembly rules: perspectives, advances, retreats, Cambridge University Press, Cambridge.
- Kembel, S. Hubbell, S. 2006. The phylogenetic structure of a neotropical forest tree community. Ecology 87: 86-99.

- Kraft, N. Cornwell, W. Webb, C. Ackerly, D. 2007. Trait evolution, community assembly, and the phylogenetic structure of ecological communities. *American Naturalist* 170: 271–283
- Losos, J. Leal, M. Glor, R. De Queiroz, K. Hertz, P. Rodriguez, L. Chamizo, A. Jackman, T. Larson, A. 2003. Niche liability in the evolution of a Caribbean lizard community. *Nature* 424 (6948):542-545
- Maherali, H. Klironomos, J. 2007. Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Function. *Science* 22 (316): 17469-1748
- Martin, A. 2002. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 68: 3673–3682.
- Pausas, J. Verdu, M. 2010. The Jungle of Methods for Evaluating Phenotypic and Phylogenetic Structure of Communities. *BioScience* 60 (8): 614-625
- Papke, R. Ward, D. 2004. Minireview: The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48:293-303.
- Peay, K. Garbelotto, M. Bruns, T. 2010. Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology* 91: 3631–3640.
- Prinzinger, A. Durka, W. Klotz, A. Brandl, R. 2001. The niche of higher plants: evidence for phylogenetic conservatism. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268, 2383–2389.
- Ricklefs, R. 2004. A comprehensive framework for global patterns in biodiversity. *Ecol Lett* 7:1–15.
- Silvertown, J. McConway, K. Gowing, D. Dodd, M. Fay, M. Joseph, J. Dolphin, K. 2006. Absence of phylogenetic signal in the niche structure of meadow plant communities. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273 (1582):39-44
- Soliveres, S. Eldridge, D. Maestre, F. Bowker, M. Tighe, M. Escudero, A. 2011. Microhabitat amelioration and reduced competition among understorey plants as drivers of facilitation across environmental gradients: towards a unifying framework. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic* 13: 247–258.
- Taylor, J. Turner, E. Townsend, J. Dettman, J. Jacobson, D. 2006. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 361: 1947–1963.
- Vamosi, S. Heard, S. Vamosi, J. Webb, C. 2009. Emerging patterns in the comparative analysis of phylogenetic community structure. *Mol. Ecol.* 18:572–592
- Vellend, M. 2010. Conceptual synthesis in community ecology. *Q. Rev. Biol.*, 85, 183–206.
- Webb, C. 2000. Exploring the phylogenetic structure of ecological communities: an example for rain forest trees. *American Naturalist*. 156:145-155
- Webb, C. Ackerly, D. McPeck, M. Donoghue, P. 2002. Phylogenies And Community Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33 (1):475-505
- Wiens Jj, Graham Ch (2005) Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 36, 519–539.
- Wiens, J. Ackerly, D. Allen, A. Anacker, B. Buckley, L. Cornell, H et al. 2010. Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecol. Lett.*, 13, 1310–1324.
- Wilberforce, E. Boddy, L. Griffiths, R. Griffith, G. 2003. Agricultural management affects communities of culturable rootendophytic fungi in temperate grasslands. *Soil Biology and biochemistry* 35: 1143–1154.

**DIVERSIDAD DE HONGOS DEL GENERO *TRICHODERMA* (HYPHOMYCETES) EN  
DIVERSOS AMBIENTES EN CHILE**

**DIVERSITY OF FUNGUS OF GENERA TRICHODERMAS (HYPHOMYCETES) IN  
DIVERSE ENVIRONMENTS FROM CHILE**

**RESUMEN**

Dentro de los microorganismos de suelo, los hongos tienen una diversidad global que supera los 1.5 millones de especies, dentro de los hongos descomponedores del suelo, los del género *Trichoderma*, son interesantes pues cumplen una diversidad de funciones: simbioses de plantas, y parásitos de otros hongos, las especies de este género se considera como un componente mayor de la microbiota del suelo en varios ecosistemas. En este estudio, se buscó establecer la estructuración de comunidades de hongos del género *Trichoderma*, obtenidas de muestreo en distintas zonas de Chile, (desde los 18° hasta los 70° S). Se caracterizaron los ensamblajes en función de su composición, diversidad de especies, diversidad filogenética y estructuración filogenética comunitaria. Encontrándose total de 11 especies del género *Trichoderma*, distribuidas heterogéneamente lo largo de Chile, con una máxima abundancia en Chile central; pero mayores niveles de diversidad en el sur de Chile.

Se observó una correlación positiva entre la distancia geográfica y a) la riqueza de especies (correlación: 0,29  $P < 0,05$ ), b) la diversidad estándar (S) (correlación: 0,61  $P < 0,05$ ) y c) la diversidad filogenética (DP) (correlación: 0,54  $P < 0,05$ ); no se encontró correlación entre estas variables ambientales con la estructura filogenética (correlación: -0,07  $P = 0,56$ ). Pero sin un efecto de la temperatura ( $r = 0,3$ ;  $P < 0,05$ ) y precipitaciones ( $r = 0,38$ ;  $P < 0,05$ ) sobre la riqueza de especies, no se observa efecto de estas variables sobre la diversidad ecológica; se observa un efecto negativo de las precipitaciones sobre la diversidad filogenética ( $r = 0,25$ ;  $P < 0,05$ ); y se encontró un efecto significativo y positivo de la temperatura ( $r = 0,26$ ;  $P < 0,05$ ) y precipitaciones ( $r = 0,21$ ;  $P < 0,05$ ). Con base en los resultados obtenidos, en ambientes con alto nivel de contraste, los procesos de filtrado ambiental locales, a escala de los organismos, podrían generar una estructura sobredispersa, no asociada a competencia, sino a procesos simultáneos e incluso contrarios de filtrado ambiental, incluso en condiciones de ausencia de limitaciones a la dispersión

Palabras claves: *Trichoderma*, Diversidad, Estructura filogenética.

## RESUMEN EN INGLES

In the soil microorganisms, fungi had a high diversity global, that exceeds 1.5 million species, into the soil decomposer fungus, the genera *Trichoderma* are interesting because they meet a variety of functions: plants symbionts, and parasites of other fungi, species of this genus is considered as one principal component of soil micro flora in several ecosystems..

In this study, the goal was to establish the community structure of fungi of the genus *Trichoderma*, along diverse environments from Chile, (from the 18 ° to 70 ° S). Assemblies were characterized according to its composition, species diversity, phylogenetic diversity and phylogenetic community structure. A total of 11 species of the genus *Trichoderma*, heterogeneous distributed throughout Chile, with a maximum abundance in central Chile; but higher levels of diversity in the South of Chile.

A positive correlation was observed between geographic distance and a) species richness (correlation: 0.29  $P < 0,05$ ), b) the diversity standard (S) (correlation: 0.61  $P < 0.05$ ) and c) phylogenetic diversity (PD) (correlation: 0.54  $P < 0.05$ ); We did not find significant correlation between these environmental variables with the phylogenetic structure (correlation: - 0.07  $P = 0,56$ ). But without a positive effect of temperature ( $r = 0,3$ ;  $P < 0,05$ ) and rainfall ( $r = 0,38$ ;  $P < 0,05$ ) about the richness of species, there is no significant effect of these variables on the ecological diversity; shown a negative and effect of rainfall on the phylogenetic diversity ( $r = 0,25$ ;  $P < 0,05$ ); and found a positive effect of temperature ( $r = 0,26$ ;  $P < 0,05$ ) and precipitation ( $r = 0,21$ ;  $P < 0,05$ ). Thus on the basis of the results obtained, environments with a high contrast level, the environmental filter processes, at microorganism scale, could generate a structure over disperse, not associated to competition, but to a simultaneous and even opposed processes of environmental filter, in absence of dispersion constraints

Key Word: *Trichoderma*, Diversity Phylogenetic Structure.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de los microorganismos de suelo, los hongos tienen una diversidad global que supera las 1.5 millones de especies (Hawksworth, 2001, 2004). Las comunidades de hongos son importantes para el funcionamiento ecosistémico (van der Heijden et al., 2008), cumpliendo un rol clave como descomponedores de materia orgánica, así como un recurso para otros organismos, en especial invertebrados (Wheeler, 1984; Fossli & Andersen, 1998).

Los hongos descomponedores del suelo, son un buen modelo para entender las reglas de ensamblaje de las comunidades microbianas. De hecho, se han utilizado como modelos para investigar la biogeografía funcional de microorganismos descomponedores de hojarasca (De Boer et al., 2005; Baldrian, 2006), y para estudiar el rol de la dispersión de esporas a largas distancias (Hallenberg and Kuffer, 2001). Otros estudios más recientes, se han focalizado en la biogeografía de hongos tanto patógenos como endófitos asociados a plantas, (Kivlin et al., 2011; Tedersoo et al., 2012); sin embargo, pocos estudios han considerado la dinámica de las comunidades de hongos saprofitos de vida libre (Green et al., 2004; Feinstein and Blackwood, 2012).

Dentro de los hongos descomponedores del suelo, los del género *Trichoderma*, son interesantes pues cumplen una diversidad de funciones: ellos son simbioses de plantas (Harman et al., 2004), endófitos (Wilberforce et al., 2003), y parásitos de otros hongos (Harman, 2004). Las especies de este género se considera como un componente mayor de la microbiota del suelo en varios ecosistemas, agrícolas, praderas, forestales, marismas, desiertos e incluso ecosistemas acuáticos (Danielson and Davey, 1973; Papavizas, 1985; Zhang et al., 2005). Las especies de *Trichoderma* poseen altas capacidades reproductivas, son capaces de sobrevivir en ambientes con alto nivel estrés, y son muy eficientes en el uso de diversos tipos de nutrientes (Woo et al., 2005). También han sido considerado como agentes de control biológico de enfermedades de plantas cultivadas y promotores de su crecimiento (Samuels, 2006; Donoso et al. 2008).

Pese a su importancia, el estudio de los factores que afectan la diversidad de hongos, es un tema poco tratado. Las causas que estructuran estas comunidades pueden ser diversas. Para comunidades microbianas en general, se plantean que si no hay limitaciones a la dispersión, el ensamble de especies, que se estructura en una localidad determinada será función directa, del pool de especies disponibles (Papke and Ward, 2004). En segundo lugar, existirían diversos filtros ambientales que seleccionarían las especies, capaces de sobrevivir y reproducirse en una localidad determinada: (i) podría haber disponibilidad de compuestos carbonados y nitrogenados que son recursos para algunas especies y no para otras (Allison et al. 2007); (ii) para aquellos que concurren a usar recursos similares, la competencia interespecífica actuaría como un filtro selectivo adicional para determinar así una particular estructura comunitaria (Keddy, 1992).

Para entender la composición y estructura de las comunidades en una perspectiva histórica, es necesario considerar, los efectos de filtro ambiental o sea, las condiciones ecológicas existentes que determinan, qué especies pueden establecerse en función de sus requerimientos de nicho fundamental (Weiher and Keddy 1995); esto determinaría que dentro de una comunidad se genere una reducción en distancia filogenética (i.e. agregación filogenética) significativamente menor que lo esperado por azar (Cavender-Bares, Keen, and Miles 2006; Cavender-Bares et al. 2004; Horner-Devine et al. 2004; Tofts and Silvertown 2002; Webb et al. 2002); esto se debería a que las especies componentes compartirían las mismas restricciones fisiológicas y por lo tanto exhibirían un conservacionismo evolutivo de su nicho, lo cual se expresaría en un incremento en la similitud fenotípica (Webb et al. 2002).

Por otra parte, en condiciones de bajo estrés ambiental, con poca disponibilidad de recursos, se esperaría que especies más emparentadas (del mismo género) tendieran a competir más que especies menos emparentadas debido a que poseen similitudes morfológicas y de uso de recursos (Darwin 1859). A partir de este planteamiento original, se han realizado predicciones específicas respecto de la estructura filogenética esperada para una comunidad de especies competidoras emparentadas (Cheng and Foght 2007); ésta sería de un incremento de distancia filogenética (i.e. sobredispersión) significativamente mayor de lo que se esperaría por azar; adicionalmente se esperaría una mayor diferenciación fenotípica (i.e. segregación de

caracteres) como una consecuencia evolutiva, de la reducción de la competencia interespecífica; de la misma forma, procesos de filtrado ambiental, estarían seleccionando organismos con una mayor similitud de caracteres que los esperados por azar, y en el caso de ser conservados, generaría una estructura filogenética en agregados con una distancia filogenética promedio menor a la esperada por azar (Maherali and Klironomos 2007). Ambas fuerzas de estructuración, podrían actuar al mismo tiempo dando estructuras al azar o bien ejerciendo su efecto a distintas escalas geográficas (Cavender-Bares, Keen, and Miles 2006).

En este estudio, se buscó establecer la estructuración de comunidades de hongos del género *Trichoderma*, obtenidas desde distintos ambientes de Chile (desde los 18° hasta los 70° S). Se caracterizaron los ensamblajes en función de su composición, diversidad de especies, diversidad filogenética y estructuración comunitaria. De acuerdo con el marco teórico existente, se esperaba, que ambientes de mayor estrés presenten estructuras filogenéticas en agregados debido a que el ambiente filtraría especies similares en nicho, y si este es conservado, se esperaba que la distancia filogenética entre los componentes del ensamblaje sería menor a lo esperado por azar, mientras que en un ambiente sin estrés, la competencia sería el principal factor de estructuración, donde los miembros más emparentados, tenderían a competir más entre ellos, incrementando así la distancia filogenética promedio de la comunidad, generando una estructura filogenética sobredispersa.

## MATERIALES Y METODOS

### *Prospección, identificación y análisis filogenético*

Con el fin de obtener una diversidad de condiciones ecológicas contrastantes, se seleccionaron puntos de recolecta que comprendieron distintas formaciones vegetales, representativas de Chile, abarcando desde clima desértico hasta climas polares (Isla Rey Jorge, Campo de hielo norte y glaciares). Incluyendo tanto sitios naturales como agrícolas, en cada sitio se seleccionaron 10 puntos de extracción de muestras intentando así cubrir la variabilidad local de cada sitio. Los lugares de colecta fueron caracterizados en términos de ubicación geográfica, clima predominante (temperaturas y precipitaciones medias anuales) caracterizado según Rioseco et. Al (2013) y, abarcando un rango geográfico de 4.900 km (Figura 2; Anexo 1).

La recolección fue enfocada en la fracción cultivable del hongo, no existiendo reportes de que porcentaje de la diversidad total podría cubrir esta fracción. Cada uno de los 10 puntos de recolecta corresponden a muestras de suelo, 100 g de suelo cada una, obtenidos desde los primeros 30 cm. de profundidad. Cada muestra fue homogenizada, para luego extraer 10 g, los que fueron suspendidos en 100 ml de buffer de extracción (suero fisiológico + tween 50  $\mu$ l/l) y puestos en agitación (250 r.p.m) por 30 minutos. Se extrajo una alícuota de 1 ml, la que fue sembrada en placas Petri con un medio selectivo (TSM, Smith, 1994). Las placas fueron puestas a incubación a 25°C por 24 horas; luego se determinó la presencia de colonias presuntamente de *Trichoderma* sp., usando como criterios su color, forma de colonia, así como forma de los conidióforos. Estas colonias se re- aislaron, y se dejaron crecer en agar extracto malta, hasta la formación de estructuras reproductivas, las que fueron observadas por microscopia. Su identidad taxonómica se realizó hasta el nivel de género, a partir de este nivel taxonómico, se generaron cultivos monospóricos; esta es una técnica usada para organismos modulares, donde se extrae una sola espora, con el fin de asegurar que se está obteniendo un cultivo genéticamente homogéneo de una sola especie o cepa y así proceder a la identificación a nivel de especie por marcadores moleculares. Las cepas se consideraron como equivalentes a individuos

dentro de la población y, su presencia en las muestras, se consideró una medida indirecta de la abundancia poblacional por sitio de colecta.

Las cepas aisladas fueron identificadas a nivel de especie por extracción de ADN y posterior secuenciación de la región ribosomal intergénica (ITS1-ITS2) (Druzhinina, 2008). La amplificación por PCR fue efectuada en un volumen de 50  $\mu$ l que contiene una mezcla de 40 ng de DNA molde con 0.2 mM de cada partidor, r, 200 mM de cada nucleótido y 2.5 U of Taq DNA polymerasa en GeneAmp 103 PCR Buffer II (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl) (Perkin-Elmer). Estas reacciones fueron sometidas a desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1.5 min a 94°C, 2 min a 55°C, y 3 min a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C en un termociclador Eppendorf. Alicuotas (4  $\mu$ l) fueron analizadas por electroforesis en gel agarosa al 1,2% p/v en tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA [pH8]), teñido con GelRed y fotografiado en transiluminador con luz UV. El amplicón obtenido se secuenció incluyendo los espaciadores ITS1 e ITS2 y 5.8S rDNA, lo que fue realizado por Macrogen Inc. (<http://www.macrogen.com>). El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1994). Las secuencias resultantes, fueron contrastadas por el programa Trichokey (Druzhinina et al. 2005) considerándose identificaciones correctas, sobre un 95% de similitud.

Con las secuencias obtenidas en cada cepa, se procedió a la reconstrucción de las relaciones filogenéticas de las cepas; el alineamiento fue optimizado manualmente, se determinó la divergencia de secuencias y ésta se correlacionó con la distancia geográfica entre los puntos de colecta, aplicando test de Mantel para lo cual que se utilizó el programa Passage® (Rosenberg & Anderson 2011). La divergencia de secuencias fue estimada con el programa Modeltest, aplicando el método de Kimura de dos parámetros (Kimura, M. 1980.), excluyendo gaps y sitios equívocos; la inferencia filogenética propiamente tal se realizó mediante máxima verosimilitud, usando el programa Paup (Swofford & Sullivan 2003). Los cladogramas fueron sustentados por el procedimiento de bootstrap, con 1000 réplicas en cada caso. Se utilizó al hongo filamentoso *Giberella moniliforme* como outgroup determinándose finalmente la topología del árbol seleccionado.

### *Biodiversidad y estructura filogenética comunitaria*

Utilizando las abundancias relativas de cada especie y los arboles obtenidos, se determinó la diversidad ecológica y diversidad filogenética de los ensamblajes en cada punto de colecta, usando el programa Phylocom (Webb et. al 2008); se consideró a cada localidad como una comunidad fúngica, determinándose así la diversidad de especies con el Índice de Simpson (S); también se pudo estimar la diversidad de entropía cuadrática; esta métrica entrega una medida de la diversidad de la comunidad ajustada a la distancia filogenética de las especies que la conforman (DP), expresadas como número de nodos promedio entre miembros de la comunidad (Rao, 1982). Esta medida de diversidad se interpreta como el grado de parentesco esperado entre dos individuos extraídos de diferentes especies. Adicionalmente, se estableció si las comunidades generadas, presentaban algún nivel de estructuración filogenética, a través de la media de distancia filogenética, usando el parámetro Net Relatedness Index (NRI), siendo los valores negativos y significativos, indicadores de una estructura filogenética sobredispersa y valores positivos significativos indicadores de una estructura filogenética; cualquier valor sin significancia se considera como una estructura al azar (Vamosi et al. 2009; Pausas & Verdu, 2010). Dado que en la Isla rey Jorge solo se obtuvo una especie con una abundancia de una cepa, ésta no se consideró en los análisis.

Una vez obtenidas las variables de diversidad y estructura comunitaria de cada sitio, se evaluó el efecto de la distancia geográfica entre sitios, sobre la composición de las distintas comunidades y su diversidad, aplicando una prueba de Mantel, y una prueba de Mantel Parcial (controlando por distancia geográfica); luego, se determinó el efecto de las variables climáticas de temperatura y precipitaciones en forma independiente de la distancia geográfica, sobre la diversidad de especie y la estructura filogenética de sus comunidades.

## RESULTADOS

### *Prospección identificación y análisis filogenético*

Se encontró un total de 11 especies del género *Trichoderma*, distribuidas heterogéneamente a lo largo de Chile, con una máxima riqueza en Chile central; en cuanto a las abundancias de cada especie se encontraron seis cepas de *Hypocrea virens*, cinco de *Hypocrea aureoviride*, cinco de *T. longibrachiatum*, cuatro cepas de *H. lixii* (Sin. *T. harzianum*), tres cepas de *Trichoderma sinensis*, igual número para *H. psychrophilla*, *H. jecorina* y *H. koningi*, dos de *Bionectria oleruclata* (Sin. *Gliocadium roseum*, Sin. *Trichoderma roseum* y una de *T. ovalisporum*, y *T. intricatum*. De estas especies, se han reportado para Chile a *H. lixii* (Donoso et al. 2008), *H. virens* (Schmeda-Hirschmann et al. 2005), *H. aureoviride* (Perez et al. 1991), *T. longibrachiatum* (Aroca et al. 2004). Por su parte *T. sinensis* ha sido propuesta como una nueva especie, en base a cepas aisladas desde Asia, especialmente Himalaya y Malasia (Bissett, et al 2003). *T. ovalisporum*, ha sido descrito desde aislados de Latinoamérica, en especial zonas tropicales con capacidad endófito (Holmes et al. 2004, Dang et al 2010), *H. psychrophilla*, ha sido asociada a ambientes fríos (Frisvad, 2008), (Apéndice 1).

### *Biodiversidad y estructura filogenética comunitaria*

La mayor abundancia de cepas se dio en el sitio Talca, donde 9 de las 10 muestras recolectadas, presentaron cepas de especies relacionadas al género *Trichoderma*, mientras que en Rey Jorge solo se encontró una muestra positiva; en cuanto a riqueza de especies, Talca y Glaciar Exploradores son los que presentan la mayor riqueza de especies, seguidas muy de cerca por la mayoría de los sitios, excepto Queules con 3 y Rey Jorge con solo una especie (Tabla 1). Al observar la diversidad ecológica a través del Índice de Simpson (S) (Tabla 1), vemos que la mayor diversidad se da en Glaciar Exploradores donde cada especie obtenida, tienen una abundancia similar lo mismo ocurrió en Peteroa y Laguna del Maule, pero con valores menores dada la menor riqueza de especies (Tabla 1); la localidad de Talca que presentaba la mayor riqueza

de especie, presentó una baja diversidad, dada la prevalencia de *H. virens* con un 44% de la abundancia relativa (Anexo 1); la localidad Los Queules presentó la diversidad más baja. Por su parte la diversidad Filogenética (DP), presentó los mayores valores en Glaciar Exploradores, seguido de Peteroa, mientras que Talca presentó una diversidad intermedia. (Tabla 1).

Se observó una correlación positiva entre la distancia geográfica y a) la riqueza de especies ( $r = 0,29$   $P < 0,05$ ), b) diversidad ecológica de especies (S) ( $r = 0,61$   $P < 0,05$ ) y c) la diversidad filogenética (DP) ( $r = 0,54$   $P < 0,05$ ); no se encontró correlación significativa entre las variables ambientales, temperatura y precipitaciones medias anuales con la estructura filogenética ( $r = -0,07$   $P = 0,56$ ).

Al aislar el efecto de la distancia geográfica entre puntos de colecta, se observa un efecto positivo y significativo de la temperatura sobre la riqueza de especies ( $r = 0,3$ ;  $P < 0,05$ ) y sobre la abundancia ( $r = 0,38$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 2), no se observa efecto significativo de estas variables sobre la riqueza de especies y diversidad ecológica.

Los datos muestran que hay un efecto negativo y significativo de las precipitaciones sobre la diversidad filogenética ( $r = -0,25$ ;  $P < 0,05$ ); se encontró un efecto significativo y positivo de la temperatura ( $r = 0,26$ ;  $P < 0,05$ ) y precipitaciones ( $r = 0,21$ ;  $P < 0,05$ ) sobre la estructura filogenética.

En relación con la estructura filogenética de las comunidades (Tabla 1), se observa que los puntos de colecta de Azapa, Ovalle y Laguna del Maule, muestran una estructura filogenética agregada, mientras que los puntos Chungará, Talca, Peteroa, Queles y Glaciar Exploradores, muestran una estructura filogenética sobredispersa, no siendo evidente un patrón, así cuando se comparan sitios que se encuentran en la misma latitud por ejemplo Azapa y Chungará o los sitios Talca y Laguna del Maule (Figura 1) se encuentra diferentes estructura filogenética, siendo al parecer más importante la conformación vegetal existente.



Figura 2: Puntos de colecta de cepas del hongo *Trichoderma spp.* desde distintos puntos de Chile y Antártica. Collect sites, of the fungal strains, from different points of Chile and Antarctica.

Tabla 1 Abundancia (Número de cepas por punto de colecta), riqueza de especies, índices de diversidad (ecológica y filogenética) e índice de estructura filogenética comunitaria NRI (Nearest Relatedness Index), para cada uno de los puntos de colecta y el global de Chile. \* Indica significativamente valores significativamente diferentes del azar (test de bootstrap  $P < 0,05$ ).

Abundance (number of strains per site), species richness, diversity index's (ecological and phylogenetic) and community phylogenetic structure index NRI (Nearest Relatedness index) for each of collection sites and global from Chile.

\* Indicates values significantly different from random (bootstrap test  $P < 0.05$ ).

Punto de colecta	Abundancia	Riqueza de especies	Diversidad ecológica Índice de simpson	Diversidad filogenética	Estructura Filogenética
AZAPA	4	3	0.63	1,38	0.73*1
CHUNGARA	4	3	0.63	1,56	-0.15
OVALLE	5	3	0.64	1,28	14.40*
TALCA	9	4	0.62	1,51	-0.46*
PETEROA	3	3	0.67	1,78	-0.1
LAGUNA DEL MAULE	3	3	0.67	1,56	0.71*
QUEULES GLACIAR	3	3	0.75	1,56	-11.27*
EXPLORADORES GLOBAL	4	4	0.75	2,13	-0.74*
	33	11	0.89	2,19	-0.99*

Valores significativos positivos indican estructura filogenética agregada, mientras que valores significativos negativos indican estructura filogenética sobredispersa, valores no significativos indican estructura filogenética al azar.

\*. Efecto significativo por Bootstrap.

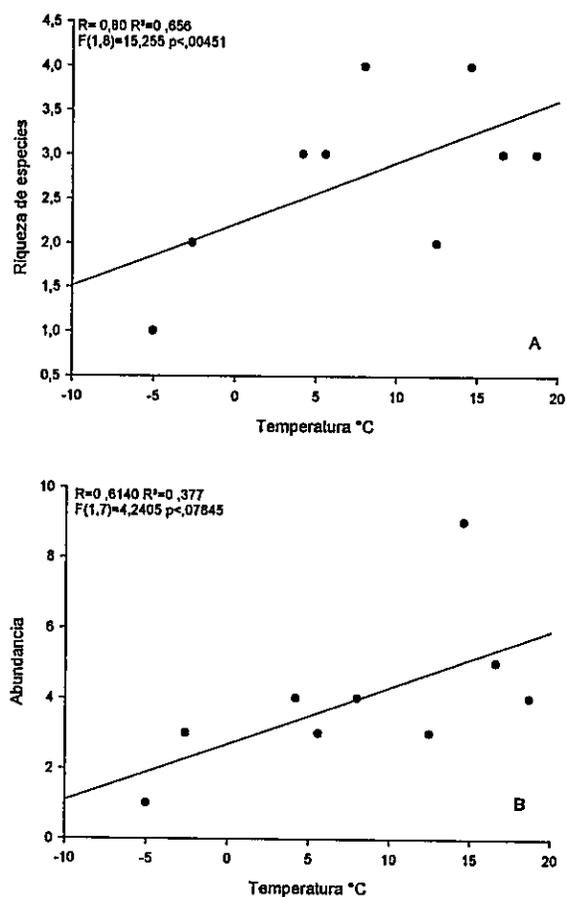


Fig. 3: Correlaciones, ajustadas según test parcial de Mantel: a) Riqueza de especies vs Temperatura; b) Abundancia versus temperatura. Significant correlations adjusted by Partial Mantel test: a) Species richness vs Temperature; b) Abundance vs Temperature.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Un patrón notable que emerge de nuestro estudio es que para el género *Trichoderma*, existirían dos máximos de diversidad ecológica: uno en la Reserva Los Queules (centro de Chile) y otro, en Glaciar Exploradores (zona Sur), mientras que para la diversidad filogenética ésta sería máxima en Glaciar Exploradores, seguido por Peteroa, siendo estos dos sitios los que presentan los mayores contrastes ambientales. Nuestros resultados destacan además la importancia de la temperatura sobre los patrones de diversidad de las comunidades fúngicas.

La temperatura ha sido positivamente correlacionada con la diversidad (Pommier et al. 2007), lo que ha sido ampliamente comunicado (Hillebrand 2004), incluyendo hongos endófitos (Arnold et al. 2009) y ectomicorrízicos (Rahbek 2005), bacterias marinas (Pommier et al. 2007) así como la fauna del suelo conformada por ácaros, lombrices y nematodos, las que tienden a ser más diversas en ambientes temperados, (Lavelle et al. 1995; Boag & Yeates 1998; Wardle 2002; Maraun et al. 2007). Consistentemente, los ambientes sub-árticos, así como las tierras bajas tropicales, muestran una baja diversidad filogenética (Bjorbækmo et al. 2010; Tedersoo & Nara 2010). En nuestro estudio, la menor riqueza de especies se encontró en la Isla rey Jorge (Antártica marítima); pero en contraste la mayor diversidad ecológica y filogenética se encontró en Glaciar Exploradores, una localidad con baja temperatura, pero probablemente con una alta variabilidad ambiental a micro-escala, debido las variaciones que pueden existir entre un "mulan" (flujo de agua de deshielo bajo el glaciar), hielo, sustrato obtenido del glaciar de roca, u hojarasca de un roble al borde del glaciar, las cuales pueden ser relevantes para las comunidades microbianas o fúngicas (Anexo 1). Esta mayor diversidad en Glaciar Exploradores contrasta con lo encontrado para hongos endófitos (Arnold et al. 2009) y ectomicorrízicos (Rahbek 2005). Probablemente esto se pueda relacionar, a que hongos del género *Trichoderma*, pueden desarrollarse independiente de la presencia de plantas (Harman 2004, Cook, 1989); mientras que los hongos endófitos y micorrízicos están en estrecha asociación con plantas y por lo tanto su diversidad está condicionada por la diversidad de plantas, a las cuales se asocian:

En el caso de *Trichoderma* las condiciones del microambiente generados por las plantas sería menos importante.

Existen variaciones importantes en cuanto a temperaturas y precipitaciones entre los diversos lugares de estudio, los que como ya se mencionó tuvieron efecto en la riqueza y diversidad filogenética de *Trichoderma*. Al aislar el efecto de la distancia geográfica, vemos que las condiciones climáticas entre puntos de colecta son un factor relevante sobre la composición de las especies, no pudiendo así establecerse un efecto *per se* de la distancia geográfica entre localidades.

Diversos estudios moleculares, ya han mostrado que las limitaciones a la dispersión definen los patrones de distribución biogeográfica en muchos grupos de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y micro eucariotas (Taylor et al. 2006; Fierer 2008; Peay et al. 2010), en oposición a lo que ocurre con algunos hongos endófitos de raíces y bacterias del suelo que no exhiben patrones biogeográficos distinguibles y donde el paradigma de "todo está en todas partes y el ambiente selecciona se estaría cumpliendo, con la información disponible (Chu et al. 2010; Quélez et al. 2011). En el caso de *Trichoderma*, si bien puede estar limitado por dispersión, lo cual se traduce en efectos de la distancia geográfica entre localidades, es importante destacar que en nuestro caso las variables ambientales, principalmente temperatura, serían las que determina la abundancia de estos hongos de suelo (Figura 2). Pero también a una escala más pequeña se estarían generando condiciones contrastantes en un mismo sector de colecta, lo que podría estar incrementando la diversidad, lo que se ajustaría a lo planteado por Cavenders et al. (2009), quienes postulaban que al reducirse la escala espacial la diversidad debería aumentar, en este caso, esto se relacionaría con un incremento de microambiente relevantes para el microorganismos, lo que no necesariamente se asociara a diversidad de plantas (Ejemplo Glaciar Exploradores). En ambientes considerados extremos (desiertos, áreas polares, etc.) la diversidad estaría dada por la presencia de contrastes acentuados, a micro-escala. En desiertos calientes (probablemente también en los desiertos fríos) podría producirse aislamiento espacial que genera numerosos micro-hábitat. Zhou y col. (2002) sugieren que un bajo contenido hídrico, puede explicar altas diversidades microbianas en suelos con bajo contenido de carbono orgánico. Según

estos autores la falta de agua limitaría la comunicación entre micro-hábitats dentro de la matriz del suelo, resultando en una mayor heterogeneidad espacial que disminuye o anula el efecto de la competencia. Además, en estos suelos con un bajo contenido de carbono orgánico, las poblaciones microbianas podrían evitar la competencia al permanecer aisladas y en bajo número, usando unos recursos que son escasos, pero, probablemente, heterogéneos. Así, estas condiciones permitirían el mantenimiento de comunidades más diversas y equitativas, lo que es consistente con el efecto negativo de las precipitaciones con la diversidad.

Tedersoo et al. (2012), indica que los máximos de diversidad de hongos ectomicorrizicos se producen en latitudes templadas y boreales, pero con una alta variación entre sitios, lo que indicaría la importancia de la heterogeneidad de los ambientes, así como procesos locales. Algo similar podría estar ocurriendo en el sitio Talca, donde existe una alta variabilidad de ambientes, dados por diversas especies vegetales, tipos de suelo y nivel de acción antropogénica, pasando desde cultivos anuales a bosques mixtos artificiales con especies nativas, pero con condiciones ambientales globales más benignas para el desarrollo del hongo; de hecho 9 de las 10 muestras de suelo presentaron poblaciones de *Trichoderma*, mientras que en la isla Rey Jorge, sólo una muestra tuvo hongos.

Es interesante notar que los ambientes considerados climáticamente más extremos muestran una tendencia a una mayor distancia filogenética y por ende una estructura sobre dispersa: De acuerdo a la teoría, este tipo de estructura comunitaria sería consecuencia de competencia interespecífica (Maherali and Klironomos 2007; Cavenders-Bares et al, 2009) la cual no es esperable que ocurra en este tipo de ambientes. Esta discrepancia puede deberse a la existencia de una variabilidad ambiental importante, a pequeña escala la cual determinó que cada una de las 10 muestras tomadas en esas localidades, representara ensambles de *Trichoderma* muy diferentes entre sí, sugiriendo que patrones espaciales de pequeña escala quedan oscurecidos al realizar un análisis a escala biogeográfica, como ya ha sido enunciado (Cavenders-Bares et al, 2009), así como también existe la posibilidad de que la competencia sea relevante en esos ambientes, para este tipo de organismos, ya ha sido reportado la alta capacidad de cepas de *Trichoderma* aisladas de ambiente fríos,

para competir y parasitar a hongos fitopatógenos (Ghildiyal & Pandey; 2008). Estudios previos que han abordado la biogeografía de este género, encontraron un efecto de la latitud, en la distribución de especies en China, siendo notoria la segregación de *T. harzianum* solo en el norte de China, este efecto fue correlacionado también con la temperatura (Zhang et al 2005), mientras que los estudios en América Central y Sud América, mostraron la ocurrencia de composiciones únicas de especies en esas regiones, lo que podría deberse tanto a sesgos geográfico climáticos, como a un artefacto producido por el limitado número de muestras involucradas (Zhang et al, 2005). Ninguno de estos estudios previos, ha abordado el tema de los contrastes a escalas relevantes para los hongos.

En general las consideraciones de escala espacial, han ido incrementando su importancia en ecología, dado que la detección de los patrones y la identificación de los mecanismos causales, (Gardner et al. 2001, Levin 1992, Peterson & Parker 1998), son de importancia en estudios de gradiente en relación a la riqueza de especies (Willig 2001), esto es de alta importancia en especial con organismos microscópicos, donde nuestros datos indican que la latitud o las condiciones ambientales a escalas mayores, serían relevantes en ambientes con condiciones homogéneas, mientras que ambientes con condiciones altamente contrastantes, a escala de hongos del suelo, logran incrementar la diversidad tanto en riqueza y equitatividad de especies, así como la diversidad filogenética. Existiendo una tendencia a que los lugares con mayores contrastes ambientales, ya sea por composición vegetal como ocurre en los sitios Talca y Quelue o bien por mayores contrastes a baja escala, como son Chungara, Peteroa y Glaciar exploradores, se genera una estructura filogenética sobredispersa, mientras que ambientes más homogéneos, con una marcada limitación ambiental por temperatura o disponibilidad de agua existirá una tendencia a estructura en clúster.

En función de los datos obtenidos por este trabajo, podríamos indicar que la diversidad, a lo menos microbiológica de un ambiente, no solo estaría dado por las condiciones generales del lugar, sino también por el nivel de contrastes existentes en ese lugar, siendo probablemente en ambientes considerados extremos (desiertos, climas polares, etc.), donde esto se vea más acentuado, es especial para diversidad filogenética y podría generar que en un área en que existan condiciones altamente

contrastante , que no se encuentren alejados a un nivel en que exista limitación a la dispersión por distancia, se obtenga un estructura filogenética sobredispersa, ocasionada por procesos de filtrado ambiental, provocados en cada uno de estos puntos contrastantes, sin la participación de competencia.

Esto requiere el desarrollo, de estudios experimentales, que permitan determinar como la competencia y procesos de filtrado ambiental, estructuran las comunidades, al existir condiciones ambientales contrastantes o un gradiente de estas.

## LITERATURA CITADA

- Allison, S. Hanson, C. Treseder, K. 2007. Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 1878–1887
- Astudillo, L. Schmeda-Hirschmann, G. Soto, R. Sandoval, C. Afonso, C. González, M. Kijjoa, A. 2000. Acetophenone derivatives from Chilean isolate of *Trichoderma pseudokoningii* Rifai. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16:585-587.
- Arnold, A. Miadlikowska, J. Higgins, K. 2009. A phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous fungi: are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? *Systematic Biology* 58: 283–297.
- Aroca, T. Piontelli, L. Cruz, C. 2004. Case report: *Trichoderma longibrachiatum* infection in a paediatric patient with peritoneal dialysis. *Bol Micol* 19: 13-7.
- Auguet, J. Barberan, A. Casamayor, E. 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. *The ISME Journal* 4: 182–190
- Baldrian P (2006) Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30: 215–242
- Bissett J, Szakacs G, Nolan C A, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Kubicek Cp (2003) New species of *Trichoderma* from Asia *Can J Bot* 81:570–586.
- Bjorbækmo, M. Carlsen, T. Brysting, A. Et Al. 2010. High diversity of root associated fungi in both
- Boag, B. Yeates, G. 1998. Soil nematode biodiversity in terrestrial ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 7: 617–630.
- Cavender-Bares, J. Keen, A. Miles, B. 2006. Phylogenetic Structure Of Floridian Plant Communities Depends On Taxonomic And Spatial Scale. *Ecology Letters* 7 (87):S109-S122.
- Cavender-Bares, J. Ackerly, D. Baum, D. Bazzaz, F. 2004. Phylogenetic Overdispersion in Floridian Oak Communities. *The American naturalist* 163 (6):823-843.
- Cook, J. Baker, K. 1989 *The Nature and practice of biological control of plant pathogens* II Edition. T. A. P. Society, New York
- Cheng, S. Foght, J. 2007. Cultivation-independent and -dependent characterization of Bacteria resident beneath John Evans Glacier. *FEMS Microbiology Ecology* 59 (2):318-330.
- Chu, H. Fierer, N. Lauber, C. 2010. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology* 12: 2998–3006.
- Dang, L. Guohong, L. Yang, Z. Luo, S. Zheng, X. Keqin, C. 2010. Chemical constituents from the endophytic fungus *Trichoderma ovalisporum* isolated from *Panax notoginseng*. *Annals of Microbiology* 60(2): 317-320
- Danielson, R. Davey, C. 1973. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biol Biochem* 5: 486–494
- Donoso, E. Bustamante, R. Caru, M. Niemeyer, H. 2008. Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Appl Environ Microbiol* 74, 1412–1417

- Darwin, C. 1859. *The Origin of Species by Means of Natural Selection*. Murray, London
- De Boer, W. Folman, L. Summerbell, R. Boddy, L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev* 29:795–811
- Druzhinina, I. Komon, M. Laszlo, Z. Kredics, J. Hatvani, L. Antal, Z. Belayneh, T. Kubicek, C. 2008. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology* 154: 3447–3459
- Feinstein, L. Blackwood, C. 2012. Taxa-area relationship and neutral dynamics influence the diversity of fungal communities on senesced tree leaves. *Environ Microbiol* 14: 1488–1499
- Fierer, N. 2008. Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. In: *Assessing Uncultivated Microorganisms: From the Environment to Organisms and Genomes and Back* (ed. Zengler K) ASM Press, Washington DC
- Fossli, T. Andersen, J. 1998. Host preference of *Cisidae* (Coleoptera) on tree-inhabiting fungi in northern Norway. *Entomol Fenn* 9: 65–78
- Frisvad, J. 2008. Fungi in cold ecosystems. In: Margesin R, Schinner F, Marx JC, Gerday C (eds) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer, Berlin, pp 137–156
- Gaston, K. 1996. Biodiversity – latitudinal gradients. *Phys. Geogr.* 20:466–76
- Gardner, R. Kemp, W. Kennedy, V. Petersen, J. 2001. *Scaling Relations in Experimental Ecology*. Columbia Univ. Press, New York
- Ghildiyal, Pandey. 2008. Isolation of Cold Tolerant Antifungal Strains of *Trichoderma* sp. From Glacial Sites of Indian Himalayan Region. *Research Journal Of Microbiology*. 3 (8): 559-564
- Green, J. Holmes, A. Westoby, M. Oliver, I. Briscoe, D. Dangerfield, M. Et Al. 2004. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* 432: 747–750
- Hallenberg, N. Kuffer, N. 2001. Long-distance spore dispersal in wood-inhabiting basidiomycetes. *Nord J Bot* 21: 431–436
- Harman, G. Chet, I. Baker, R. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. *Phytopathology* 71:569-572
- Harman, G. Howell, C. Viterbo, A. Chet, I. Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56
- Hawkins, B. 2001. Ecology's oldest pattern? *Trends Ecol. Evol.* 16: 470
- Hawksworth, D. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological research* 105 (12): 1422-1432
- Hillebrand, H. 2004. On the generality of the Latitudinal diversity gradient. *American Naturalist* 163: 192–211
- Holmes, K. Schroers, H. Thomas, S. Evans, H. Samuels, G. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycol. Prog.* 3:199-210.
- Horner-Devine, M. Lage, M. Hughes, J. Bohannan, B. 2004. A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432 (7018):750-753.
- Keddy, P. Weiher, E. 1999. Introduction: the scope and goals of research on assembly rules. In: Weiher E, Keddy P (ed) *Ecological assembly rules: perspectives, advances, retreats*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:11–120

- Kivlin, S. Hawkes, Treseder, K. 2011. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 43: 2294–2303
- Lavelle, P. Lattaud, C. Trigo, D. Barois, I. 1995. Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil* 170: 23–33.
- Levin, S. 1992. The problem of pattern and scale in ecology. *Ecology* 73:1943–46
- Lozupone, C. Knight, R. 2007. Global patterns in bacterial diversity. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11436–11440.
- Maherali, H. Klironomos, J. 2007. Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Function. *Science* 22 (316): 17469-1748
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Resources* 27: 209–220.
- Maraun, M. Schatz, H. Scheu, S. 2007. Awesome or ordinary? Global patterns of oribatid mites. *Ecography* 30: 209–216.
- Mcpeek, M. Miller, T. 1996. Evolutionary biology and community ecology. *Ecology Letters* (77):1319-20
- Mop, Ministerio De Obras Públicas, 2001. Perfiles Ecológicos de las cuencas de los ríos Lluta, San José, Huasco, Elqui, Limarí, Petorca, La Ligua, Mataquito, Itata, Imperial y del Lago Budi. Dirección General de Aguas. Santiago
- Queloz, V. Sieber, T. Holdenrieder, O. McDonald, B. Grunig, C. 2011. No biogeographical pattern for a root-associated fungal species complex. *Global Ecology and Biogeography* 20:160–169.
- Papavizas, G. 1985. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23–54
- Pérez, L. Mettifogo, S. Saldivar, M. Musalem, M. 1991. Sooty molds infecting citrus species in Chile: identification of the associated fungi and their ability to excrete cell wall hydrolyzing enzymes. *Fitopatología* 26:28-38.
- Peay, K. Garbelotto, M. Bruns, T. 2010. Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology* 91: 3631–3640.
- Peterson, D. Parker, V. 1998. *Ecological Scale: Theory and Application*. Columbia Univ. Press New York
- Pommier, T. Canbaña, B. Riemann, L. 2007. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular Ecology* 16:867–880.
- Rao, R. 1982. Diversity and dissimilarity coefficients: a unified approach. *Theoretical Population Biology* 21:24–43.
- Rahbek, C. 2005. The role of spatial scale and the perception of large-scale species-richness patterns. *Ecology Letters* 8: 224–239.
- Rice, N. Martinez-Meyer, E. Peterson, A. 2003. Ecological niche differentiation in the Aphelocoma jays: a phylogenetic perspective. *Biological Journal of the Linnean Society* 80:369-383
- Rioseco, R. Tesser, C. 2013. *Cartografía Interactiva de los climas de Chile*. Instituto de Geografía. Pontificia Universidad Católica de Chile. [www.uc.cl/sw\\_educ/geografia/cartografiainteractiva](http://www.uc.cl/sw_educ/geografia/cartografiainteractiva)
- Ruzzante, J. 2012. Monitoreo termo-geomorfológico de la cumbre del complejo volcánico Peteroa, Mendoza, Argentina : cuadernos ICES 6 . - 1a ed. Comisión Nacional de Energía Atómica - CNEA - Buenos Aires :. 70 p
- Rosenberg, M. Anderson, C. 2011. PASSAGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics and Geographic Exegesis. Version 2. *Methods in Ecology & Evolution* 2(3):229-232

- Rosenzweig, M. 1995. *Species Diversity in Space and Time*. Cambridge University Press, Cambridge
- Samuels, G. 2006. *Trichoderma: Systematics, the Sexual State, and Ecology*. *Phytopathology* 96:195–206
- Scheiner, S. Cox, B. Willig, M. Mittelbach, G. Osenberg, C. Kaspari, M. 2000. Species richness, species-area curves, and Simpson's paradox. *Evol. Ecol. Res.* 2:791–802
- Schmithüsen, J. 1960. Conifers in the forest associations of the southern Andes. *Vegetation* 9: 313–27.
- Silvertown, J. Mcconway, K. Gowing, D. Dodd, M. Fay, M. Joseph, J. Dolphin, K. 2006. Absence of phylogenetic signal in the niche structure of meadow plant communities. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273 (1582):39-44
- Swofford, D. 1991. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1 Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.  
Taylor, J. Turner, E. Townsend, Jp. Dettman, J. Jacobson, D. 2006. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 361: 1947–1963.
- Tedersoo, L. May, T. Smith, M. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217–263.
- Tedersoo, L. Bahram, M. Toots, M. Diédhiou, A. Henkel, W. Kjøller, T. 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Mol Ecol* 21: 4160–4170
- Thompson, J. Higgins, D. Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680
- Tofts, R. Silvertown, J. 2002. Community assembly from the local species pool: an experimental study using congeneric species pairs. In: *Proc. R. Soc. Lond. B* 90 (2):385-393.
- Turner, J. 2004. Explaining the global biodiversity gradient: energy, area, history and natural selection. *Basic App. Ecol.* 5: 435–48.
- Van Der Heijden, M. Bardgett, R. Van Straalen, N 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11: 296–310
- Wardle, D. 2002. *Communities and Ecosystems: Linking the Aboveground and Belowground Components*. Princeton University Press, New York.
- Webb, C. Ackerly, D. Kembel, S. 2008. Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and character evolution. *Bioinformatics* 24: 2098-2100
- Webb, C. 2000. Exploring the phylogenetic structure of ecological communities: an example for rain forest trees. *American Naturalist.* 156:145-155
- Webb, C. Ackerly, D. Mcpeek, M. Donoghue, P. 2002. Phylogenies And Community Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33 (1):475-505
- Weiher, E. Keddy, P. 1995. Assembly rules, null models, and trait dispersion: new questions from old patterns. *Oikos* (74):159-164

- Wheeler, Q 1984. Evolution of slime mould feeding in leiodid beetles. *Fungus-Insect Relationships: Perspectives in Wheeler QD, Blackwell M, eds Ecology and Evolution*. Columbia University Press, New York
- Wilberforce, E. Boddy, L. Griffiths, R. Griffith, G. 2003. Agricultural management affects communities of culturable rootendophytic fungi in temperate grasslands. *Soil Biology and biochemistry* 35: 1143–1154.
- Willig M R (2001) Common trends with latitude See Levin 2001.
- Woo SI, Scala F, Ruocco M, Lorito M (2005) The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96:181–185.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138
- Wright, S. 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31: 39–59
- Zhang, C. Druzhinina, I. Kubicek, C. Xu, T. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: Evidence for a North to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letters* 251: 251–257
- Zhou, J. Beicheng, X. Treves, D. Wu, L. Marsh, T. O'neill, R. Palumbo, A.
- Tiedje, J. 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 326-334

APENDICES

Apéndice 1. Descripción lugares de prospección y clasificación climática (temperaturas y precipitaciones medias anuales), ubicación geográfica, origen de muestra y especies obtenidas de los distintos sitios de muestreo.

SITIO DE COLECTA	CLIMA <sup>1</sup>	TEMP. MEDIA ANUAL °C	PP (acumulada anual) mm	UBICAC. GEOGRÁFICA	Origen de muestra	ESPECIE IDENTIFICADA
Valle Azapa Arica	Desértico con nublados abundantes	18,7	0,5	18°30'56.25"S 70°11'20.14"O	Cultivo tomate	<i>H. aureoviridis</i> (Ha1)
					Borde canal (vegetación herbácea)	<i>Hypocrea koningi</i> (Hk1)
					Entre hileras cultivo tomate (gramíneas)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Tlong1)
					Cultivo de olivos.	<i>H. aureoviridis</i> (Ha2)
Chungara	frio de tundra por altura	4,2	465,4	18°14'9.24 "S 69°10'56.41"O	Cultivo Orégano	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Tlong2)
					Borde río y (liques musgo)	<i>Hypocrea jecorina</i> (Hj1)
					Bofedal	<i>Hypocrea koningi</i> (Hk2)
					Cactus Candelabro.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Tlong3)
Ovalle <sup>2</sup>	Semiarido templado con lluvias invernales	16,6 <sup>2</sup>	125,7 <sup>2</sup>	30° 34'54"S 71° 31'08" O Cultivo	Vid vinifera cv. Red globe	<i>Hypocrea jecorina</i> (Hj2)
					Vid Vinifera cv. Thompson	<i>H. aureoviridis</i> (Ha3)
					Borde cultivo (malezas gramíneas y asteráceas)	<i>H. aureoviridis</i> (Ha4)
					Tomate	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Tlong4)
					Pimentón	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Tlong5)

Talca	Templado cálido con lluvias invernales	14,6	689,3	71° 30'53" 35° 25'30"	Vid vinífera cv. Cabernet 20 años	<i>Hypocrea virens</i> (Hvtem)
					Vid vinífera cv. Cabernet 10 años	<i>Hypocrea virens</i> (Hvten)
					cultivos anuales	<i>Hypocrea virens</i> (Hvtra)
					cultivo anual	<i>H.lixii</i> (Tgvichu)
					cultivo anual	<i>Hypocrea virens</i> (Thqueule)
					hierbas perenes	<i>Hypocrea virens</i> (Thsan pedro)
					bosque de maqui	<i>T.ovalisporum</i> (Thshanomila)
					borde río (sauce)	<i>Hypocrea lixii</i> (Tporilla)
					corredor biológico	<i>T.intricatum</i> (Hvsher)
Volcan Peteroa <sup>3</sup>	frio de tundra por altura	-2,6 <sup>3</sup>	337,25 <sup>3</sup>	70° 32'15" 35° 09'49"	Glaciar Planchón	<i>H.psychrophila</i> (Hvglaciar)
					Ñire (nombre científico)	<i>T. sinensis</i> (Hv cabrito)
					Sedimento de estero	<i>H. aureoviridis</i> (Ha5)
Laguna del Maule	frio de tundra por altura	5,6	1482	70° 33'39" 36° 02'2.16"	sedimento	<i>Bionectria ochroleuca</i> (Hvsed)
					cactus	<i>Hypocrea jecorina</i> (Hj3)
					pino	<i>T. sinensis</i> (Ts1)
Queules	Templado cálido con lluvias invernales y gran humedad atmosférica	12,5	811,9	72°42'30" 35°58'10"	Queule	<i>Hypocrea koningi</i> (Hk3)
					Roble	<i>T. lixii</i> (Hvlix)
					Canelo	<i>H lixii</i> (Hlix2)
Glaciar Explorados	Frio de hielo por altura	8	3600	73° 10'21" 46° 30 '16"	Glaciar de roca	<i>T.sinensis</i> (hv cámara)
					roble	<i>Bionectria ochroleuca</i> (bionec2)
					Glaciar de hielo	<i>Hypocrea psychrophila</i> (Hpycro2)
					Mulan	<i>Hypocrea virens</i>

						(Hv1)
Isla Rey Jorge	Clima ma rítimo frío	-2,5	797.2	61° 57'56"S 58° 06'32"O	Sedimento	Hypocrea psychrophila (Hpycro3)

1. Rioseco, Reinaldo y Tesser, Claudio : Cartografía Interactiva de los climas de Chile [en línea]. Instituto de Geografía. Pontificia Universidad Católica de Chile. [www.uc.cl/sw\\_educ/geografia/cartografiainteractiva](http://www.uc.cl/sw_educ/geografia/cartografiainteractiva)

2: Fuente MOP, Ministerio de Obras Públicas, Dirección General de Aguas. Perfiles Ecológicos de las cuencas de los ríos Lluta, San José, Huasco, Elqui, Limarí, Petorca, La Ligua, Mataquito, Itata, Imperial y del Lago Budi. Documento Final. 2001.

3 Ruzzante, José E. Monitoreo termo-geomorfológico de la cumbre del complejo volcánico

Peteroa, Mendoza, Argentina : cuadernos ICES 6 . - 1a ed. - Buenos Aires : Comisión Nacional de Energía Atómica - CNEA, 2012. 70 p

## DETERMINANTES HISTÓRICAS Y ECOLÓGICAS EN LA ESTRUCTURACIÓN DE COMUNIDADES FÚNGICAS: UNA APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

### ECOLOGICAL AND HISTORICAL DETERMINANTS TO UNDERSTAND FUNGAL COMMUNITY STRUCTURE: AN EXPERIMENTAL APPROACH

#### RESUMEN

Si la historia evolutiva de las especies es importante en la estructuración de las comunidades, ésta debería expresarse en la estructura filogenética de las especies y en una distribución de los rasgos funcionales relacionados con el uso de recursos, reflejando así el resultado de los ajustes evolutivos y ecológicos. En este estudio, se trabajó, generando ensambles de cepas experimentales de hongos del género *Trichoderma*, en condiciones *in vitro*, caracterizadas en cuanto a capacidad competitiva. Con el objetivo de determinar cómo el grado de parentesco dentro de una comunidad (estructura filogenética) y la disponibilidad de recursos, afecta a la estructura comunitaria. Para ello en placas Petri, se co cultivaron grupos de cepas de *Trichoderma*, con diferentes grados de parentesco filogenético y sometidas a diferentes niveles de recursos, evaluando los cambios en riqueza, diversidad y grado de parentesco. Ninguno los caracteres relacionados con la habilidad competitiva se asociaron a una especie en particular, distribuyéndose en forma aleatoria, sobre el árbol filogenético. Se obtuvo una correlación positiva entre la jerarquía competitiva de cada especie y la liberación de compuestos difusibles ( $r=0.86$ ;  $p<0.01$ ), y la existencia de microparasitismo ( $r=0.72$ ;  $P<0.05$ ).

El nivel de parentesco y la disponibilidad de recursos afectaron significativamente la intensidad de la competencia difusa ( $P<0.05$ ). Al igual que la diversidad de especies ( $P<0.05$ ); no se detectó una interacción estadísticamente significativa entre ambos. El grado de parentesco y la disponibilidad de recursos, modificaron significativamente la estructura filogenética de la comunidad fúngica. Además, se detectó una interacción estadísticamente significativa entre ambos factores, lo cual sugiere que los cambios

más intensos se produjeron en el tratamiento con menor disponibilidad de recursos ( $P < 0.01$ ).

Nuestro estudio, hace tres aportes interesantes: (i) el experimento fue realizado a lo largo de un gradiente de recursos lo cual puede tener importantes implicancias teóricas por cuanto las interacciones de competencia pueden pasar a ser reemplazadas por facilitación, la competencia se vio intensificada a medida que disminuía la disponibilidad de recursos, (ii) el diseño experimental incluye explícitamente la evaluación de la competencia inter-específica, en particular competencia difusa, actuando sobre cada una de las especies y (iii) pese a que en estudios previos se trabajó con organismos que competían, pero *Trichoderma*, es un hongo capaz de competir y depredar a sus congéneres, siendo los con menor capacidad competitiva los depredados, lo que añade mayor complejidad a la comprensión de la estructura comunitaria, En microorganismos, también es necesario considerar las características idiosincráticas de las especies que conforman las comunidades. Bajo un contexto de depredación actuando simultáneamente con la competencia, podría ser que el efecto positivo de un hongo competidor fuerte y depredador a la vez actúe en forma sinérgica, de modo de reducir con más intensidad la diversidad de especies.

En conclusión, el nivel de parentesco que se establece, en el momento de conformarse una comunidad, generará efectos diferenciales en la estructura de las comunidades, los cuales estarían modulados, por la disponibilidad de recursos. En segundo lugar, la inclusión de otras interacciones biológicas como la depredación en la determinación de la estructura filogenética de las comunidades, constituyen un desafío que debería enfrentarse en futuros estudios comunitarios que incluyan las relaciones filogenéticas de las especies.

## RESUMEN EN INGLES

If the evolutionary history of the species is important in structuring communities, as a measure of the degree of relatedness, this should be expressed in the phylogenetic structure of the species in the community and a distribution of the functional traits related to the use of resources, thus reflecting the results of evolutionary and ecological settings. In this study, we worked generating experimental *in vitro* ensembles of strains of the fungus *Trichoderma*, previously characterized respect to competition ability. With the objective of determining how the degree of relatedness within a community (phylogenetic structure) and the availability of resources, affects community structure. These experimental communities with different degrees of relatedness phylogenetic and subjected to different levels of resources were generated, assessing changes in richness, diversity and degree of kinship.

The characters related to the competitive ability were, distributed randomly on the phylogenetic tree. A positive and significant correlation between the competitive hierarchy of each species and the release of diffusible compounds was obtained ( $r = 0.86$ ;  $p < 0.01$ ), the existence of microparasitism ( $r = 0.72$ ;)  $P < 0.05$ ). The level of relatedness and the availability of resources significantly affected the intensity of diffuse competition ( $P < 0.05$ ). As well as the diversity of species ( $P < 0.05$ ); not detected a statistically significant interaction between both the degree of relatedness and the availability of resources, significantly modified the phylogenetic structure of the fungal community (table 4). Also detected a statistically significant interaction between both factors, which suggests that more intense changes was detected in the less nutrient availability ( $P < 0.01$ )

Our study, makes three interesting contributions: (i) the experiment was carried out along of a the experiment was carried out along an environmental gradient (resources) which may have important theoretical implications for how the interactions of competition can shift from competition to facilitation, competition was intensified as it decreased the availability of resources, (ii) experimental design explicitly includes the evaluation of interspecific competition, specifically diffuse competition, acting on each of the species and (iii) none of previous studies worked with organisms capable competing and preying to conspecifics, which adds greater complexity to the

understanding of the community structure, in microorganisms , it is also necessary to consider the idiosyncratic features of the species that make up the communities.

Under the context of predation acting simultaneously with the competition, it could be that the positive effect of a strong competitor fungus and predator simultaneously act in synergy, in way of reducing species diversity. In conclusion, the level of relatedness that settles down, at the time of forming a community, will generate differential effects on the structure of the communities, which would be modulated by the availability of resources. Secondly, the inclusion of other biological interactions like predation in the determination of the phylogenetic structure of communities, constitute a challenge that should be faced in future Community studies that include the phylogenetic relationships of species.

## INTRODUCCION

La competencia interespecífica ha sido tradicionalmente considerada como una fuerza estructuradora de las comunidades naturales (Tilman 1982; Bazzaz 1991; Weiher & Keddy 1999, Pausas & Verdú, 2010), sin embargo, es cada vez más reconocido el hecho que la estructura de una comunidad no sólo depende de su contingencia ecológica, sino que además es el producto de una historia evolutiva de los linajes (Maherali and Klironomos 2007, Webb et al. 2002). La importancia del componente histórico en la ecología de las comunidades tiene sus raíces en Charles Darwin (1859), quien propuso la hipótesis de competencia/parentesco (HCP), que indica que especies con-genéricas que evolucionaron en simpatria, deberían competir más intensamente que con especies de diferente género, debido a sus similitudes morfológicas y a un uso similar de recursos. De esta idea básica, se deduce que el parentesco entre especies que componen una comunidad, implica una cierta similitud de nicho, la cual modularía la importancia de la competencia interespecífica (Pausas & Verdu, 2010). Así, la competencia será importante, si las especies están altamente emparentadas y hay recursos limitantes, mientras que será menos importante si las especies están poco emparentadas y no hay escasez de recursos.

Si el grado de parentesco entre las especies, es importante para determinar la intensidad de la competencia, éste debería expresarse, además de cambios en diversidad y/o dominancia de especies, en una estructura filogenética y un patrón de distribución de rasgos funcionales (relacionados con la competencia), claramente predecibles, reflejando así el resultados de ajustes evolutivos y ecológicos de las especies a las condiciones ecológicas, pretéritas y actuales (Ackerly 2003; Cavender-Bares et al. 2004; Chazdon 2003; McPeck and Miller 1996; Webb et al. 2002; Cavender-Bares, Keen, and Miles 2006). Como hipótesis nula, podríamos suponer que si el ambiente va a seleccionar en una comunidad, operando sobre especies con requerimientos ecológicos similares independiente del grado de parentesco, entonces se esperaría un arreglo de las especies coexistentes, que no depende de su grado de parentesco, el cual debería expresarse en una estructura filogenética de tipo aleatoria (Cavender-Bares, Keen, and Miles 2006; Cavender-Bares et al. 2004; Horner-Devine et

al. 2004; Tofts and Silvertown 2002; Webb et al. 2002). Por el contrario, en presencia de competencia inter-específica la comunidad presentaría una estructura filogenética sobre-agregada, se esperaría un cambio hacia una sobre-dispersión y una mayor diferenciación fenotípica entre las especies (i.e. desplazamiento de caracteres) (Maherali and Klironomos 2007, 2012).

Así, para poner a prueba la hipótesis HCP, se requiere evaluar experimentalmente (i) la competencia interespecífica en comunidades con diferentes parentescos filogenéticos (ii) cambios en la diversidad de especies y (iii) la existencia de cambios en el parentesco filogenético de las especies, como una consecuencia de la competencia inter-específica (Kraft et al. 2007). Muchos estudios han trabajado en el contexto de esta hipótesis (Tofts and Silvertown 2002; Webb et al. 2002); sin embargo, una evaluación completa y rigurosa de la hipótesis HCP requiere una aproximación experimental manipulativa. En este sentido, los microorganismos son excelentes modelos para poder trabajar (Maherali and Klironomos 2007, 2012), pues se pueden controlar experimentalmente otros procesos que también afectan las comunidades por ejemplo, depredación, perturbaciones y procesos de dispersión de las especies (Horner-Devine and Bohannan 2006).

El objetivo de este estudio es determinar como el grado de parentesco dentro de una comunidad y la disponibilidad de recursos, afecta a la estructura comunitaria de las comunidades. Se propone trabajar con un sistema *in vitro*, generando ensambles de aislados de hongos del género *Trichoderma* obtenidos todos desde un mismo sitio de colecta. En condiciones *in vitro* se colocaron ensambles de aislados que poseían diferentes grados de parentesco filogenético y que estaban sometidos a diferentes niveles de recursos. Se evaluó la intensidad de la competencia, los cambios en diversidad, y los cambios en los grados de parentesco de las especies.

## MATERIALES Y METODOS

### *Selección e identificación de cepas*

Para este estudio se utilizaron 9 cepas, correspondientes a 4 especies, provenientes de la prospección realizada a lo largo de Chile. Todas las cepas utilizadas, fueron recolectadas desde una área, en las cercanías de Talca, Región del Maule, Chile Central (71° 30'53" O; 35° 25'30"S), en ese punto se tomaron 10 muestras de suelo, desde distintas formaciones vegetales, a no más de 100 m unas de otra, contando este punto de colecta con un clima templado cálido con lluvias invernales, temperatura media de 14,6°C y precipitaciones de 689,3 mm anuales ([http://www7.uc.cl/sw\\_educ/geografia/cartografiainteractiva/](http://www7.uc.cl/sw_educ/geografia/cartografiainteractiva/)). Las muestras se obtuvieron a una distancia no mayor a 100 metros desde un punto de colecta a otro (Tabla 1). Cada cepa, consiste en un clon; por simplicidad se consideró a cada cepa como un linaje diferente.

Las cepas aisladas fueron identificadas a nivel de especie por extracción de ADN y posterior secuenciación de la región ribosomal intergénica (ITS1-ITS2) (Druzhinina, 2008). La amplificación por PCR fue efectuada en un volumen de 50 µl que contiene una mezcla de 40 ng de DNA molde con 0.2 mM de cada partido, r, 200 mM de cada nucleótido y 2.5 U of Taq DNA polimerasa en GeneAmp 103 PCR Buffer II (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl) (Perkin-Elmer). Estas reacciones fueron sometidas a desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1.5 min a 94°C, 2 min a 55°C, y 3 min a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C en un termociclador Eppendorf. Alicuotas (4 µl) fueron analizadas por electroforesis en gel agarosa al 1,2% p/v en tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA [pH8]), teñido con GelRed y fotografiado en transiluminador con luz UV. El amplicón obtenido se secuenció incluyendo los espaciadores ITS1 e ITS2 y 5.8S rDNA, lo que fue realizado por MacroGen Inc. (<http://www.macrogen.com>). El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1994). Las secuencias resultantes, fueron contrastadas por el programa Trichokey (Druzhinina et al. 2005) considerándose identificaciones correctas, sobre un 95% de similitud.

Con las secuencias obtenidas en cada cepa, se procedió a la reconstrucción de las relaciones filogenéticas de estas. El alineamiento fue optimizado manualmente, se determinó la divergencia de nucleótidos, estimada con el programa Modeltest, resultando seleccionado el método de Kimura de dos parámetros (Kimura, M. 1980.), excluyendo gaps y sitios equívocos. La inferencia filogenética propiamente tal se realizó mediante máxima verosimilitud, usando el programa Paup (Swofford & Sullivan 2003). Los clados fueron sustentados por procedimiento de bootstrap, con 1000 réplicas en cada caso. Se utilizó al hongo filamentoso *Giberella moniliforme* como *outgroup* determinándose finalmente la topología del árbol seleccionado. Se generaron arboles con Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana (Anexo 3), utilizándose para los análisis el obtenido por Máxima Verosimilitud.

#### Rasgos funcionales.

Se determinó micoparasitismo, equivalente a la depredación entre hongos, donde las hifas de uno atacan y digieren a las hifas de otro, para lo cual en placas de Petri, se colocaron discos de micelio de 5 mm de diámetro, proveniente de la zona de avance de cultivos puros de cada cepa, para luego ser incubados a 25° C por 5 días, esperando hasta que los micelios de ambas colonias se encontraron, observándose bajo microscopía, observándose interacción entre hifas y crecimiento de la cepa sobre micelio de hongos competidores.

Para determinar producción de compuestos difusibles (capaces de difundirse por el medio y generar un halo de inhibición), definida como ausencia de crecimiento de la cepa), se colocaron placas de Petri, con agar papa dextrosa (APD), sobre las cuales se puso un disco de celofán, y al medio de éste se inoculó con discos de micelio de 5 mm de diámetro, proveniente de la zona de avance de cultivos puros de cada cepa, para luego ser incubados a 25° C por 5 días. Posteriormente, el disco de celofán conteniendo el crecimiento de las cepas, fueron retirados y sobre el agar se colocó un disco de micelio, proveniente de cultivos puros de *Fusarium oxysporum*, adicionalmente se dejaban cultivos con solo las cepas de *Trichoderma* y de cada uno de los patógenos como controles, cuando el crecimiento de estos últimos completaba

el diámetro de la placa de Petri, se determinaba el porcentaje de inhibición causado por la presencia de las cepas de *Trichoderma*. Se consideró como presencia de compuestos difusibles, cuando el crecimiento del patógeno, fue significativamente inferior al crecimiento en agar papa dextrosa APD sin crecimiento de las cepas de *Trichoderma*.

Se estableció la señal filogenética de dichos caracteres calculada por la aleatorización de los valores de rasgos a través de los ápices del árbol filogenético, determinando si la distribución de éstos esta correlacionada con la distancia filogenética entre los organismos componentes del árbol, en caso de existir una correlación significativa se consideran caracteres conservados. (Anexo 4).

#### Capacidad competitiva.

Con el fin de contar con una métrica cuantitativa de la capacidad de competencia de las distintas cepas, y de las comunidades, se determinó la jerarquía de competencia entre todas las cepas, evaluando la competencia interespecifica entre pares de aislados considerados en este estudio. En placas de Petri de 9 cm de diámetro, se colocaron a) un par de cepas enfrentadas unas con otras y b) cada una de las cepas creciendo en placas independientes (cultivos puros), Estos tratamientos fueron incubados a 25°C por 48 horas, evaluándose el crecimiento de cada una de las cepas, comparando el diámetro de crecimiento de cada una respecto a las mismas cepas cultivadas en forma independiente; la reducción porcentual en el crecimiento de una cepa creciendo junto con otra comparada con el crecimiento de la cepa creciendo sola fue una medida de la capacidad competitiva de cada una de las cepas. Así para cada cepa, se promedió, el efecto de inhibición que ejerce sobre el total de cepas estudiadas lo que fue considerado una medida de su capacidad competitiva. Todos los pares de competidores, se realizaron en triplicado, bajo un diseño completamente al azar.

### Ensayo *In vitro*

Se estableció un ensayo *in vitro*, a través de un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 3, donde los factores fueron grado de parentesco alto (agregada), medio (al azar) y bajo (sobredispersa) y riqueza del medio (rico, medio y pobre); la riqueza del medio se cuantificó como el porcentaje de extracto de malta, el que cumple todos los requerimientos nutricionales de los hongos: pobre (4 g/l), estándar (10 g/l) y rico (23 g/l) de extracto de malta utilizado en el agar. Para cada tratamiento se dispusieron cinco réplicas.

El número inicial de especies por comunidad fue de 4, este número se eligió, con el fin de eliminar el factor ubicación, al poder ubicar en forma equidistante a todos los componentes de la comunidad en las placas. El grado de parentesco se generó por medio de iteración usando el programa Phylocom (Webb et. al 2008); se estimó el Índice de parentesco neto (Net Relatedness Index) (NRI), siendo los valores negativos y significativos, indicadores de bajo parentesco y valores positivos significativos indicadores alto grado de parentesco); cualquier valor cercano a cero implica que el grado de parentesco no determina la estructura de la comunidad (Vamosi et al. 2009; Pausas & Verdu, 2010).

La abundancia de cada cepa fue representada por la superficie ocupada en las placas Petri, la que fue iniciada como un disco de micelio de 0,5 cm, bajo el supuesto que cada población contaba con una abundancia igual al inicio del ensayo. Estos discos fueron puestos en una distribución equidistante entre todas las cepas, separados a 0,5 cm unos de otros. Adicionalmente como control, se pusieron placas con solo un disco de micelio, de cada población, como referencia. Posteriormente las placas, fueron incubadas a 25 °C durante para todos los casos. Todos los tratamientos fueron realizados en triplicado. El índice de Simpson, se evaluó usando el área de crecimiento dentro de la placa por cada cepa. Cuando una cepa fue completamente cubierta por otra, se consideró extinta y por tanto una reducción de la riqueza de especies.

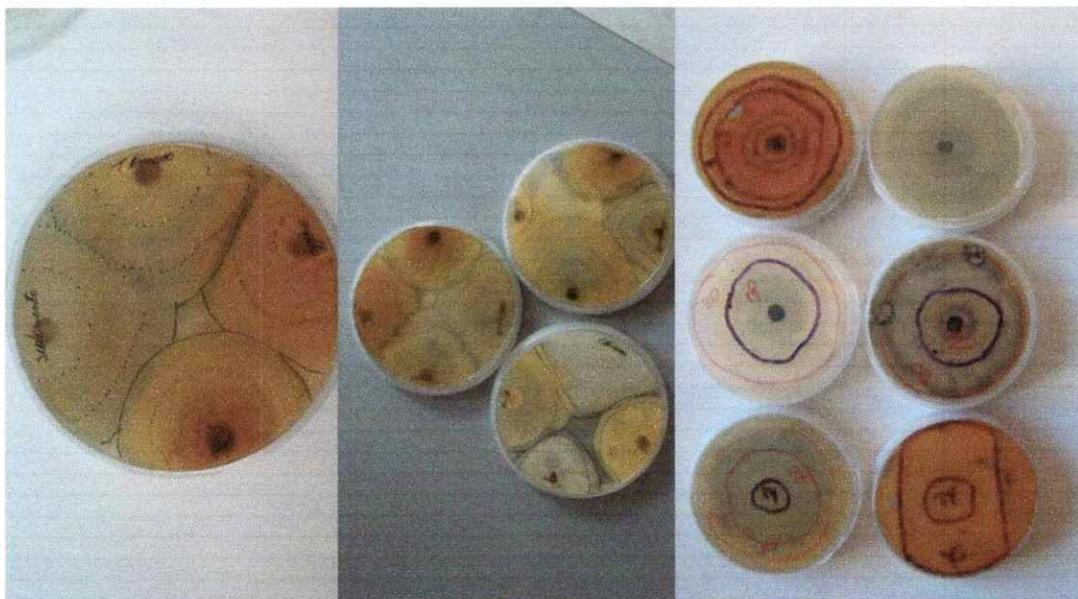


Figura 4 Disposición de cepas, en placa de Petri y cultivo de controles. Cada miembro de la comunidad, fue colocada en un extremo de la placa, midiéndose en forma consecutiva su crecimiento (izquierda), y determinando su abundancia relativa, en relación al área que ocupaba cada uno de la placa de Petri, los efectos de la competencia, se evaluó, utilizando las placas control, con cada especie creciendo en forma aislada (Derecha), El gradiente ambiental, se generó por cambios en la concentración de extracto malta de cada placa (centro).

Para determinar la intensidad de la competencia entre los tratamientos se evaluó la competencia difusa sobre cada cepa, o sea el efecto que tienen las especies de la comunidad experimental sobre una especie focal. Para ello se compararon cambios en el radio de crecimiento de cada cepa ( $a$ ) coexistiendo con el resto de las especies ( $b, c$  y  $d$ ), con los cambios en el radio de crecimiento de la especie ( $a$ ) creciendo sola. El efecto de la competencia difusa sobre la cepa  $a$  se estimó usando la siguiente formula.

$$Ef(a) = \frac{Ra(b, c, d) - Ra}{Ra}$$

Donde  $Ef(a)$  = Efecto de la competencia difusa sobre la cepa "a" en una comunidad formada por las especies "a,b,c,d";  $Ra$  = Radio de la colonia de la especie "a" creciendo sola;  $Ra(b,c,d)$  = radio de la colonia de la especie "a" creciendo con las especies "b, c y d". Valores cercanos a cero indican ausencia de competencia; valores negativos indican presencia de competencia. El efecto de la competencia difusa sobre cada cepa de la comunidad, nos da el nivel de competencia interespecífica. Este valor se obtuvo de la siguiente manera: para cada réplica se midió el efecto competitivo sobre cada una de las 4 especie, obteniéndose así un promedio del efecto competitivo sobre las tres réplicas por tratamiento, obteniéndose así un total de 12 valores (4 valores por réplicas x 3 réplicas)

#### Análisis estadístico.

Para verificar el efecto de la disponibilidad de recursos y el grado de parentesco, se realizó un ANDEVA, previa comprobación de los supuestos requeridos para este tipo de análisis (prueba de normalidad por test de Kolmogorov Smirnov y prueba de homocedasticidad por test de Levene) (Sokal and Rohlf, 1995). En los casos que no se cumplieron los supuestos, se aplicó test de Box-Cox para realizar las transformaciones requeridas. En los casos que se detectó un ANDEVA significativo, se aplicó una prueba *a posteriori* para identificar el par de tratamiento que eran diferentes (test de Tukey,  $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Rasgos funcionales y jerarquías competitivas.

Ninguno de estos caracteres relacionados con la habilidad competitiva se asoció a una especie en particular, distribuyéndose en forma aleatoria, sobre el árbol filogenético (Figura 5). La aleatorización de los valores de caracteres a través de los ápices del árbol filogenético, no mostró una distribución correlacionada con la distancia filogenética entre los organismos componentes del árbol, por lo que se consideró que no exista una señal filogenética (Anexo 4).

Las cepas *Trichoderma virens* (Thvichu) y *Trichoderma ovalisporum* (Thshanomila), mostraron la mayor capacidad de disminuir el crecimiento del resto de las especies, siendo ambas capaces de producir compuestos difusibles y generar micoparasitismo sobre sus competidores. Cabe destacar que las correspondientes a la especie *T. virens*, mostraron jerarquías de competencia tanto altas como bajas (figura 4). Pese a que la especie *T. virens* (San Pedro), presentó los 3 caracteres que sugieren habilidad competitiva, mostró la jerarquía competitiva más baja obtenida de los experimentos binarios (Figura 4). Se obtuvo una correlación positiva entre la jerarquía competitiva de cada especie y la liberación de compuestos difusibles ( $r=0.86$ ;  $p<0.01$ ) así como la capacidad de micoparasitismo ( $r=0.72$ ;  $P<0.05$ ).

### *Evaluación de la competencia difusa*

El nivel de parentesco y la disponibilidad de recursos afectaron significativamente la intensidad de la competencia difusa. Además, se detectó una interacción estadísticamente significativa entre estos dos factores (Tabla 2; Figura 4), lo cual sugiere que en comunidades con bajo nivel de recursos la competencia fue siempre más intensa independiente del grado de parentesco.

### *Diversidad de especies*

El grado de parentesco y la disponibilidad de recursos afectaron significativamente la diversidad de especies; no se detectó una interacción estadísticamente significativa entre ambos factores (Tabla 3). Ambos factores contribuyeron a la reducción en la diversidad de especies, pero fue más intenso el efecto de la disponibilidad de recursos (Figura 5). Se obtuvo que tanto, en la condición media como baja de recursos las comunidades menos emparentadas expresaran las menores reducciones en la diversidad (Figura 6).

### *Estructura Filogenética*

El grado de parentesco y la disponibilidad de recursos, modificaron significativamente la estructura filogenética de la comunidad fúngica (Tabla 4). Además se detectó una interacción estadísticamente significativa entre ambos factores, lo cual sugiere que los cambios más intensos se produjeron en el tratamiento con menor disponibilidad de recursos (Figura 7) En esta condición experimental, los resultados fueron diversos, por ejemplo, mientras que la comunidad altamente emparentada disminuyó significativamente su grado de parentesco (lo esperado); las comunidades de parentesco bajo y medio incrementaron significativamente su grado de parentesco (Figura 6); por el contrario, en la condición de elevada disponibilidad de recursos, no se detectaron cambios significativos en el grado de parentesco (Figura 6).

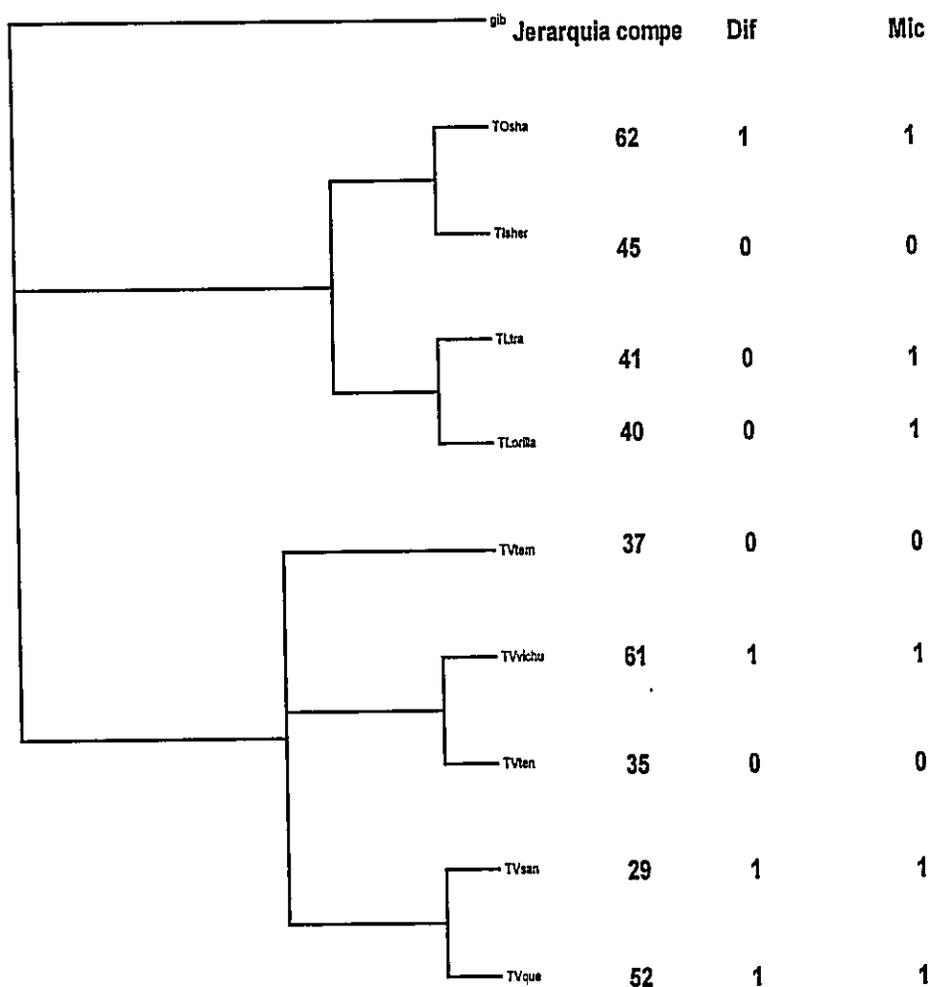


Figura 5. Reconstrucción filogenética de las cepas de *Trichoderma* (obtenido por máxima verosimilitud) y caracteres asociados a habilidad competitiva: Jerarquía competitiva, Producción de sustancias Difusibles (Dif.) y Micoparasitismo (Mic).

\*1 presencia del carácter; 0 ausencia del carácter.

Phylogenetic reconstruction of *Trichoderma* strains and competition ability related : Siderofores (Sid.), Difusibles (Dif.), mycoparasitism (Mic) and Competition Ranking

\*1 presencia del carácter; 0 ausencia del carácter.

\*1 character presence; 0 character absence.

Tabla 2 Efecto de grado de parentesco y la disponibilidad de recursos sobre la intensidad de la competencia difusa presente en las comunidades experimentales de *Trichoderma*, en un ensayo de microcosmos. Effect of relatedness and resource availability, on diffuse intensity competition in communities of the genera *Trichoderma* in microcosm's trial

	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media de los cuadrados	F	P
Grado de Parentesco	0,67	2	0,33	9,35	0,0002
Disponibilidad de recursos	0,43	2	0,21	5,98	0,004
Interacción	0,38	4	0,09	2,68	0,03
Error	3,58	18	0,03		

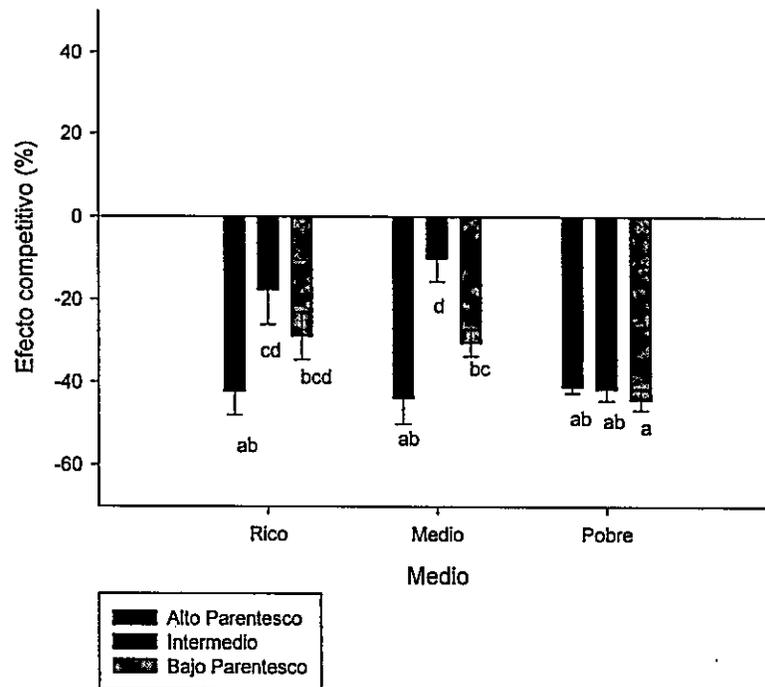


Figura 6: Efecto del grado de parentesco y riqueza de recursos sobre la intensidad de la competencia difusa en comunidades de hongos del género *Trichoderma*, en condiciones *in vitro*.

Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas Tukey HSD,  $P < 0.05$ . Effect of relatedness and resource availability, on diffuse intensity competition in communities of the genera *Trichoderma* *in vitro* conditions.

Same letter show absence of statistical differences Tukey HSD ( $P < 0.05$ )

Tabla 3.- Efecto de grado de parentesco y la disponibilidad de recursos sobre la diversidad (Índice de Simpson) en comunidades de *Trichoderma*, en un ensayo *in vitro*. Effect of relatedness and resource availability, on diversity (Simpson Index) in communities of the genera *Trichoderma* in *in vitro* trial

	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media de los cuadrados	F	P
Grado de Parentesco	0,10	2	0,05	4,57	0,02
Riqueza del medio	0,439	2	0,21	19,12	0,001
Interacción	0,074	4	0,018	1,63	0,21
Error	0,20	18	0,011		

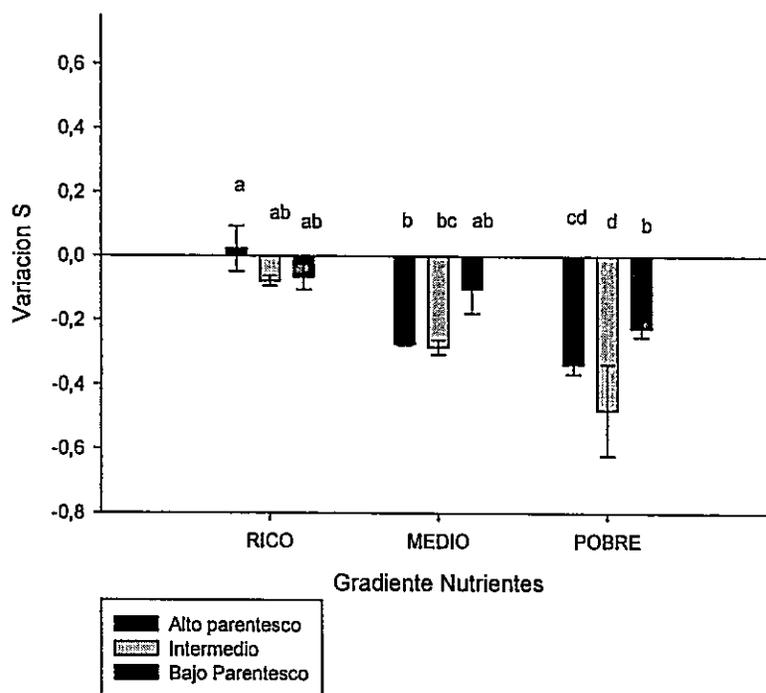


Figura 7: Efecto del grado de parentesco y la disponibilidad de recursos sobre la diversidad (Índice de Simpson) de comunidades de *Trichoderma*, en condiciones *in vitro*.

Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas Tukey HSD,  $P < 0,05$ .

Effect of relatedness and resource availability, on diversity (Simpson Index) in communities of the genera *Trichoderma* *in vitro* conditions. Same letter show absence of statistical differences Tukey HSD ( $P < 0,05$ )

Tabla 4 Efecto de grado de parentesco y la disponibilidad de recursos sobre los cambios en el grado de parentesco en comunidades de *Trichoderma*, en un ensayo *in vitro*. Effect of relatedness and resource availability, on relatedness grade in communities of the genera *Trichoderma in vitro* trial

	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media de los cuadrados	F	P
Grado de Parentesco	9066,67	2	4533,33	157,91	< 0,0001
Riqueza del medio	397,23	2	198,61	6,91	0,0059
Interacción	1418,03	4	354,51	12,34	< 0,0001
Error	516,72	18	28,70		
Tiempo	1062,26	1	1062,26	37,00	< 0,0001
Tiempo x Parentesco	2999,07	2	1499,53	52,23	< 0,0001
Tiempo x Riqueza medio	397,23	2	198,61	6,91	0,0059
Tiempo x Riqueza medio x TG. Parentesco	1418,08	4	354,51	12,34	< 0,0001
Error	516,723	36	28,70		

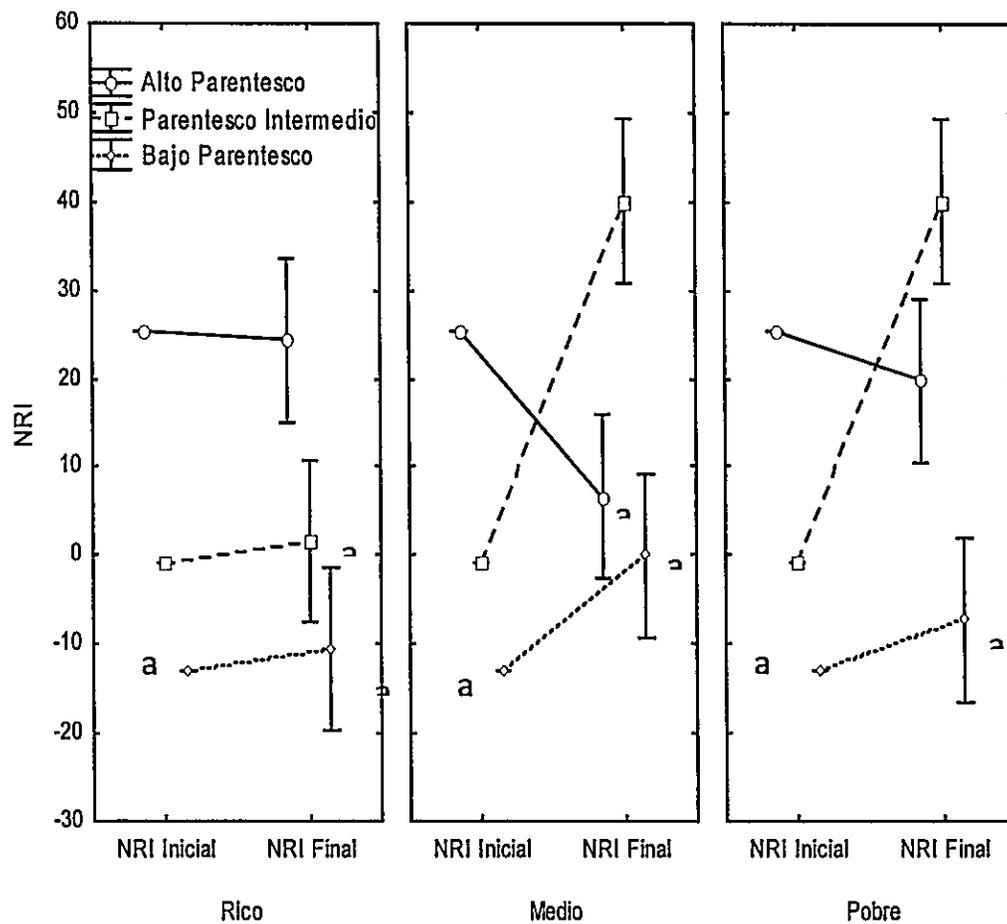


Figura 8: Efecto del grado de parentesco y la disponibilidad de recursos, sobre los cambios en la estructura filogenética medido como el índice de parentesco neto (NRI), en comunidades del género *Trichoderma*, en condiciones *in vitro*. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas Tukey HSD,  $P < 0.05$ .

Effect of relatedness and resource availability, on the phylogenetic structure variation, asses as net relatedness index (NRI), in community's og the genera *Trichoderma* *in vitro* conditions.

Same letter show absence of statistical differences Tukey HSD ( $P < 0.05$ )

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados más importantes de este estudio, se pueden resumir de la siguiente manera: tanto el grado de parentesco como la disponibilidad de recursos afectaron, significativamente la intensidad de la competencia interespecífica, lo cual a su vez implicó una reducción en la diversidad de especies y cambios significativos en la estructura filogenética de las comunidades, existiendo un efecto combinado de estos factores sobre las variables respuestas.

Los ensambles más emparentados fueron las más intensamente afectadas por la competencia, en especial en las condiciones de escasez de recursos. La disponibilidad de recursos, fue más importante que el grado de parentesco en sus efectos sobre la estructuración comunitaria de *Trichoderma*. Así, las predicciones de la HCP se ven corroboradas en términos generales, detectándose además un efecto más intenso de la contingencia ecológica (recursos), sobre la estructura comunitaria; así la contingencia ecológica tendría un rol modulador sobre los efectos históricos que afectan la estructura de las comunidades.

### *Competencia y estructuración de comunidades*

Los atributos funcionales que explicarían la competencia obtenida en este trabajo parecen ser la liberación de compuestos difusibles y el mico-parasitismo, como ha sido ampliamente reportado en otros trabajos (Cook, 1989; Harman 2000; Benítez et al. 2004). Es interesante destacar, que, en todas las condiciones experimentales, las cepas que se extinguieron fueron, las con menor jerarquía competitiva (Anexo 2), lo que por una parte respalda la determinación de dicha jerarquía y respalda aún más la pre-eminencia de la escasez de recursos sobre el grado de parentesco como el mecanismo estructurador de las comunidades.

De acuerdo con lo esperado, la competencia es potenciada por una condición limitante de nutrientes; es materia de debate si es que en este tipo de organismos (los hongos) el mecanismo inhibitorio es sencillamente sobre crecimiento producto de una elevada

tasa de crecimiento, efectos alelopáticos por la liberación de compuestos difusibles o bien mico-parasitismo en el cual un tipo de hongo consume a otros (Harman 2000, Cook, 1989). Este tipo de mecanismo inhibitorio es bastante diferente a lo que se podría esperar para plantas vasculares o animales, en los cuales es posible reconocer inequívocamente a la competencia por explotación como el principal mecanismo estructurador de las comunidades (Soliveris 2011; Losos 1998). Es interesante notar que en los hongos existen límites sutiles entre competencia y depredación (Cook, 1989); esta condición idiosincrática debería ser estudiada con mayor atención para dilucidar hasta qué punto los marcos teóricos relacionados con la competencia, son aplicables para el estudio de la ecología comunitaria de los hongos (Mahelari and Klironomos, 2007).

Es necesario considerar además que las condiciones experimentales de nuestro estudio, probablemente forzaron la existencia de la competencia, al generar un ambiente homogéneo, sin refugios u otras fuentes de heterogeneidad ambiental que permiten la coexistencia entre especies con distintas habilidades competitivas (Tilman, 1994; Grace et al., 1993; Bowker et al., 2010), por lo cual la proyección de estos resultados hacia las comunidades naturales de hongos debe ser tratada con precaución.

Otro aspecto metodológico a considerar es la manera como se evaluó la competencia interespecífica en este estudio; en esencia se evaluó el promedio de la competencia difusa, actuando en cada tratamiento. Esto pudo haber diluido la importancia de algunos atributos competitivos, que pudieran ser relevantes en una interacción binaria y además incrementar los efectos competitivos al ser las especies afectadas por la totalidad del resto de las especies. Sin embargo, es muy probable que la competencia difusa sea la forma como las especies interactúan en las comunidades naturales (Connell, 1980, Miller et al. 2014,). Es interesante notar que de acuerdo a lo esperado, las especies que se extinguieron en los tratamientos experimentales, eran aquellas con las menores jerarquías competitivas.

### *Hipótesis de Darwin.*

En nuestro estudio, las predicciones de Darwin, tuvieron un soporte empírico positivo; sin embargo, el diseño experimental nos permitió identificar una mayor complejidad de respuestas. En ausencia de competencia (tratamiento con abundancia de recursos) el parentesco filogenético de las especies fue irrelevante, mientras que, en la condición de escasez de recursos, todas las comunidades experimentales expresaron respuestas significativas. Se destaca el hecho de que la disminución en la diversidad de las comunidades, se debió a exclusión competitiva (constatado por la disminución en la riqueza de especies) más que en cambios en dominancia de las especies, lo cual es consistente con un proceso mediado por competencia interespecifica intensa entre competidores fuertes y débiles (Webb et al. 2002; Cavender-Bares, Keen, and Miles 2006).

Un aspecto novedoso de este estudio es la distribución de los rasgos funcionales dentro de la filogenia (*ad-hoc*) construida para el grupo. Teóricamente, la HCP supone que los caracteres asociados a competencia entre especies emparentadas, sean conservados, es decir tengan una fuerte señal filogenética (Cavender-Bares et al. 2004); esto no ocurrió, en nuestro estudio: los caracteres convergieron entre las especies, independientemente del linaje (ANEXO 3). Así, a pesar que los caracteres funcionales considerados no expresaron una señal filogenética, las predicciones que emergen de la hipótesis de competencia/parentesco de Darwin, continúa teniendo validez. Estos resultados sugieren que la filogenia *ad-hoc* construida y la escala temporal de nuestro estudio no permitieron capturar la existencia de señal filogenética en los rasgos estudiados. Es posible que, en estudios de comunidades naturales, las cuales han evolucionado en escalas de tiempos bastante mayores, sea posible detectar la existencia de señal filogenética (si es que ésta existe).

Uno de los primeros intentos de integrar la filogenia molecular, con experimentos de competencia en comunidades terrestres fue un meta-análisis (Cahill et al. 2008). Este estudio entregó poca evidencia, de competencia entre especies emparentadas; la mayor cantidad de estudios se han realizado en el contexto de la ecología de comunidades y la filogenia se ha realizado en plantas vasculares a lo largo de

gradientes ambientales donde las interacciones dominantes se ubican en un continuo entre competencia y facilitación (Webb et al. 2002; Cavender-Bares et al. 2004,2009, Solivieri et al. 2011; Fritschie et al 2014), Estudios experimentales más recientes (Jiang et al. 2010, Burns and Strauss 2011, Violle et al. 2011, Peay et al. 2012, Tan et al. 2012, Best et al.2013), han reportado relaciones entre parentesco tanto como de incremento como de disminución de la intensidad de interacciones de competencia.

En comunidades experimentales de bacterias, se observó que el nivel de parentesco de las especies componentes de comunidades experimentales, decrecía con el aumento de la disponibilidad de carbón orgánico, siendo asociado a una disminución de la competencia inter-específica, aun cuando no pudo ser demostrado experimentalmente (Horner-Devine & Bohanan, 2006). Esto se condice parcialmente con nuestro experimento donde comunidades con un parentesco inicial bajo, mostraron una tendencia a incrementar este parentesco frente a una disminución de las fuentes de carbono, pero comunidades con un nivel de parentesco inicialmente alto, mostraron una disminución marcada de este parentesco (Figura 5). En un estudio en que se generaron comunidades con un mismo número de especies de hongos micorrícicos, Maherali & Klironomos (2007) encontraron una menor riqueza de especies en comunidades, conformadas por hongos de una sola familia, en comparación con las comunidades, compuestas por hongos de 2 o 3 diferentes familias. Así mismo en un experimento de invasión de bacterias, Jiang et al. (2010) mostró que la frecuencia de establecimientos exitosas de bacterias invasoras, decrecía a medida que se incrementaba el parentesco filogenético con la comunidad bacteriana nativa, suponiendo que fuertes interacciones de competencia, resultaban en baja riqueza de especies y en invasiones fallidas, en cada estudio respectivamente. De la misma forma, en experimentos con protozoos también se ha encontrado fuerte evidencia, que mientras mayor el nivel de parentesco, mayor es la intensidad de la competencia (Violle et al 2014). En las comunidades naturales, sin embargo, es posible que, dado que las condiciones y los recursos varían tanto en tiempo como espacio, las posibilidades que ocurra competencia incluso cuando el parentesco entre especies es alto, se ve disminuida y por lo tanto las especies van a persistir más bien en relación con sus requerimientos de nicho fundamental (Fox 2002; Jiang & Morin 2004).

Nuestro estudio, hace tres aportes interesantes: (i) nuestro experimento fue realizado a lo largo de un gradiente ambiental (de recursos) lo cual puede tener importantes implicancias teóricas por cuanto las interacciones de competencia pueden pasar a ser reemplazadas por facilitación. Esto puede ser particularmente importante para plantas vasculares (Solivieris et al 2011); en nuestro estudio, sin embargo, nosotros no pudimos detectar este tipo de cambio; de hecho, la competencia se vio intensificada a medida que disminuía la disponibilidad de recursos. (ii) nuestro diseño experimental incluye explícitamente la evaluación de la competencia inter-específica, en particular competencia difusa, actuando sobre cada una de las especies. De hecho, lo más frecuente es inferir la competencia a partir de los cambios estructurales observados en las comunidades (Cavenders-Bares 2009; Solivieris 2011). Esto puede ser una limitación por cuanto se sabe que existen otros factores que también pueden modificar la estructura de las comunidades en un sentido similar a la competencia inter-específica, tales como depredación, facilitación, especiación alopátrica, migraciones y extinciones locales (Losos 2008; Pigot 2014; Soliviers et al 2011; Mayfield and Levine 2010 Cavender-Bares et al. 2009; Valiente-Banuet & Verdu 2007). (iii) Ninguno de los estudios antes mencionados, se realizó con organismos, capaces de además de competir, depredar a sus congéneres como es el caso de *Trichoderma* (Cook, 1989; Harman et al 2000). Este hecho añade mayor complejidad a la comprensión de la estructura de las comunidades, al menos en organismos unicelulares, pues es necesario también considerar las características idiosincráticas de las especies que conforman las comunidades. Bajo un contexto de depredación actuando simultáneamente con la competencia, podría ser que el efecto positivo de un hongo competidor fuerte y depredador a la vez actúe en forma sinérgica, de modo de reducir con más intensidad la diversidad de especies.

Dilucidar cuán extrapolables son los resultados que se obtengan de experimentos manipulativos a la comprensión de las comunidades naturales, donde existe, entre otras cosas, una alta heterogeneidad ambiental, constituye un desafío pendiente, en especial en organismos como los hongos, donde se ha determinado que la estructura en horizontes del suelo, podría permitir la coexistencia de especies emparentadas ocupando nichos divergentes (Taylor et al 2014).

En conclusión, el nivel de parentesco que se establece, en el momento de conformarse una comunidad, generará efectos diferenciales en la estructura de las comunidades, los cuales estarían modulados, por la disponibilidad de recursos. En segundo lugar, la inclusión de otras interacciones biológicas como la depredación en la determinación de la estructura filogenética de las comunidades, constituyen un desafío que debería enfrentarse en futuros estudios comunitarios que incluyan las relaciones filogenéticas de las especies.

## LITERATURA CITADA

- Bais, H. Weir, T. Perry, L. Gilroy, S. Vivanco, J. 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu Rev Plant Biol.*;57:233-266.
- Blomberg, S. Garland, T. Ives, A. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*,57, 717-745
- Cahill, J. Kembel, S. Lamb, E. Keddy, P. 2008. Does the phylogenetic relatedness influence the strength of competition among vascular plants? *Perspectives in Plant Ecology. Evolution and Systematics* 10: 41-50
- Cavender-Bares, J. Keen, A. Miles, B. 2006. Phylogenetic Structure Of Floridian Plant Communities Depends On Taxonomic And Spatial Scale. *Ecology Letters* 7 (87):S109-S122.
- Cavender-Bares, J. Ackerly, D. Baum, D. Bazzaz, F. 2004. Phylogenetic Overdispersion in Floridian Oak Communities. *The American naturalist* 163 (6):823-843.
- Cook, J. Baker, K. 1989. *The Nature and practice of biological control of plant pathogens II Edition.* T. A. P. Society, New York
- Donoso, E. Bustamante, R. Caru, M. Niemeyer, H. 2008. Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Appl Environ Microbiol* 74, 1412-1417
- Darwin, C. 1859. *The Origin of Species by Means of Natural Selection.* Murray, London
- Druzhinina, I. Komon, M. Laszlo, Z. Kredics, Hatvani, L. Antal, Z. Belayneh, T. Kubicek, C. 2008. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology* 154: 3447-3459
- Gause, I. 1934. *The Struggle for Existence.* Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Harman, G. Chet, I. Baker, R. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. *Phytopathology* 71:569-572
- Harman, G. Howell, C. Viterbo, A. Chet, I. Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56
- Horner-Devine, M. Lage, M. Hughes, J. Bohannan, B. 2004. A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432 (7018):750-753
- Huston, M. 1979. A general hypothesis of species diversity. *Am. Nat.* 113: 81-101
- Keddy, P. Weiher, E. 1999. Introduction: the scope and goals of research on assembly rules. In: Weiher, E. Keddy, P. (ed) *Ecological assembly rules: perspectives, advances, retreats.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:11-120
- Kraft, N. Cornwell, W. Webb, C. Ackerly, D. 2007. Trait evolution, community assembly, and the phylogenetic structure of ecological communities. *American Naturalist* 170: 271-283
- Levin, S. 1992. The problem of pattern and scale in ecology. *Ecology* 73:1943-46
- Leibold, M. 1998. Similarity and local coexistence of species in regional biotas. *Evol Ecol* 12:95-100

- Losos, J. Leal, M. Glor, R. De Queiroz, K. Hertz, P. Rodriguez, L. Chamizo, A. Jackman, T. Larson, A. 2003. Niche liability in the evolution of a Caribbean lizard community. *Nature* 424 (6948):542-545
- Maherali, H. Klironomos, J. 2007. Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Function. *Science* 22 (316): 17469-1748
- Mayfield, M. Levine, J. 2010. Opposing effects of competitive exclusion on the phylogenetic structure of communities. *Ecol Lett* 13:1085–93
- Mcpeck, M. Miller, T. 1996. Evolutionary biology and community ecology. *Ecology Letters* (77):1319-20
- Pausas, J. Verdú, M. 2010. The Jungle of Methods for Evaluating Phenotypic and Phylogenetic Structure of Communities. *BioScience* 60 (8): 614-625
- Pigot, L. Etienne, S. 2014. A new dynamic null model for phylogenetic community structure. *Ecology Letters*. Volume 18 (2): 153–163
- Samuels, G. 2006. Trichoderma: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology* 96:195–206
- Silvertown, J. Mcconway, K. Gowing, D. Dodd, M. Fay, M. Joseph, J. Dolphin, K. 2006. Absence of phylogenetic signal in the niche structure of meadow plant communities. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273 (1582):39-44
- Sokal, R. Rohlf, F. 1995. *Biometry*. 3rd. Ed. – W.H. Freeman and Company.
- Swofford, D. 1991. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1 Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Thompson, J. Higgins, D. Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680
- Tilman, D. 1982. *Resource Competition And Community Structure*. Princeton University Press, Princeton, NJ
- Taylor, D. Hollingsworth, T. Mcfarland, J. Lennon, J. Nusbaum, C. Ruess, R. 2014. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecological Monographs*, 84(1), 3–20.
- Tofts, R. Silvertown, J. 2002. Community assembly from the local species pool: an experimental study using congeneric species pairs. In: *Proc. R. Soc. Lond. B* 90 (2):385-393.
- Vamosi, S. Heard, S. Vamosi, S. Webb, C. 2009. Emerging patterns in the comparative analysis of phylogenetic community structure. *Mol. Ecol.* 18:572–592
- Vamosi, J. Vamosi, S. 2007. Body size, rarity, and phylogenetic community structure: Insights from diving beetle assemblages of Alberta. *Diversity and Distributions* 13: 1–10
- Webb, C. Ackerly, D. Kembel, S. 2008. Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and character evolution. *Bioinformatics* 24: 2098-2100
- Webb, C. 2000. Exploring the phylogenetic structure of ecological communities: an example for rain forest trees. *American Naturalist*. 156:145-155
- Webb, C. Ackerly, D. Mcpeck, M. Donoghue, P. (2002) Phylogenies And Community Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33 (1):475-505.

- Weiher, E. Keddy, P. 1995. Assembly rules, null models, and trait dispersion: new questions from old patterns. *Oikos* (74):159-164
- Weiher, E. Keddy, P. 1999. *Ecological Assembly Rules: Perspectives, Advances, Retreats*. Cambridge University Press, Cambridge.

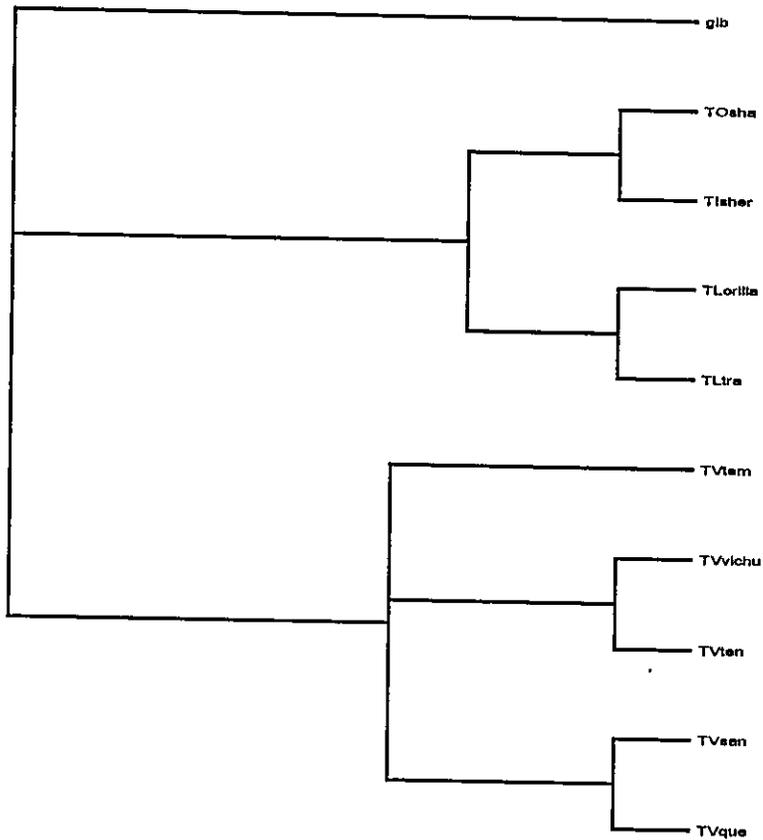
## APENDICES

Apendice 2 Composición de las comunidades, así como caracteres determinados para cada cepa (Producción de Difusibles (Dif.), mico parasitismo (Mic), y Jerarquía de competencia (JC). Y presencia (1) ausencia (0) de cada cepas al finalizar en ensayo en cada una de las condiciones de riqueza del medio..

Estructura Inicial	Cepas iniciales	Rico	Medio	Pobre	Jerarquía competitiva	Dif	Mic
agregada	thshanomila	1	1	1	62	1	1
agregada	thqueule	1	1	1	52	1	1
agregada	thsanpedro	1	0	0	29	1	1
agregada	hvtra	1	0	0	41	0	1
sobredispersa	tporilla	1	1	1	40	0	1
sobredispersa	hvsher	1	1	1	45	0	0
sobredispersa	hvtem	1	1	0	37	0	0
sobredispersa	hvten	1	1	0	35	0	0
Azar	hvsher	1	1	1	45	0	0
Azar	hvten	1	0	0	35	0	0
Azar	tgavichu	1	1	1	61	1	1
Azar	tporilla	1	0	0	40	0	1

### Anexo 3 Árboles obtenidos de reconstrucción filogenética

#### Parsimonia



#### Parámetros del Árbol

Numero de caracteres informativos = 607

Gaps tratados como "ausentes"

Optimización de estado de caracteres: Transformación acelerada (ACCTRAN)

Numero de árboles = 1

Largo del árbol = 941

Índice de consistencia (CI) = 0.9299

Índice de Homoplasia (HI) = 0.0701

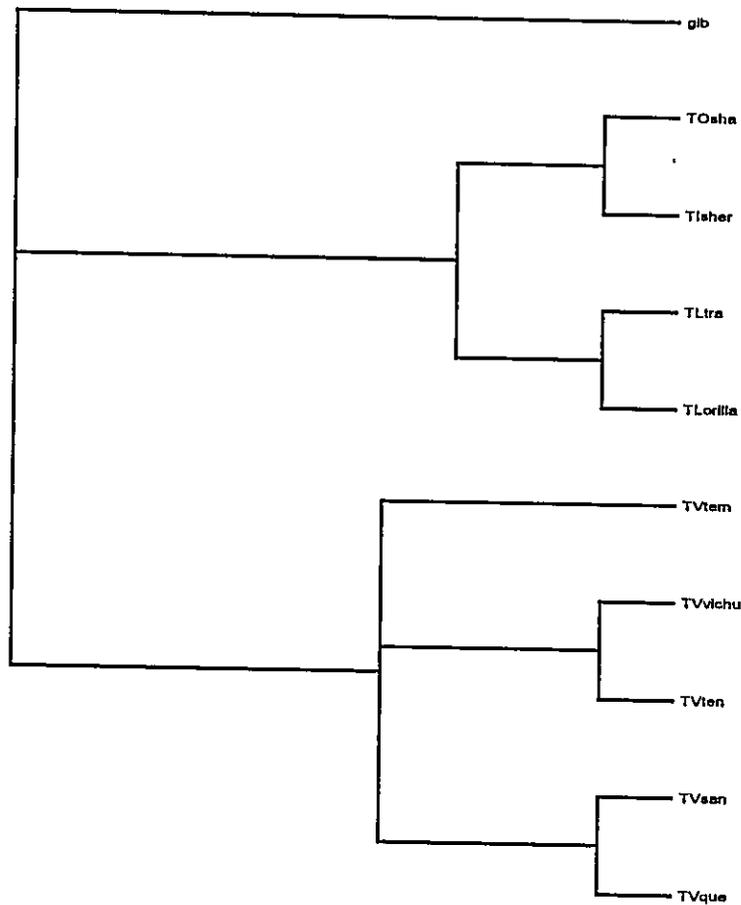
CI excluyendo caracteres no informativos = 0.9267

HI excluyendo caracteres no informativos = 0.0733

Índice de Retención (RI) = 0.9382

Índice de consistencia re escalado (RC) = 0.8724

#### Máxima Verosimilitud



Parámetros del Árbol

Numero de tipos de sustitución = 2

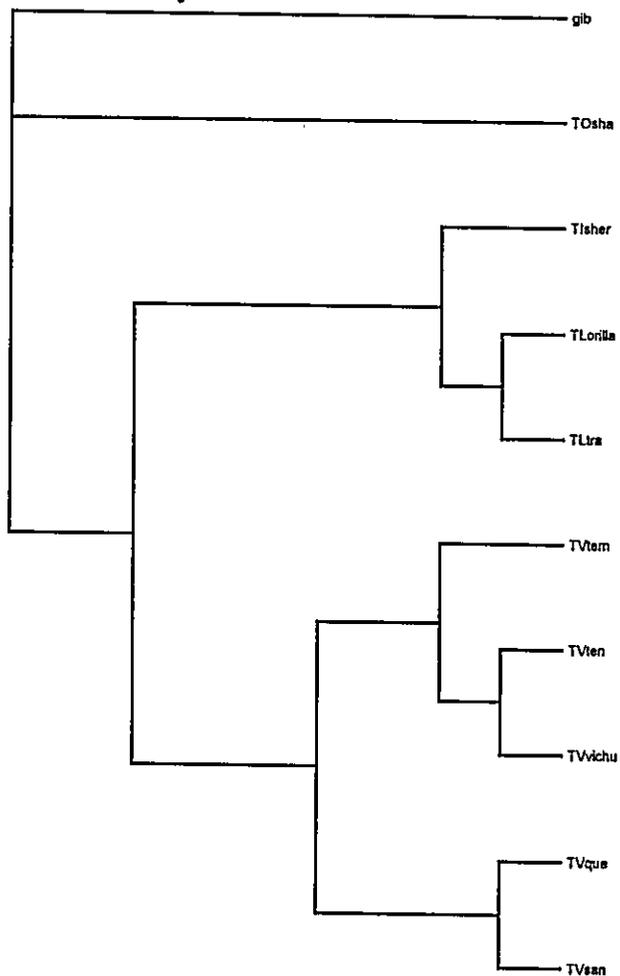
Optimización de Largo de rama = 1-dimensional Newton-Raphson con limite =20, delta=1e-006

-ln L (unconstrained) = 4975.93795

-Ln likelihood = 3875.29516v

Número de árboles = 1

## Inferencia Bayesiana



Numero de Arboles= 9

1 [p = 0.320, P = 0.320]

2 [p = 0.316, P = 0.636]

3 [p = 0.313, P = 0.949]

4 [p = 0.013, P = 0.962]

5 [p = 0.012, P = 0.975]

6 [p = 0.012, P = 0.987]

7 [p = 0.005, P = 0.992]

8 [p = 0.005, P = 0.997]

9 [p = 0.003, P = 1.000]

Anexo 4 Determinación de señal filogenética de caracteres asociados a competencia.

Los caracteres, relacionados a competencia fueron contrastados con la reconstrucción filogenética de las cepas de *Trichoderma*, determinándose si eran conservados o no (significativo para señal filogenética por medio de contrastes de la dispersión de la desviación estándar DS), para lo que se utilizó el software Phylocom (Webb et al. 2008). La señal filogenética es definida, como la tendencia de parientes cercanos, a parecerse uno al otro en ausencia de un proceso en particular, que pueda ser responsable de la evolución del patrón de rasgos (Blomberg and Garland, 2002). La correlación de rasgos con la filogenia, son testeados en función a contrastes independientes, donde la significancia estadística es realizada, por la aleatorización de los valores de rasgos a través de los ápices del árbol filogenético, determinando si la distribución de estos esta correlacionada a la distancia filogenética entre los organismos componentes del árbol, generando un valor AOT por permutaciones, siendo los valores menores a 0,05 significativos.

Los datos obtenidos, fueron contrastados con la reconstrucción filogenética de las cepas de *Trichoderma*, determinándose si eran conservados o no (significativo para señal filogenética), para lo que se utilizó el software Phylocom (Webb et al. 2008)

Carácter	Tipo carácter	AOT
Difusibles	Convergente	0,14
Micoparasitismo	Convergente	0,31
Capacidad Competitiva	Convergente	0,45

## DISCUSION GENERAL

### Aproximación observacional

Nuestro trabajo de campo, nos permite sugerir que la distancia geográfica no es una variable relevante para la estructuración de las comunidades de hongos; de hecho, se observó que la abundancia, la riqueza y diversidad (específica y filogenética) de las comunidades no se correlaciona con las distancia geográfica, como ya ha sido reportado para comunidades de hongos (Pellissier et al. 2014), reforzando así la idea general que "todo está en todas partes y es el ambiente el que selecciona", lo cual implica ausencia de limitaciones a la dispersión de los microorganismos (de Wit & Bouvier, 2006; O'Malley, 2007), pudiendo ser la temperatura la variable forzante para la estructuración de las comunidades locales (Tederso et al. 2012).

Otro resultado relevante fue que ninguna de las comunidades seleccionadas en el campo tenía una estructura filogenética al azar. O sea, todas las comunidades estaban o significativamente sobre dispersas, lo que se esperaría como producto de competencia o bien significativamente agrupadas, lo que se esperaría por efectos de filtro ambientales que operan sobre las especies en función de requerimientos de nichos similares. Dada la escala relevante para los microorganismos en estudio, las muestras pueden haber sido insuficientes para detectar una estructura filogenética aleatoria o este estado constituiría así un estado transiente de la comunidad el cual rápidamente evoluciona hacia estructuras filogenéticas más estables, como fue detectado en condiciones de campo. Por lo que sería recomendable realizar muestreos posteriores a perturbaciones relevantes para dichos organismos.

La ausencia de grandes diferencias entre los puntos de colecta en diversidad (Índice de Simpson) y la alta diversidad filogenética encontrada en glaciar Exploradores, nos hace cuestionarnos los enfoques biogeográficos tradicionales, que muestran un incremento de la biodiversidad hacia el ecuador (Hawkins 2001). Donde los niveles de contrastes presentes a escala local serían más relevantes que los patrones geográficos a gran escala, siendo el nivel de contrastes en factores abióticos tales como temperatura, humedad, pH y nitrógeno del suelo (Bahram et al. 2012, Hanson et al. 2012, McGuire et al. 2012). Nuevamente hay que indicar que nuestro esfuerzo de muestreo puede ser insuficiente.

La detección de hongos del genero *Trichoderma* en microambientes sin presencia de plantas (sedimento de Laguna del Maule; hielo glaciar, sedimento de glaciar de rocas y de mulanes), sumado a la capacidad de trasformar a sus congéneres en recursos, permitirá a estos organismos, estructurar sus comunidades en forma independiente de la de la diversidad de plantas y diversidad funcional como ha sido postulado previamente (Peay et al. 2013)

Las conclusiones de la caracterización de las comunidades, del hongo *Trichoderma*, a través de una variabilidad de ambientes, con distancias de más de 4.000 km, nos

permitió demostrar la importancia del nivel de contrastes, ambientales a escala de microorganismos, tanto sobre riqueza, diversidad y estructura filogenética de las comunidades de este hongo, que puede hacer que los gradientes tradicionales (latitud, altitud), sean irrelevantes para este tipo de organismos.

#### Aproximación experimental

Se demostró experimentalmente que la competencia interespecífica es importante y que, para el caso de organismos como los hongos, es una fuerza estructuradora de las comunidades, como ha sido ampliamente enunciado (Tilman 1982; Weiher & Keddy 1999, Pausas & Verdú, 2010), la cual puede ser modulada por el contexto filogenético de las comunidades (Maherali and Klironomos 2007, Webb et al. 2002).

La evaluación en forma simultánea y explícita de la disponibilidad de recursos y parentesco filogenético nos muestra que existen sinergias entre ambos procesos, a diferencia de lo normalmente planteado, en que se asumen como procesos que actúan en forma separada (Webb et al. 2002 Cavender-Bares et al. 2004) o en forma opuesta (Soliveres et al. 2011).

Otros aspecto controversial de este estudio es que la distribución de los rasgos funcionales dentro de la filogenia (ad-hoc) construida para el grupo, donde teóricamente, la HCP supone que los caracteres asociados a competencia entre especies emparentadas, sean conservados, es decir tengan una fuerte señal filogenética (Cavender-Bares et al. 2004); esto no ocurrió, en nuestro estudio: los caracteres convergieron entre las especies, independientemente del linaje (ANEXO 3). Esto podría deberse a que la escala temporal del experimento y/o la manipulación experimental de las especies oscurezca la señal filogenética, la cual debería expresarse en comunidades que habrían evolucionado en escalas temporales mayores a la de nuestro estudio. No obstante lo anterior, las predicciones que emergen de la hipótesis de competencia/parentesco de Darwin, fueron corroboradas experimentalmente. Esto podría deberse a la ausencia de heterogeneidad ambiental, que podría incrementar la importancia de la competencia (Zhou et al. 2002).

Este estudio sugiere que el marco teórico de la competencia interespecífica puede resultar insuficiente para entender cómo se pueden estructurar las comunidades naturales. En el caso de los hongos, por ejemplo, emerge la posibilidad de depredación (o parasitismo) como una fuerza biótica alternativa que puede estar actuando. Sin embargo, no existe un cuerpo teórico que haga predicciones específicas sobre la estructura de comunidades de competidores/depredadores muy o poco emparentadas. Aquí se abre la oportunidad de estudiar con mayor profundidad los efectos de otras interacciones biológicas (mutualismo, depredación) sobre la estructura filogenética de las comunidades y la distribución de rasgos asociados a estas interacciones.

## LITERATURA CITADA

- Bahram, M. Olme, S.Oljalg, U. Zarre, S. Tedersoo, L. 2012. Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytologist*, 193, 465–473.
- Cavender-Bares, J. Ackerly, D. Baum, D. A. Bazzaz, F. A. 2004. Phylogenetic Overdispersion in Floridian Oak Communities. *The American naturalist* 163 (6):823-843.
- De Wit, R. Bouvier, T. 2006. 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology*, 8, 755–758.
- Hanson, C. Fuhrman, J. Horner-Devine, M. Martiny, J. 2012. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 497–506.
- Hawkins, B.A. 2001. Ecology's oldest pattern? *Trends Ecol.Evol.*16: 470
- Maherali, H. Klironomos, J. 2007. Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functionin. *Science* 22 (316): 17469-1748
- O'malley, M.A. 2007. The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. *Nature ReviewsMicrobiology*, 5, 647–651.
- Mcguire, K. Fierer, N. Bateman, C. Treseder, K. Turner, B.I. 2012. Fungal community composition in neotropical rain forests: the influence of tree diversity and precipitation. *Microbial Ecology*, 63, 804–812.
- Pausas, J. Verdú, M. 2010. The Jungle of Methods for Evaluating Phenotypic and Phylogenetic Structure of Communities. *BioScience* 60 (8): 614-625
- Peay, K. Garbelotto, M. Bruns, T. 2010. Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology* 91: 3631–3640.
- Pellissier, L. Niculita-Hirzel, H. Dubuis, A. Pagni, N. Guex, C. Salamin, N. Xenarios, I. Goudet, J. Sanders, I. Guisan, A. 2014. Soil fungal communities of grasslands are environmentally structured at a regional scale in the Alps. *Molecular Ecology* 23, 4274–4290
- Soliveres, S. Eldridge, D. Maestre, F. Bowker, M. Tighe, M. Escudero, A. 2011. Microhabitat amelioration and reduced competition among understorey plants as drivers of facilitation across environmental gradients: towards a unifying framework. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic* 13: 247–258. *Molecular Ecology* (2014) 23, 4274–4290
- Tilman, D. 1982. *Resource Competition and Community Structure*. Princeton University Press, Princeton, NJ
- Webb, C. Ackerly, D. Mcpeek, M. Donoghue, P. 2002. Phylogenies And Community Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33 (1):475-505
- Weiher, E. Keddy, P. 1995.. Assembly rules, null models, and trait dispersion: new questions from old patterns. *Oikos* (74):159-164
- Zhou, J. Beicheng, X. Treves, D. Wu, L. Marsh, T. O'Neill, R. Palumbo, A.
- Tiedje, J. 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 326e334