



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

ECOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
COMUNIDADES DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS ASOCIADOS A
ENCINOS EN LA CUENCA DE CUITZEO, MICHOACÁN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

OLIMPIA MARIANA GARCÍA GUZMÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
Instituto de Geología, UNAM

DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad
Morelia, UNAM

MÉXICO, D.F.

Junio, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

ECOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
COMUNIDADES DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS ASOCIADOS A
ENCINOS EN LA CUENCA DE CUITZEO, MICHOACÁN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

OLIMPIA MARIANA GARCÍA GUZMÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM
DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
Instituto de Geología, UNAM

MÉXICO, D.F.

Junio, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de abril de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GARCÍA GUZMÁN OLIMPIA MARIANA** con número de cuenta **512012940** con la tesis titulada “**Estudio de la diversidad genética de comunidades de hongos ectomicorrizicos asociados a encinos en la Cuenca de Cuitzeo, Michoacán**”, realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL**:

Presidente: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
Vocal: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS
Secretario: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
Suplente: DR. DIEGO RAFAEL PÉREZ SALICRUP
Suplente: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de junio de 2014.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser un programa de posgrado de alta calidad y por permitirme realizar mis estudios en el.

Agradezco al Consejo Nacional Para la Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado con el número de CVU 412713.

Agradezco al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica Conacyt, Gobierno del Estado de Michoacán en apoyo al proyecto: “Estudio de la diversidad de los hongos ectomicorrízicos asociados a los encinos de la Cuenca de Cuitzeo”, Clave MICH-2009-C05-112966 por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A mi asesor de tesis el Dr. Roberto Garibay Orijel por ser mi guía académica durante estos últimos años, por ser para mi un ejemplo a seguir, por enseñarme el valor de una crítica, por las discusiones que me hicieron reflexionar y crecer y por esperar siempre lo mejor de mi.

Al Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa por plasmar su visión en este trabajo, por sus comentarios acertados que fueron muy enriquecedores y por permitirme cada tanto volver a su laboratorio.

A la Dra. Pilar Ortega Larrocea por los comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto y por los conocimientos y las discusiones en clase, y por sus palabras llenas de experiencia en momentos críticos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al que está alla arriba, por permitirme vivir esta vida y cumplir estos sueños, por cada día feliz y luminoso y cada día en que me permitiste caer, aprender y mejorar. A veces solo caer.

A mis padres.

A mi mamá Olimpia Guzmán, por la revisión y los aportes a este escrito, por tu confianza, pero sobre todo por tu cariño, la fortaleza que siempre transmites, por tu paciencia en este proceso y por esperar siempre, siempre mi mejor esfuerzo.

A mi papá Alberto García, por tu apoyo incondicional, tu ternura y tu cariño, por tu congruencia, por predicar con el ejemplo, por ser un biólogo de corazón, por que en tus cuentos soy feliz, por hacerme reir y sonreir tantas veces.

A mi hermano Beto por ser mi inspiración en todo momento, por creer en mi a pesar de todo, aún cuando hasta yo tenia dudas, por ser un guerrero y por que en tu ejemplo aprendo cada día.

A Lobo por tu cariño incondicional por regalarme tantos momentos de alegría y por enseñarme lo inimaginable del amor.

A David, por haber aparecido en mi vida, por comprenderme, por presentarme tu teoría del pay y por ser mi apoyo y mi compañero. Por ser testigo y parte en este trabajo con las noches de desvelos en el instituto, las discusiones de ideas que le dieron mucho sentido a todo esto y tu ayuda en todo este proceso.

A mi tío Ulices por compartir la pasión de la biología.

A mi tía Vero por su cariño.

A la familia Guzmán-Valdéz por estar siempre a mi lado y el de mi familia, por su cariño.

Al Dr. Diego Pérez Salicrup, Dra. Margarita Villegas Ríos y la Dra. María del Carmen González Villaseñor por la revisión, las sugerencias y los comentarios que permitieron mejorar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Rodo, Andrés, Caro, Julieta, Ibeth y Magda por hacer que mi paso por el laboratorio fuera algo tan divertido, por las discusiones académicas y porque cada uno a su manera me ha enseñado algo distinto, también gracias por su amistad.

A quienes a pesar de la distancia mi siguieron dando su amistad, a July, a Polly y a Picho, siempre las llevo conmigo.

A quienes me regalaron su amistad Isaias y Stefani.

A Lourdes por su enseñanza emocional que siempre me hace tanta falta.

A la Dra. Laura Trejo, por su amistad, sus comentarios críticos y su cariño.

A la M. en C. Laura Márquez Valdemár por realizar la secuenciación de muestras y por las facilidades otorgadas en su laboratorio.

A Rocío, auxiliar de posgrado por su ayuda en los trámites durante la maestría.

A la Dra. Susana Magallón-Puebla, por ser un ejemplo a seguir!

A la Dra. Patrica Ornelas y al Dr. Carlos Pedraza por su increíble hospitalidad y apoyo que me permitió avanzar en este proceso.

Al Instituto de Biología por ser mi segundo hogar durante este tiempo.

A la Máxima Casa de Estudios la Universidad Nacional Autónoma de México. Como la UNAM no hay otra!

Al pueblo de México y de Michoacán por que este pequeño logro es de todos y en el se siembran también la esperanzas de un futuro mejor para todos.

A Mi abuela Eva

y

*A mis grandes amores; Olímpia, Alberto, Beto, David y
Lobo.*

Por hablar conmigo el idioma del amor y recordarme que es eso lo que mueve al mundo.

*Que ría tu corazón aunque sea como ríen las piedras, discretas, serias y grises.
Que se haga fuerte tu corazón aunque sea como una piedra y puedas gritar como cuando ésta es lanzada con una honda al ojo de un Goliat cualquiera.
Que sea sereno tu corazón como una piedra que se apaga,
Como una estrella que desciende a la tierra.
Asienta tus latidos en el fondo del agua dulce, una piedra que prevé épocas de lluvia en el fondo del mar.
Y como dice Charles Simic “que otros se conviertan en paloma o rechinen sus dientes de tigre”.
Sea usted feliz con ser una piedra.
Hacer del corazón una piedra, hacer del Yolotl una semilla que late incandescentemente, el corazón es semilla, Yolotl es semilla, un corazón de tierra fértil.
La piedra es otro tipo de tierra.
Sea fuerte,
Que se asiente su corazón,
Que otros se conviertan en palomas o rechinen sus dientes de tigre.
Sea usted alegre, sea usted fuerte, sea usted capaz de mantener el estomago en su lugar para que pueda ser utilizado en el momento ideal.
Habrá que reír, habrá que ser fuerte y habrá que conservar la calma.
Y como dice Simic “he visto frotar dos piedras y sacar chispas”
...Yo soy feliz con ser una piedra.*

*Mardonio Carballo
Tomado de “Las Plumas de la Serpiente”*

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| <i>Generalidades de hongos</i> | 1 |
| <i>El papel funcional de los hongos ectomicorrízicos (HEM) en los ecosistemas</i> | 4 |
| <i>El estudio de los HEM y el sesgo en la información</i> | 6 |
| <i>La biología molecular en el estudio de los hongos ectomicorrízicos</i> | 7 |
| <i>El efecto del hospedero en la comunidad de HEM</i> | 9 |
| 2. ANTECEDENTES | 11 |
| <i>Los HEM en bosques templados en México</i> | 11 |
| <i>La diversidad biológica de los encinos</i> | 14 |
| <i>El uso de la región de los interespaciadores ribosomales en la identificación de los HEM</i> | 15 |
| <i>Estudios de HEM en encinos</i> | 18 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 36 |
| 4. HIPÓTESIS | 37 |
| 5. OBJETIVOS | 38 |
| 6. METODOLOGÍA | 39 |
| 6.1 Características del área de estudio | 39 |
| <i>Población</i> | 41 |
| <i>Clima</i> | 41 |
| <i>Vegetación y cambio del uso de suelo</i> | 41 |
| <i>Ubicación de los sitios de muestreo</i> | 42 |
| 6.2 Procesamiento de las muestras | 43 |
| <i>Diseño del muestreo</i> | 43 |
| <i>Recolección y procesamiento de micorrizas</i> | 44 |
| <i>Extracción del ADN</i> | 44 |
| <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> | 45 |
| <i>Limpieza de los productos de PCR</i> | 46 |
| <i>Reacción de secuenciación y secuenciación del ADN</i> | 46 |
| <i>Edición de secuencias</i> | 46 |
| 6.3 Designación de la identidad de las unidades taxonómicas operacionales moleculares (MOTUs) | 47 |

| | |
|---|------------|
| 6.4 Análisis de datos ecológicos: Diversidad y Estructura de la Comunidad | 48 |
| 6.5 Análisis de similitud genética | 48 |
| 6.6 Análisis de MOTUs compartidos con otras comunidades de HEM del mundo | 49 |
| 7. RESULTADOS | 51 |
| 7.1 Diversidad de HEM y no ectomicorrzicos asociados a encinos de la Cuenca de Cuitzeo | 51 |
| Micorrizas y Secuencias ADN..... | 51 |
| Especies..... | 52 |
| Riqueza taxonómica..... | 59 |
| Abundancia..... | 61 |
| Índices de diversidad..... | 68 |
| Análisis de rarefacción..... | 69 |
| 7.2 Estructura de la comunidad de HEM asociados a encinos de la Cuenca de Cuitzeo | 69 |
| Especies compartidas entre sitios..... | 82 |
| 7.3 Similitud genética | 85 |
| 7.4 Comparación de la comunidad de HEM asociada a encinos de la Cuenca de Cuitzeo Michoacán con las reportadas en algunas partes del mundo | 96 |
| 8. DISCUSIÓN | 104 |
| Eficiencia en la amplificación y secuenciación..... | 104 |
| 8.1 La diversidad de la comunidad de HEM asociada a encinos de la Cuenca de Cuitzeo | 105 |
| Análisis de rarefacción..... | 106 |
| Distribución de la riqueza de especies entre sitios..... | 107 |
| 8.2 La estructura de la comunidad | 108 |
| La composición de especies entre zonas y sitios..... | 120 |
| La identificación y las bases de datos..... | 120 |
| 8.3 Similitudes genéticas | 121 |
| 8.4 MOTUs compartidos entre las comunidades | 123 |
| 8.5 Los bosques de encinos como un ecosistema clave en el mantenimiento de la biodiversidad | 125 |
| 9. CONCLUSIONES | 127 |
| 10. LITERATURA CITADA | 129 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Estudios sobre ecología molecular de HEM realizados en los bosques templado de México..... | 13 |
| Cuadro 2. Estudios sobre ecología molecular de HEM realizados en los bosques dominados por encinos en el Mundo..... | 35 |
| Cuadro 3. Uso de suelo en la Cuenca de Cuitzeo para el año 2006. | 42 |
| Cuadro 4. Coordenadas, altitud y vegetación dominante de los sitios de muestreo..... | 42 |
| Cuadro 5. Numeración de muestras por sitio..... | 44 |
| Cuadro 6. Muestras de ectomicorrizas por sitio de estudio en la Cuenca de Cuitzeo..... | 51 |
| Cuadro 7. Contribución de cada sitio a la obtención de secuencias, eficiencia de amplificación y porcentaje de éxito total..... | 51 |
| Cuadro 8. Especies, micorrizas y secuencias por sitio y en total para la Cuenca de Cuitzeo..... | 52 |
| Cuadro 9. MOTUs ectomicorrízicos de la comunidad de la Cuenca de Cuitzeo y su asignación taxonómica..... | 53 |
| Cuadro 10. MOTUs no ectomicorrízicos de la comunidad de la Cuenca de Cuitzeo y su asignación taxonómica. | 57 |
| Cuadro 11. Asignación taxonómica usando secuencias de esporomas de la Cuenca de Cuitzeo de la base de datos BoldSystems..... | 58 |
| Cuadro 12. Número de MOTUs de HEM por orden..... | 59 |
| Cuadro 13. Número de MOTUs de HEM por familia..... | 59 |
| Cuadro 14. Número de MOTUs de HEM por género..... | 60 |
| Cuadro 15. Abundancia de MOTUs en los órdenes..... | 62 |
| Cuadro 16. Abundancia de MOTUs en las familias..... | 64 |
| Cuadro 17. Abundancia de MOTUs en los géneros..... | 66 |
| Cuadro 18. Índices de diversidad y dominancia de especies..... | 68 |
| Cuadro 19. Estimador de abundancia Chao 1..... | 68 |
| Cuadro 20. Estimador de abundancia Jackknife 1..... | 68 |
| Cuadro 21. Base de datos de la estructura de la comunidad de HEM de la Cuenca de Cuitzeo. Número de micorrizas por MOTU para cada sitio..... | 78 |
| Cuadro 22. Matriz de especies compartidas entre sitios..... | 83 |
| Cuadro 23. Matriz de especies compartidas entre zonas..... | 83 |

| | |
|---|-----|
| Cuadro 24. Similitud genética de los MOTUs a los pares más cercanos en las bases de datos del NCBI..... | 85 |
| Cuadro 25. Similitud genética de los MOTUs al par más cercano (“hit”) usando muestras ambientales en las bases de datos del NCBI..... | 92 |
| Cuadro 26. Especies compartidas entre las comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados principalmente a encinos..... | 98 |
| Cuadro 27. MOTUs compartidos con cada comunidad comparada..... | 100 |
| Cuadro 28. Similitud genética de los MOTUs más cercanos a <i>Sebacina</i> sp. 1 en las bases de datos..... | 116 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa de la Cuenca de Cuitzeo ubicada en Michoacán México..... | 39 |
| Figura 2. Ubicación de los sitios de estudio. | 43 |
| Figura 3. Diseño de muestreo por sitio..... | 44 |
| Figura 4. Número de micorrizas por Phylum..... | 62 |
| Figura 5. Número de micorrizas por órdenes..... | 63 |
| Figura 6. Número de micorrizas por familia..... | 65 |
| Figura 7. Número de micorriza por géneros..... | 67 |
| Figura 8. Curva de rarefacción de especies..... | 69 |
| Figura 9. Abundancia de las especies en el Águila 1..... | 71 |
| Figura 10. Abundancia de las especies en el Águila 2..... | 72 |
| Figura 11. Abundancia de las especies en Icuacato 1..... | 73 |
| Figura 12. Abundancia de las especies en Icuacato 2..... | 74 |
| Figura 13. Abundancia de las especies en el Águila..... | 75 |
| Figura 14. Abundancia de las especies en Icuacato..... | 76 |
| Figura 15. Abundancia de las especies en la comunidad..... | 77 |
| Figura 16. Especies totales, únicas y compartidas entre los sitios..... | 82 |
| Figura 17. Especies únicas y compartidas entre zonas Águila e Icuacato..... | 83 |
| Figura 18. Especies únicas y compartidas entre Águila 1 y Águila 2..... | 84 |
| Figura 19. Especies únicas y compartidas entre Icuacato 1 e Icuacato 2..... | 84 |
| Figura 20. Similitud genética de los MOTUs de la Cuenca de Cuitzeo en la base de datos del NCBI..... | 90 |

| | |
|--|----|
| Figura 21. Similitud genética de los MOTUs al par más cercano (“hit”) usando muestras ambientales en las bases de datos del NCBI..... | 96 |
| Figura 22. Mapa de especies compartidas entre la comunidad de HEM de la Cuenca de Cuitzeo con otras comunidades del mundo asociadas principalmente a bosques de encinos..... | 99 |

RESUMEN

Tradicionalmente los hongos ectomicorrízicos (HEM) han sido estudiados por medio de sus estructuras de reproducción sexual, lo que ha sesgado el conocimiento de su biodiversidad. Al estudiar estas estructuras subterráneas, que son la parte vegetativa del hongo, se puede obtener un mejor panorama de la diversidad de la comunidad de los HEM que cuando se utiliza únicamente a los esporomas. Para nuestro país, sólo el trabajo de Morris et al. (2009) ha estudiado la comunidad de HEM en asociación con bosques de encino, por lo que se sabe muy poco de esta asociación en México. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la diversidad de HEM asociados a especies de encino (*Quercus deserticola*, *Q. castanea*, *Q. obtusata*, *Q. magnolifolia*, *Q. rugosa* y *Q. laeta*) en los bosques de la Cuenca de Cuitzeo en Michoacán. Este se logró recolectando las micorrizas y utilizando técnicas de biología molecular amplificando y secuenciando la región de los interespaciadores ribosomales internos (ITS). La asignación taxonómica de las secuencias se hizo utilizando las bases de datos Genbank y Bold Systems.

En total se recolectaron 1671 ectomicorrizas y con una eficiencia final del 34.6% se lograron amplificar y secuenciar 578 ectomicorrizas, con las que se obtuvieron 880 secuencias correspondientes a cuatro sitios (Águila 1, Águila 2, Icuacato 1 e Icuacato 2). A partir de ellas se identificaron 170 Unidades Taxonómicas Operacionales Moleculares (MOTUs) de HEM asociados a encinos y 17 MOTUs no ectomicorrízicos, también presentes en las raíces de árboles del género *Quercus*. La mayoría de las especies identificadas fueron raras y estuvieron representadas por un MOTU único, estas en conjunto equivalieron al 48.8% del total de especies en la comunidad. La comunidad estuvo representada por 22 familias, las más diversas resultaron ser: Thelephoraceae, Russulaceae, Sebacinaceae, Inocybaceae y Pezizaceae. Las más abundantes fueron Russulaceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae, Inocybaceae y Pyronemataceae, que en conjunto sumaron el 75.8% de ectomicorrizas. Las especies pertenecieron a 27 géneros, los que resultaron más diversos dentro de la comunidad fueron *Russula* (26 especies), *Tomentella* (24 especies), *Sebacina* (23 especies), *Inocybe* (14 especies) y *Pachyphloeus* (9 especies). Los que presentaron una abundancia mayor fueron *Sebacina* (21.7%), *Russula* (20.8%), *Tomentella* (13.8%), *Inocybe* (6.4%), *Genea* (5.7%), *Pachyphloeus* (3.4%), *Clavulina* (2.3%) y *Cortinari* (1.9%), estos ocho grupos representaron el 76% de la comunidad. Las especies más abundantes en la comunidad fueron *Sebacina* sp. 1 con 35 micorrizas, *Sebacina epigaea complex* sp. 1 con 23 micorrizas y *Russula* aff. *curtipes* con 19 micorrizas.

Por otra parte, cuando se comparó la estructura de los sitios Águila 1 y Águila 2 contra la encontrada en Icuacato 1 e Icuacato 2 se compartieron sólo 29 MOTUs, 81 y 60 resultaron únicas para cada zona. Estos datos indican una alta diversidad Beta.

Aunque sabemos poco de la simbiosis entre los HEM y las raíces de los encinos mexicanos, la alta diversidad podría estar atribuida a diversos factores como son el fraccionamiento del nicho, la calidad del hábitat, la especificidad al hospedero ectomicorrízico y la interacción entre especies y a que los bosques de encino en la Cuenca de Cuitzeo no son monoespecíficos, y poseen diferentes especies de *Quercus*, lo que podría promover el mantenimiento de la diversidad de HEM. En este trabajo se genera evidencia de que estos bosques son un ecosistema diverso en HEM.

Los análisis de similitud genética, revelaron que el 65.3% (111 MOTUs) obtuvo similitudes por debajo del 97% de afinidad genética respecto de la base de datos del Genbank cuando se analizaron únicamente vouchers, mientras que cuando se realizó la comparación usando muestras ambientales de las bases de datos el 48.8% (83 MOTUs) presentaron similitudes genéticas menores al 97%. Estos resultados revelan la falta de datos e información en las bases públicas para esta región geográfica, y sugieren que en la zona, y en asociación con los bosques de encino, podrían estar ocurriendo un buen número de endemismos.

Se propuso un método para análisis y comparación de comunidades, en donde la comunidad de HEM asociados a bosques de encino de la Cuenca de Cuitzeo, Michoacán compartió especies con 11 comunidades reportadas para el mundo, en diferentes bosques templados principalmente de Norte América. La comunidad con la que se compartieron un mayor número de especies fue la reportada por Morris et al. (2009) asociada a *Quercus* en Guerrero México, con la que se coincidió en 22 especies de HEM, es muy probable que esto se deba a que los MOTUs que comparten tengan una distribución neotropical y a que estén distribuidos en la misma zona geográfica, y a que los mecanismos de dispersión de las especies compartidas entre las comunidades son efectivos por lo que tienen un amplio rango de distribución.

Es importante generar conocimiento sobre la comunidad de hongos ecotomicorrízicos de encinos, pues este tipo de vegetación es el hogar de una gran diversidad, además de que en México es el sitio donde los encinos tienen especies únicas en el mundo.

ABSTRACT

Traditionally ectomycorrhizal fungi (HEM) have been studied through their sexual reproductive structures, which skewed the knowledge of its biodiversity. By studying these underground structures, which are the vegetative part of the fungus, we can get a better picture of the diversity of the community of HEM that when we used only the esporomas. For our country, only the study of Morris et al. (2009) studied the community of HEM in association with oak woodland, so little is known of this association in Mexico. The aim of this work was to study the diversity of HEM associated with species of oak (*Quercus deserticola*, *Q. castanea*, *Q. obtusata*, *Q. magnolifolia*, *Q. rugosa* and *Q. laeta*) in the forests of the Cuitzeo Basin in Michoacán. This was achieved by collecting mycorrhizae and using molecular techniques, amplifying and sequencing the region of the internal ribosomal interespaciadores (ITS). Taxonomic identification of the sequences generated was performed using the GenBank database and Bold Systems.

In total 1671 ectomicorrizas were collected and the final efficiency was 34.6%, 578,880 sequences were generated which corresponding to four sites (Aguila 1, Aguila 2, Icuacato 1 and Icuacato 2). One hundred seventy Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) of HEM were associated with oaks and 17 ectomycorrhizal MOTUs not but they were also present in the roots of trees of the *Quercus*. Most of the identified species were rare and were represented by a single MOTU these together amounted to 48.8% of all species in the community. The community was represented by 22 families, the most diverse were: Thelephoraceae, Russulaceae, Sebacinaceae, Inocybaceae and Pezizaceae. The most abundant were Russulaceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae, Inocybaceae and Pyronemataceae, which together accounted for 75.8% of ectomycorrhizae. The species belonged to 27 genera, the more diverse in the community were *Russula* (26 species), *Tomentella* (24 species), *Sebacina* (23 species), *Inocybe* (14 species) and *Pachyphloeus* (9 species). Those who had a higher abundance were *Sebacina* (21.7%), *Russula* (20.8%), *Tomentella* (13.8%), *Inocybe* (6.4%), *Genea* (5.7%), *Pachyphloeus* (3.4%), *Clavulina* (2.3%) and *Cortinarius* (1.9 %), these eight groups represented the 76% of the community. The most abundant species in the community were *Sebacina* sp. 1 (35 mycorrhizae), *Sebacina epigaea complex* sp. 1 (23 mycorrhizae) and *Russula* aff. *curtipes* (19 mycorrhizae).

Additionally, structure were compared between sites Aguila 1 and Aguila 2 against Icuacato 1 and Icuacato 2 were shared only 29 species, 81 and 60 were unique to each area. These data indicate a high diversity Beta.

Although we know little of the symbiosis between HEM and the roots of Mexican oaks, the high diversity could be attributed to many factors such as the fragmentation of the niche, habitat quality, the ectomycorrhizal host specificity and interaction between species as oak forests in the Cuitzeo Basin are not monospecific, and have different species of *Quercus*, which could promote the maintenance of the diversity of HEM. This study generated evidence that these forests are a diverse ecosystem in HEM.

The genetic similarity analysis revealed that 65.3% (111 MOTUs) have similarities below 97% of the genetic relationship regarding Genbank database when only analyzed vouchers,

while when the comparison was made using environmental samples of databases 48.8% (83 MOTUs) showed genetic similarities lower than 97%. These results reveal the lack of data and information available in public databases for this geographic region, and suggest that in the area, and in association with oak forests could be having a good number of endemic species.

A method for analysis and comparison of communities was proposed, where the community of HEM associated with Cuitzeo Basin oak woodland, shared species with 11 communities reported for the world, mainly in different temperate woodlands of North America. The community with a greater number of shared species was reported by Morris et al. (2009) associated with *Quercus* in Guerrero Mexico, with which they shared on 22 species of HEM is very likely that this is due to the MOTUs sharing have a neotropical distribution and they are distributed in the same geographic area and the dispersal mechanisms of the species shared between communities are effective so they have a wide range of distribution.

Generate knowledge about the community of HEM in oak is important, as this type of vegetation is home to a great diversity, and that Mexico is where oaks have unique species in the world.

1. INTRODUCCIÓN

Generalidades de hongos

Los hongos son organismos eucariotas típicos y poseen núcleos que contienen varios cromosomas, y orgánulos citoplasmáticos, con mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80S. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplasmática, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular (Deacon 1998).

Algunos de los factores que influyen en el crecimiento de los hongos son la humedad, el pH, la temperatura y el oxígeno. Debido a la gran diversidad que existe en este grupo y a los diferentes ambientes que pueden colonizar, es difícil hacer generalizaciones de la importancia de cada factor (Alexopoulos et al., 1996). Aproximadamente 98000 especies de hongos han sido descritas, aunque cada año se describen alrededor de 1000 nuevas especies (Moore et al., 2011).

Los hongos están considerados generalmente como quimioheterótrofos estrictos. Son incapaces de fotosintetizar y por consiguiente necesitan sustratos ricos en nutrientes para alcanzar sus requerimientos energéticos y de generación de biomasa. Una de las características que separa a los hongos de las plantas es que su principal carbohidrato de almacenamiento es el glicógeno y su nutrición es por absorción (Moore et al., 2011), por ello necesitan estar inmersos en el sustrato del cual se alimentan, en donde liberan exoenzimas como las oxidasas e hidrolasas, que les permiten degradar moléculas largas y relativamente insolubles como carbohidratos, proteínas y lípidos provenientes de distintos tipos de sustratos orgánicos, y convertirlos en moléculas simples para posteriormente absorberlas a través de las membranas celulares y paredes (Alexopoulos et al., 1996).

La reproducción puede ser sexual y asexual en los hongos, sin embargo, algunas especies parecen haber perdido la capacidad de tener reproducción sexual o la tienen infrecuentemente, ya que este proceso involucra la combinación de nuevos genes necesarios para permitir que la descendencia se pueda adaptar a las condiciones ambientales y esto sienta las bases de la evolución. Las estructuras sexuales son extremadamente útiles en la identificación de los hongos, sin embargo la producción de

esporas asexuales se pueden producir en un periodo de tiempo corto, lo cual puede tener ventajas para la colonización rápida de sustratos disponibles. Algunos hongos pueden ser capaces de tener ambos tipos de reproducción que en general parecen no producirse al mismo tiempo, pero en general la reproducción asexual tiende a ser predominante en hongos considerados de clados más basales (Stephenson, 2010).

Debido a que todos los hongos requieren materia orgánica como sustrato u hospederos vegetales o animales para desarrollarse, muchos de ellos por ejemplo habitan el suelo o se asocian a las raíces de las plantas. En el caso de los hongos asociados a la raíz encontramos a los saprótrofos, parásitos, endófitos y micorrízicos de distintos tipos. En el caso de los micorrízicos el recurso por el cual compiten los hongos son las raíces ya que ahí es el sitio de intercambio de nutrientes por carbono con la planta (Newton, 1992).

Otra característica que define a los hongos es que han establecido una cantidad extraordinaria de interacciones complejas con otros seres vivos, por ejemplo los líquenes, que consiste en una asociación entre un hongo y un alga verde y/o una cianobacteria, de los cuales se han descrito alrededor de 35000 especies que representa hasta el 20% de la diversidad conocida entre los hongos. Por otra parte se encuentran los hongos endófitos, que son distintos de los patógenos o micorrízicos, pero que al igual que ellos se encuentran en el tejido de las plantas. El término endófito proviene del latín (*endo*: dentro y *phyton*: planta). Estos pueden tener un amplio espectro de hospederos (Schulz y Boyle, 2005), se considera endófitos a aquellos hongos que no provocan síntomas de enfermedad a las plantas pero que tampoco producen estructuras de intercambio como las micorrizas. Estos pueden estar presentes en cualquier tejido de las plantas pero principalmente en las hojas que pueden estar totalmente colonizadas por una variedad de hongos (Alexopoulos et al., 1996). Otro tipo son los epífitos que han sido definidos como aquellos que crecen en las superficies vegetales, algunos presentan adaptaciones especiales, lo que representa un reto para soportar condiciones ambientales como sequía o exposición directa al sol, por ello algunos hongos de este tipo están melanizados para protegerse de la radiación UV, algunos incluso pueden digerir lípidos como cera de la superficie epidérmica de las hojas (Alexopoulos et al., 1996).

La mayoría de las interacciones que ocurren entre los hongos y otros seres vivos son mutualistas, es decir que ambos organismos se ven beneficiados de dicha interacción,

por lo que son de gran importancia ecológica. La simbiosis entre las raíces de las plantas y los hongos, refiriéndonos a los micorrízicos, es uno de los mutualismos más ubicuos del planeta tierra. Las micorrizas resultan de la interacción simbiótica entre los hongos y las raíces de plantas, es probable que la adaptación de las plantas a la vida terrestre fuera posible solo con la ayuda de los simbiontes micorrízicos (Simon et al., 1993). Esta adaptación pudo haberse desarrollado en una etapa muy temprana de la colonización del sistema terrestre por las plantas, pues las micorrizas se originaron hace más de 400 millones de años en el Devónico temprano (Read 1998, Brundrett, 2002). Debido a la dependencia nutricional mineral de las plantas hacia los hongos, se ha hipotetizado que la ausencia de hongos apropiados podría significar la alteración de la estructura de la comunidad vegetal (Weber et al., 2005, Peay et al., 2008).

Se ha estimado que más de 6000 hongos son capaces de formar micorrizas y que por lo menos el 95% de las plantas vasculares forman este tipo de asociaciones en sus raíces y dependen en gran medida de éstas para establecerse, sobrevivir y desarrollarse óptimamente (Finlay y Read, 1986, Van der Heijden et al., 1998). Las micorrizas, se forman básicamente por tres phylla los Glomeromycota que forman las micorrizas arbusculares y algunos grupos de Ascomycota y Basidiomycota forman las ectomicorrizas, ectendomicorrizas, micorrizas arbutoides y orquidioides entre otras. Existen varios tipos de hongos micorrízicos clasificados de acuerdo a su morfología y estructura que se dividen principalmente en los llamados ectomicorrizógenos y los arbusculares (Pérez-Moreno y Read, 2004).

Aunque existen distintas formas de clasificar a las micorrizas según los autores que propongan la clasificación y los criterios que utilicen, estas clasificaciones son artificiales y nos sirven para estudiar las interacciones de manera más ordenada, por ejemplo Smith y Read (2008) proponen siete tipos de simbiosis micorrízica que son: micorriza arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutoide, monotropoide, ericoide y orquideoide. A continuación se definen los cuatro tipos de simbiosis micorrízica más importantes usados por la mayoría de autores: 1) endomicorrizas o micorrizas arbusculares, siendo el más común y se forma con cerca del 80% de las especies de plantas terrestres que incluyen muchas cultivables aprovechadas por la humanidad; 2) endomicorrizas ericoides, que se da con plantas de montaña y brezales de tierras bajas como el arándano, y mejora la captación de nitrógeno y fósforo; 3)

endomycorrizas orquideoides, estas son similares a las anteriores pero se establecen con la familia Orchidaceae que es la más grande del grupo de las plantas con flor, debido a la íntima relación con sus polinizadores y simbiontes micorrízicos orquideoides, esta micorriza utiliza fuentes complejas de carbono del suelo y los productos de la digestión fúngica se hacen disponibles para la orquídea, adicionalmente la germinación y la etapa primaria de plántulas son absolutamente dependientes del hongo, y esto puede ser interpretado como parasitismo de la planta al hongo en esta etapa; 4) Ectomicorrizas, estas resultan de la asociación entre las plantas superiores y algunos hongos, encontrando que cerca del 3% de las plantas con semilla, incluidas la mayoría de los árboles de los bosques (templados y tropicales) son capaces de formar ectomicorrizas, los hongos involucrados pertenecen al phylum Basidiomycota principalmente y Ascomycota (Alexopoulos et al., 1996).

Las ectomicorrizas se dan por la asociación entre algunos grupos de hongos y las raíces de las plantas, en donde las hifas de los hongos se distribuyen en los espacios intercelulares sin penetrar las células de las raíces (Molina et al., 1992). La asociación ectomicorrízica se caracteriza porque el hongo forma una capa de hifas que rodea las raicillas de las plantas y modifica su crecimiento normal. Esta capa se denomina manto; las hifas penetran exclusivamente los espacios intercelulares de la corteza de la raíz formando la red de Hartig. Esta red es el órgano mediante el cual la planta y el hongo intercambian agua y nutrientes (Ingleby et al., 2004).

El papel funcional de los hongos ectomicorrízicos (HEM) en los ecosistemas

Los hongos juegan un papel crucial en las funciones y las dinámicas de los ecosistemas terrestres, influenciando directamente la estructura de las comunidades de plantas, animales y bacterias a través de un amplio rango de interacciones que se expanden en el continuo entre el mutualismo y el parasitismo. Además, los hongos ejercen numerosas funciones en los ecosistemas como: degradar materia orgánica, reciclar y hacer disponibles nutrientes para las plantas, cumpliendo papeles esenciales en los ciclos del carbono y nitrógeno, además favorecen la estructura y estabilidad del suelo, etc. (Peay et al., 2008). Por su aporte ecosistémico, uno de los grupos funcionales más importantes lo constituyen los hongos micorrízicos.

En los ecosistemas forestales, la simbiosis micorrízica tiene gran relevancia porque los árboles dentro del bosque en las zonas templadas y boreales forman esta asociación (Horton y Bruns, 2001), que para ambas partes es benéfica ya que modifica la prevalencia de cada parte en el bosque.

Las ectomicorrizas tienen un papel importante en el aporte de nutrientes a la planta hospedera y participan en el reciclamiento de los nutrientes del suelo. Además estos hongos influyen en la productividad, el restablecimiento, la dinámica y la sucesión de las comunidades vegetales y la estabilidad del hábitat (Amaranthus, 1998). Esta interacción es beneficiosa para las especies hospederas ya que les brinda resistencia a los factores estresantes bióticos y abióticos (Smith y Read, 2008) además, juega un papel importante en el establecimiento de interacciones interespecíficas y el mantenimiento de la biodiversidad en el ecosistema (Simard et al., 1997).

Aproximadamente 5000 especies de Basidiomycetes y Ascomycetes forman ectomicorrizas que se asocian fundamentalmente con las familias Betulaceae, Casuarinaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae, Fabaceae, Fagaceae, Myrtracae, Pinaceae, Salicaceae, etc. Es decir con especies de árboles de zonas templadas y tropicales, como encinos, pinos, oyameles, hayas, muchas leguminosas y numerosos grupos vegetales. A pesar de que el número de especies vegetales involucradas no es muy alto, la mayor parte de ellas son árboles y arbustos dominantes en ecosistemas templados por lo que esta asociación es de gran significado ecológico y forestal (Pérez-Moreno y Read, 2004).

Un solo árbol adulto puede establecer estas interacciones simbióticas hasta con 20 especies de hongos ectomicorrízicos. Los sistemas radiculares de las plantas se conectan por HEM formando lo que se conoce como red micorrízica común. Estas redes permiten el intercambio de azúcares simples y nutrientes entre distintas especies vegetales a través del micelio de los hongos. Esta conexión aumenta su valor cuando alguna de las plantas en contacto se encuentra en condiciones desventajosas de nutrientes y agua, por lo que sus oportunidades de supervivencia son mayores ya que puede usar recursos de sus vecinos gracias a sus intermediarios, los hongos micorrizógenos, ello facilita el establecimiento de plántulas nuevas dentro de los bosques y su crecimiento e incluso aquellas que crecen en condiciones de sombra pueden sobrevivir gracias a los carbohidratos producidos en árboles conectados a la red. Una forma indirecta para determinar si existe la red micorrízica común, es observar si hay un cambio en el

ensamblaje de las comunidades de HEM (Selosse et al., 2006). Las redes miceliales micorrízicas de HEM juegan un importante papel en la movilización de nutrientes de sustratos orgánicos naturales a las plantas.

Los hongos ectomicorrízicos son fundamentales para el funcionamiento de los ecosistemas forestales pues brindan a los árboles una mayor capacidad de absorción de nutrimentos y agua, así como una protección contra patógenos, etc. A pesar de su importancia, en México el conocimiento de su diversidad y ecología es incipiente. Esto se debe principalmente a lo complejo que resulta su estudio ya que la asociación ectomicorrízica se establece a partir de la fase somática de los hongos la cual se encuentra inmersa en el suelo y esta fase ha sido poco estudiada.

Los hongos ectomicorrízicos son componentes importantes en muchos ecosistemas forestales y juegan roles clave en los ciclos biogeoquímicos (Morris et al., 2007), han sido reportados como elementos críticos para el establecimiento durante la sucesión primaria de ecosistemas subalpinos (Cazares et al., 2005) y en dunas costeras (Ashkannejhad y Hurton, 2006).

El estudio de los HEM y el sesgo en la información

En ecosistemas de bosques templados las comunidades micorrízicas presentan niveles de riqueza sobresalientes que han evolucionado durante un largo periodo de tiempo. La riqueza es comparable con la diversidad de las funciones ecológicas como las características ecofisiológicas que presenta cada taxa para la adquisición de nutrientes o la tolerancia al pH (Mc Afee y Fortin, 1986).

La mayoría de los estudios sobre hongos ectomicorrízicos se han basado en los esporomas, que son sus estructuras de reproducción sexual, y no en la parte somática como el micelio o las micorrizas. Esto ha sesgado la información sobre su biodiversidad y con ello el conocimiento sobre tan importante grupo, debido a que muchos de estos hongos no presentan reproducción sexual o los esporomas que producen han sido poco muestreados porque son hipogeos o inconspicuos (Tedersso et al., 2010). El conocimiento sobre su ecología también está influenciado por este sesgo ya que la productividad de esporomas es sólo un reflejo de la energía invertida en la reproducción sexual y no de su extensión vegetativa subterránea, fase en la que tienen mayor incidencia sobre la función ecosistémica.

El nivel de sofisticación en el muestreo e identificación de los HEM se ha incrementado a lo largo del tiempo y se ha hecho más claro que las especies hospedadoras de plantas pueden estar influyendo fuertemente en sus comunidades (Ishida et al., 2007).

La biología molecular en el estudio de los hongos ectomicorrízicos

Actualmente se empieza a conocer la verdadera diversidad de hongos ectomicorrízicos y los patrones de distribución de éstos en los diferentes ecosistemas del mundo, ya que las técnicas moleculares han permitido identificar la presencia de material genético fúngico directamente del tejido vegetal sin tener que lograr un aislamiento en medio de cultivo (Arnold y Lutzoni, 2007). Se estima que hasta el 99% de estos microorganismos no son cultivables, por lo que los estudios clásicos de microbiología basados en aislamientos tienen muchas limitaciones (Torsvik y Øvreås, 2002), las técnicas moleculares permiten estudiar a detalle a estos microorganismos e ir superando las limitaciones para detectarlos, cuantificarlos e identificarlos.

Sin embargo cada técnica tiene sus fortalezas y limitaciones por lo que se debe ser cuidadoso en su elección pues ésta debe responder a una pregunta de investigación específica.

Son varios los métodos moleculares que pueden aplicarse para el estudio de las comunidades de HEM. Sin embargo cada uno tiene sus fortalezas y limitaciones. Para poder responder una pregunta de investigación específica, se debe seleccionar con cuidado uno o varios métodos como pueden ser el uso de RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la clonación y secuenciación de muestras de ADN hasta la novedosa secuenciación de segunda y tercera generación, o incluso combinaciones de algunos de ellos.

El polimorfismo de restricción de fragmentos largos o RFLP por sus siglas en inglés, es un método que se ha usado para el estudio de los HEM, este usa enzimas de restricción que cortan los productos de PCR en fragmentos más pequeños. Debido a que la localización de estos sitios de restricción varía en cada organismo, y diferentes organismos producirán fragmentos de distintos tamaños. Los patrones de bandeo son usados para reconocer las muestras y permiten diferenciar entre cada una.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la base de las técnicas en ecología molecular. La PCR usa iniciadores o primers que consisten en aproximadamente 20 pares de bases que están diseñados para empatarse o embonarse con regiones

específicas del genoma (de entre 500 a 1000 bases) y sirven como los puntos de comienzo para crear nuevas copias de la región. El proceso de la PCR comienza usando temperaturas altas (de 95° C aproximadamente) para separar el ADN genómico de doble cadena. Cuando la temperatura se reduce, los cebadores se unen a secuencias de nucleótidos complementarios, y una enzima de síntesis de ADN térmicamente estable (Taq polimerasa) utiliza los cebadores como punto de partida para crear nuevas plantillas de ADN. Los pasos térmicos requieren separar el ADN de la muestra, pegar el iniciador a las cadenas abiertas y crear copias nuevas en cada ciclo de la PCR. La naturaleza de la doble cadena del ADN permite duplicar el número de copias por cada ciclo de la PCR y puede crear billones de copias partiendo de pocas cadenas a partir de 20 a 30 ciclos (Peay et al., 2008) una vez que se obtienen los productos de la PCR estos pueden ser secuenciados.

El método de secuenciación de ADN Sanger, llamado así en honor a su creador Frederick Sanger, se basa en el proceso biológico de la replicación del ADN, en este se utilizan dideoxynucleótidos que no tienen un grupo hidroxilo del carbono 3', y cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN que esta en crecimiento esta cadena para de élongarse. Esto se debe a que la ADN polimerasa necesita un grupo terminal 3' OH para añadir el próximo nucleótido y el dideoxynucleótido que se incorpora no tiene este grupo hidroxilo. En síntesis el proceso comienza cuando el ADN se desnatura para poder emplear una sola hebra del mismo, para preparar la reacción de secuenciación se requiere ADN polimerasa y un iniciador (cebador) o "primer", además del ADN molde que se quiere secuenciar. Se preparan cuatro reacciones y a cada una se le añade una cantidad de uno sólo de los cuatro nucleótidos trifosfatados (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP). Esto producirá cadenas de ADN de distintas longitudes, ya que terminarán donde se incorporó el dideoxynucleótido correspondiente añadido al tubo. De esta manera se puede reconstruir la secuencia del ADN muestra deseado (Sanger, 1977).

La secuenciación de nueva generación o de alto rendimiento, es una tecnología de determinación de secuencias de ADN a gran escala, aplicable a genomas completos, mediante luminiscencia o detección de iones de hidrógeno. A diferencia del sistema Sanger, capaz de resolver 67000 bases cada hora, este método puede determinar la secuencia de 20 millones cada cinco horas, lo cual abarata enormemente los costos del proceso y permite obtener más información en menos tiempo (Metzker, 2010).

Entonces el desarrollo de técnicas de biología molecular para el estudio de las micorrizas directamente en las raíces de plantas o bien del micelio en el suelo ha revolucionado el entendimiento sobre estos hongos. Con su uso se han descubierto numerosas especies previamente desconocidas para la ciencia, muchos hongos previamente considerados como saprobios se han reclasificado como micorrízicos. Además se ha reportado que comúnmente existe una inconsistencia entre la diversidad y estructura de la comunidad medida en función de las micorrizas contra la que se encuentra cuando se trabaja con esporomas únicamente (Horton y Bruns, 2001).

El efecto del hospedero en la comunidad de HEM

La diversidad y la productividad de los hongos depende del tipo de hospedero y de la estructura del bosque, elementos que influyen tanto en la producción de esporomas (Nantel y Neumann, 1992, Såstad, 1995) como en la de las micorrizas (Kernaghan et al., 2003).

Algunos estudios previos han examinado el efecto de los hospederos en la comunidad de hongos ectomicorrízicos y han reportado que éstos hongos se ligan a especies de plantas específicas (Horton y Bruns, 1998). Sin embargo, la especificidad al hospedero puede actuar como una dimensión del nicho importante por si sola. El uso de técnicas moleculares tiene la ventaja de identificar de manera independiente a la planta hospedera y al hongo simbionte huésped a partir de la misma muestra de ADN, lo que permite que sea posible cuantificar los patrones de especificidad al hospedero (Lian et al., 2006). La identidad del hospedero es uno de los factores más importantes en la estructuración de la comunidad de HEM. El efecto del hospedero puede ser resultado de la coevolución que ocurre entre los hongos y su simbionte vegetal, sin embargo la relación e importancia entre estos dos elementos de la interacción es todavía incomprendida (Murata et al., 2013). Los patrones de especificidad al huésped han sido probablemente mejor caracterizados en hongos patógenos debido a su importancia económica. Por ejemplo, Roy en el 2001 (en Peay et al., 2008) utilizó filogenias moleculares para examinar los patrones de especificidad en un huésped en particular, y de manera sorprendente las filogenias mostraron que los patógenos eran más propensos a saltar a nuevos huéspedes que estaban cercanos geográficamente y no a los que estaban genéticamente relacionados, esto sugiere que las limitaciones de dispersión y la especiación local son factores importantes que determinan los patrones de especificidad

al hospedero en los hongos, al menos para el caso de los patógenos. Es decir, cuando la dispersión es limitada, los hongos muy especializados a un hospedero en particular pueden presentar una desventaja si este último es raro en el paisaje. Por esta razón, se ha predicho que la especificidad a un hospedero debería ser baja en comunidades altamente diversas y viceversa (May, 1991, Peay et al., 2008).

Pocos estudios han examinado la especificidad al hospedero en los trópicos, en parte porque la taxonomía e identificación en hongos y árboles tropicales son un reto. Por otra parte estudios recientes encontraron que la especificidad de los hongos ectomicorrízicos al hospedero es significativamente mayor en los bosques con mayor riqueza vegetal, así demostraron que estas preferencias tienen un papel importante en el mantenimiento de la riqueza de los hongos en los bosques de especies mixtos (Peay et al., 2008).

Para investigar los mecanismos relacionados al hospedero, Murata et al. (2013) muestrearon micorrizas de un bosque relicto de *Pseudotsuga japonica*, que es una especie endémica en peligro de extinción en Japón, así como otras especies de *Pseudotsuga* de Asia *Pseudotsuga japonica* ha sido aislada de Norte América, ya que las especies de *Pseudotsuga* se originaron desde el Oligoceno y han evolucionado independientemente como especies adaptadas a climas templados. Para ese trabajo se recolectaron 100 muestras de suelo de cuatro localidades de *Pseudotsuga japonica* mezcladas con otras coníferas y árboles boreales, las puntas micorrizadas del suelo se sometieron a análisis moleculares para identificar tanto al hongo como al hospedero. Los resultados mostraron 136 especies de HEM identificadas, las comunidades fueron significativamente diferentes entre grupos, confirmando la existencia del efecto del hospedero en la comunidad de HEM. Ninguno de las 68 especies de HEM encontradas en *Pseudotsuga japonica*, pertenecieron a linajes específicos de *Pseudotsuga* (como por ejemplo subgrupos de: *Rhizopogon* y *Suillus*) que son comunes en Norte América. Muchos de los hongos ectomicorrízicos de *Pseudotsuga japonica*, se compartieron con otros hospederos filogenéticamente cercanos de otros simbiontes en Asia. Este resultado sugiere que después de la migración de *Pseudotsuga*, linajes específicos de hongos, podrían haberse extinguido en poblaciones pequeñas y aisladas en Japón. En cambio, sugieren que la mayoría de los HEM simbiontes de *P. japonica* probablemente se originaron a partir de cambios de huésped en la región.

2. ANTECEDENTES

Los HEM en bosques templados en México

El conocimiento de los hongos ectomicorrízicos en México se ha desarrollado principalmente a través del estudio de esporomas, pero recientemente se han hecho aportaciones a partir de investigaciones basadas en técnicas de biología molecular. Por ejemplo, Argüelles (2013) estudió a la comunidad de HEM asociados a *Abies religiosa* en el estado de México y el efecto del suelo en la misma y al utilizar métodos moleculares obtuvo 591 secuencias de ADN que correspondieron a 91 OTUS (Unidad Taxonómica Operacional, por sus siglas en inglés Operational Taxonomic Units) de las cuales 87 pertenecen a hongos ectomicorrízicos. Las especies más abundantes fueron *Clavulina* cf. *cinerea* (76 secuencias), *Membranomyces spurius* (51 secuencias), y *Thelephoraceae* sp. 1 (39 secuencias). En el mismo orden las tres especies fueron las que obtuvieron un valor de importancia ecológica (abundancia y frecuencia relativa) más alto. El género *Inocybe* fue el más representado en la comunidad con 21 OTUs, seguido de *Tomentella* con 10, y *Russula* con 8. Los estimadores Chao 1 y Jackknife 1, calcularon posible encontrar 147.07 y 129.86 especies respectivamente. El análisis de factores mostró que el porcentaje de carbono, el pH en agua, las concentraciones de KCl, y la biomasa en peso seco de raíces explican el 73.05% de la varianza de los datos y sugiere que las propiedades del suelo tienen un efecto en la estructura de la comunidad.

Los HEM asociados a *Pinus montezumae* han sido estudiados a lo largo de una cronosecuencia volcánica en la sierra del Chichinautzin en Morelos por Reverchon et al. (2010) en donde registraron los esporocarpos ectomicorrízicos en tres sitios de tres edades geológicas (1835 años ante presente (A.P), 4200 años A.P. y 10,000 años A.P.), durante un periodo de tres años. Los datos consistieron en la recolección de 2795 esporocarpos, que representaron 153 especies ectomicorrízicas, cuya producción fue diferente tanto en biomasa como en abundancia entre los sitios de muestreo, siendo el sitio volcánico más antiguo el que tuvo una biomasa de los esporocarpos más alta, sin embargo en el sitio joven la abundancia fue mayor y el 52% de los esporomas totales provinieron de este, aunque no hubo diferencias significativas entre localidades en cuanto a riqueza. La diversidad más baja se encontró en el sitio de edad intermedia. Las tres localidades presentaron diferencias en cuanto a la composición de especies de

esporocarpos de HEM, el 51.6% de las especies fueron exclusivas de un sitio y solamente 19% de ellas se encontraron en los tres sitios. Los géneros como *Inocybe* o *Laccaria* fueron abundantes en todos los sitios. La mayor proporción de especies exclusivas se encontró en el sitio joven (38.5% contra 27.5% para el de edad intermedia y 23.1% para el sitio antiguo).

En contraste utilizando herramientas de biología molecular, también en asociación con *Pinus montezumae* Reverchon et al. (2012) realizaron un trabajo en donde se investigó la comunidad de HEM asociados con plántulas y árboles maduros de *Pinus montezumae* en un bosque neotropical en México y se comparó la estructura y la composición de especies. Se muestrearon las micorrizas de ambos estadios de *P. montezumae* tanto en las plántulas como en los árboles adultos. Los resultados arrojaron un total de 42 OTUs de HEM. Los índices de diversidad y similitud mostraron que la estructura de la comunidad era similar en los dos estadios de crecimiento. Pero la diversidad filogenética y el estimador de riqueza de Chao fue mayor en las plántulas. Adicionalmente la composición de especies difirió entre las comunidades. Los OTUs dominantes pertenecieron a las familias Atheliaceae, Cortinariaceae, y Sebacinaceae, a pesar de ello, solo se compartieron 12 OTUs entre las plántulas y los adultos, lo que sugirió que los HEM que colonizan las plántulas aun no están incorporados a las redes miceliales y que ésta colonización podría originarse a partir de los propágulos de los hongos en el suelo. En este trabajo se sugiere que la diversidad intragenérica podría garantizar el mantenimiento de la productividad de los bosques bajo condiciones de estrés.

Garibay-Orijel (2007) y Garibay-Orijel et al. (2008) al estudiar la asociación ectomicorrizica en bosques templados de pino en el estado de Michoacán, México, en general encontraron que la diversidad alfa y beta son altas. En ambos trabajos se reportan poco más de 1000 secuencias de los ITS ribosomales, de éstas, 623 son únicas y agrupadas al 97% de similitud genética representan 253 especies de hongos ectomicorrízicos. La diversidad de las familias Thelphoraceae y Sebacinaceae es considerablemente alta. Cuando las secuencias fueron comparadas con las bases de datos de The National Center for Biotechnology Information (NCBI) y Bold Systems generalmente se obtuvieron similitudes bajas. Para evaluar distancia de las secuencias mexicanas de grupos selectos como el del género *Tomentella* se usaron métodos filogenéticos y no filogenéticos como UNIFRAQ. Los datos indicaron que los HEM

mexicanos son considerablemente diferentes a sus contrapartes norteamericanas. En cuanto a la ecología se obtuvo que las especies de HEM más comunes fueron *Pezizomyces* sp.1, *Phialocephala fortinii*, *Russula* grp. *delica*, *Cenococcum geophilum*, *Rhizoscyphus* sp., *Lactarius* sect. *piperites*, *Russula* aff. *cyanoxantha*, *Wilcoxina rehmii*, *Sebacinaceae* sp. 1, *Ascomycota* sp. 1 *Atheliaceae* sp. 1, *Russula* grp. *pectinatoides*, *Lactarius* sect. *deliciosi*, *Leotiomyces* sp. 1 e *Inocybe* sp. En conjunto estas representaron el 26.33% de las micorrizas analizadas y el hongo ectomicorrízico más abundante no pudo ser identificado más que a nivel de clase, se menciona en este trabajo que ésta y muchas otras especies constituyen potencialmente taxa nuevos para la ciencia, y es clara la importancia que tienen las especies de hongos anamórficos o con fructificaciones no evidentes en estos ecosistemas; dentro de los HEM más comunes estas constituyen el 60% de la riqueza y el 65.82% de la abundancia. Entre los hongos con fructificaciones evidentes destaca el aporte de la familia Russulaceae con cinco especies que juntas micorrizaron el 27.03% de las raíces. Estos trabajos se encuentran en proceso de publicación.

Morris et al. (2008b, 2009) estudiaron la comunidad de HEM asociados a encinos (*Quercus laurina*, *Q. castanea* y encinos deciduos *Q. crassifolia*, *Q. magnoliifolia* y *Q. candicans*) en Taxco Guerrero, en donde reportaron 154 taxa para la comunidad y 44 taxa para *Q. crassifolia* cuando se evaluó la comunidad asociada a un solo individuo de esta especie. Estos trabajos se explican a detalle más adelante en el texto, ya que son los antecedentes directos de la presente tesis al ser los únicos artículos en reportar la comunidad de HEM de encinos en México hasta el momento.

A continuación en el Cuadro 1 se muestra un resumen de los datos obtenidos en los estudios sobre ecología molecular de micorrizas realizados en los bosques templados de México.

Cuadro 1. Estudios sobre ecología molecular de HEM realizados en los bosques templados de México.

| Trabajo | Especies | Especies de hospederos |
|------------------------------|------------------|--|
| Morris et al. (2008b) | 44 ^a | <i>Q. crassifolia</i> |
| Morris et al. (2009) | 154 ^a | <i>Q. crassifolia</i> , <i>Q. laurina</i> |
| Smith y Pfister (2009) | 6 ^b | <i>Quercus</i> spp. |
| Kennedy et al. (2011) | 23 ^c | <i>Alnus jorullensis</i> y <i>A. acuminata</i> |
| Reverchon et al. (2012) | 42 ^b | <i>Pinus montezumae</i> |
| Garibay-Orijel et al. (2013) | 27 ^b | <i>Pinus montezumae</i> |
| Arguelles (2013) | 87 ^b | <i>Abies religiosa</i> |

Los super índices indican lo siguiente: a=taxa, c=especies y b=OTUs.

La diversidad biológica de los encinos

Los encinos son plantas leñosas ecológica y económicamente importantes, el género *Quercus* de la familia Fagaceae es el que presenta mayor distribución en el mundo, se encuentra en la mayoría de los bosques templados del hemisferio Norte, y también en regiones tropicales y subtropicales del mismo: en América se localiza desde Canadá hasta Colombia (Nixon 1993, Valencia, 2004).

Para este género se reconocen dos centros de diversidad: el primero al sureste de Asia con 125 especies aproximadamente (Menitsky, 1984, Valencia, 2004) y el segundo en las regiones montañosas de los bosques templados en México principalmente (Govaerts y Frodin, 1989).

En diferentes estimaciones de la riqueza específica del género *Quercus*, se ha calculado que abarca desde 300 (Lawrence, 1951 en Valencia, 2004), 400 (Nixon et al., 1997), 500 (Manos et al., 1999) a 531 especies (Govaerts y Frodin, 1989), aunque este conocimiento aún es deficiente.

El número de especies de encinos mexicanos tampoco se ha calculado con exactitud, pero algunos autores proponen que hay entre 253 (Trelease, 1924 en Valencia, 2004), 135-150 (Nixon, 1993), 173-213 (González, 1993), 125-150 (Zavala-Chávez, 1995) y Govaerts y Frodin (1989 en Valencia, 2004) en su revisión proponen 251 especies de encinos. Sin embargo algunos autores (Nixon, 2002, Valencia, 2004) aseguran que México es el país con la mayor cantidad de especies de encinos en el mundo.

Como ya se mencionó, el conocimiento de la diversidad específica de este género aún es deficiente, principalmente por las dificultades para diferenciar a cada especie debido a la variación morfológica que existe aún dentro del mismo individuo, a los problemas para la identificación taxonómica (el acceso a los materiales tipo, la sobre descripción de muchas especies, distintos criterios entre especialistas del grupo, etc.) y a la hibridación que pueden presentar algunos grupos (Valencia, 2004) son algunas de ellas. En el trabajo de Valencia (2004) también se hace una revisión integral sobre la riqueza de las especies del género *Quercus* en México y se presenta una lista preliminar de las mismas, la sinonimia respectiva para cada especie, así como la distribución estatal y altitudinal. Esta revisión propone 161 especies del género para México y de acuerdo a las 400 y 500 que calcula Nixon y colaboradores (1997), en nuestro país estarían

representadas entre el 32.2 y 40.2% de las especies del género, lo que equivale a la tercera parte de la diversidad mundial.

Para el continente americano se ha estimado la existencia de alrededor de 234 especies de encinos y en México se encuentra el 68.8% de ellas a nivel continental.

Dentro de los dos subgéneros de *Quercus* (*Cyclobalanopsis* y *Quercus*), en México sólo está representado *Quercus*, con tres secciones: *Quercus* (encinos blancos) con 81 especies, *Lobatae* (encinos rojos) con 76 especies, y *Protobalanus* (encinos intermedios o de copa dorada) con cuatro de las cinco especies que en total conforman la sección.

Ahí 109 especies endémicas que equivalen al 67.7% del total de especies del género en el país, 47 pertenecen a la sección de *Quercus*, 61 a *Lobatae* y una a *Protobalanus*. La sección de *Lobatae* es la que destaca por el mayor número de endemismos y es considerada una sección endémica al continente americano (Nixon, 1993).

México es un “hot spot” en lo que a diversidad de encinos se refiere, ya que estos se encuentran en todas las grandes cadenas montañosas del país y son un componente dominante que es importante en términos de biomasa (Morris, 2007). Los bosques de encino soportan ecosistemas clave y tienen funciones como la de proveer hábitat a la vida silvestre, mantener la calidad del agua y facilitar el reciclado de nutrientes (Dahlgren et al., 2003). Pero cabe señalar que los encinos dependen fuertemente de las asociaciones con hongos ectomicorrízicos ya que les proporcionan una ventaja adaptativa al aumentar su área de absorción en las raíces así como mejorar la captación de nutrientes (Smith y Read, 2008). Los encinos son plantas leñosas ecológica y económicamente importantes que se encuentran ampliamente distribuidas desde las montañas tropicales hasta los bosques templados. (Nixon, 1993).

El uso de la región de los interespaciadores ribosomales en la identificación de los HEM

Las técnicas de detección por ADN son muy utilizadas para la identificación de especies en organismos como hongos (en especial para sus micorrizas) debido a que tienen pocos caracteres morfológicos que son realmente útiles para su correcta asignación taxonómica.

El desarrollo de iniciadores específicos de hongos para la amplificación de la región de los ITS de los genes de RNA que se encuentran en varias copias dentro del ADN (Gardes y Bruns, 1993, Horton y Bruns, 2001) fue esencial para el avance de la

investigación filogenética, ambiental y genética para diversos organismos como hongos, plantas y animales (Horton y Bruns, 2001).

Los iniciadores se distinguen por alinearse a regiones sumamente conservadas del genoma que flanquean regiones altamente variables. Utilizando este principio, los iniciadores pueden ser diseñados para ser específicos de hongos, y en muestras donde se encuentra ADN de plantas, animales u organismos procarióticos mezclados con los del hongo, se pueden rescatar secuencias que pertenecen a hongos únicamente. Los iniciadores pueden distinguir objetivos específicos a niveles taxonómicos desde los reinos hasta individuos, dependiendo de la naturaleza de la pregunta de investigación (Peay et al., 2008). Con la llegada de herramientas de biología molecular, las especies fúngicas se han definido cada vez más por la variación de las secuencias de ADN. La idea de la identificación basada en el ADN emplea datos de loci múltiples, ya que un locus único no siempre resulta fiable para el reconocimiento de especies (Taylor et al. 2000). La región de los ITS ha mostrado varias ventajas respecto a otras regiones: 1) Una de las características favorables de estos marcadores es que existen una amplia variedad de sets o pares de primers específicos por grupo taxonómico, por lo que facilitan su uso en muestreos ambientales. La evolución concertada homogeniza las multicopias de los genes, por lo que la variación es poca o inexistente dentro de las poblaciones o individuos (Horton y Bruns, 2001). Sin embargo, contrariamente a la teoría, la variación de los ITS ha sido confirmada en las poblaciones y los individuos de varios organismos (Gardes y Bruns, 1993, Bruns et al., 1998, Horton y Bruns, 2001, Taylor y McCormick, 2008). La presencia de variación intraespecífica e intraindividual en los genes multicopia tiene implicaciones importantes para estudios filogenéticos y ecológicos, sin embargo, se sabe relativamente poco sobre la variación natural de estos genes, en particular a nivel de la comunidad (Horton y Bruns, 2001). 2) La característica de ser multicopia es positiva, por lo que la cantidad de ADN que se necesita para una amplificación es muy baja. 3) Es una región con sitios conservados que favorece el reconocimiento de los iniciadores y también posee múltiples regiones altamente variables. 4) Hay muchas secuencias disponibles en las bases de datos que contienen esta región y que pueden usarse para comparar, lo que facilita la identificación de muestras desconocidas. 5) Se correlaciona bien con las definiciones de especie usando datos morfológicos que definen a una especie en muchos grupos (Smith et al., 2007a).

Como una regla general se acepta que un 3% de variación intraespecífica es generalmente apropiada para distinguir especies en estudios ambientales. Sin embargo, hay grupos en los que los ITS no son útiles, ya que no discriminan entre especies estrechamente relacionadas por lo que es importante reconocer que el uso de los ITS no es más que una aproximación conveniente (Peay et al., 2008).

Smith, Douhan y Rizzo (2007a) examinan la variación intraespecífica e intraesporocarpio de los ITS en esporocarpos y puntas micorrízicas de 68 especies de hongos ectomicorrízicos recolectados en un bosque de *Quercus*. Para calcular la variación intraespecífica de los ITS, se utilizaron las secuencias de cada individuo por cada especie y fueron alineadas. Un enfoque conservador fue el de considerar que un tipo de ITS era variable en una posición particular si y solo si la misma variación de esa posición se encontraba en dos o más núcleos de suelo separados. Con base en este criterio, la variación de los taxa en las raíces se analizó sólo por sus tipos de ITS que se encontraron por separado en cuatro o más núcleos de suelo ($n = 37$ especies). La variación intraespecífica e intraesporocarpio fue detectada en 27 especies de las 68 que se analizaron (40% de los taxa examinados), lo cual representa una mayor proporción con respecto a trabajos previos que utilizaron otras técnicas como los RFLP. Por otro lado, la variación intraespecífica en general fue de 0.16 a 2.85% de nucleótidos, media = 0.74%, más baja en comparación con trabajos previos, pero estaba muy extendida dentro de esta comunidad fúngica y la escala espacial así como también el número de esporocarpos examinados fue más pequeño en contraste con los otros trabajos. La variación se detectó tanto en esporocarpos como en raíces ectomicorrízicas, y estuvo presente en especies de Ascomycetes y Basidiomycetes. En este estudio la variación en los ITS no fue al azar y fue mayor en los esporocarpos que en los clones de las raíces ectomicorrízicas. Esto pudo obedecer a dos razones: primero, que a pesar de que se realizó la clonación de las micorrizas antes de hacer la PCR, debido a la amplificación y selección azarosa de los fragmentos de ADN en esta técnica, no se puede asegurar que se esté secuenciando toda la variación existente; segundo, los esporocarpos ofrecen una mayor probabilidad de muestrear un alto número de genets y por lo tanto tener una representación más amplia de la variabilidad existente.

Aunque los niveles de variación intraespecífica detectada en los ITS son bajos, los resultados del trabajo junto con estudios previos, sugieren que la diversidad intraespecífica en los ITS es un fenómeno que probablemente ocurre con mayor

frecuencia de la que se había pensado y no es un artefacto de los métodos moleculares, también se sugiere que esta variación puede ser más común en algunos géneros o familias que en otros. Por último, se sugiere que el uso de los ITS para estudiar comunidades fúngicas a grandes escalas puede ser de mucha utilidad y que en el contexto de la ecología de hongos, la secuenciación de la región de los ITS a partir de muestras múltiples, morfológicamente similares de esporocarpos locales, parece una vía eficiente para la detección de la variación intraespecífica en los ITS que podría tenerse en cuenta en técnicas como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) o TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). Por lo tanto, las conclusiones basadas en métodos como RFLP o TRFLP deberán ser corroboradas por la secuenciación de ADN, en particular para los grupos en donde la variación sugiere la existencia de especies crípticas.

Estudios de HEM en encinos

Pese a que existen pocos estudios sobre la comunidad ectomicorrízica en ecosistemas de encinos (Smith et al., 2007b), se sabe que estos interactúan con una gran cantidad de organismos que albergan la diversidad y establecen relaciones bióticas que resguardan la salud de los ecosistemas, se conoce que estos son sumamente dependientes de los hongos que los colonizan, quienes en sus raíces forman estructuras especializadas llamadas ectomicorrizas, en estas estructuras el hongo forma un manto que rodea la punta de la raíz y una red de hifas que se desarrolla entre las células corticales de la raíz del encino, mediante la cual se transfiere el carbono de la planta al hongo mientras que los hospederos, en este caso los encinos, reciben beneficios como la capacidad de obtener más nutrientes y agua del suelo.

Las micorrizas pueden tener un gran impacto ecológico sobre la comunidad vegetal a la que se asocian, de manera que influyen la diversidad así como la productividad de la misma, algunos de los factores que pueden estar influyendo en la diversidad de los HEM son la estacionalidad y la especificidad del huésped (Morris, 2007). Aunque se sabe poco acerca de la microbiota correspondiente a cada especie de *Quercus*, hay trabajos taxonómicos que sugieren que los hongos asociados a los encinos son diversos y se ha sugerido que podría existir un alto número de endemismos (Morris et al., 2009). La comunidad ectomicorrízica exhibe una amplia diversidad a varias escalas. En pequeños bosques templados se encuentra un hospedero único que podría contener más

de 90 especies (Smith et al., 2007b) y árboles individuales que pueden albergar más de 15 especies (Saari et al., 2005 en Morris et al., 2008b), en México se encontraron 44 especies de HEM asociadas a un solo individuo de *Quercus crassifolia* (Morris et al., 2008b). A pequeñas escalas espaciales la diversidad de HEM puede ser alta e incluso las raíces de las plántulas pueden estar colonizadas por más de un simbionte. La diversidad de la comunidad HEM se ha evaluado a diferentes escalas espaciales, temporales y con distintos enfoques, que aunque intentan responder a preguntas diversas, nos permiten entender cómo es la estructura de las comunidades de estos grupos y nos dejan ver lo súper diversas que pueden llegar a ser.

Para esta sección los estudios realizados en el tema están divididos en tres enfoques distintos, 1) el enfoque de la generación de conocimiento con fines de aplicación y económicos donde encontramos el trabajo de Giomaro et al. (2009); 2) el enfoque de observar efectos en la comunidad ante algún disturbio ecológico o antropogénico donde se encuentran los trabajos de Baxter et al. (1999), Avis et al. (2003), Montecchino et al. (2004), de Román y de Miguel (2005), Gebhardt et al. (2007), Azul et al. (2010) y Karpati et al. (2011); 3) por último se encuentran los trabajos con orientación en el entendimiento de la ecología de comunidades de HEM, donde están los siguientes estudios; Schmit et al. (1999), Bergero et al. (2000), Valentine et al. (2004), Richard et al. (2005), Walker et al. (2005), Smith et al. (2007b), Courty et al. (2008), Morris et al. (2008b), Morris et al. (2008a), Morris et al. (2009), Dickie et al. (2009), Smith et al. (2009), Torres-Gómez (2012) y Wang et al. (2012).

Dentro del primer enfoque Giomaro et al. (2009) realizaron un estudio *in vitro* donde se caracterizó la formación de micorrizas de *Tuber brumale* en *Tilia americana* y *Quercus pubescens*, se utilizaron cultivos de micelio puro para la inoculación y para la caracterización distintos métodos como: identificación molecular, caracterización morfológica y biométrica. El estudio mostró que las micorrizas pueden variar morfológicamente dependiendo del hospedero al que se asocian, se probó además que los métodos moleculares pueden ser una herramienta útil en el reconocimiento de las micorrizas de *Tuber*.

En el segundo enfoque Baxter y colaboradores (1999) compararon la estructura de la comunidad ectomicorrízica en bosques de encino localizados en áreas rurales (cinco sitios) y en áreas urbanas (cinco sitios), concluyendo que las áreas urbanas tenían más deposición de nitrógeno, niveles más altos de metales pesados, y un recuento menor de

lombrices de tierra que las áreas rurales. El estudio se realizó en Nueva York en Estados Unidos, en bosques dominados por *Quercus rubra* y *Quercus velutina*, en sitios con una temperatura media anual de entre 8.5-2.5° C. Los tipos de ectomicorrizas fueron contadas a partir de muestras de raíces de *Quercus* maduros, las muestras consistieron en núcleos de suelo y plántulas trampa de *Quercus rubra*. Veintiseis tipos de ectomicorrizas se encontraron en los núcleos de suelo provenientes de áreas rurales y 16 en áreas urbanas, nueve tipos de ectomicorrizas se distinguieron en las plántulas de *Quercus rubra* plantadas en suelos de áreas rurales y siete fueron encontradas en plántulas de áreas urbanas. La riqueza total para ambas áreas fue de 30 morfotipos ectomicorrízicos utilizando los criterios propuestos por Agerer (1987-1995). A pesar del menor número de tipos ectomicorrízicos en los suelos urbanos, la riqueza de tipos de HEM por centímetro de raíz de plántulas de roble no fue significativamente diferente entre los suelos urbanos y rurales. La colonización ectomicorrízica fue menor en los núcleos de suelos urbanos que en los núcleos de suelos rurales. Estas diferencias en la estructura de la comunidad HEM se deben probablemente a los impactos antropogénicos.

En Avis et al. (2003) analizaron el efecto de la fertilización con nitrógeno en la comunidad ectomicorrízica en encinos de sabana templada en Minnesota. El experimento consistió en la adición de nitrógeno por 16 años en parcelas definidas con distintas concentraciones de éste elemento (0, 5.4, y 17 gr por metro cuadrado al año), se midió la producción de esporocarpos en los años 14, 15 y 16 de la fertilización, y se analizó la comunidad ectomicorrízica usando PCR y RFLP así como análisis de secuencias en los años 14 y 15 del experimento. En total se redujo la riqueza de esporocarpos en un 50% en ambos tratamientos (5.4 y 17 gr por metro cuadrado) mientras que las especies de *Russula* produjeron aproximadamente cinco veces más esporocarpos en el tratamiento de adición de 17g por metro cuadrado anual. Mientras tanto la riqueza de especies fue menor en parcelas donde se adicionó 17g por metro cuadrado anual. Las especies dominantes colonizando las raíces en los sitios con y sin tratamiento fueron *Cenococcum geophilum*, *Cortinarius* spp. mientras que *Russula* spp. fueron dominantes en las parcelas con mayor adición de nitrógeno. Por lo que en este trabajo se concluye que las comunidades de HEM en ecosistemas deciduos templados responden a la adición de nitrógeno de manera similar que otros ecosistemas con

coníferas, y que la adición del mismo altera la diversidad de la comunidad y aumenta la dominancia de las especies de *Russula*.

También se han realizado estudios de HEM en encinos costeros, como en el caso del trabajo que Montecchino y sus colaboradores llevaron a cabo (2004), en el cual se discute la hipótesis de una respuesta adaptativa de la comunidad ectomicorrízica, en donde síntomas de decaimiento aparecieron en los robles de un bosque costero de *Quercus ilex* donde la pérdida de tierras adyacentes ocasionó una rápida disminución de aguas subterráneas y la intrusión subterránea de agua del Mar Adriático (al norte de Italia). Debido a que la salud de los robles es el resultado de una interacción dinámica entre los mismos árboles y una mezcla de causas bióticas, abióticas y ambientales como la sequía, salinidad y heladas, estos pueden ser factores importantes en la salud de los árboles y las relaciones que establecen con sus simbioses como resultado de estas interacciones. Los árboles afectados comienzan a mostrar síntomas de estrés generalmente debajo del suelo, expresándolo en modificaciones funcionales y anatómicas a nivel de las raicillas y los cambios en el estado de las ectomicorrizas. Por lo que en dicho estudio se examinaron las características de las raicillas de los encinos y la frecuencia relativa de los morfotipos ectomicorrízicos más frecuentes en árboles asintomáticos, débilmente y fuertemente deteriorados. Los resultados del análisis de estos datos sugieren que la sequía y la salinidad están participando en la disminución de los encinos, además de mostrar un número limitado de morfotipos en las raíces. Por otra parte, se observó que de todos los morfotipos, sólo un tercio se encontró en las tres clases de árboles (asintomáticos, débilmente disminuidos y fuertemente disminuidos), mientras que los dos tercios restantes fueron reemplazados gradualmente por otros mientras la proporción de la disminución aumentó. En total se recuperaron 62 morfotipos con una frecuencia superior al 0.1%, de estos, tres fueron asignados a la familia Cortinariaceae, 13 a géneros (*Amanita*, *Boletus*, *Hygrophorus*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Russula*, *Tuber* y *Xerocomus*), cinco a especie (*Amphinema byssoides*, *Cenococcum geophilum*, *Cortinarius* sp., *Leccinum lepidum*) y 4 ectomicorrizas (*Q. araneosa* + *Q. ilex*, *Q. bicolor* + *Q. ilex*, *Quercirhiza cistidiophora* + *Q. ilex*, *Q. incrustata* + *Q. ilex*). Los restantes se mantuvieron indeterminados.

Por otra parte la comunidad de HEM se ha estudiado por de Román y de Miguel (2005) en parcelas en donde hubo fuegos moderados y controles (sin fuego), en bosques de *Quercus ilex* localizados al norte de España. En un periodo de tres años se tomaron

muestras de suelo (para obtención de micorrizas) en cada una de las estaciones del año, utilizando identificación de morfotipos únicamente, y se obtuvieron los siguientes resultados: la abundancia relativa de ciertos morfotipos difiere entre las parcelas control y las quemadas, el porcentaje de puntas micorrízicas fue significativamente más bajo en éstas últimas respecto de las parcelas control. Sin embargo no hubo diferencias significativas en la diversidad, riqueza de especies, o composición de la comunidad entre tratamientos. En este trabajo se reportaron 32 morfotipos en total, los morfotipos dominantes en ambos casos fueron *Cenococcum geophilum*, *Sphaerosporella brunnea* y *Pisolithus tinctorius* que prosperó más en la parcela quemada. Morfotipos del género *Hebeloma* fueron especialmente abundantes en los sitios control. Cabe destacar que en este trabajo no hubo variación significativa en la abundancia relativa de los morfotipos ectomicorrízicos entre las estaciones del año, pero la riqueza de especies fue mayor en otoño y menor en verano. El porcentaje de puntas micorrízicas alcanzó su máximo en invierno y su mínimo en otoño. La colección de muestras durante los tres años también les permitió detectar un aumento significativo en el porcentaje de colonización ectomicorrízica a través del tiempo en la parcela que fue quemada.

En un bosque templado en recuperación con zonas de minería en la periferia, en Alemania (Gebhardt et al., 2007) en un sitio dominado por *Q. rubra*, se investigó cómo cambiaban las comunidades de HEM en el suelo, a través de una cronosecuencia. El muestreo consistió en la recolecta de esporocarpos en 2 semanas del período de lluvias durante los años 2002 y 2003, bajo el suelo se obtuvieron las micorrizas que posteriormente se clasificaron en morfotipos, los cuales fueron identificados mediante la comparación de secuencias de las regiones del transcrito interespaciador interno del ADNr nuclear y con las registradas en el GenBank, 15 especies de hongos fueron identificadas a partir de los esporocarpos y 61 fueron determinadas a partir del muestreo de micorrizas utilizando análisis morfológicos, anatómicos y moleculares. Para este trabajo se concluyó que el número de HEM aumenta con la edad de la plantación, el hongo más abundante fue *Cenococcum geophilum*, las especies más abundantes variaron sin ningún patrón aparente a lo largo de las plantaciones de las distintas edades. Moser et al. (2009) al estudiar la comunidad de HEM de dos tipos de suelos, los no serpentinos y los suelos serpentinos, los primeros son ricos en hierro, magnesio y metales pesados lo que se traduce en una baja fertilidad, vieron que estos poseen una comunidad de plantas única y especies endémicas, y debido a que los hongos

micorrízicos son los mediadores de la interacción plantas-suelo, elaboraron la hipótesis de que los HEM podrían colonizar las raíces de *Quercus garryana* en ambos suelos. En este trabajo se muestrearon raíces de localidades en Oregon y se identificaron las micorrizas morfológica y molecularmente. Los resultados mostraron que de 13 especies de HEM, las seis micorrizas más abundantes y frecuentes fueron encontradas en ambos tipos de suelo fueron: *Cenococcum geophilum*, *Tuber candidum*, *Genea harknessii*, *Tomentella* sp., *Sebacina* sp. e *Inocybe* sp. El índice de Sørensen señaló que no existía diferencia significativa entre las comunidades de HEM de los dos tipos de suelos y que las especies que se asocian a *Q. garryana* tienen una tolerancia edáfica importante.

Los bosques de encino y su comunidad ectomicorrízica han sido estudiados en múltiples escenarios por ejemplo en el del uso de suelo y sequias, están han incrementado la mortalidad de encinos en los bosques de la cuenca mediterránea de Portugal, en donde existe un manejo sustentable ejemplar agro-silvo-pastoral. En esta cuenca se examinó la comunidad de HEM asociada a bosques dominados por *Quercus suber* también llamados “montando” o bosques de alcornoque. Se utilizó la descripción de morfotipos de manera combinada con análisis de la región de los ITS del rADN, y medidas climáticas, edáficas y la historia de uso de la tierra de los últimos 25 años, se pudo obtener que 55 taxa de HEM conformaron la comunidad, *C. geophilum* y las familias Russulaceae y Thelephoraceae explicaron el 56% de la comunidad de HEM, además otros grupos como *Cortinariaceae*, *Boletaceae*, *Amanita*, *Genea*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, y *Tuber* también estuvieron presentes (Azul et al., 2010).

En un trabajo reciente Karpati et al. (2011), investigaron la comunidad de HEM asociados a *Quercus* en sitios urbanos con disturbio y bosques maduros de Nueva York, concluyendo que la presencia y calidad de la comunidad de micorrizas del subsuelo puede estar influyendo fuertemente la comunidad de plantas, la estructura y las respuestas de los hospederos. En este estudio se utilizaron bioensayos tomando suelo de sitios urbanos y de sitios de bosques maduros (ambos dominados por *Quercus*) se utilizaron plántulas trampa de la especie *Quercus rubra* que fueron sembradas en los suelos de los diferentes sitios, con ello se probó que el impacto del disturbio antropogénico y la urbanización afecta la diversidad de la comunidad de HEM. Se utilizaron criterios morfológicos Agerer (1987-1996), métodos moleculares RFLP, y secuenciación de ADN (con los primers ITS1F-ITS4). Los resultados mostraron una diversidad total de 34 especies de HEM, en total. Siendo más diversas las

ectomicorrizas en las plántulas de bioensayos con suelo proveniente de bosques maduros que de las plántulas con suelo proveniente de sitios urbanos.

Por otra parte, con fines de entender la comunidad de HEM desde el punto de vista ecológico que obedece al tercer enfoque, en un bosque dominado por *Quercus* de hoja caduca, en Indiana en el “National Dunes Lakeshore”, se reportaron 36 especies ectomicorrízicas y 141 no ectomicorrízicas. Este estudio se enfocó a la diversidad macrofúngica y en probar estimadores de riqueza de especies, para el cual se identificaron los esporomas de los distintos grupos de hongos (Schmit et al., 1999).

Bergero et al. (2000), estudiaron muestras de micorrizas cercanas entre *Quercus ilex* y *Erica arborea* en Italia con el objetivo de ver si compartían los mismos hongos endófitos. En este trabajo se utilizaron diversos métodos como aislados axénicos, identificación molecular de las micorrizas, reinoculación de los cultivos axénicos en plántulas de los hospederos mencionados etc. Se obtuvieron 70 y 150 aislados respectivamente (*Quercus ilex* y *Erica arborea*) comprobando que los hongos con habilidades micorrízicas se derivaron de ambos hospederos. Adicionalmente las especies de *Odiodendron* y cinco morfotipos de especies de aislados estériles formaron micorrizas ericoides en *E. arborea* en condiciones *in vitro*. Estos resultados indican que el hecho de que las micorrizas ericoides se asocien con raíces ectomicorrízicas tiene una implicación ecológica significativa.

Hace casi una década (Valentine et al., 2004) se estudió la diversidad de ectomicorrizas asociadas a *Q. garryana*, en las sabanas conservadas del sur de Oregon, y basándose en la descripción de morfotipos, y RFLP caracterizaron 39 ectomicorrizas asociadas a esta vegetación, en donde el más abundante fue *Cenococcum geophilum* que ocurrió en el 75% de los núcleos de suelo que recolectaron, adicionalmente encontraron que los morfotipos con patrones de bandeo similares a las especies de *Tuber* fueron comunes, sin embargo los morfotipos poco comunes fueron responsables de la mayoría de la diversidad de ectomicorrizas asociadas a *Q. garryana*. Un dato interesante fue que los patrones de RFLP de esporocarpos no coincidían con los encontrados para la diversidad bajo tierra.

Richard et al. (2005) analizaron la comunidad de HEM en una plantación madura dominada por *Quercus ilex* en Córcega Francia, en donde *Arbutus unedo* era el único otro hospedero ectomicorrízico. Muestras de ectomicorrizas fueron tomadas de árboles de *Q. ilex* y de *A. unedo*, de diferentes estadios (plántulas de 1 año, plantas de 3-10

años, y de árboles viejos), se utilizó la técnica de RFLP-ITS para identificar los patrones de los cuerpos fructíferos o mediante secuenciación. Se obtuvo una diversidad de 140 taxa a partir de 580 ectomicorrizas analizadas y se presentaron muchos taxa raros. *Cenococcum geophilum* dominó con el 35% de las ectomicorrizas, así como Russulaceae, Cortinariaceae, Thelephoraceae y Sebacinaceae. La riqueza fúngica fue comparable sobre y por debajo del suelo ya que los dos niveles mostraron un traslape de más del 20% de la composición de especies de hongos. Ambos hospederos ectomicorrízicos comparten especies, aproximadamente el 15% de la diversidad de HEM. El método utilizado reveló que los patrones de distribución son similares en la comunidad epigea que hipogea, adicionalmente la de cuerpos fructíferos presentó algunos tipos comunes y un gran número de especies raras, patrón que se repite en la comunidad hipogea (ectomicorrizas). Otro hallazgo considerable fue que la composición de la comunidad de HEM no depende de la edad del hospedero, además de que los hospederos *Q. ilex* y de *A. unedo* comparten simbioses.

Walker y colaboradores (2005) estudiaron la diversidad de micobiontes en plántulas de dos especies de encinos *Q. rubra* y *Q. prinus*, trasplantadas a sitios de bosques maduros mixtos en las montañas del sur de los Apalaches. Se utilizaron las plántulas como trampas para atrapar la diversidad global de HEM, obteniendo secuencias de rADN de la región de los ITS de las micorrizas de las mismas. Las plántulas capturaron una gran diversidad, que incluían aquellas presentes en asociación con bosques maduros que estuvieron bien representadas. La riqueza total fue de 75 “tipos” y 42 “tipos” respectivamente (como se nombran en el estudio) representados por una secuencia única, aunque los estimadores de primer y segundo orden de Jackknife fueron de 116 y 143 tipos respectivamente. Los grupos con más riqueza fueron tomenteloide/theleforoide, russuloide y cortinarioide. El ascomiceto *Cenococcum geophilum* estuvo ubicuamente presente. Los hongos dominantes incluyeron a *Tuber* sp., *Craterellus* sp., y *Laccaria laccata*. La menor diversidad se presentó en el sitio de bosque seco más elevado (1170 msnm) comparado con uno de elevación baja (720 msnm). Un aspecto relevante en este trabajo fue que no existió especificidad de las micorrizas encontradas en las plántulas de roble rojo (*Q. rubra*) y roble blanco (*Q. prinus*). El alto grado de rareza en este sistema impone limitaciones sobre el poder de análisis de la comunidad. La alta diversidad de micobiontes destaca el potencial de las

plántulas para la adquisición de carbono de las redes de micelio y confirma su utilidad de uso para estimar la diversidad micorrízica.

Los tipos más frecuentes en las dos especies de plántulas trampa *Q. rubra* (*Qr*), y *Q. prinus* (*Qp*) fueron: *Cenococcum geophilum* *Qr*= 53, *Qp*=53, *Tuber* 1 *Qr*=11, *Qp*=5, *Cantharellaceae* 1 *Qr*=3, *Qp*=4, *Laccaria laccata* *Qr*=2, *Qp*=4, *Russula* 2 *Qr*=2, *Qp*=4, *Tomentella terrestris* *Qr*=3, *Qp*=2, *Hebeloma* 1 *Qr*=4, *Qp*=1 y *Russula* 4 *Qr*=3, *Qp*=1. Este trabajo es relevante para entender la comunidad de HEM ya que demuestra que las plántulas de roble se pueden asociar a una gran diversidad de hongos considerados como de bosques maduros por ejemplo *Albatrellus* sp., *Amanita* sp., Boletales, *Cortinarius* sp., *Gautieria* sp., *Hydnellum* sp., Russulales, *Tricholoma* sp., y Tuberales, por lo que la hipótesis de que las plántulas de encino podrían estar asociadas principalmente a hongos de etapas tempranas fue descartada. Adicionalmente se discute que la diversidad total fue similar a la que se encontró al muestrear esporocarpos en un periodo de tres años en una zona cercana (Walker y Miller, 2002 en Walker et al., 2005) que usando plántulas trampa y técnicas moleculares muestreando un solo año.

El trabajo de Walker y colaboradores (2005) confirma la utilidad del uso de plántulas trampa para documentar efectivamente la diversidad de los micobiontes *in situ*. Además concluye que la alta diversidad de micobiontes en las plántulas tiene importantes implicaciones para respaldar la idea de que ellas podrían estar adquiriendo hidratos de carbono de los árboles del dosel maduro a través de redes micorrízicas. La transferencia neta de carbono fijado a plántulas de sombra a través de redes comunes de micelio fue demostrada por Simard et al. (1997).

En otra investigación Smith y colaboradores (2007b) estudiaron la comunidad de los HEM asociados a *Q. douglasii* (caducifolio) en California Estados Unidos, mediante la recolección e identificación de esporocarpos (incluidos hipogeos y resupinados) y micorrizas de las que se obtuvieron patrones de RFLP's y secuenciación de ADN. Las muestras de micorrizas provenían de cuatro muestreos realizados en los años 2003 y 2004, durante este periodo la estructura de la comunidad de micorrizas se mantuvo relativamente estable y no se encontraron evidencias de que hubiera taxa adaptados a las condiciones de invierno o de primavera demostrando que para este sistema no hay evidencias de estacionalidad en la comunidad de micorrizas. En total, utilizando los datos de micorrizas y esporomas se obtuvieron 161 "especies" de las cuales 46 pertenecen a Ascomycota y se menciona que existe la limitación del número de

muestreos cuando se quiere evaluar la diversidad y discuten que los estudios que realizan un sólo muestreo sólo pueden proporcionar una “instantánea” de las comunidades y no pueden explicar su dinámica temporal (Buee et al., 2005 en Smith et al., 2007b), por lo que se plantea la hipótesis de que en diferentes fechas de muestreo se obtendrá una estructura de la comunidad distinta, al final los datos revelan que para este sistema no existe estacionalidad y se argumenta que no puede haber recambio de las especies significativas a escala anual en algunos ecosistemas (Izzo et al., 2005 en Smith et al., 2007b) y que se esperaría que las comunidades de HEM cambiaran radicalmente a escalas temporales más largas (Taylor y Bruns, 1999 en Smith et al., 2007b).

En otro estudio europeo, Courty y colaboradores (2008) evaluaron la estructura de la comunidad de especies de HEM a través de los horizontes del suelo en un bosque templado de encinos en el noreste de Francia, los muestreos se realizaron mensualmente durante 15 meses en dos horizontes, el A1 y el A2. Las especies de HEM se identificaron mediante la secuenciación del ITS, los resultados mostraron una comunidad compuesta por 75 simbiontes de los cuales los más dominantes fueron Thelephoraceae, Russulaceae, Cortinariaceae y Boletales, las cuatro especies más abundantes resultaron ser *Lactarius quietus*, *Tomentella sublilacina*, *Cenococcum geophilum*, y *Russula* sp1. La abundancia relativa varió dependiendo del horizonte del suelo y el tiempo en el muestreo, algunas especies se presentaron más en uno que en otro, por ejemplo *Lactarius quietus* se presentó en ambos, mientras que *Tomentella sublilacina* fue más abundante en el horizonte A1. Los dos horizontes compartieron el 48% de las especies lo que equivale a 38 especies. Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de la rápida rotación de la composición de especies en la comunidad de HEM que se da de un mes a otro, así como la distribución desigual espacial y temporal entre las especies, lo cual se explica por las preferencias ecológicas de cada especie impulsadas por factores como la longevidad de la raíz, la competencia por los recursos y la resistencia a los cambios ambientales.

Morris et al. (2008a) realizaron un estudio con el fin de tener un mejor entendimiento del rol que juegan las especies hospederas en la estructuración de las comunidades de hongos ectomicorrízicos, en dos especies simpátricas de *Quercus* en la Sierra Nevada de California, con el uso de técnicas moleculares (PCR, clonación, RFLP y secuenciación de ADN). Los hongos de las raíces de *Q. douglasii* y *Q. wislizeni* fueron identificados a partir de 64 muestras de núcleos de suelo. Los principales resultados reportan una

riqueza de 140 taxa de los cuales sólo 40 se comparten entre las dos especies de encino, y dividiendo a los taxa encontrados en grupos (epigeos, hipogeos y resupinados) se observó una mayor diversidad y riqueza de HEM de hábitos epigeos en *Quercus wislizeni*. *Q. douglasii* presentó 88 especies y *Q. wislizeni* 92. Adicionalmente al hacer análisis de suelo, los datos mostraron que el fósforo extraíble y la especie de encino pueden explicar significativamente la proporción de la variación de la distribución de especies de HEM. Los resultados de este estudio indican que las especies hospederas pueden ser un factor importante que influencia la composición de la comunidad de HEM, incluso en árboles congénéricos.

Morris y colaboradores (2008b) detectaron múltiples especies de hongos en las raíces de un sólo individuo de *Quercus* y reconocieron la importancia de los hongos ectomicorrízicos en los ecosistemas tropicales en donde se han realizado pocos estudios utilizando técnicas moleculares para examinar la comunidad de los mismos. En este trabajo se caracterizó la comunidad de HEM de *Q. crassifolia* en el sureste de México en bosques tropicales nublados, mediante secuencias y clonación para el caso de productos de amplificación con más de una banda, ya que se observó que micorrizas individuales pueden albergar múltiples especies de hongos, por ello mediante la clonación de los productos de PCR se identificaron dos o más HEM del 26% de las puntas micorrízicas y cuando se consideraron a los hongos no ectomicorrízicos el porcentaje aumento el 13%. Se registraron 44 taxa de HEM y nueve de no HEM, provenientes de 21 núcleos con un total de 104 micorrizas, las taxa de las familias Russulaceae, Cortinariaceae, Inocybaceae y Thelephoraceae fueron frecuentes. Este es un estudio que caracterizó la comunidad ectomicorrízica bajo tierra de un ecosistema templado muy húmedo dominado por *Quercus crassifolia*, ya que la mayoría de los trabajos se centran en caracterizar la diversidad de bosques templados, sin embargo destacan que el conocimiento de las comunidades HEM en ecosistemas tropicales es limitado (Tedersoo et al., 2007) y casi nada se sabe de la simbiosis entre los HEM y las raíces de los encinos mexicanos (Valencia y Estrada-Torres, 1997 en Morris et al., 2008b).

En Morris et al. (2008b) se genera evidencia que muestra que un solo individuo de encino puede hospedar múltiples especies de HEM y discuten que el mantenimiento de la alta diversidad de especies de la comunidad HEM puede ser atribuida a diversos factores como el particionamiento del nicho (Dickie et al., 2002 en Morris et al.,

2008b), la especificidad del hospedero (Ishida et al., 2007), la sucesión (Twieg et al., 2007 en Morris et al., 2008b) y la interacción entre especies (Bruns, 1995). Debido a la alta diversidad subterránea de HEM en escalas espaciales pequeñas, las interacciones entre especies de HEM pueden ser comunes, ya que compiten para colonizar las raíces y adquirir el carbono de la planta (Morris et al., 2008b) además se ha documentado que la competencia entre especies de HEM puede jugar un rol en la estructura de esta comunidad de HEM (Kennedy y Bruns, 2005).

Adicionalmente el trabajo de Morris et al. (2009) ha estudiado las ectomicorrizas de las especies de encino, *Q. crassifolia* y *Q. laurina* en un bosque nublado tropical de montaña. Muestreando 80 núcleos de suelo obtuvieron 8000 micorrizas que fueron secuenciadas resultando en 154 OTUS de los cuales seis fueron identificados a nivel de especie y 76 a nivel de género, aunque las curvas de acumulación de especies indicaron que nuevas especies continuaban sin ser detectadas incluso después de haber muestreado 80 núcleos de suelo. Usando el primer y segundo orden del estimador de Jackknife se estima una riqueza general de 219 y 256 especies. Los análisis de correspondencia canónica mostraron que el encino hospedero explicaba significativamente la variación en las comunidades de cada encino estudiado (*Q. crassifolia* y *Q. laurina* pertenecientes ambos a la sección *Lobatae* o encinos rojos). Las especies de *Tuber* se encontraron en el 23% de los núcleos de suelo, y fue el taxón más frecuente. Similar a lo encontrado en las comunidades de HEM de bosques templados dominados por encinos se vio que Thelephoraceae, Russulaceae y Sebaciniales fueron diversos y dominantes. Esto rompe con el paradigma de que las asociaciones ectomicorrízicas están principalmente restringidas a ecosistemas templados, ya que estudios como este documentan la variedad de especies en ecosistemas tropicales.

Dickie et al. (2009) probaron en Minnesota Estados Unidos que los encinos de sabana soportan una comunidad ectomicorrízica única altamente diversa en ascomicetes, a comparación de la de los encinos de bosques adyacentes, en donde la ausencia de fuegos ha mantenido el bosque. La comunidad presentó 42 especies y las dominantes fueron *Cenococcum geophilum*, *Cortinarius*, *Russula*, *Lactarius* y Thelephoraceae. La comunidad ectomicorrízica de encinos fue distinta en el bosque que en la sabana tanto en los esporocarpos como en las micorrizas que fueron identificadas usando RFLP, sin embargo la diversidad total no fue más alta en los encinos de sabana que en los del

bosque, pero la presencia de una comunidad fúngica única indica que los encinos de sabana juegan un rol importante en el mantenimiento de la diversidad regional.

En el 2009 Smith y su grupo de trabajo escribieron un artículo en el que los supuestos principales que retoman son los que plantean Bruns et al. (2002) y Kennedy et al. (2003) y establecen que muchas plantas ectomicorrízicas se asocian con muchos HEM no relacionados, y una gran variedad de estos se asocian con bastantes plantas diversas, los autores nombran a esto último como “multihospedero” u “hongo generalista”. Esta característica generalista podría mejorar el éxito de las plantas, darles una ventaja al mejorar el acceso a los nutrientes, aumentar las posibilidades de transferencia de carbono entre distintos huéspedes, etc. También utilizan los datos del trabajo de Smith et al. (2007b) (la comunidad de HEM medida en función de los esporocarpos y micorrizas utilizando secuencias de rADN de un bosque de *Quercus xerico*), los obtenidos por Morris et al. (2008a) (comunidades de HEM de las micorrizas de dos *Quercus* simpátricos) y los generados en este estudio, en donde exploran la comunidad de HEM a través de las micorrizas en un bosque seco de *Pinus sabiniana* (endémico del área de distribución, Graves, 1932 en Smith et al. (2009)) que se ubica en la misma área donde se realizaron los trabajos de *Quercus* (*Q. douglasii* y *Q. wislizeni*) en California, ambos encinos endémicos de una amplia área de baja elevación en California (Pavlik et al., 1991 en Smith et al., 2009). *Q. douglasii* es deciduo y forma una ligera capa de hojarasca, mientras que *Q. wislizeni* es siempre verde y la capa de hojarasca que forma es densa. Por lo que se hipotetizó que estas diferencias fisiológicas y de descomposición de hojarasca entre los dos encinos podrían estar influyendo en la comunidad de HEM. Sin embargo las mismas especies dominantes ocurrieron en ambos hospederos, pero paradójicamente la comunidad en general fue distinta, *Q. wislizeni* mostró una diversidad más amplia y una frecuencia de esporocarpos epigeos mayor, mientras que los hongos correspondientes a Ascomycota fueron más frecuentes en *Q. douglasii* (Morris et al., 2008a). Entonces a pesar de la cercana relación filogenética entre estos hospederos, cada uno tiene una comunidad de HEM única. Los multihospederos fueron detectados en ambos encinos, pero algunos taxa ectomicorrízicos o grupos funcionales “prefirieron” aparentemente un hospedero sobre el otro. Por lo que el objetivo del trabajo fue determinar los HEM dominantes de las raíces de *P. sabiniana* y compararlas con las extensamente documentadas comunidades de *Quercus* que co-ocurren en el área. Se quiso examinar si los hongos multihospederos estarían compartiéndose entre las

tres especies de árboles ectomicorrízicos o si existiría un grupo que prefiriese al hospedero *P. sabiniana*. Estudios recientes han mostrado que la identidad de la planta hospedera influye fuertemente en la comunidad de HEM y que este efecto se exagera con el incremento de la distancia filogenética del hospedero (Ishida et al., 2007, Tedersoo et al., 2008 en Smith et al., 2009), y debido a que *Q. douglasii* y *Q. wislizeni* que están relacionados presentan una comunidad única, se hipotetizó que la comunidad de HEM del distante *Pinus sabiniana* podría ser incluso más divergente. Para ello se tomaron muestras de micorrizas y se analizaron usando RFLP y secuenciación, y utilizando los datos generados en Morris et al. (2008a) y Smith et al. (2007b) se realizó un análisis de componentes principales o (PCA) así como un procedimiento de múltiple respuesta a la permutación (MRPP) para ilustrar la separación entre los grupos. El análisis de PCA mostró diferencia en la composición de especies de los hospederos y permitió señalar que Basidiomycota fue dominante para *P. sabiniana*, con 25 especies que sumaron el 77.6% de la frecuencia relativa y se detectaron 8 especies Ascomycota que representan el 22.4% de la frecuencia relativa. En contraste el 37-39% de las especies fueron Ascomycota y sumaron del 31-49% de la frecuencia relativa. Sin embargo muchos HEM en *Quercus* fueron Ascomycota (*Cenococcum*, *Tuber*, *Peziza*). Diecinueve de los 33 detectados en *P. sabiniana* (58% de los taxa) no habían sido identificados previamente en *Quercus*, a pesar del amplio esfuerzo de muestreo. Esto fue comprobado para siete de los 10 HEM asociados a pino. Cinco especies de dos linajes que se asociaron sólo con *Pinus* (*Rhizopogon*, Atheliaceae) contribuyeron mayormente a este patrón, juntos estos taxa acumularon el 28% de la frecuencia relativa en *Pinus*. El análisis de PCA mostró un solapamiento significativo entre las especies de encino que fue confirmado por el MRPP. Cabe destacar que la mayoría de HEM asociados a *Pinus* fueron sólo detectados en este hospedero, 14 ectomicorrizas coocurrieron en por lo menos alguna de las especies de *Quercus* (42% de los taxa), además todas los HEM que compartieron *Pinus* y *Quercus* fueron Basidiomicetes, cinco especies fueron generalistas y se encontraron en los tres hospederos (15% de los taxa). *P. sabiniana* compartió cerca de mismo número de ectomicorrizas con *Q. douglasii* (nueve) y *Q. wislizeni* (10) sin embargo la mayoría de los HEM detectados en *Pinus* y *Quercus* tuvieron frecuencias relativas bajas en el segundo hospedero (menores al 2%) con excepción de *Laccaria bicolor* (4.3% de frecuencia relativa en *Q. wislizeni*) y Thelephoraceae (3.5% de frecuencia relativa en *Q. douglasii*) que podrían ser hongos

fuertemente multihospedero. Las especies como *Laccaria* podrían estar preparadas para ser HEM multihospedero debido a que son especies pioneras que regularmente establecen nuevos genetos a partir de esporas, las cuales tienen un gran potencial para ser invasoras (Smith et al., 2009). Muchos de los linajes a niveles más altos fueron detectados en *P. sabiniana* y *Quercus* (Thelephoraceae, Pezizales) pero a nivel de especie muchos HEM fueron diferentes en los dos géneros de hospederos. Lo que sugieren los datos reportados en este trabajo, es que algunos grupos de HEM podrían tener algunas preferencias de hospedero. Por ejemplo, Pezizales parecen tener una marcada afinidad al hospedero, aunque estuvo presente en los dos géneros, ninguna de las siete especies asociadas a *Pinus* fueron detectadas en *Quercus*. En contraste otros grupos que parecen exhibir un patrón poco específico al hospedero. Por ejemplo Russulaceae fue encontrado en *Pinus* y en *Quercus*.

Smith et al. (2009) concluyen que la imagen emergente es una en la que los HEM podrían mostrar algún nivel de preferencia al hospedero, y la mayoría de las plantas ectomicorrízicas podrían estar albergando a una fracción de los HEM localmente disponibles.

En Michoacán en un trabajo reciente (Torres-Gómez 2012) estudió los esporomas de HEM asociados a bosques de encino-pino con un enfoque de productos forestales no maderables comparando la disponibilidad (densidad, peso fresco por hectárea, riqueza de especies y disponibilidad temporal) de esporomas silvestres comestibles entre plantaciones de *Cupressus lusitanica*, (género no ectomicorrízico) y bosque nativo de encino-pino. Se hipotetizó que la disponibilidad de esporomas ectomicorrízicos y saprobios comestibles sería influida por la composición vegetal, es decir se esperaba que en los sitios dominados por *Quercus* y *Pinus* hubiera una mayor densidad de esporomas y la comunidad tuviese una mayor riqueza. Los resultados mostraron una mayor riqueza (7 spp. ectomicorrízicas y 3 spp. saprobias), y densidad (peso/ha: 3433.72 gr/ha) de esporomas silvestres comestibles (incluidos los saprobios) en el bosque de encino-pino. En las plantaciones hubo mayor densidad y dominancia de una sola especie saprobia (*Gymnopus dryophilus*). Se concluye que las plantaciones de *Cupressus lusitanica* efectivamente comprometen la disponibilidad de esporomas silvestres comestibles, particularmente para las especies ectomicorrízicas. Además se muestra la importancia de las especies ectomicorrízicas nativas y la necesidad de un manejo forestal apropiado.

En un bosque templado al norte de China se estudió a la comunidad ectomicorrízica de *Quercus liaotungensis* de diferentes edades (plántulas, árboles jóvenes y árboles maduros). En total se identificaron 66 especies ectomicorrízicas basadas en morfotipos, PCR y RFLP, y secuencias de ADN. De estos taxa fúngicos 51 (77.3%) fueron Basidiomycetes y 15 Ascomycetes (22.7%). La especie dominante fue *Cenococcum geophilum*. Las especies más abundantes y ricas pertenecieron a Thelephoraceae que presentó 16 taxa (19.5%), Sebacinaceae 12 taxa (17.6%) y Russulaceae 7 taxa (8.3%). Los resultados mostraron un efecto significativo marginal en la comunidad de HEM respecto a las tres edades de los encinos y a la estación del año (Wang et al., 2012). Como evidencian los trabajos anteriores durante las últimas dos décadas se ha incrementado el estudio de la comunidad de HEM asociada a encinos, lo que permite concluir que en términos generales, como en otros casos de simbiosis ectomicorrízica, la comunidad se encuentra dominada por un conjunto reducido de especies muy abundantes y un grupo amplio de especies raras poco abundantes.

El año en el que más estudios de este tipo se han publicado es en 2009 en donde aparecieron cinco artículos, el 2008 y 2005 también fueron productivos ya que en cada uno de ellos se publicaron tres trabajos de HEM asociados a encinos.

El hospedero cuya diversidad de HEM se ha evaluado en un mayor número de ocasiones, cuatro oportunidades, ha sido *Q. ilex*, y *Q. rubra*. *Q. ilex* ha sido estudiado en Europa únicamente y en contraste *Q. rubra* se reporta tanto en América (en tres artículos) como en Europa (en un artículo), *Q. douglasii* siguen en la lista con 3 veces, *Q. garryana* también ha sido explorado desde el punto de vista de hospedero ectomicorrízico en un par de oportunidades.

Los métodos también han mejorado con el paso del tiempo y han permitido conocer a esta comunidad de manera más profunda y efectiva, confirmando su gran diversidad y a los encinos como un hospedero gentil que la alberga, a pesar de la amplia diversidad de HEM que se ha encontrado asociada al género *Quercus*, una de las conclusiones más significativa a la que se ha llegado en la mayoría de los casos es que aun no se conoce la totalidad de sus simbioses, y que el recambio de especies es constante, por lo que los trabajos permiten ver lo que está sucediendo justo en el momento del muestreo a manera de una “instantánea” y una de las conclusiones después de este análisis, es que se esperara que las comunidades de HEM cambien radicalmente a escalas temporales más largas (Taylor y Bruns, 1999, Smith et al., 2007b).

Está claro que la diversidad obtenida depende primeramente del sistema en cuestión, de la escala a la que se mida, del esfuerzo de muestreo que se realiza, y de los métodos con los que se evalúa. Los sistemas en los que se ha encontrado una diversidad mayor corresponden a los descritos en Smith et al. (2007), con 161 especies en California, E.U.A., seguido del reportado por Morris et al. (2009), con 154 especies en Guerrero, México, posteriormente Richard et al. (2005) y Morris et al. (2008a), encontraron 140 especies en Córcega, Francia y en California, E.U.A. respectivamente.

El estudio de los HEM en encinos ha progresado abordando diferentes temáticas a lo largo del tiempo, algunas de las preguntas que se han respondido son referentes a la diversidad y ecología de las comunidades de HEM, a la preferencia de los hongos por un estadio de vida del árbol, a la especificidad al hospedero tema que ha generado controversia. Los estudios también se han dirigido a evaluar las respuestas a disturbios naturales o antropogénicos, a la adición de nitrógeno o en respuesta a metales pesados, las investigaciones también se han dirigido a estudiar la comunidad de HEM de grupos de encinos que se asocian con hongos hipogeos llamados trufas que son utilizados en la cocina Gourmet y que tienen un alto valor comercial.

Pero a pesar del gran esfuerzo a lo largo de estas dos últimas décadas por comprender la comunidad de HEM asociada a encinos siguen sin estar totalmente claras las respuestas a dichas preguntas, lo que es evidente es que esta asociación es diversa tanto para los encinos como para los simbioses y que las reglas que marcan la pauta en estas interacciones se desconocen aun y que falta mucho por entender al respecto. En el Cuadro 2 se resumen los trabajos revisados sobre la diversidad de HEM en bosques de roble.

Cuadro 2. Estudios sobre ecología molecular de HEM realizados en los bosques dominados por encinos en el Mundo.

| Trabajo | País | No. especies | Especies de árboles |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------------------|---|
| Giomaro et al. (2009) | <i>In vitro</i> | --- | --- |
| Baxter et al. (1999) | EUA | 30 ^a | <i>Q. rubra</i> , <i>Q. velutina</i> |
| Avis et al. (2003) | --- | --- | --- |
| Montecchino et al. (2004) | Italia | 62 ^a | <i>Q. ilex</i> |
| de Román y de Miguel (2005) | España | 32 ^a | <i>Q. ilex</i> |
| Gebhardt et al. (2007) | Alemania | 15 ^c / 61 ^d | <i>Q. rubra</i> |
| Moser et al. (2009) | EUA | 13 ^h | <i>Q. garryana</i> |
| Azul et al. (2010) | Portugal | 55 ^c | <i>Q. suber</i> |
| Karpati et al. (2011) | EUA | 34 ^h | <i>Q. spp</i> y <i>Q. rubra</i> |
| Schmit et al. (1999) | EUA | 36 ^b | <i>Quercus spp</i> |
| Bergero et al. (2000) | Italia | 70 ^e | <i>Q. ilex</i> |
| Valentine et al. (2004) | EUA | 39 ^b | <i>Q. gurrayana</i> |
| Richard et al. (2005) | Francia | 140 ^c | <i>Q. ilex</i> |
| Walker et al. (2005) | EUA | 75 ^g | <i>Q. rubra</i> , <i>Pinus sp</i> |
| Smith et al. (2007b) | EUA | 161 ^d | <i>Q. douglasii</i> |
| Courty et al. (2008) | Francia | 75 ^f | <i>Quercus spp</i> |
| Morris et al. (2008a) | EUA | 140 ^c | <i>Q. douglasii</i> , <i>Q. wislizeni</i> |
| Morris et al. (2008b) | México | 44 ^c | <i>Q. crassifolia</i> |
| Morris et al. (2009) | México | 154 ^d | <i>Q. crassifolia</i> , <i>Q. laurina</i> |
| Dickie et al. (2009) | EUA | 42 ^h | <i>Quercus spp</i> |
| Smith et al. (2009) | EUA | 225 ^d | <i>Pinus sabiniana</i> , <i>Q. douglasii</i> , <i>Q. wislizeni</i> |
| Wang et al. (2011) | China | 66 ^c | <i>Q. liaotungensis</i> |

Los super índices indican; a=morfotipos, b=ectomicorrizas, c=taxa, d=OTUs, e=aislados, f=simbiontes, g=tipos h=especies.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de los HEM como componentes de la simbiosis micorrízica brindan datos no sólo sobre su ecología, taxonomía y sistemática, sino además dan información sobre las relaciones con sus hospederos y su papel como componentes de los bosques. A nivel forestal es relevante pues es posible saber qué especies de hongos están asociadas con qué especies de plantas, pues permite diseñar y plantear esquemas de reforestación y restauración adecuadas a las plantas y condiciones del suelo, particulares. Adicionalmente, la información generada en el presente estudio, puede aplicarse en las plantaciones forestales seleccionando hongos que brinden a los árboles mayor crecimiento y mejores ventajas adaptativas. Por otra parte el conocimiento de los HEM de los encinos de la Cuenca de Cuitzeo es fundamental, pues como se ha visto el tipo de ecosistema dominado por encinos suele albergar una gran diversidad, que al presentarse en menores altitudes tiene un papel fundamental en la retención del suelo y la humedad. Desgraciadamente los bosques de encino en Michoacán están sujetos a una gran presión debido a la expansión urbana y a la extracción de leña y carbón (Arizaga et al., 2009, Aguilar et al., 2012). Por lo que la profundización de este conocimiento original es urgente para su protección. La información que se obtenga junto con los datos con los que ya se cuenta de las ectomicorrizas de otros tipos de vegetación, permitirá tener un panorama completo de la diversidad e importancia ecológica de los hongos ectomicorrízicos en los ecosistemas templados de esta cuenca. Lo que sentará las bases para el entendimiento de la diversidad, distribución y ecología de los HEM y para la incorporación de estos recursos a la reforestación, restauración y actividad forestal.

4. HIPÓTESIS

1. El hecho de que los encinos sean tan buenos hospederos de la diversidad biológica y que tengan interacciones a tantos niveles, aunado al hecho de que México es uno de los centros de diversificación del género *Quercus*, sugiere que los bosques de encino de la Cuenca de Cuitzeo resultarán un ecosistema diverso en hongos ectomicorrízicos.
2. Dado que las comunidades de HEM normalmente están dominadas por pocas especies y tienen un gran número de especies raras, se espera que la estructura entre las dos zonas de muestreo (Águila e Icuacato) sea similar, es decir, estará dominada por pocas especies y presentará muchos MOTUs únicos. Sin embargo se espera que difieran en la composición de especies entre sitios.
3. Asumimos que la mayoría de las especies reportadas en este trabajo no han sido secuenciadas en Norte América y Europa, por lo que el porcentaje de similitud genética en las bases de datos, en la mayoría de los casos será menor al 97%, lo que podría sugerir un alto nivel de endemismo.
4. El número de MOTUs compartidos entre la comunidad de HEM de la Cuenca de Cuitzeo, Michoacán y los reportados para el estado de Guerrero en el trabajo de Morris et al. (2009), será mayor que los que podrían compartirse con otros estudios de comunidades de HEM en bosques de encino en Norte América con los de Cuitzeo. Es decir: a menor distancia entre las zonas de estudio mayor número de MOTUs compartidos.

5. OBJETIVOS

1. Caracterizar la diversidad de hongos ectomicorrízicos asociados a encinos en la Cuenca de Cuitzeo en Michoacán, a través de la obtención de secuencias de ADN de la región de los Interespaciadores Ribosomales.
2. Determinar la estructura de la comunidad de los HEM en los sitios de estudio en la Cuenca de Cuitzeo, así como la composición de especies en los mismos.
3. Evaluar el nivel de similitud genética de las secuencias obtenidas en este trabajo, respecto de las del resto del mundo (presentes en las bases de datos públicas).
4. Proponer un método utilizando secuencias producidas en otros trabajos de comunidades de HEM, que permita evaluar cuál es el número de especies que se comparten entre dichos estudios con las del presente estudio.

6. METODOLOGÍA

Este trabajo formó parte del proyecto de investigación Fondo mixto CONACYT-Michoacán Mich-2009-C05-112966, que contempla el estudio de los hongos ectomicorrízicos en bosques de encinos de la Cuenca de Cuitzeo, Michoacán. Para dicho proyecto se recolectaron micorrizas en 4 sitios de muestreo con bosques de *Quercus deserticola*, *Q. obtusata*, *Q. castanea*, *Q. magnifolia*, *Q. rugosa* y *Q. laeta*.

6.1 Características del área de estudio

La Cuenca de Cuitzeo se localiza principalmente al norte del estado de Michoacán y al sur del estado de Guanajuato ambos en México como se muestra en la Figura 1, y comprende un área de casi 4000 km², la cuenca está formada por dos colinas bajas y altas de origen volcánico del Mioceno-Plioceno, depósitos piroclásticos asociados de caída y llanuras fluviolacustrine con suelos de textura fina como vertisoles, luvisoles, andosoles y acrisoles. Su vegetación es una mezcla de matorrales, bosques templados y tierras de cultivo (Mendoza et al., 2011). Las cubiertas terrestres dominantes y usos del suelo forman un paisaje altamente fragmentado de bosque, matorral y tierras agrícolas, combinados en un patrón de mosaico (López et al., 2006).

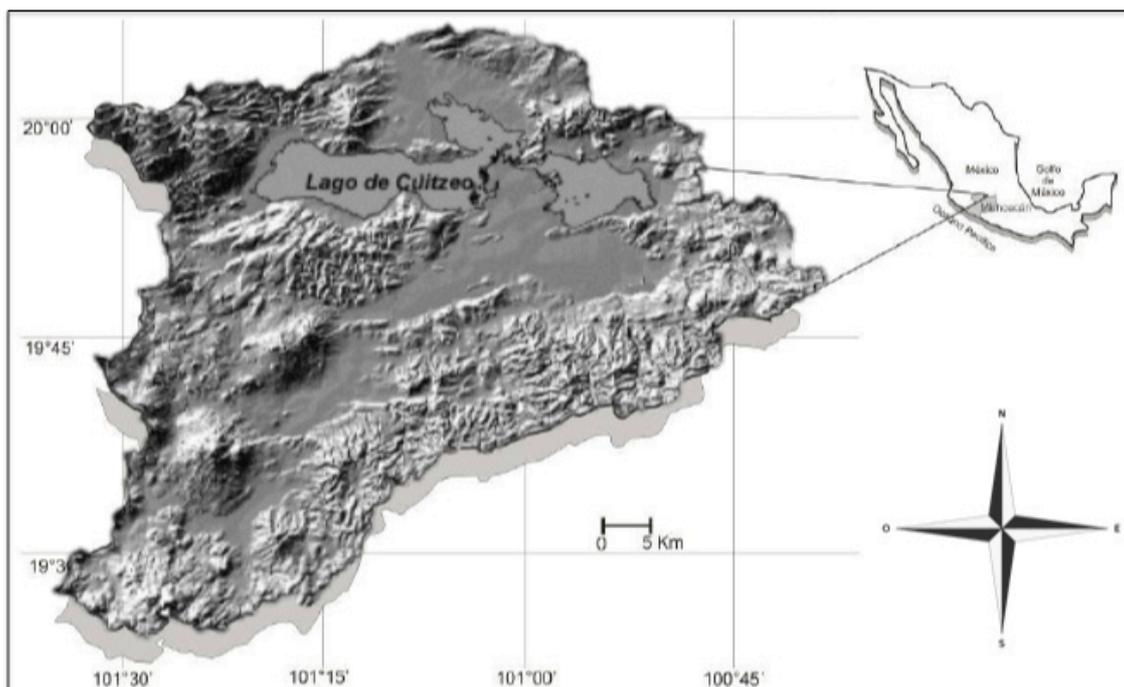


Figura 1. Mapa de la Cuenca de Cuitzeo ubicada en Michoacán México.

La Cuenca de Cuitzeo está ubicada en el eje volcánico transmexicano, entre los 19° 30' - 20° 05' latitud norte y 100° 30' - 101° 35' longitud oeste (Gómez-Tagle, 2008). Está delimitada al suroeste y oeste por volcanes de secuencia volcánica del Oligoceno-Mioceno y el cuaternario del corredor Tarasco (Garduño-Monroy, 1999). Al sur de la cuenca se encuentra la falla del sistema del Balsas de la secuencia del Oligoceno-Mioceno de Mil Cumbres (Pasquaré et al., 1991). En esta se encuentran los cerros Burro, El Frijol, La Nieve, La Taza, el Tzirate, Tzanambo, La Mesa, El Chapulín y el Cerro Hueco entre otros. Al este de la misma se localizan los elementos volcánicos de los Azufres que la delimitan. Al norte los volcanes Manuna y la Sierra de San Pablo, todos con fallas geológicas intensas (Silvia-Mora, 1995). La cuenca del lago de Cuitzeo o Cuenca de Cuitzeo es de tipo endorreica, sus principales escurrimientos provienen de la porción sur y sur-oriente que son zonas de mayor elevación, el principal escurrimiento en la cuenca es el Río Grande de Morelia (Leal, 2009).

Dentro de los municipios que pertenecen a la cuenca se encuentra Morelia localizado en la parte centro-norte del estado de Michoacán. Este municipio presenta terrenos de topografía accidentada con sistemas montañosos: al este la sierra de Otzumatlán que se extiende hasta los cerros de San Miguel, Azul y Punhuato; por el sur, el parteaguas se dirige hacia el suroeste desde el cerro Verde y el cerro de Atécuaro hasta los Cerros de la Camba y el Burro, limitando con los valles de Lagunillas, Tiripetio, Huiramba y Acuitzio. Hacia el poniente, se deslinda por las elevaciones de los cerros Pelón y Quinceo, al sur se observan dos conos basálticos Tetillas del Quinceo y el Cerro del Águila, que se extienden hasta Cointzio (Chávez y Guevara, 2003). Esta cuenca alberga el segundo cuerpo de agua natural más grande de México, el lago de Cuitzeo que pertenece a la región hidrológica del Lerma-Chapala y tiene una extensión de aproximadamente 233 Km² (Mendoza et al., 2002). Los cuerpos de agua superficiales en la cuenca constituyen sistemas lacustres, y en menor proporción palustres y riparios, han sido considerado como un cuerpo de agua susceptible a alteración debido a que es un vaso plano y extenso con gran evaporación (Leal, 2009), adicionalmente ha sido propuesto como sitio RAMSAR.

Población

En el interior de la Cuenca de Cuitzeo se encuentra la ciudad de Morelia, que pertenece al municipio del mismo nombre, con una población estimada de 729,279 habitantes (INEGI, 2010) además de 28 municipios en total; 23 correspondientes al norte de Michoacán (92.8%) y cinco al sur del estado de Guanajuato (7.2%) (Leal, 2009) cuyos efectos ambientales sobre sus alrededores son principalmente la deforestación, el abatimiento de los acuíferos y la contaminación del lago de Cuitzeo.

Clima

El clima de la cuenca en general va del templado húmedo a subhúmedo (Cb) con régimen de lluvias en verano y precipitación invernal, sin embargo presenta un gradiente de incremento de humedad y descenso de temperatura que va de norte a sur, esto se debe a que hay un incremento de amplitud de relieve en la cuenca (Carlón et al., 2009). La precipitación anual promedio va de los 595.4 a los 1499.9 mm, siendo marzo el mes más seco con un promedio de 70 mm y julio el más húmedo con aproximadamente 199.3 mm. La cuenca presenta precipitación altamente variable, con desviaciones estándar promedio entre 2.7 para el mes de marzo hasta 52.0 para julio según los datos registrados de 22 estaciones meteorológicas que reporta Carlón et al. (2009). La temperatura anual promedio es de 16-18° C. En la cuenca se presenta una transición del clima templado-seco al templado-húmedo, con una precipitación promedio de 1000 mm aproximadamente y temperatura media anual de 15° C.

Vegetación y cambio del uso de suelo

El suelo de la cuenca se compone de materiales volcánicos, que dan lugar a suelos de textura fina, como vertisoles, luvisoles, andosoles y Acrisoles (López et al., 2002). Su cobertura vegetal está constituida por: bosques de encino, pino-encino, abeto, matorrales, pastizales, así como plantaciones de pinos, eucaliptos entre otros árboles y cultivos temporales y de riego.

Para dar a conocer la dinámica de uso de suelo que es compleja se retoma el Cuadro 3 de Lopez, 2006 en donde se reportan áreas deforestadas o en recuperación o sucesión de la vegetación original, que constituyen parcelas que fueron abandonadas para este año.

Cuadro 3. Uso de suelo en la Cuenca de Cuitzeo para el año 2006.

| Tipo de vegetación | Cobertura | ha |
|-------------------------|-----------|--------|
| Matorrales | 23% | 94,956 |
| Cuerpos de agua | 7% | 30,262 |
| Humedales | 1.4% | 5,720 |
| Bosque templado | 19.6% | 78,544 |
| Agricultura de temporal | 18.5% | 74,385 |
| Agricultura de riego | 15.5% | 62,313 |
| Asentamientos humanos | 4.8% | 19,416 |
| Plantaciones forestales | 2.6% | 10,453 |

Ubicación de los sitios de muestreo

Se estudiaron dos zonas con cuatro sitios de muestreo, por su ubicación, a las zonas se les llamó Águila localizada en el cerro del mismo nombre, en ella se ubicaron los sitios Águila 1 y Águila 2, y en la zona Icuacato nombrada así por el poblado del mismo nombre se encontraron los sitios Icuacato 1 e Icuacato 2, todos los sitios pertenecieron a la Cuenca de Cuitzeo, las coordenadas de cada uno se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Coordenadas, altitud y vegetación dominante de los sitios de muestreo.

| Zona | Referencia | Sitio | Coordenadas | Altitud | Información |
|----------|-----------------------------------|------------|--|-----------|--|
| Águila | Cerro del Águila | Águila 1 | N 19° 37' 8.53'' W 101° 19' 21.62'' | 2280 msnm | <i>Quercus deserticola</i> |
| | | Águila 2 | N 19° 37' 0.23'' W 101° 20' 5.8'' | 2550 msnm | <i>Q. deserticola</i> , <i>Q. castanea</i> y <i>Q. obtusata</i> |
| Icuacato | Quiroga-Icuacato Cerro Tzirate | Icuacato 1 | N 19° 42' 3'' W 101° 28' 9'' | 2414 msnm | <i>Q. castanea</i> , <i>Q. magnifolia</i> , <i>Q. rugosa</i> y <i>Q. laeta</i> . |
| | | Icuacato 2 | N 19° 42' 39'' W 101° 28' 18'' | 2490 msnm | <i>Q. castanea</i> , <i>Q. magnifolia</i> , <i>Q. rugosa</i> y <i>Q. laeta</i> . |

Los datos de la vegetación de la zona Águila se tomaron de la información generada en Zacarias-Eslava et al. (2011) en donde se describen los sitios del Águila, la información de la zona Icuacato se obtuvo de Oyama (com. pers).

En la siguiente figura (2) se muestran los sitios de toma de muestras georreferenciados en el mapa que los ilustra.

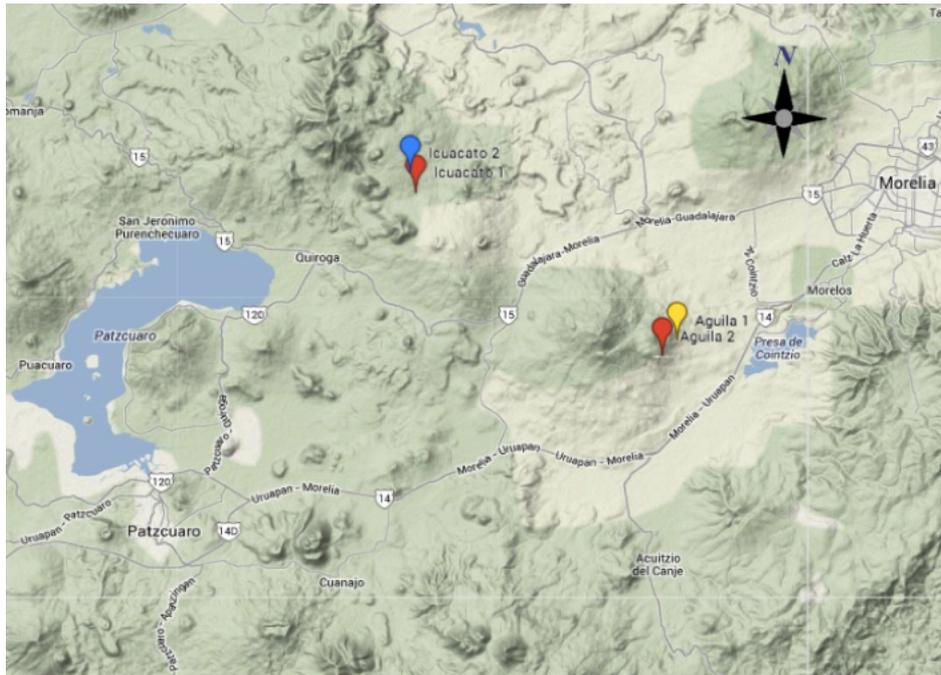


Figura 2. Ubicación de los sitios de estudio.

6.2 Procesamiento de las muestras

Diseño del muestreo

Para el estudio ecológico sobre la diversidad y estructura de la comunidad de HEM en cada sitio de muestreo se fijaron diez transectos de 60 m de largo, en cada transecto se tomaron tres núcleos de suelo distanciados 20 m uno de otro. De cada muestra se extrajeron aleatoriamente 15 morfotipos de micorrizas diferentes aproximadamente. Se procesaron el total de micorrizas extraídas por sitio como se muestra en la Figura 3 y se identificó qué especies son más importantes en términos de cuáles son más representativas en su fase vegetativa y funcional (ectomicorrizas).

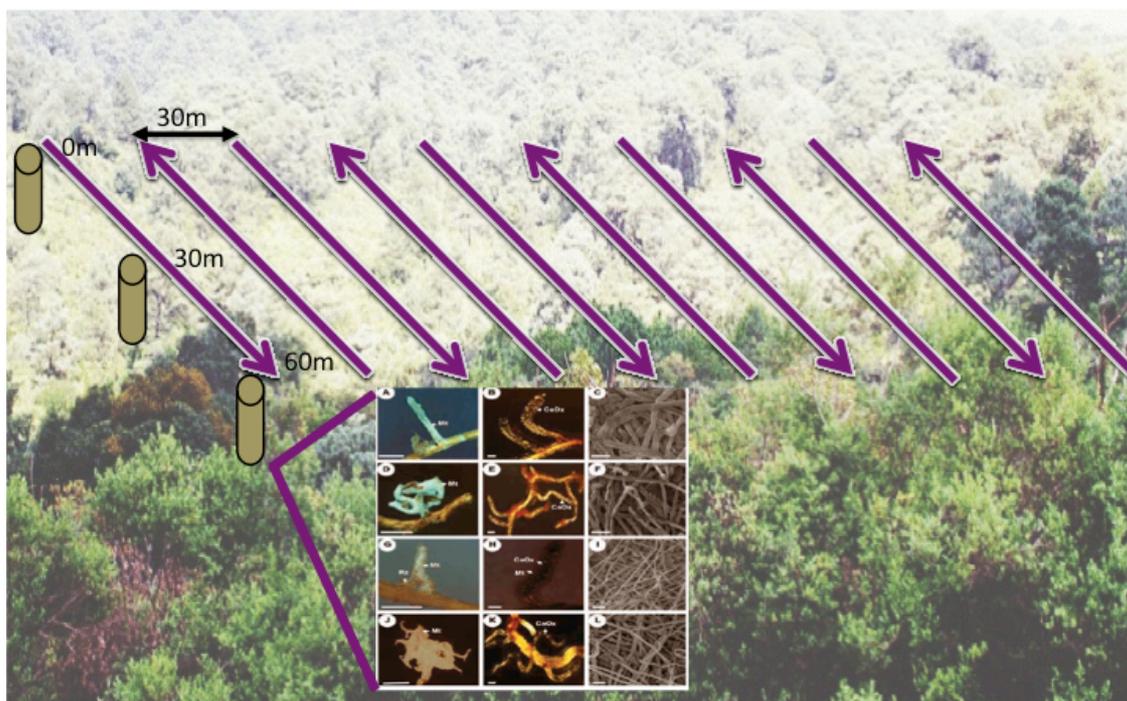


Figura 3. Diseño de muestreo por sitio.

Recolección y procesamiento de micorrizas

Para obtener las micorrizas se tomaron núcleos de suelo de 2.5 cm de diámetro y 30 cm de profundidad. Las muestras fueron recolectadas en el año 2009, e inmediatamente después de su extracción se colocaron en hielo, después fueron transportadas al laboratorio y almacenadas a 4°C. Después se lavaron inicialmente en un tamiz de 0.35 mm y las raíces micorrízicas se disectaron. Una vez limpias, las micorrizas se preservaron en CTAB a -80°C para que posteriormente fueran analizadas molecularmente.

Las muestras de micorrizas en cada sitio se numeraron consecutivamente comenzando del número 1 hasta el 1671, como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Numeración de muestras por sitio.

| Numeración de muestras | Nombre del sitio |
|------------------------|------------------|
| Q1 – Q451 | Águila 1 |
| Q452 – Q828 | Águila 2 |
| Q829 – Q1245 | Icuacato 1 |
| Q1246 – Q1671 | Icuacato 2 |

Extracción del ADN

Las muestras fueron procesadas molecularmente a partir de octubre del 2011. De cada sistema micorrízico se cortó un pequeño fragmento de entre 1 y 2 mm de longitud, cada

fragmento fue colocado en un pozo de placas para PCR de 96 pozos. El ADN de las muestras se extrajo con el kit de extracción XNAP-REDEExtract-N-Amp Plant Kit, utilizando 10 μ l de solución de extracción (ES) que fue sometido a un ciclo corto de temperaturas (10 min 65° C, 10 min 95° C y 4° C ∞), posteriormente se añadieron 20 μ l de solución de dilución (DS). Cada placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego las extracciones fueron almacenadas a -20° C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La identificación taxonómica de las micorrizas se basó en la región de ADN de los inter espaciadores ribosomales pues ésta región proporciona suficiente poder de resolución para diferenciar las muestras a nivel de especie y además es la más representada en las bases de datos genéticas para este tipo (Horton y Bruns, 2001).

Para hacer la reacción de PCR se utilizó el kit REDEExtract-N-Amp (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EUA) con los iniciadores ITS1F-ITS4, particularmente el ITS1F es usado frecuentemente para amplificar los phylla Ascomycota y Basidiomycota en muestras mezcladas con ADN de plantas como lo reporta Gardes y Bruns (1993). En conjunto la combinación de los iniciadores ITS1F-ITS4 (Gardes y Bruns, 1993) pueden emplearse para estudiar la estructura de comunidades de hongos. La secuencia de los iniciadores es la siguiente para el ITS1F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA y TCCTCCGCTTATTGATATGC para el ITS4. La mezcla de reacción, tuvo un volumen final de 20 μ l: 7.6 μ l de H₂O, 0.2 μ l del iniciador ITS1F a 50 μ M, 0.2 μ l del iniciador ITS4 a 50 μ M, 10 μ l del reactivo REDEExtract para PCR, 2 μ l de ADN micorrízico.

Las muestras se incubaron en un termociclador modelo PTC 100, Mj Research Inc. El programa de amplificación consistió en los siguientes pasos: 3 min a 94° C (para eliminar un anticuerpo que está asociado a esta Taq polimerasa), 34 ciclos de 1 min a 94° C (desnaturalización), 1 min a 51° C (alineamiento) y 1 min a 72° C (elongación), posteriormente 8 min a 72° C (elongación o extensión final) y por último 4° C ∞ .

Para verificar la amplificación de las muestras, se realizó una electroforesis, que se corrió a 90 voltios durante 60 min. Las bandas amplificadas se observaron en un gel de agarosa al 1% utilizando buffer TBE al 1X, para la preparación del gel y como medio de conducción en la cámara de electroforesis, el gel fue teñido con 2 μ l de RedGel (Biotium) por cada 200 μ l de TBE al 1X. Cada gel contó con 200 pozos y en cada pozo se depositó una muestra de producto de PCR de 4 μ l. Los geles fueron fotografiados

utilizando el transiluminador MultiDoc-It Digital Imaging System Benchtop UVP con cámara de observación integrada. Posteriormente las fotografías de los geles fueron analizadas y las muestras que no presentaron bandas, mostraron bandas dobles o débiles se descartaron, los fragmentos amplificados de tamaño adecuado y no contaminados se limpiaron.

Limpieza de los productos de PCR

La limpieza se realizó con el fin de remover el exceso de nucleótidos e iniciadores remanentes en la reacción, el producto que se utilizó fue ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, EUA), primero se preparó una mezcla de agua destilada desionizada estéril de 1 μ l y 1 μ l de ExoSAP-IT, que se depositó en cada pozo de una nueva placa y se añadió 3.5 μ l del producto de amplificación a cada uno, con la pipeta se mezcló suavemente y luego la placa se centrifugó durante 1 min a 1500 rpm. Por último la placa se colocó en un termociclador a 37° C durante 45 min seguido de 80° C por 15 min y 4° C para concluir.

Reacción de secuenciación y secuenciación del ADN

Las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo por la M. en C. Laura Margarita Marquez Valdelamar en el Laboratorio de biología molecular de la biodiversidad y de la salud del Instituto de Biología de la UNAM, utilizando una reacción de secuenciación con Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes. La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático ABI 3100.

Edición de secuencias

Las secuencias pertenecientes a los sitios Águila 1 y Águila 2 se editaron utilizando el programa Sequencher 4.8 (Gibbs y Cockerill, 1995), las secuencias pertenecientes a los sitios Icuacato 1 e Icuacato 2 se editaron con el programa Geneious Pro 5.5.6 (Drummond et al., 2011). Los MOTUs fueron delimitados basados en el criterio taxonómico del 97% de similitud entre las secuencias como se utilizó en Peay et al. (2009), con Geneious Pro 5.5.6. Se generaron secuencias consenso utilizando este mismo criterio, estos constituyeron nuestros MOTUs. Las secuencias fueron editadas de manera individual, la secuencia consenso se editó tomando en cuenta todas las

secuencias que formaron el grupo (contig en inglés), por eso si existía una base heteróciga esta se respeto poniendo el carácter de una base degenerada del código de la Unión Internacional de Química Pura Aplicada o por sus siglas en inglés IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). En el caso de que las secuencias de la misma muestra no pudieran sobrelaparse, debido a su estructura secundaria, se forzó el sobrelapamiento disminuyendo el porcentaje de similitud genética hasta el 80%, para poder rescatar la información de ambos sentidos de la secuencia, este procedimiento se hizo manualmente para alrededor de 450 secuencias, aunque no todas ellas se utilizaron para los análisis debido a que en algunos casos eran muy cortas o de mala calidad.

6.3 Designación de la identidad de las unidades taxonómicas operacionales moleculares (MOTUs)

La identidad taxonómica de los MOTUs se obtuvo al compararlos contra las bases de datos del NCBI en GenBank mediante el algoritmo de búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997) y se empleó un filtro para excluir las muestras ambientales.

Las especies reportadas en este trabajo como ya se dijo se identificaron a partir del criterio de similitud genética a 97% citado en Peay et al. (2008), aquellas que coincidieron al 97% o más se consideraron conespecíficas. La asignación taxonómica fue un proceso cuidadoso en donde además de considerar la similitud genética se tomaron en cuenta algunos criterios para la selección del mejor empate. El primer criterio fue el tener un valor de “e” (que nos habla de la probabilidad de error en la coincidencia) igual a cero o cercano a este, el segundo fue tener un porcentaje total alto (Bit-Score) (en donde se incluye el porcentaje de la similitud, el valor de “e” y el porcentaje de cobertura de la secuencia empatada en cuestión) y el último si el trabajo al que pertenecía la secuencia mejor empatada estaba publicado o no. La asignación taxonómica de cada MOTU se hizo utilizando la información perteneciente al NCBI Taxonomy.

Adicionalmente las secuencias fueron comparadas con Bold Systems que es la base de datos de la iniciativa de códigos de barras de la vida, en donde la comunidad de Cuitzeo generada en este trabajo se comparó con 55 secuencias de esporomas identificados

utilizando técnicas de taxonomía tradicional e identificación molecular que provinieron de la misma cuenca hidrológica, pero que se encontraron en asociación con pino y pinoencino. Debido a que las secuencias que se empataron tenían el mismo nombre en la base de datos que el previamente asignado utilizando Genbank, la mayoría de los nombres no cambiaron, sin embargo en dos casos en los que en Bold Systems se llegó a un nombre con epíteto específico se tomó la decisión de emplear estos últimos y al final del nombre se añadió un asterisco para especificar este hecho.

6.4 Análisis de datos ecológicos: Diversidad y Estructura de la Comunidad

Los análisis de diversidad se hicieron utilizando la identidad de los MOTUs y el número de micorrizas por MOTU, los MOTUs fueron sinónimos de especies, lo cual está acorde con el tipo de investigación, con ellos se obtuvieron los datos de riqueza por sitio y la abundancia de cada una de las especies respectivamente (cada ectomicorriza secuenciada en uno o ambos sentidos consistió en un dato). Con la identidad taxonómica se pudo saber cuántos MOTUs se obtuvieron por Phylum, Orden, Familia, Género y especie cuando la identificación lo permitió. Para evaluar la diversidad se empleó el índice de diversidad de Shannon (Shannon y Wever, 1949) y para evaluar la equitatividad el índice de dominancia de Simpson (Krebs, 1999). Con el fin de evaluar la eficiencia del muestreo se construyeron curvas de acumulación de especies de la comunidad y se calculó la riqueza esperada con los estimadores no paramétricos Chao1 y Jackknife 1, los análisis se realizaron usando el programa Biodiversity Pro (SAMS).

6.5 Análisis de similitud genética

La similitud genética de la comunidad respecto de las bases de datos se evaluó realizando dos análisis, el primero utilizando únicamente vouchers de las bases de datos (excluyendo muestras ambientales), este método se utilizó para la asignación de nombres taxonómicos también (como se mencionó anteriormente) y el segundo realizando la búsqueda de la secuencia más parecida sin ningún tipo de filtro, por lo que este último consideró a las muestras ambientales.

En ambos análisis una vez que se obtuvo la identidad de los MOTUs se consideraron como “no reportados en la base de datos” a aquellos cuyo mejor empate (Best Match o “hit”) en GenBank tuviera una similitud menor al 97%, mientras que aquellos que obtuvieron valores de similitud del 97% o más se consideraron como conespecíficos y “si reportados en la base de datos”, y estos datos sirvieron para evaluar la hipótesis de similitud genética.

El umbral definido por la divergencia genética menor o igual al 3% se ha empleado en otros estudios (Peay et al., 2008 Morris et al., 2009, Ciardo et al., 2006) que utilizaron la región de los ITS para la identificación de especies de HEM a partir de ectomicorrizas extraídas del suelo. Este criterio se basa en la variación interespecífica de la región de los ITS, e incluye las tasas de error que se pueden generar en la PCR y secuenciación (Izzo et al., 2005, Walker et al., 2005).

Con ello se asume que en los hongos la variabilidad genética en esta región es comparable y aplicable a todo el reino, sin embargo, este método está débilmente soportado desde el punto de vista evolutivo ya que no considera la variación en las tasas de sustitución de las especies o los clados, por lo que es necesario el desarrollo de métodos evolutivos que reafirmen su uso (Fujisawa y Barraclough, 2013).

Por otra parte este criterio de delimitación estándar establecido a priori, que aunque es conservador, puede subestimar la diversidad de algunos grupos y sobre estimar la de otros, esto lo convierte en conveniente pero controversial (Peay et al., 2008, Tedersoo et al., 2006).

6.6 Análisis de MOTUs compartidos con otras comunidades de HEM del mundo

Para realizar el análisis de MOTUs compartidos con algunas comunidades de HEM del mundo se propone un método de comparación de comunidades, utilizando secuencias de comunidades de distintos trabajos y la herramienta de agrupamiento “Assembly” del programa Geneious Pro 5.5.6 (Drummond et al., 2011).

Para determinar el grado de similitud entre los MOTUs del presente estudio con los reportados en otros trabajos sobre ectomicorrizas asociadas con otras especies de encinos se obtuvieron las secuencias de los trabajos de Walker et al. (2005), Smith et al. (2007b), Palmer et al. (2008), Morris et al. (2008b), Moser et al. (2009), Dickie et al.

(2009), Morris et al. (2009), Benucci et al. (2010), Karpati et al. (2011), Wang et al. (2012), Reverchon et al. (2012), Argüelles (2013) y Garibay-Orijel et al. (2013), las secuencias fueron descargadas de las bases de datos públicas usando los números de acceso del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), las cuales se agruparon con las generadas en esta tesis siguiendo el mismo criterio de delimitación de especie del 97% de similitud genética. Posteriormente se cuantificó el número de MOTUs que se compartieron entre las comunidades.

El criterio para la selección de estos trabajos fue que fueran estudios con un enfoque ecológico, metodológicamente similares en bosques de encinos y que las secuencias estuvieran disponibles en las bases de datos públicas. Los trabajos de Reverchon et al. (2012) (*Pinus montezumae*), Argüelles (2013) (*Abies religiosa*) y Garibay-Orijel et al. (2013) (*Pinus montezumae*) se consideraron en el análisis por la cercanía geográfica a la Cuenca de Cuitzeo aunque no representan comunidades de HEM asociados a encinos. Adicionalmente el trabajo de Palmer et al. (2008) se tomó en cuenta porque el hospedero principal *Castanea dentata* se encuentra en la misma familia que los encinos (Fagaceae).

7. RESULTADOS

7.1 Diversidad de HEM y no ectomicorrizcos asociados a encinos de la Cuenca de Cuitzeo

Micorrizas y Secuencias de ADN

Los resultados obtenidos entre las micorrizas y secuencias fueron los siguientes. En total, se muestrearon 1671 micorrizas extraídas de cuatro sitios de estudio en la Cuenca de Cuitzeo (Cuadro 6) de las cuales se lograron amplificar y secuenciar 578; 232 micorrizas del sitio Águila 1, 117 de Águila 2, 52 del sitio Icuacato 1 y 177 de Icuacato 2. A partir de ellas, se obtuvieron 880 secuencias de ADN ribosomal de la región de los ITS que corresponden a Águila 1 con 380 secuencias, Águila 2 con 180, Icuacato 1 con 73 e Icuacato 2 con 242. El porcentaje de éxito del total de micorrizas desde la toma de muestras hasta la obtención de las secuencias fue de 34.59% como se ve en el Cuadro 7. Se produjeron un total de 1,394 secuencias de las cuales 755 se editaron en Geneious Pro 5.5.6 (Drummond et al., 2011) y 639 en Sequencher 4.8 (Gibbs y Cockerill, 1995). Las secuencias fueron editadas en ambos sentidos (3'-5' y 5'-3).

Cuadro 6. Muestras de ectomicorrizas por sitio de estudio en la Cuenca de Cuitzeo.

| Nombre del sitio | Numeración de muestras | Número de muestras por sitio |
|------------------|------------------------|------------------------------|
| Águila 1 | Q1 – Q451 | 451 |
| Águila 2 | Q452 – Q828 | 379 |
| Icuacato 1 | Q829 – Q1245 | 416 |
| Icuacato 2 | Q1246 – Q1671 | 425 |
| Total | | 1671 |

Cuadro 7. Contribución de cada sitio a la obtención de secuencias, eficiencia de amplificación y porcentaje de éxito total.

| Sitios | Número de micorrizas recolectadas por sitio | Porcentaje en la contribución total de muestras | Micorrizas amplificadas y secuenciadas | Del total de muestras secuenciadas (578) porcentaje de cada sitio | Eficiencia de amplificación | Porcentaje de éxito respecto del total de muestras tomadas (1671) |
|--------------|---|---|--|---|-----------------------------|---|
| Águila 1 | 451 | 26.98% | 232 | 40.13% | 51.44 % | 13.88% |
| Águila 2 | 379 | 22.68% | 117 | 20.24% | 30.87% | 7.00% |
| Icuacato 1 | 416 | 24.89% | 52 | 8.99% | 12.5% | 3.11% |
| Icuacato 2 | 425 | 25.43% | 177 | 30.62% | 41.65% | 10.59% |
| Total | 1671 | 100% | 578 | 100% | - | 34.59 % |

Especies

Las 880 secuencias fueron ensambladas a 97%, esto generó 187 grupos o “contigs”, los cuales constituyeron nuestros MOTUs. Aunque todos ellos aparecieron en las raíces, se pudo ver que 170 pertenecen a géneros o especies previamente reportados como ectomicorrízicos (Rinaldi et al., 2008, Tedersoo et al., 2010) y 17 no han sido reportadas como especies ectomicorrízicas. Los datos obtenidos están ordenados por sitio de estudio en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Especies micorrizas y secuencias por sitio y en total para la Cuenca de Cuitzeo.

| Sitio | Especies | | Micorrizas | | Secuencias | |
|--------------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| | Ecm | No ecm | Ecm | No ecm | Ecm | No ecm |
| Águila 1 | 88 | | 232 | | 380 | |
| | 83 | 5 | 224 | 8 | 369 | 11 |
| Águila 2 | 44 | | 117 | | 180 | |
| | 36 | 8 | 108 | 9 | 166 | 14 |
| Icuacato 1 | 33 | | 52 | | 73 | |
| | 33 | 0 | 52 | 0 | 73 | 0 |
| Icuacato 2 | 70 | | 177 | | 242 | |
| | 66 | 4 | 172 | 5 | 236 | 6 |
| TOTAL | 187 | | 578 | | 880 | |
| | 170 | 17 | 556 | 22 | 850 | 30 |

Las especies se dividieron en ectomicorrízicas= Ecm, y no ectomicorrízicas= No ecm.

De las 556 ectomicorrizas que aportaron datos respecto a la diversidad que existe en la Cuenca de Cuitzeo para estos sitios, el 14.9% es decir 83 micorrizas, resultaron ser MOTUs únicos lo que equivaldría al 48.8% del total de especies y el 51.2% esto es 87 micorrizas tuvieron una o más repeticiones, agrupándose al 97% o más de similitud genética.

La asignación de la identidad taxonómica supragenérica de los MOTUs se realizó utilizando los criterios que se explicaron previamente en la metodología, basándose en la información presente en la base de datos del NCBI Taxonomy. En el Cuadro 9 se muestra la ubicación taxonómica de cada uno de los MOTUs.

Cuadro 9. MOTUs ectomicorrízicos de la comunidad de la Cuenca de Cuitzeo y su asignación taxonómica.

| Nombre del MOTU | Phylum | Orden | Familia | Género |
|----------------------------------|---------------|--|------------------|---------------------|
| <i>Astraeus hygrometricus</i> | Basidiomycota | Boletales | Astraeaceae | <i>Astraeus</i> |
| Atheliaceae sp. 1 | Basidiomycota | Atheliales | Atheliaceae | |
| Atheliaceae sp. 2 | Basidiomycota | Atheliales | Atheliaceae | |
| Auriculariales sp. 1 | Basidiomycota | Atheliales | | |
| Boletus sp. 1 | Basidiomycota | Boletales | Boletaceae | <i>Boletus</i> |
| <i>Cenococcum geophilum</i> | Ascomycota | Dothideomycetes <i>insertasedis</i> | | <i>Cenococcum</i> |
| Clavulina sp. 1 | Basidiomycota | Cantharellales | Clavulinaceae | <i>Clavulina</i> |
| Clavulinaceae sp. 1 | Basidiomycota | Cantharellales | Clavulinaceae | |
| Clavulinaceae sp. 2 | Basidiomycota | Cantharellales | Clavulinaceae | |
| <i>Cortinarius aff. flexipes</i> | Basidiomycota | Agaricales | Cortinariaceae | <i>Cortinarius</i> |
| <i>Cortinarius decipiens</i> | Basidiomycota | Agaricales | Cortinariaceae | <i>Cortinarius</i> |
| Cortinarius sp. 1 | Basidiomycota | Agaricales | Cortinariaceae | <i>Cortinarius</i> |
| <i>Elaphomyces muricatus</i> | Ascomycota | Eurotiales | Elaphomycetaceae | <i>Elaphomyces</i> |
| <i>Entoloma aff. sinuatum</i> | Basidiomycota | Agaricales | Entolomataceae | <i>Entoloma</i> |
| Entoloma sp. 1 | Basidiomycota | Agaricales | Entolomataceae | <i>Entoloma</i> |
| <i>Genea papillosa</i> | Ascomycota | Pezizales | Pyronemataceae | <i>Genea</i> |
| Genea sp. 1 | Ascomycota | Pezizales | Pyronemataceae | <i>Genea</i> |
| Genea sp. 2 | Ascomycota | Pezizales | Pyronemataceae | <i>Genea</i> |
| Genea sp. 3 | Ascomycota | Pezizales | Pyronemataceae | <i>Genea</i> |
| Genea sp. 4 | Ascomycota | Pezizales | Pyronemataceae | <i>Genea</i> |
| Genea sp. 5 | Ascomycota | Pezizales | Pyronemataceae | <i>Genea</i> |
| Genea sp. 6 | Ascomycota | Pezizales | Pyronemataceae | <i>Genea</i> |
| Hebeloma sp. 1 | Basidiomycota | Agaricales | Cortinariaceae | <i>Hebeloma</i> |
| Hebeloma sp. 2 | Basidiomycota | Agaricales | Cortinariaceae | <i>Hebeloma</i> |
| Helotiales sp. 1 | Ascomycota | Helotiales | | |
| Helotiales sp. 2 | Ascomycota | Helotiales | | |
| Helotiales sp. 3 | Ascomycota | Helotiales | | |
| Helotiales sp. 4 | Ascomycota | Helotiales | | |
| Helvella sp. 1 | Ascomycota | Pezizales | Helvellaceae | <i>Helvella</i> |
| Helvella sp. 2 | Ascomycota | Pezizales | Helvellaceae | <i>Helvella</i> |
| Helvella sp. 3 | Ascomycota | Pezizales | Helvellaceae | <i>Helvella</i> |
| Helvella sp. 4 | Ascomycota | Pezizales | Helvellaceae | <i>Helvella</i> |
| Helvella sp. 5 | Ascomycota | Pezizales | Helvellaceae | <i>Helvella</i> |
| <i>Hydnum repandum</i> | Basidiomycota | Cantharellales | Hydnaceae | <i>Hydnum</i> |
| Hygrophorus sp. 1 | Basidiomycota | Agaricales | Hygrophoraceae | <i>Hygrophorus</i> |
| Hysterangium sp. 1 | Basidiomycota | Hysterangiales | Hysterangiaceae | <i>Hysterangium</i> |
| Inocybe sp. 1 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| Inocybe sp. 2 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| Inocybe sp. 3 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| Inocybe sp. 4 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |

| | | | | |
|---|---------------|---------------|------------------|-------------------------|
| <i>Inocybe</i> sp. 5 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Inocybe</i> sp. 6 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Inocybe</i> sp. 7 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Inocybe</i> sp. 8 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Inocybe</i> sp. 9 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Inocybe</i> sp. 10 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Inocybe</i> sp. 11 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Inocybe</i> sp. 12 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Inocybe</i> sp. 13 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Inocybe</i> sp. 14 | Basidiomycota | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> |
| <i>Laccaria</i> aff. <i>amethystina</i> | Basidiomycota | Agaricales | Tricholomataceae | <i>Laccaria</i> |
| <i>Laccaria</i> sp. 1 | Basidiomycota | Agaricales | Tricholomataceae | <i>Laccaria</i> |
| <i>Lactarius subserifluus</i> | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Lactarius</i> |
| <i>Lactarius yazooensis</i> | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Lactarius</i> |
| <i>Pachyphloeus citrinus</i> | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Pachyphloeus</i> |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 1 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Pachyphloeus</i> |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 2 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Pachyphloeus</i> |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 3 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Pachyphloeus</i> |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 4 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Pachyphloeus</i> |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 5 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Pachyphloeus</i> |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 6 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Pachyphloeus</i> |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 7 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Pachyphloeus</i> |
| <i>Pachyphloeus virescens</i> | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Pachyphloeus</i> |
| <i>Peziza</i> sp. 1 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | <i>Peziza</i> |
| Pezizaceae sp. 1 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | |
| Pezizaceae sp. 2 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | |
| Pezizaceae sp. 3 | Ascomycota | Pezizales | Pezizaceae | |
| <i>Piloderma</i> sp. 1 | Basidiomycota | Atheliales | Atheliaceae | <i>Piloderma</i> |
| Pleosporales sp. 1 | Ascomycota | Pleosporales | | |
| Pleosporales sp. 2 | Ascomycota | Pleosporales | | |
| Pleosporales sp. 3 | Ascomycota | Pleosporales | | |
| <i>Pseudotomentella tristis</i> | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Pseudotomentella</i> |
| <i>Ramaria</i> sp. 1 | Basidiomycota | Gomphales | Gomphaceae | <i>Ramaria</i> |
| <i>Russula</i> aff. <i>brevipes</i> * | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> aff. <i>curtipes</i> | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> aff. <i>cyanoxanta</i> * | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> aff. <i>olivacea</i> | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula pulverulenta</i> | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 1 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 2 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 3 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 4 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 5 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |

| | | | | |
|---------------------------------------|---------------|-------------|-------------------|--------------------|
| <i>Russula</i> sp. 6 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 7 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 8 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 9 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 10 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 11 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 12 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 13 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 14 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 15 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 16 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 17 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 18 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 19 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 20 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Russula</i> sp. 21 | Basidiomycota | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> |
| <i>Scleroderma areolatum</i> | Basidiomycota | Boletales | Sclerodermataceae | <i>Scleroderma</i> |
| <i>Sebacina epigaea</i> complex sp. 1 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina epigaea</i> complex sp. 2 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina incrustans</i> | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 1 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 2 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 3 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 4 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 5 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 6 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 7 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 8 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 9 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 10 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 11 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 12 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 13 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 14 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 15 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 16 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 17 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 18 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 19 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| <i>Sebacina</i> sp. 20 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | <i>Sebacina</i> |
| Sebacinaceae sp. 1 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | |
| Sebacinaceae sp. 2 | Basidiomycota | Sebacinales | Sebacinaceae | |
| Sebacinales sp. 1 | Basidiomycota | Sebacinales | | |
| Sebacinales sp. 2 | Basidiomycota | Sebacinales | | |

| | | | | |
|--|---------------|---------------|------------------|-------------------|
| <i>Sistotrema</i> sp. 1 | Basidiomycota | Corticiales | Corticaceae | <i>Sistotrema</i> |
| Sordariomycete sp. 1 | Ascomycota | | | |
| Sordariomycete sp. 2 | Ascomycota | | | |
| <i>Thelephora anthocephala</i> | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Thelephora</i> |
| <i>Thelephora</i> sp. 1 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Thelephora</i> |
| Thelephoraceae sp. 1 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| Thelephoraceae sp. 2 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| Thelephoraceae sp. 3 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| Thelephoraceae sp. 4 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| Thelephoraceae sp. 5 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| Thelephoraceae sp. 6 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| Thelephoraceae sp. 7 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| Thelephoraceae sp. 8 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| Thelephoraceae sp. 9 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| Thelephoraceae sp. 10 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | |
| <i>Tomentella</i> aff. <i>ferruginea</i> | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella atroarenicolor</i> | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 1 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 2 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 3 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 4 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 5 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 6 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 7 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 8 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 9 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 10 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 11 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 12 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 13 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 14 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 15 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 16 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 17 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 18 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 19 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 20 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 21 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tomentella</i> sp. 22 | Basidiomycota | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> |
| <i>Tricholoma columbetta</i> | Basidiomycota | Agaricales | Tricholomataceae | <i>Tricholoma</i> |
| <i>Tricholoma populinum</i> | Basidiomycota | Agaricales | Tricholomataceae | <i>Tricholoma</i> |
| <i>Tuber castilloi</i> | Ascomycota | Pezizales | Tuberaceae | <i>Tuber</i> |
| <i>Tuber separans</i> | Ascomycota | Pezizales | Tuberaceae | <i>Tuber</i> |

Los nombres con * fueron asignados utilizando la base de datos de Bold Systems.

La asignación taxonómica de los MOTUs considerados como no ectomicorrízicos se muestra en el Cuadro 10.

Cuadro 10. MOTUs no ectomicorrízicos de la comunidad de la Cuenca de Cuitzeo y su asignación taxonómica.

| Nombres del MOTU no ectomicorrízico | Phylum | Orden | Familia | Género |
|--|---|-------------------|--------------------|-----------------------|
| Agarical sp. 1 | Basidiomycota | | | |
| Agaricomycotina sp. 1 | Basidiomycota | | | |
| Ascobolaceae sp. 1 | Ascomycota | Pezizales | Ascobolaceae | |
| <i>Cadophora luteo-olivacea</i> | Ascomycota | | | <i>Cadophora</i> |
| <i>Cryptococcus albidus</i> | Basidiomycota | | | <i>Cryptococcus</i> |
| Cyphellophoraceae sp. 1 | Ascomycota | Chaetothyriales | Cyphellophoraceae | |
| <i>Halorosellina oceanica</i> | Ascomycota | Xylariales | Xylariaceae | <i>Halorosellinia</i> |
| <i>Halorosellinia sp. 1</i> | Ascomycota | Xylariales | Xylariaceae | <i>Halorosellinia</i> |
| <i>Lecythophora sp. 1</i> | Ascomycota | Coniochaetales | Coniochaetaceae | <i>Coniochaeta</i> |
| <i>Leptodontidium sp. 1</i> | Ascomycota | Helotiales | | <i>Leptodontidium</i> |
| <i>Mortierella alpina</i> | Linajes de principios divergentes de los hongos ssubphylum: Mortierellomycotina | Mortierallales | Mortierellaceae | <i>Mortierella</i> |
| <i>Mortierella elongata</i> | Linajes de principios divergentes de los hongos ssubphylum: Mortierellomycotina | Mortierallales | Mortierellaceae | <i>Mortierella</i> |
| <i>Mycena sp. 1</i> | Basidiomycota | Agaricales | Tricholomataceae | <i>Mycena</i> |
| <i>Mycena sp. 2</i> | Basidiomycota | Agaricales | Tricholomataceae | <i>Mycena</i> |
| Nectriaceae sp. 1 | Ascomycota | Hypocreales | Nectriaceae | |
| <i>Tetrapyrgos sp. 1</i> | Basidiomycota | Agaricales | Marasmiaceae | <i>Tetrapyrgos</i> |
| <i>Thozetella sp. 1</i> | Ascomycota | Chaetosphaeriales | Chaetosphaeriaceae | <i>Thozetella</i> |

Adicionalmente, las 880 secuencias obtenidas en este trabajo fueron comparadas con las 55 secuencias de esporomas asociados a pino-encino reportadas para la Cuenca de Cuitzeo en la base de datos de la iniciativa del código de barras de la vida Bold Systems. Se encontraron nueve coincidencias, que presentaron los mismos nombres que se les había asignado cuando se analizaron los datos con los del Genbank, a excepción de dos secuencias consenso identificadas como *Russula* aff. *alutacea* y *Russula* sp. 39, a las cuales se les había asignado un nombre sin epíteto específico en el caso de la segunda. Sin embargo, en la base de datos de Bold Systems ambas tenían nombres a

nivel específico *Russula* aff. *cyanoxantha* y *Russula* aff. *brevipes* respectivamente, por lo que se decidió utilizar estos nombres ya que las muestras provenían de la misma cuenca hidrológica y las secuencias coincidían. A diferencia de esto, al comparar *Laccaria* aff. *ametystina* con la base de datos coincidió con *Laccaria* sp 2 por lo que se decidió dejarle la afinidad que se obtuvo al analizar los datos comparados con los del Genbank. Las coincidencias se muestran en el Cuadro 11 y marcadas con un asterisco encontramos los nombres que cambiaron usando esta base de datos.

Cuadro 11. Asignación taxonómica usando secuencias de esporomas de la Cuenca de Cuitzeo de la base de datos Bold Systems.

| Nombres y números de acceso | Nombre en Bold Systems | Nombre que se asignó usando Genbank | Nombres que cambiaron |
|---|--|--|--|
| ECMCU08410 <i>Boletus</i> sp. 1 ECMCU02910 <i>Boletus</i> sp. 1 <i>Boletus</i> sp. 1 Contig 26 Cuitzeo | <i>Boletus</i> sp. 1 | <i>Boletus</i> sp. 1 | |
| ECMCU06210 <i>Sebacina</i> sp. 1 ECMCU09310 <i>Sebacina</i> sp. 1 <i>Sebacina</i> sp. 11 Contig 5 Cuitzeo | <i>Sebacina</i> sp. 11 | <i>Sebacina</i> sp. 11 | |
| ECMCU01410 <i>Tricholoma</i> aff. <i>populinum</i> ECMCU01710 <i>Tricholoma</i> aff. <i>populinum</i> <i>Tricholoma populinum</i> 1386-ITS4 Cuitzeo | <i>Tricholoma populinum</i> | <i>Tricholoma populinum</i> | |
| ECMCU09510 <i>Entoloma</i> aff. <i>sinuatum</i> <i>Entoloma</i> aff. <i>sinuatum</i> 1638-ITS1F Cuitzeo | <i>Entoloma</i> aff. <i>sinuatum</i> | <i>Entoloma</i> aff. <i>sinuatum</i> | |
| ECMCU03210 <i>Scleroderma areolatum</i> <i>Scleroderma areolatum</i> Contig 65 Cuitzeo | <i>Scleroderma areolatum</i> | <i>Scleroderma areolatum</i> | |
| ECMCU05710 <i>Tomentella</i> sp. 2 <i>Tomentella</i> sp. 13 Contig 6 Cuitzeo | <i>Tomentella</i> sp. 2 | <i>Tomentella</i> sp. 13 | |
| ECMCU04810 <i>Laccaria</i> sp. 2 <i>Laccaria</i> aff. <i>ametystina</i> Contig 46 Cuitzeo | <i>Laccaria</i> sp. 2 | <i>Laccaria</i> aff. <i>ametystina</i> | |
| ECMCU02410 <i>Russula</i> aff. <i>cyanoxantha</i> <i>Russula</i> sp. 39 Contig 72 Cuitzeo | <i>Russula</i> aff. <i>cyanoxantha</i> | <i>Russula</i> sp. 39 | <i>Russula</i> aff. <i>cyanoxantha</i> * |
| ECMCU08010 <i>Russula</i> aff. <i>brevipes</i> <i>Russula</i> sp. 19 Contig 39 Cuitzeo | <i>Russula</i> aff. <i>brevipes</i> | <i>Russula</i> sp. 19 | <i>Russula</i> aff. <i>brevipes</i> * |

* Los nombres que cambiaron usando esta base de datos.

Riqueza taxonómica

En términos de riqueza el total de MOTUs de HEM obtenidos fue de 170, el phylum mejor representado fue el de Basidiomycota con 132 MOTUs, seguido de Ascomycota con 38. La diversidad de la comunidad se dividió en 14 órdenes, mientras que 3 especies permanecieron sin poder identificarse a este nivel (como se muestra en el Cuadro 12). En la comunidad el orden con mayor riqueza fue el de Thelephorales (37 MOTUs), seguido de Russulales (28 MOTUs), Pezizales y Sebacinales (27 MOTUs, respectivamente).

Cuadro 12. Número de MOTUs de HEM por orden.

| Orden | Número de MOTUs | Porcentaje (%) |
|--|------------------------|-----------------------|
| Thelephorales | 37 | 21.7 |
| Russulales | 28 | 16.4 |
| Pezizales | 27 | 15.8 |
| Sebacinales | 27 | 15.8 |
| Agaricales | 26 | 15.2 |
| Atheliales | 4 | 2.3 |
| Cantharellales | 4 | 2.3 |
| Helotiales | 4 | 2.3 |
| Boletales | 3 | 1.7 |
| Pleosporales | 3 | 1.7 |
| Corticiales | 1 | 0.5 |
| Eurotiales | 1 | 0.5 |
| Gomphales | 1 | 0.5 |
| Hysterangiales | 1 | 0.5 |
| Sin aproximación a nivel de orden | 3 | 1.7 |

En total estuvieron presentes 22 familias y 12 de los MOTUs no pudieron identificarse a este nivel taxonómico; las mejor representadas fueron Thelephoraceae (37 especies), Russulaceae (28 especies), Sebacinaceae (25 especies), Inocybaceae (14 especies) y Pezizaceae (13 especies) (Cuadro 13).

Cuadro 13. Número de MOTUs de HEM por familia.

| Familia | Número de MOTUs | Porcentaje (%) |
|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| Thelephoraceae | 37 | 21.8 |
| Russulaceae | 28 | 16.5 |

| | | |
|--|----|------|
| Sebacinaceae | 25 | 14.7 |
| Inocybaceae | 14 | 8.2 |
| Pezizaceae | 13 | 7.6 |
| Pyronemataceae | 7 | 4.1 |
| Cortinariaceae | 5 | 2.9 |
| Helvellaceae | 5 | 2.9 |
| Tricholomataceae | 4 | 2.4 |
| Atheliaceae | 3 | 1.8 |
| Clavulinaceae | 3 | 1.8 |
| Entolomataceae | 2 | 1.2 |
| Tuberaceae | 2 | 1.2 |
| Astraeaceae | 1 | 0.6 |
| Boletaceae | 1 | 0.6 |
| Corticaceae | 1 | 0.6 |
| Elaphomycetaceae | 1 | 0.6 |
| Gomphaceae | 1 | 0.6 |
| Hydnaceae | 1 | 0.6 |
| Hygrophoraceae | 1 | 0.6 |
| Hysterangiaceae | 1 | 0.6 |
| Sclerodermataceae | 1 | 0.6 |
| Sin aproximación a nivel de familia | 12 | 7.0 |

Los géneros más diversos dentro de la comunidad fueron *Russula* (26 especies), *Tomentella* (24 especies), *Sebacina* (23 especies), *Inocybe* (14 especies) y *Pachyphloeus* (9 especies) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Número de MOTUs de HEM por género.

| Género | Número de MOTUs | Porcentaje (%) |
|---------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>Russula</i> | 26 | 15.3 |
| <i>Tomentella</i> | 24 | 14.1 |
| <i>Sebacina</i> | 23 | 13.5 |
| <i>Inocybe</i> | 14 | 8.2 |
| <i>Pachyphloeus</i> | 9 | 5.3 |
| <i>Genea</i> | 7 | 4.1 |
| <i>Helvella</i> | 5 | 2.9 |
| <i>Cortinarius</i> | 3 | 1.8 |
| <i>Entoloma</i> | 2 | 1.2 |
| <i>Hebeloma</i> | 2 | 1.2 |
| <i>Laccaria</i> | 2 | 1.2 |
| <i>Lactarius</i> | 2 | 1.2 |
| <i>Thelephora</i> | 2 | 1.2 |

| | | |
|----------------------------------|----|------|
| <i>Tricholoma</i> | 2 | 1.2 |
| <i>Tuber</i> | 2 | 1.2 |
| <i>Astraeus</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Boletus</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Cenococcum</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Clavulina</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Elaphomyces</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Hydnum</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Hygrophorus</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Hysterangium</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Peziza</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Piloderma</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Pseudotomentella</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Ramaria</i> | 1 | 0.6 |
| <i>Scleroderma</i> | 1 | 0.6 |
| Sin aproximación a género | 32 | 18.8 |

Abundancia

Como ya se mencionó el total de los MOTUs ectomicorrízicos obtenidos fue de 170 con un total de 556 puntas micorrízicas. El Phylum Basidiomycota fue el más abundante con un total de 462 puntas micorrízicas, es decir el 83.1% del total, Ascomycota presentó 94 puntas micorrízicas que equivalen al 16.9% del total de ellas (Figura 4).

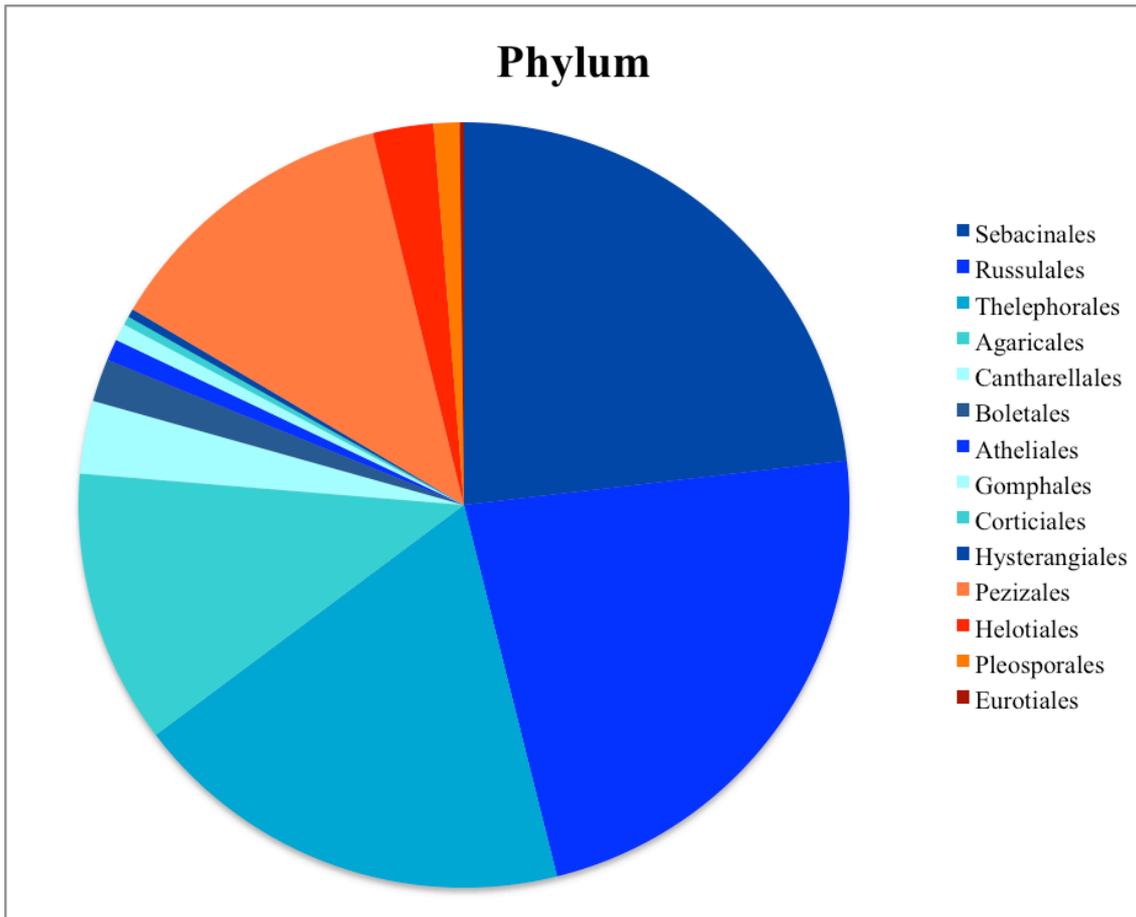


Figura 4. Número de micorrizas por Phylum. En tonos azules los órdenes pertenecientes al Phylum Basidiomycota (83.1%) y en tonos naranjas los órdenes pertenecientes al Phylum Ascomycota (16.9%).

Se encontraron 14 órdenes, los mejor representados en términos de abundancia fueron Sebacinales (23%), Russulales (22.8%), Thelephorales (18.5%) y Pezizales (12.5%), que en conjunto suman el 76.8%, en el caso de tres muestras no pudo identificarse el orden al que pertenecen las MOTUs (Cuadro 15; Figura 5).

Cuadro 15. Abundancia de MOTUs en los órdenes.

| Orden | Número de micorrizas | Porcentaje (%) |
|----------------|----------------------|----------------|
| Sebacinales | 128 | 23 |
| Russulales | 127 | 22.8 |
| Thelephorales | 103 | 18.5 |
| Pezizales | 70 | 12.5 |
| Agaricales | 64 | 11.5 |
| Cantharellales | 17 | 3 |

| | | |
|--|----|-----|
| Helotiales | 14 | 2.5 |
| Boletales | 10 | 1.7 |
| Pleosporales | 6 | 1 |
| Atheliales | 5 | 0.8 |
| Gomphales | 4 | 0.7 |
| Corticiales | 2 | 0.3 |
| Hysterangiales | 2 | 0.3 |
| Eurotiales | 1 | 0.1 |
| Sin aproximación a nivel de orden | 3 | 0.5 |

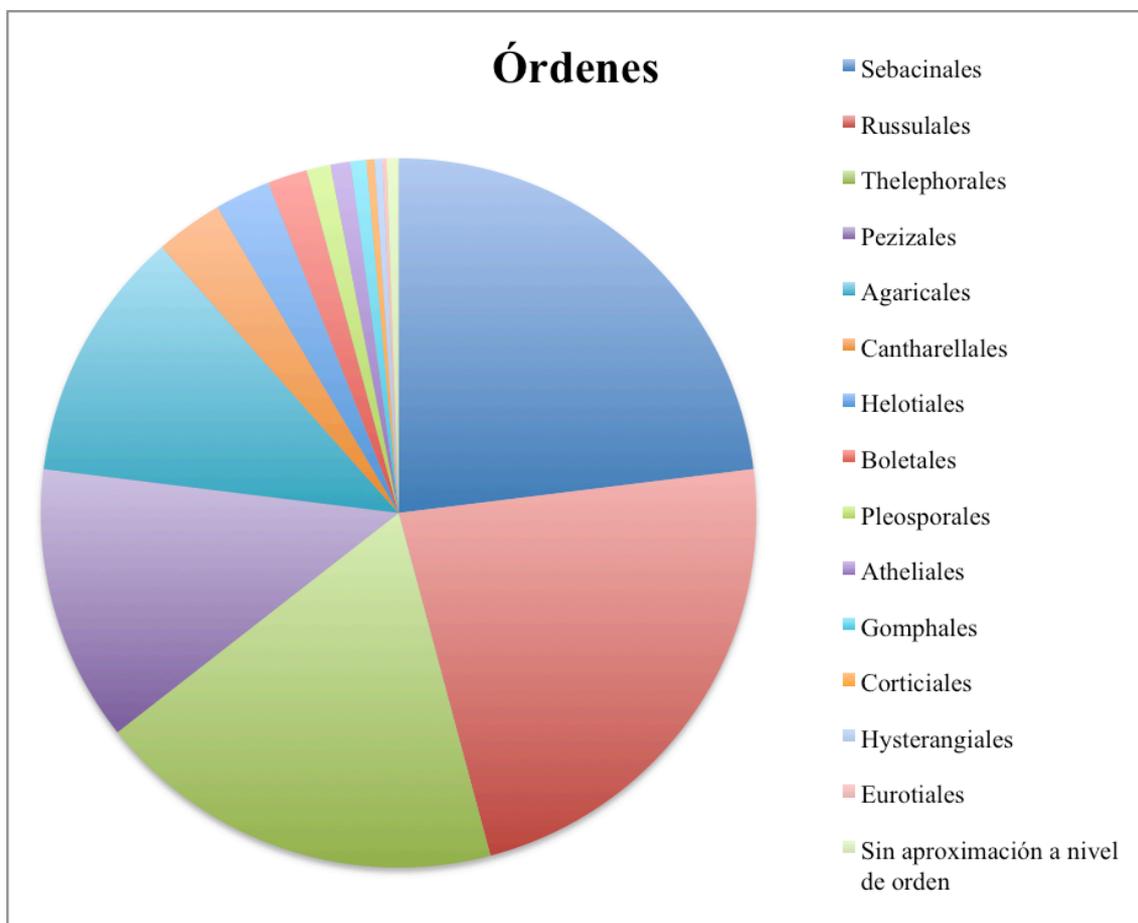


Figura 5. Número de micorrizas por órdenes.

Los datos de la comunidad de HEM se incluyeron en 22 familias y en 27 casos no fue posible hacer una asignación taxonómica a este nivel. Las de mayor abundancia fueron Russulaceae (22.8%), Sebacinaceae (22.4%), Thelephoraceae (18.5%), Inocybaceae (6.4%) Pyronemataceae (5.7%), que en conjunto suman el 76% (Cuadro 16; Figura 6).

Cuadro 16. Abundancia de MOTUs en las familias.

| Familia | Número de micorrizas | Porcentaje (%) |
|--|-----------------------------|-----------------------|
| Russulaceae | 127 | 22.8 |
| Sebacinaceae | 125 | 22.4 |
| Thelephoraceae | 103 | 18.5 |
| Inocybaceae | 36 | 6.4 |
| Pyronemataceae | 32 | 5.7 |
| Clavulinaceae | 27 | 4.8 |
| Pezizaceae | 25 | 4.4 |
| Tuberaceae | 8 | 1.4 |
| Boletaceae | 6 | 1.0 |
| Hygrophoraceae | 6 | 1.0 |
| Tricholomataceae | 6 | 1.0 |
| Astraeaceae | 5 | 0.8 |
| Helvellaceae | 5 | 0.8 |
| Gomphaceae | 4 | 0.7 |
| Entolomataceae | 3 | 0.5 |
| Corticiaceae | 2 | 0.3 |
| Cortinariaceae | 2 | 0.3 |
| Hysterangiaceae | 2 | 0.3 |
| Sclerodermataceae | 2 | 0.3 |
| Atheliaceae | 1 | 0.1 |
| Elaphomycetaceae | 1 | 0.1 |
| Hydnaceae | 1 | 0.1 |
| Sin aproximación a nivel de familia | 27 | 4.8 |

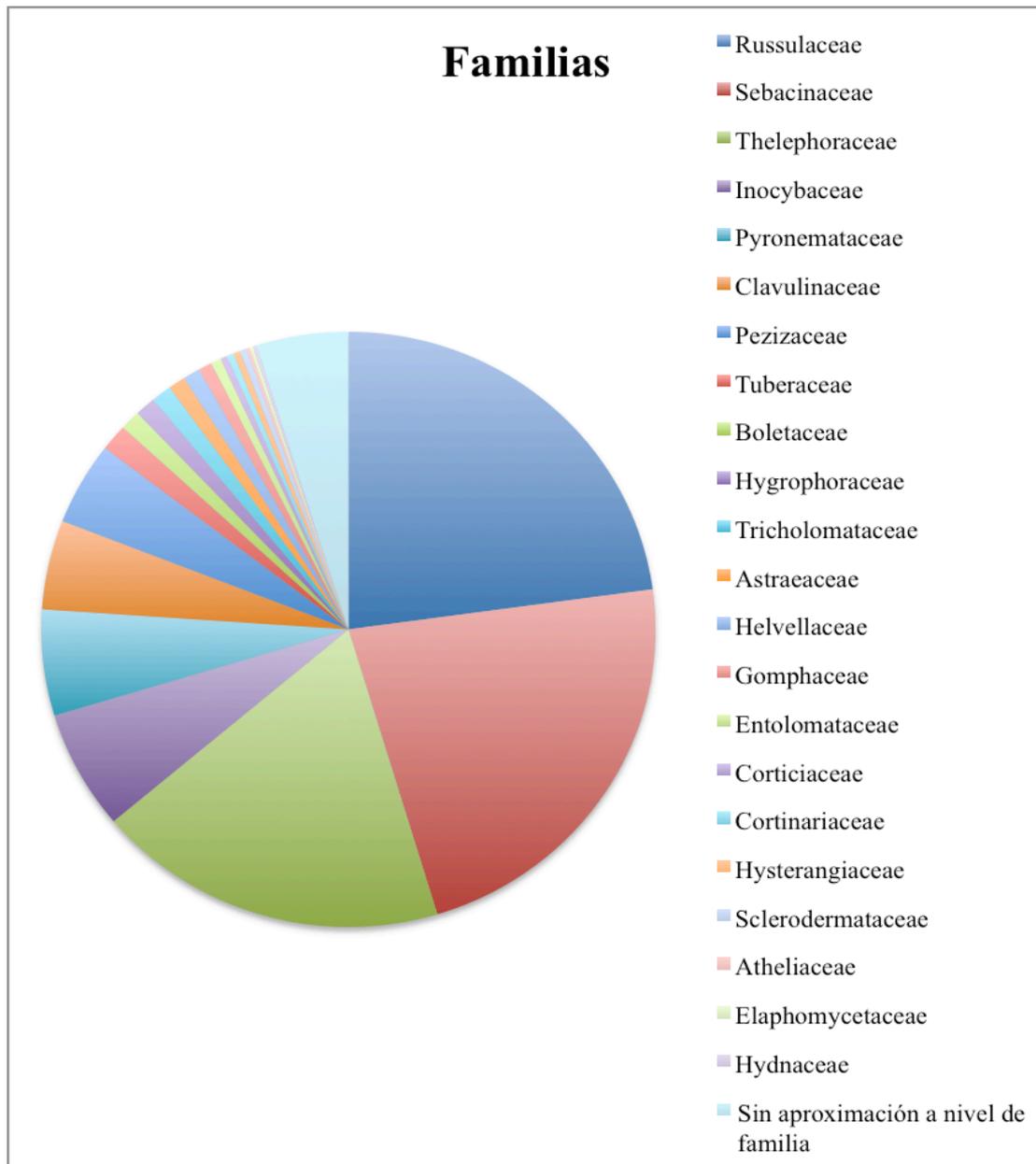


Figura 6. Número de micorrizas por familia.

Ciento treinta y ocho de los MOTUs pudieron identificarse en 27 géneros y 32 no. Los más abundantes fueron *Sebacina* (21.7%), *Russula* (20.8%), *Tomentella* (13.8%) *Inocybe* (6.4%), *Genea* (5.7%), *Pachyphloeus* (3.4%), *Clavulina* (2.3%) y *Cortinarius* (1.9%); estos ocho géneros acumularon el 76.4% de las micorrizas de la comunidad (Cuadro 17 y Figura 7).

Cuadro 17. Abundancia de MOTUs en los géneros.

| Género | Número de micorrizas | Porcentaje (%) |
|----------------------------------|----------------------|----------------|
| <i>Sebacina</i> | 121 | 21.7 |
| <i>Russula</i> | 116 | 20.8 |
| <i>Tomentella</i> | 77 | 13.8 |
| <i>Inocybe</i> | 36 | 6.4 |
| <i>Genea</i> | 32 | 5.7 |
| <i>Pachyphloeus</i> | 19 | 3.4 |
| <i>Clavulina</i> | 13 | 2.3 |
| <i>Cortinarius</i> | 11 | 1.9 |
| <i>Lactarius</i> | 11 | 1.9 |
| <i>Tuber</i> | 8 | 1.4 |
| <i>Boletus</i> | 6 | 1.0 |
| <i>Hygrophorus</i> | 6 | 1.0 |
| <i>Helvella</i> | 5 | 0.8 |
| <i>Laccaria</i> | 4 | 0.7 |
| <i>Ramaria</i> | 4 | 0.7 |
| <i>Thelephora</i> | 4 | 0.7 |
| <i>Entoloma</i> | 3 | 0.5 |
| <i>Peziza</i> | 3 | 0.5 |
| <i>Astraeus</i> | 2 | 0.3 |
| <i>Hebeloma</i> | 2 | 0.3 |
| <i>Hysterangium</i> | 2 | 0.3 |
| <i>Scleroderma</i> | 2 | 0.3 |
| <i>Tricholoma</i> | 2 | 0.3 |
| <i>Cenococcum</i> | 1 | 0.1 |
| <i>Elaphomyces</i> | 1 | 0.1 |
| <i>Hydnum</i> | 1 | 0.1 |
| <i>Piloderma</i> | 1 | 0.1 |
| <i>Pseudotomentella</i> | 1 | 0.1 |
| Sin aproximación a género | 62 | 11.1 |

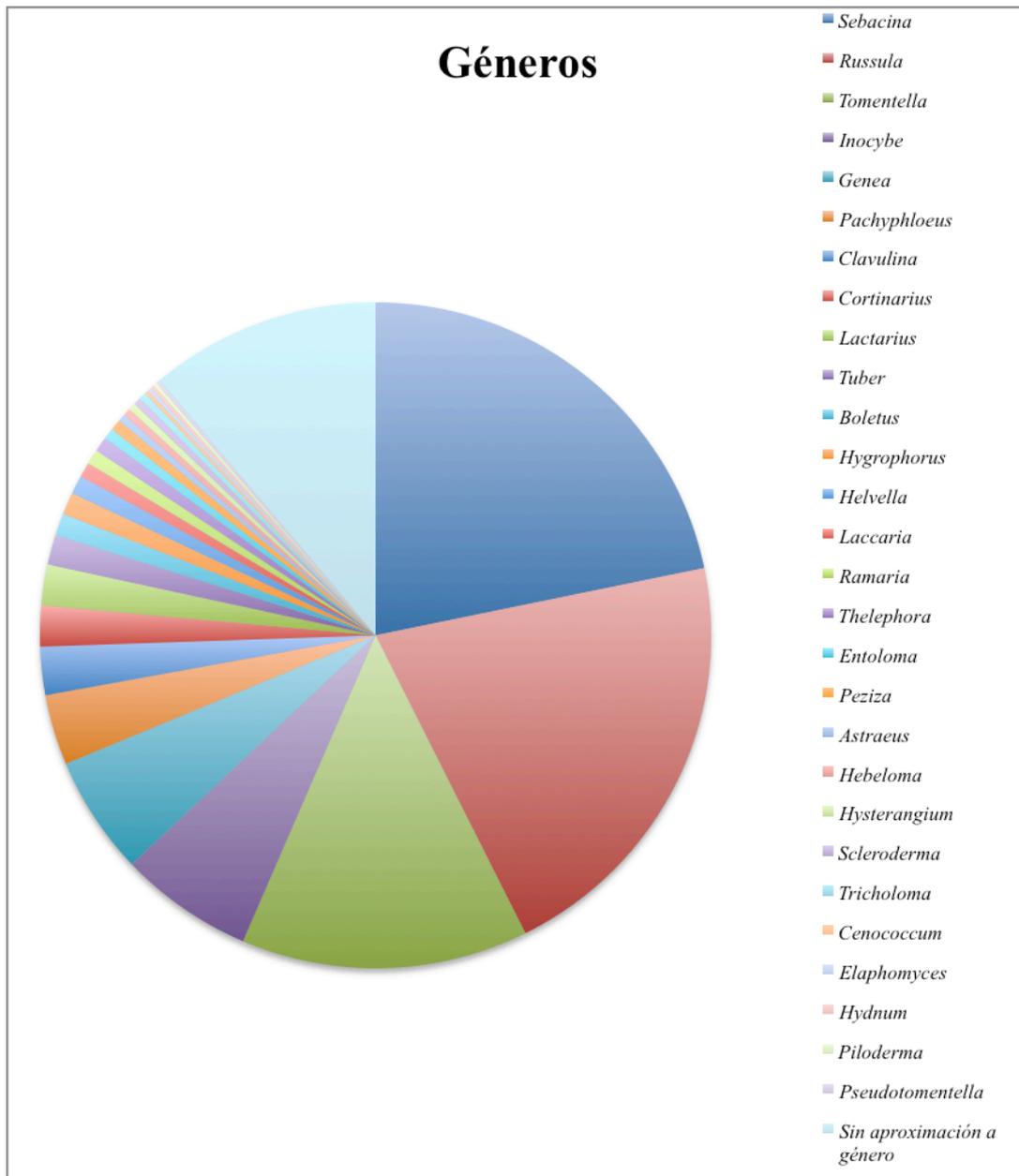


Figura 7. Número de micorriza por géneros.

Índices de diversidad

Los valores de diversidad del índice de Shannon se muestran en el Cuadro 18, así como el índice de dominancia de Simpson. El sitio más diverso fue el Águila 1.

Cuadro 18. Índices de diversidad y dominancia de especies.

| Índice | Águila 1 | Águila 2 | Icuacato 1 | Icuacato 2 |
|------------------------------|----------|----------|------------|------------|
| Shannon H' Log Base 10. | 1.791 | 1.259 | 1.444 | 1.617 |
| Shannon Hmax Log Base 10. | 1.919 | 1.556 | 1.519 | 1.82 |
| Shannon J' | 0.933 | 0.809 | 0.951 | 0.889 |
| Dominancia de Simpsons (D) | 0.016 | 0.093 | 0.026 | 0.032 |
| Diversidad de Simpsons (1/D) | 60.917 | 10.74 | 39 | 31.49 |

Los valores obtenidos utilizando el estimador de abundancia Chao 1 son los que se muestran en el Cuadro 19 y con el estimador Jackknife 1 en el Cuadro 20. El índice Chao 1 estimó una riqueza de 319 especies para el sitio Icuacato 2 y el estimador Jackknife 1 este mismo sitio obtuvo una estimación de 272 especies. En ambos casos coincide al ser el más alto.

Cuadro 19. Estimador de abundancia Chao 1.

| Sitio de muestreo | Chao 1 |
|-------------------|--------|
| Águila 1 | 115.6 |
| Águila 2 | 189.8 |
| Icuacato 1 | 269.7 |
| Icuacato 2 | 319.51 |
| De la comunidad | 297.57 |

Cuadro 20. Estimador de abundancia Jackknife 1.

| Sitio de muestreo | Jackknife 1 |
|-------------------|-------------|
| Águila 1 | 44.8 |
| Águila 2 | 139.5 |
| Icuacato 1 | 210.27 |
| Icuacato 2 | 272 |
| De la comunidad | 170 |

Análisis de rarefacción

El análisis de rarefacción muestra que en ninguno de los 4 sitios la curva se ha asintotizado, es decir que aún no se ha muestreado el total de la diversidad de cada uno de ellos, indica que el sitio mejor muestreado fue Águila 1 que se representa en la figura con la línea azul fuere, seguido de Icuacato 2 en rojo, por otra parte los sitios Águila 2 en verde, e Icuacato 1 en azul claro están débilmente muestreados (Figura 8).

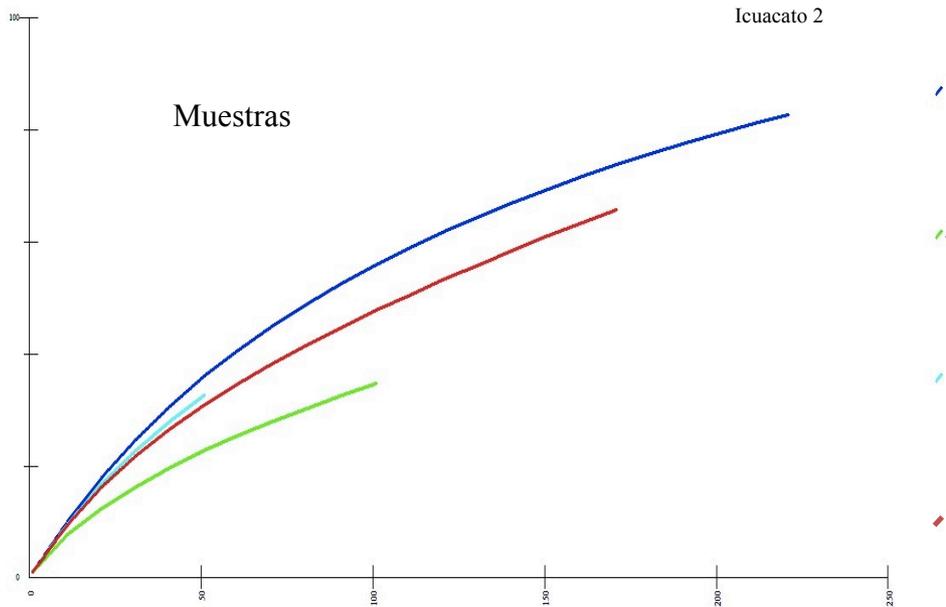


Figura 8. Curvas de rarefacción de especies de los sitios Águila 1 (línea azul), Águila 2 (línea verde), Icuacato 1 (línea azul claro) e Icuacato 2 (línea roja), de la Cuenca de Cuitzeo.

7.2 Estructura de la comunidad de HEM asociados a encinos de la Cuenca de Cuitzeo

En la zona del Águila la especie más abundante fue *Sebacina* sp. 1 la cual presentó 34 micorrizas (62 secuencias) y estuvo tanto en Águila 1 como en Águila 2, 19 puntas micorrizicas (38 secuencias) del sitio Águila 2 resultaron corresponder a *Russula* aff. *curtipes* la segunda especie con mayor abundancia, *Tomentella* sp. 3 presente sólo en el sitio Águila 1 tuvo 11 micorrizas (22 secuencias) y *Pachyphloeus* sp. 1 fue la cuarta especie más abundante con 9 micorrizas (14 secuencias) y estuvo bien representada en los dos sitios de la zona Águila.

Las especies más abundantes del cerro de Icuacato fueron *Sebacina epigaea complex*. sp 1 que tuvo 22 puntas micorrízicas (25 secuencias) se presentó tanto en el sitio Icuacato 1 como en Icuacato 2, seguida de *Russula* sp. 18 que de igual forma se presentó en Icuacato 1 y 2, en total sumó 11 puntas micorrízicas (17 secuencias), *Clavulina* sp. 1 y *Sebacina* sp. 11 fueron las siguientes más abundantes con 10 puntas micorrízicas cada especie y sólo se presentaron en el sitio Icuacato 2, con 15 y 14 secuencias, respectivamente.

La especie más abundante de la comunidad estudiada fue *Sebacina* sp. 1 con 35 micorrizas, que estuvo presente en los sitios Águila 1, Águila 2 e Icuacato 1, el segundo MOTU fue *Sebacina epigaea complex* sp. 1 con 23 micorrizas, que se localizaron en los sitios con excepción de Águila 1, la tercera especie de la comunidad que siguió en abundancia de fue *Russula* aff. *curtipes* con 19 micorrizas todas secuenciadas en ambos sentidos, esta se presentó sólo en el sitio Águila 2.

A continuación en las Figuras 9, 10, 11 y 12 se muestra la comunidad por cada sitio. Las figuras siguientes representan la abundancia de especies en la zonas Águila e Icuacato (Figura 13 y 14), así como la de abundancia de la comunidad (Figura 15).

La base de datos completa de micorrizas y secuencias obtenidos por sitio y por especie se presenta en el Cuadro 21 en donde se ordenan de manera descendente respecto de la abundancia.

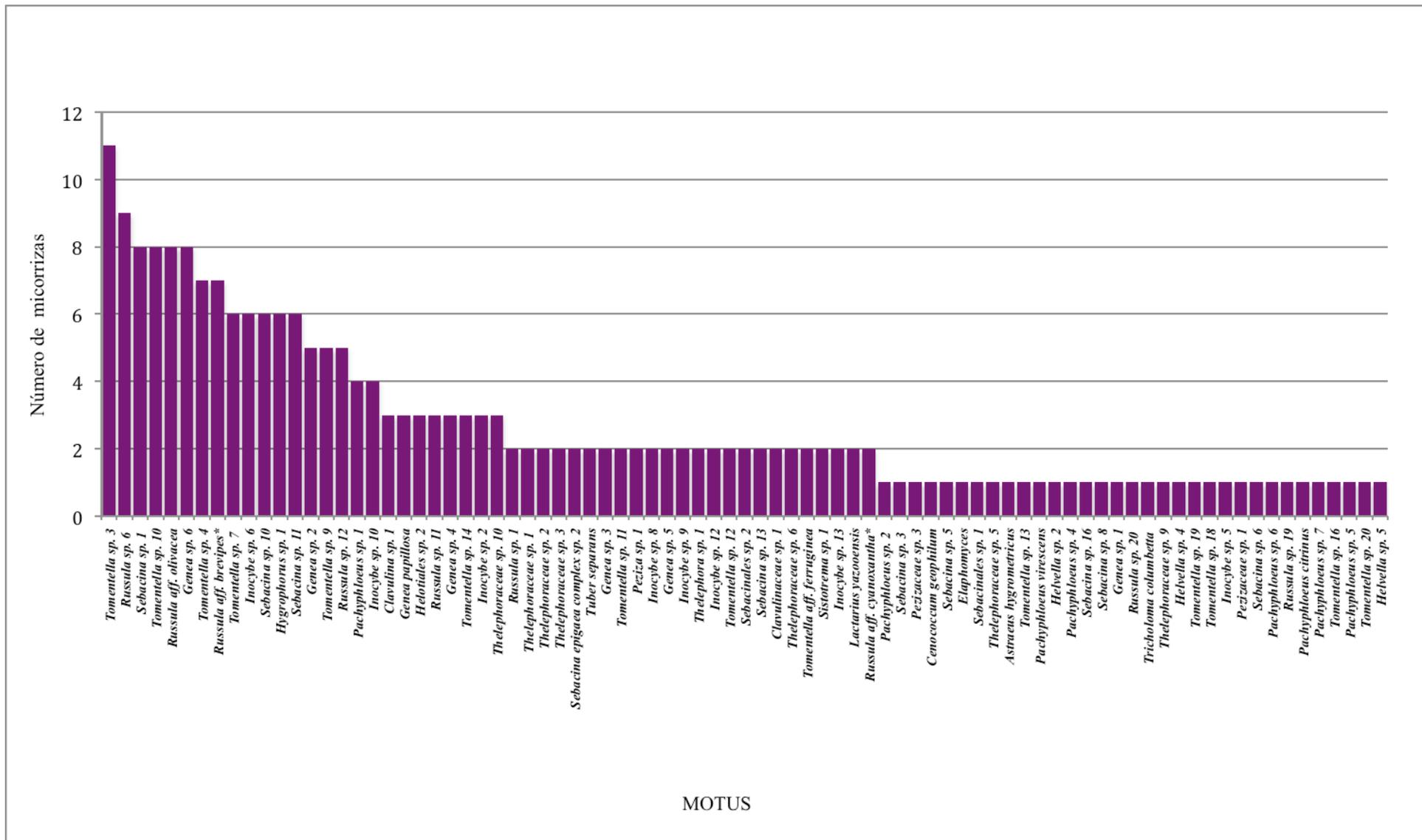


Figura 9. Abundancia de las especies en el Águila 1.

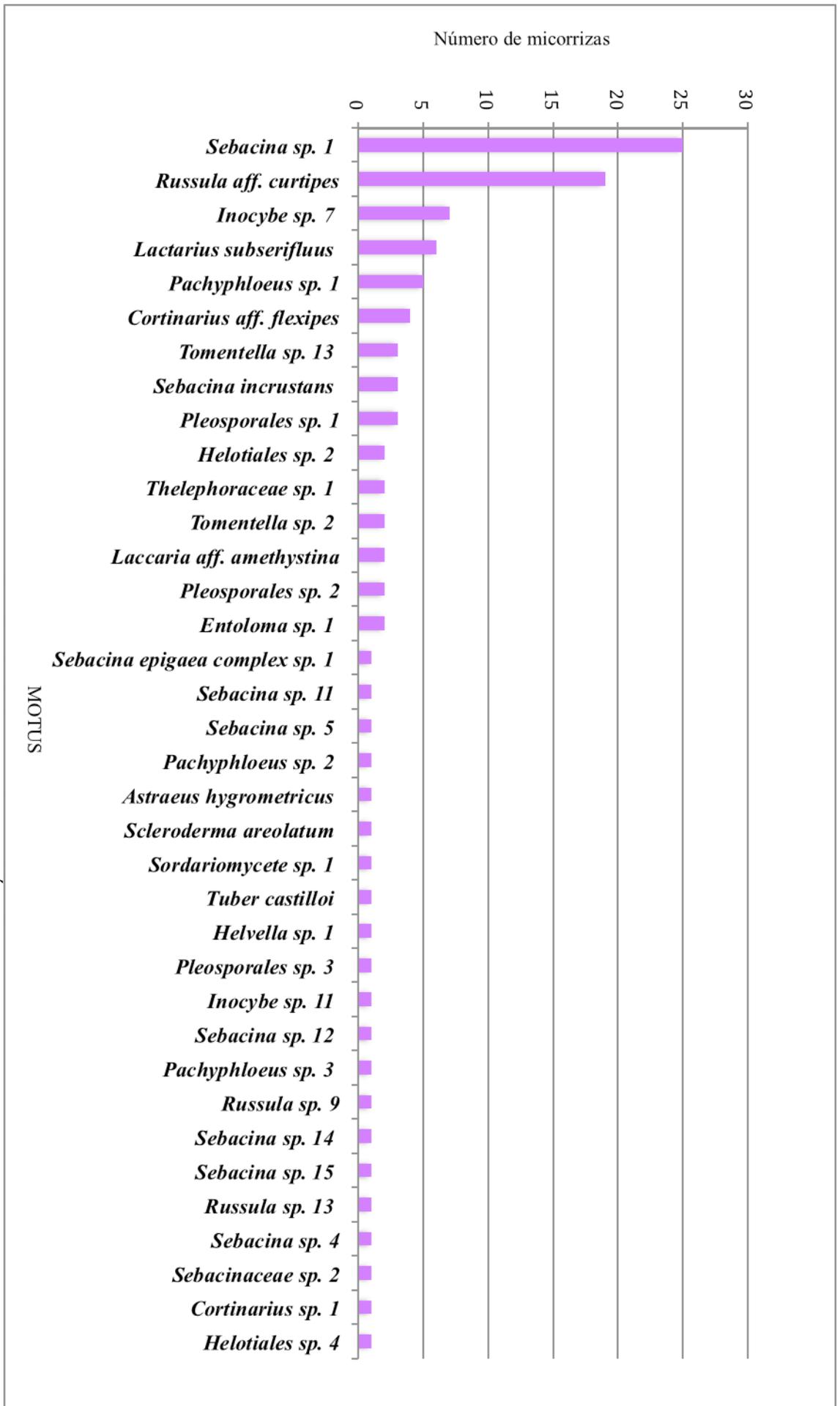


Figura 10. Abundancia de las especies en el Águila 2.

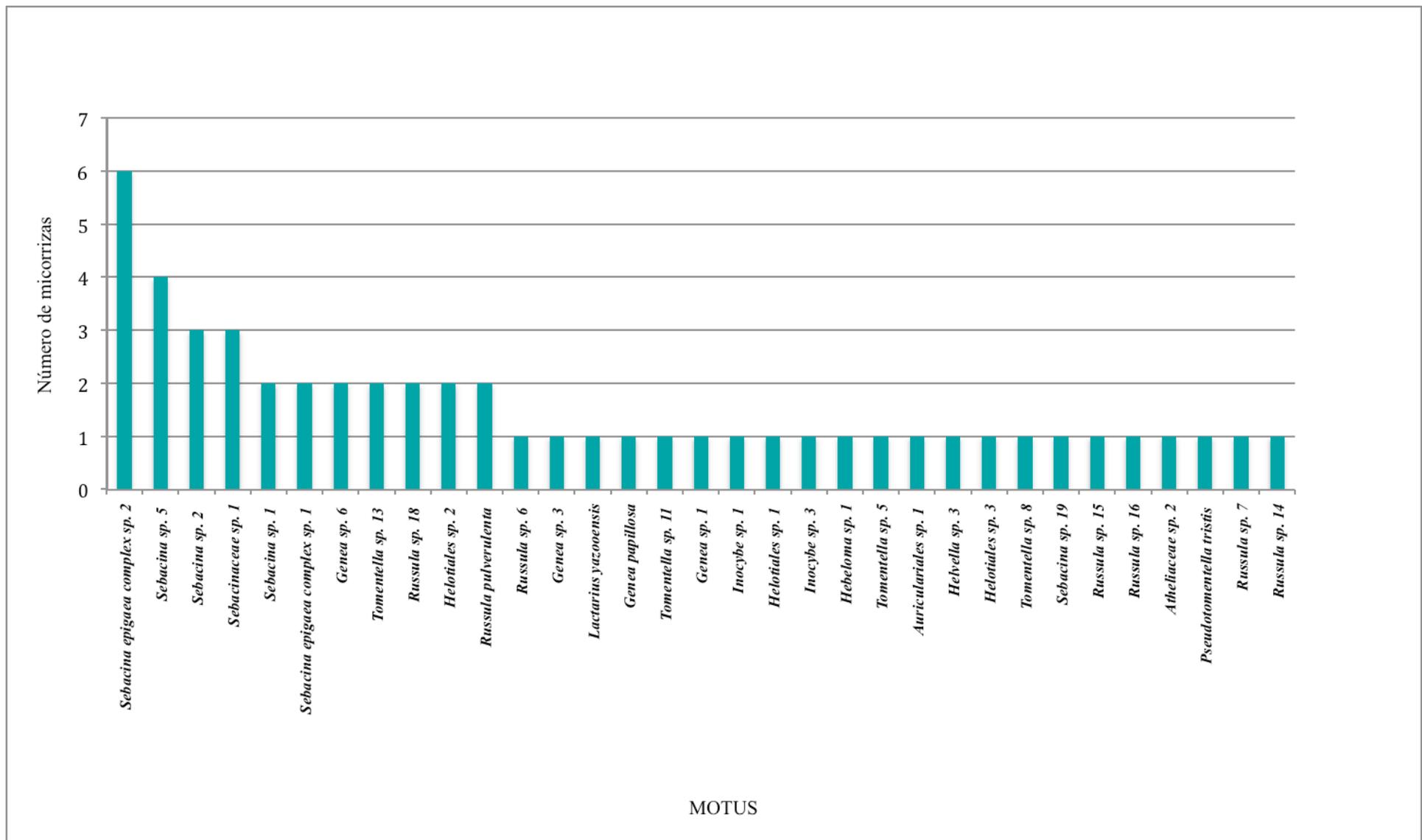


Figura 11. Abundancia de las especies en Icuacato 1.

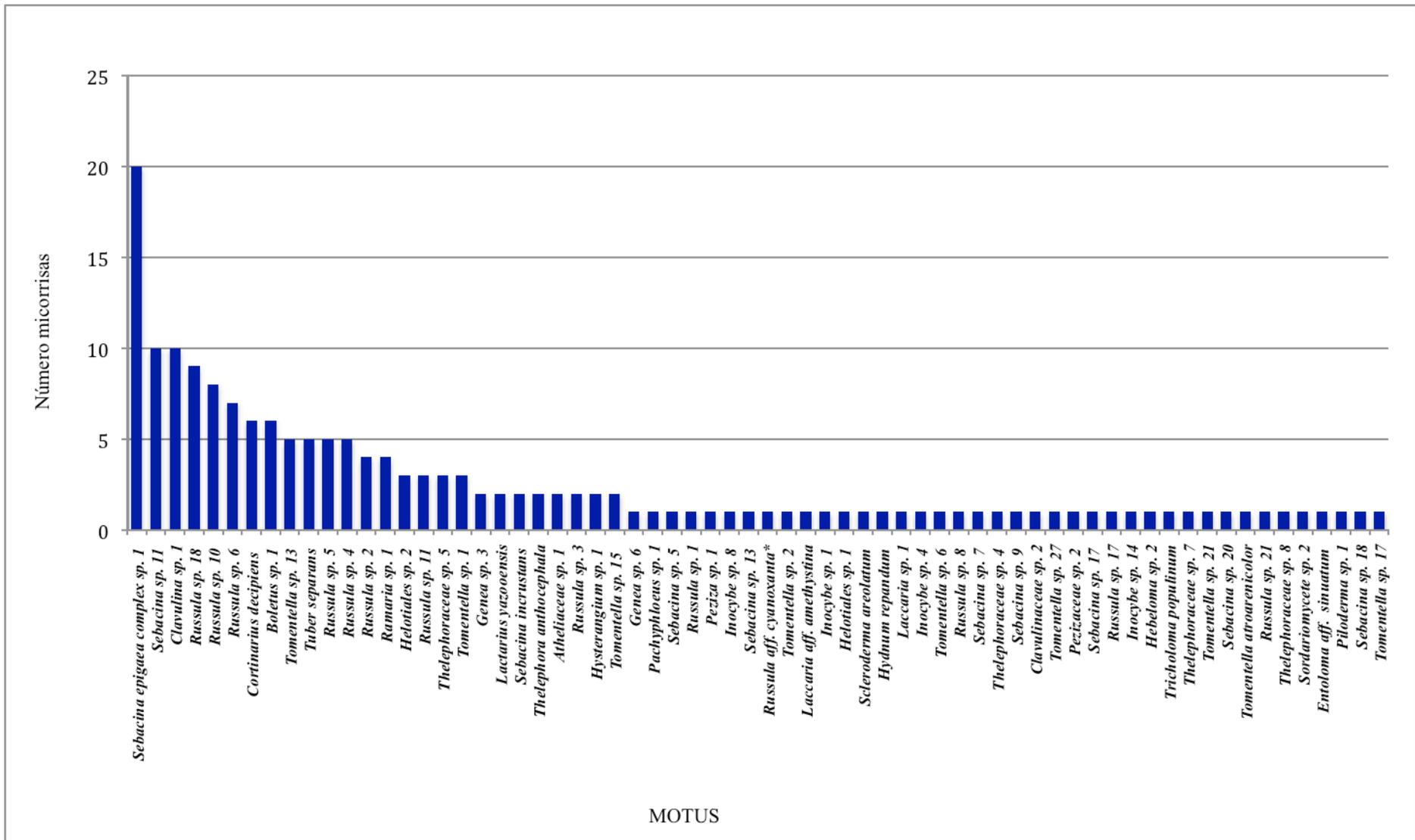


Figura 12. Abundancia de las especies en Icuacato 2.

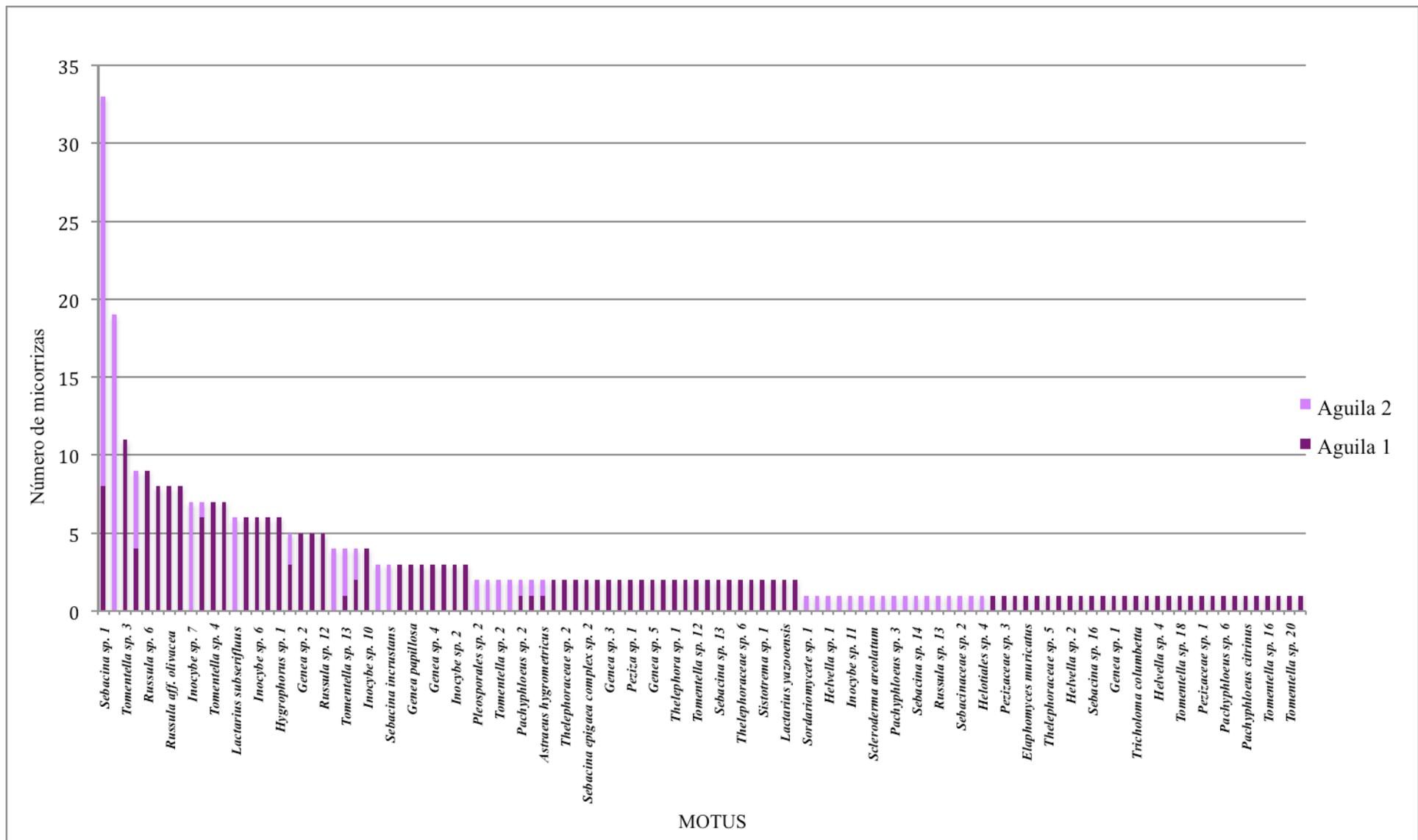


Figura 13. Abundancia de las especies en el Águila.

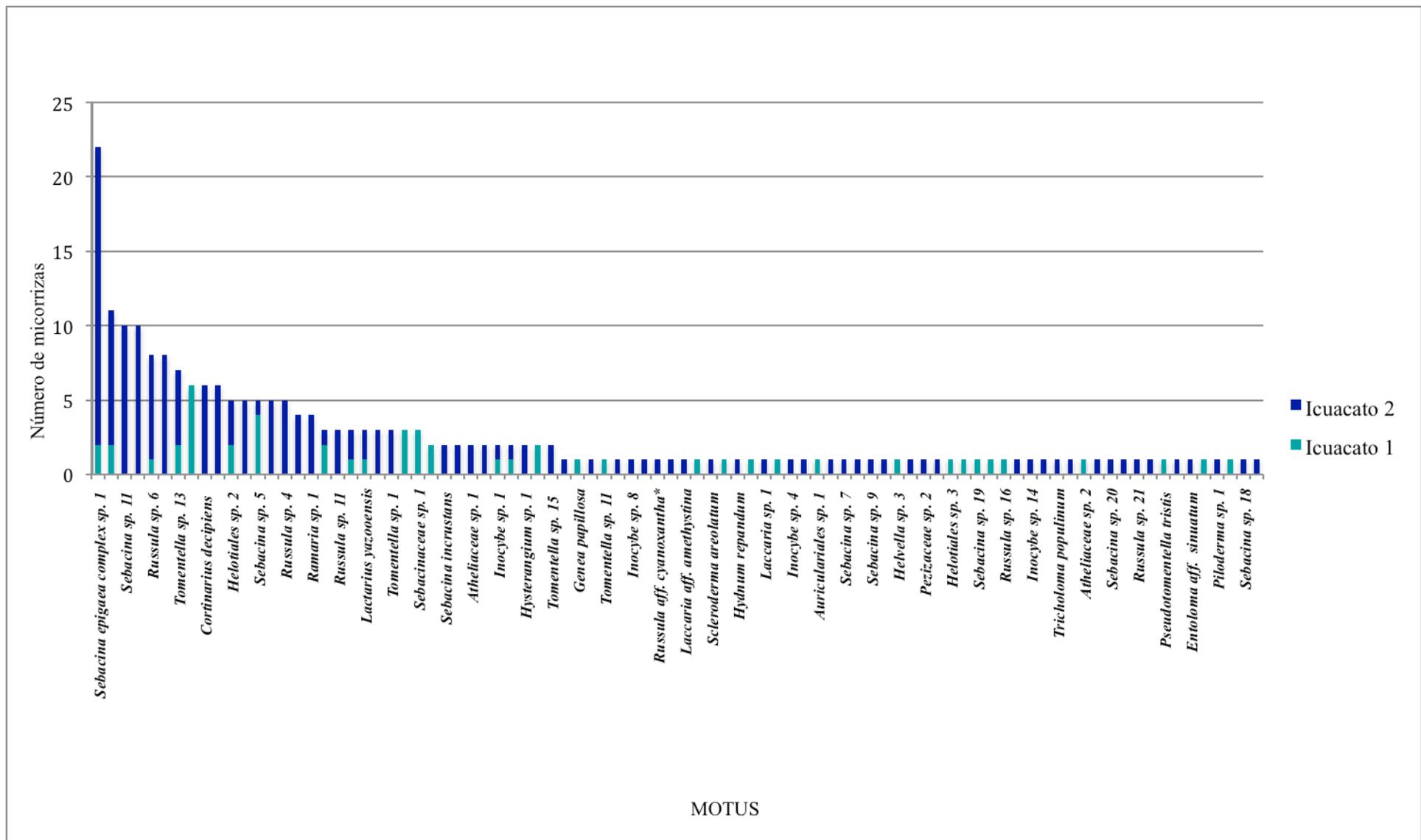


Figura 14. Abundancia de las especies en Icuacato.

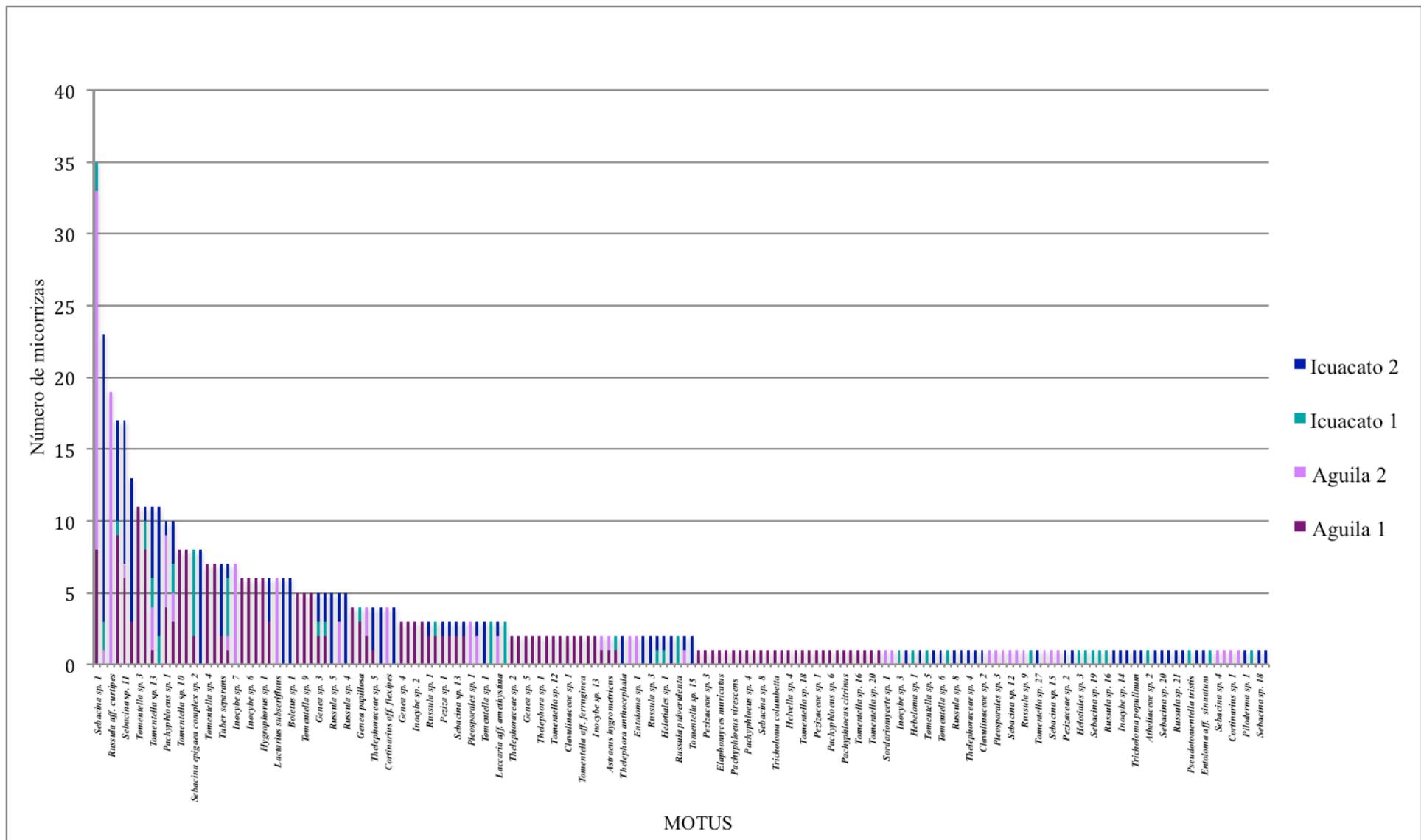


Figura 15. Abundancia de las especies en la comunidad (Sitios Aguila 1, Aguila 2, Icuacato 1 e Icuacato 2).

Cuadro 21. Base de datos de la estructura de la comunidad de HEM de la Cuenca de Cuitzé. Número de micorrizas por MOTU para cada sitio.

| | Nombre del MOTU | Águila 1 | Águila 2 | Icuacato 1 | Icuacato 2 | Micorrizas |
|----|---------------------------------------|----------|----------|------------|------------|------------|
| 1 | <i>Sebacina</i> sp. 1 | 8 | 25 | 2 | 0 | 35 |
| 2 | <i>Sebacina epigaea complex</i> sp. 1 | 0 | 1 | 2 | 20 | 23 |
| 3 | <i>Russula</i> aff. <i>curtipes</i> | 0 | 19 | 0 | 0 | 19 |
| 4 | <i>Russula</i> sp. 6 | 9 | 0 | 1 | 7 | 17 |
| 5 | <i>Sebacina</i> sp. 11 | 6 | 1 | 0 | 10 | 17 |
| 6 | <i>Clavulina</i> sp. 1 | 3 | 0 | 0 | 10 | 13 |
| 7 | <i>Tomentella</i> sp. 3 | 11 | 0 | 0 | 0 | 11 |
| 8 | <i>Genea</i> sp. 6 | 8 | 0 | 2 | 1 | 11 |
| 9 | <i>Tomentella</i> sp. 13 | 1 | 3 | 2 | 5 | 11 |
| 10 | <i>Russula</i> sp. 18 | 0 | 0 | 2 | 9 | 11 |
| 11 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 1 | 4 | 5 | 0 | 1 | 10 |
| 12 | Helotiales sp. 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 10 |
| 13 | <i>Tomentella</i> sp. 10 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 14 | <i>Russula</i> aff. <i>olivacea</i> | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 15 | <i>Sebacina epigaea complex</i> sp. 2 | 2 | 0 | 6 | 0 | 8 |
| 16 | <i>Russula</i> sp. 10 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 |
| 17 | <i>Tomentella</i> sp. 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 18 | <i>Russula</i> aff. <i>brevipes</i> * | 7 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 19 | <i>Tuber separans</i> | 2 | 0 | 0 | 5 | 7 |
| 20 | <i>Sebacina</i> sp. 5 | 1 | 1 | 4 | 1 | 7 |
| 21 | <i>Inocybe</i> sp. 7 | 0 | 7 | 0 | 0 | 7 |
| 22 | <i>Tomentella</i> sp. 7 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 23 | <i>Inocybe</i> sp. 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 24 | <i>Sebacina</i> sp. 10 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 25 | <i>Hygrophorus</i> sp. 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 26 | <i>Russula</i> sp. 11 | 3 | 0 | 0 | 3 | 6 |
| 27 | <i>Lactarius subserifluus</i> | 0 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| 28 | <i>Cortinarius decipiens</i> | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| 29 | <i>Boletus</i> sp. 1 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| 30 | <i>Genea</i> sp. 2 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 31 | <i>Tomentella</i> sp. 9 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 32 | <i>Russula</i> sp. 12 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 33 | <i>Genea</i> sp. 3 | 2 | 0 | 1 | 2 | 5 |
| 34 | <i>Lactarius yazoensis</i> | 2 | 0 | 1 | 2 | 5 |
| 35 | <i>Russula</i> sp. 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| 36 | <i>Sebacina incrustans</i> | 0 | 3 | 0 | 2 | 5 |
| 37 | <i>Russula</i> sp. 4 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| 38 | <i>Inocybe</i> sp. 10 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 39 | <i>Genea papillosa</i> | 3 | 0 | 1 | 0 | 4 |
| 40 | Thelephoraceae sp. 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 4 |
| 41 | Thelephoraceae sp. 5 | 1 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| 42 | <i>Russula</i> sp. 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |

| | | | | | | |
|----|--|---|---|---|---|---|
| 43 | <i>Cortinarius aff. flexipes</i> | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 44 | <i>Ramaria</i> sp. 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| 45 | <i>Genea</i> sp. 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 46 | <i>Tomentella</i> sp. 14 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 47 | <i>Inocybe</i> sp. 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 48 | Thelephoraceae sp. 10 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 49 | <i>Russula</i> sp. 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 50 | <i>Tomentella</i> sp. 11 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 51 | <i>Peziza</i> sp. 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 52 | <i>Inocybe</i> sp. 8 | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 53 | <i>Sebacina</i> sp. 13 | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 54 | <i>Russula</i> aff. <i>cyanoxanta</i> * | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 55 | Pleosporales sp. 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| 56 | <i>Tomentella</i> sp. 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| 57 | <i>Tomentella</i> sp. 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| 58 | <i>Sebacina</i> sp. 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| 59 | <i>Laccaria</i> aff. <i>amethystina</i> | 0 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| 60 | Sebacinaceae sp. 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| 61 | Thelephoraceae sp. 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 62 | Thelephoraceae sp. 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 63 | <i>Genea</i> sp. 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 64 | <i>Inocybe</i> sp. 9 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 65 | <i>Thelephora</i> sp. 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 66 | <i>Inocybe</i> sp. 12 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 67 | <i>Tomentella</i> sp. 12 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 68 | Sebacinales sp. 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 69 | Clavulinaceae sp. 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 70 | Thelephoraceae sp. 6 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 71 | <i>Tomentella</i> aff. <i>ferruginea</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 72 | <i>Sistotrema</i> sp. 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 73 | <i>Inocybe</i> sp. 13 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 74 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 75 | <i>Astraeus hygrometricus</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 76 | <i>Genea</i> sp. 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 77 | <i>Thelephora anthocephala</i> | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 78 | Pleosporales sp. 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 79 | <i>Entoloma</i> sp. 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 80 | Atheliaceae sp. 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 81 | <i>Russula</i> sp. 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 82 | <i>Inocybe</i> sp. 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| 83 | Helotiales sp. 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| 84 | <i>Hysterangium</i> sp. 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 85 | <i>Russula pulverulenta</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 86 | <i>Scleroderma areolatum</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| 87 | <i>Tomentella</i> sp. 15 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |

| | | | | | | |
|-----|-------------------------------|---|---|---|---|---|
| 88 | <i>Sebacina</i> sp. 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 89 | Pezizaceae sp. 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 90 | <i>Cenococcum geophilum</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 91 | <i>Elaphomyces muricatus</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 92 | Sebacinales sp. 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 93 | <i>Pachyphloeus virescens</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 94 | <i>Helvella</i> sp. 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 95 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 96 | <i>Sebacina</i> sp. 16 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 97 | <i>Sebacina</i> sp. 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 98 | <i>Russula</i> sp. 20 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 99 | <i>Tricholoma columbetta</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 100 | Thelephoraceae sp. 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 101 | <i>Helvella</i> sp. 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 102 | <i>Tomentella</i> sp. 19 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 103 | <i>Tomentella</i> sp. 18 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 104 | <i>Inocybe</i> sp. 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 105 | Pezizaceae sp. 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 106 | <i>Sebacina</i> sp. 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 107 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 108 | <i>Russula</i> sp. 19 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 109 | <i>Pachyphloeus citrinus</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 110 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 111 | <i>Tomentella</i> sp. 16 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 112 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 113 | <i>Tomentella</i> sp. 20 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 114 | <i>Helvella</i> sp. 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 115 | Sordariomycete sp. 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 116 | <i>Tuber castilloi</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 117 | <i>Inocybe</i> sp. 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 118 | <i>Hydnum repandum</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 119 | <i>Hebeloma</i> sp. 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 120 | <i>Laccaria</i> sp. 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 121 | <i>Tomentella</i> sp. 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 122 | <i>Inocybe</i> sp. 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 123 | <i>Tomentella</i> sp. 6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 124 | Auriculariales sp. 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 125 | <i>Russula</i> sp. 8 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 126 | <i>Sebacina</i> sp. 7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 127 | Thelephoraceae sp. 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 128 | <i>Sebacina</i> sp. 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 129 | Clavulinaceae sp. 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 130 | <i>Helvella</i> sp. 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 131 | Pleosporales sp. 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 132 | <i>Inocybe</i> sp. 11 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |

| | | | | | | |
|-----|--------------------------------------|------------|------------|-----------|------------|------------|
| 133 | <i>Sebacina</i> sp. 12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 134 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 135 | <i>Russula</i> sp. 9 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 136 | <i>Helvella</i> sp. 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 137 | <i>Tomentella</i> sp. 27 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 138 | <i>Sebacina</i> sp. 14 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 139 | <i>Sebacina</i> sp. 15 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 140 | <i>Russula</i> sp. 13 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 141 | Pezizaceae sp. 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 142 | <i>Sebacina</i> sp. 17 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 143 | Helotiales sp. 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 144 | <i>Tomentella</i> sp. 8 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 145 | <i>Sebacina</i> sp. 19 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 146 | <i>Russula</i> sp. 15 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 147 | <i>Russula</i> sp. 16 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 148 | <i>Russula</i> sp. 17 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 149 | <i>Inocybe</i> sp. 14 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 150 | <i>Hebeloma</i> sp. 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 151 | <i>Tricholoma populinum</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 152 | Thelephoraceae sp. 7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 153 | Atheliaceae sp. 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 154 | <i>Tomentella</i> sp. 21 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 155 | <i>Sebacina</i> sp. 20 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 156 | <i>Tomentella atroarenicolor</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 157 | <i>Russula</i> sp. 21 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 158 | Thelephoraceae sp. 8 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 159 | <i>Pseudotomentella tristis</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 160 | Sordariomycete sp. 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 161 | <i>Entoloma</i> aff. <i>sinuatum</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 162 | <i>Russula</i> sp. 7 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 163 | <i>Sebacina</i> sp. 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 164 | Sebacinaceae sp. 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 165 | <i>Cortinarius</i> sp. 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 166 | Helotiales sp. 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 167 | <i>Piloderma</i> sp. 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 168 | <i>Russula</i> sp. 14 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 169 | <i>Sebacina</i> sp. 18 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 170 | <i>Tomentella</i> sp. 17 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | TOTAL | 224 | 108 | 52 | 172 | 556 |

Totales: 83
Únicas: 57

Especies compartidas entre sitios

Totales : 36
Únicas: 22

Cuando los datos se analizaron por sitio los resultados fueron los siguientes: Águila 1 presentó 83 especies, 57 de ellas son únicas de este sitio, nueve se comparten con Águila 2, 12 con Icuacato 1 y 18 con Icuacato 2. El sitio Águila 2 en cambio presentó un total de 36 MOTUs, 22 resultaron únicos, nueve se compartieron con Águila 1, cinco con Icuacato 1 y 10 con Icuacato 2. Por su parte, Icuacato 1 presentó 33 especies de las cuales 17 resultaron únicas para el sitio, 12 se compartieron con Águila 1, cinco con Águila 2 y 11 con Icuacato 2. Por último, el sitio Icuacato 2 presentó 66 MOTUs de los cuales 40 fueron únicos, 18 compartidos con Águila 1, cinco con Águila 2 y 11 con Icuacato 1. Estos resultados en conjunto pueden apreciarse gráficamente en la Figura 16 y en el Cuadro 22.

Totales: 33
Únicas: 17

Totales: 66
Únicas: 40

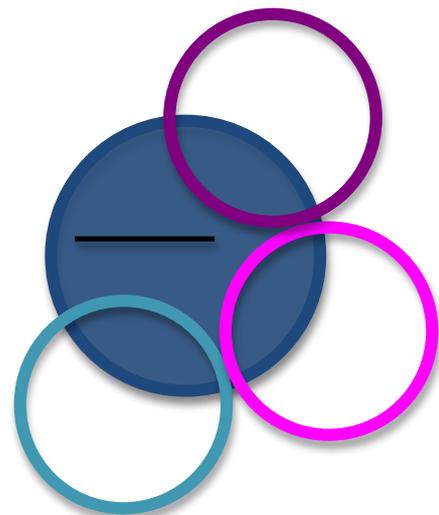
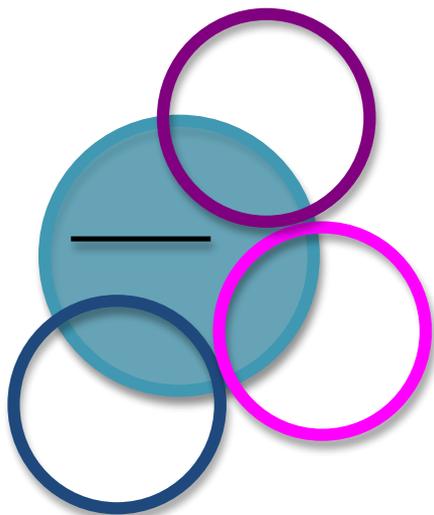
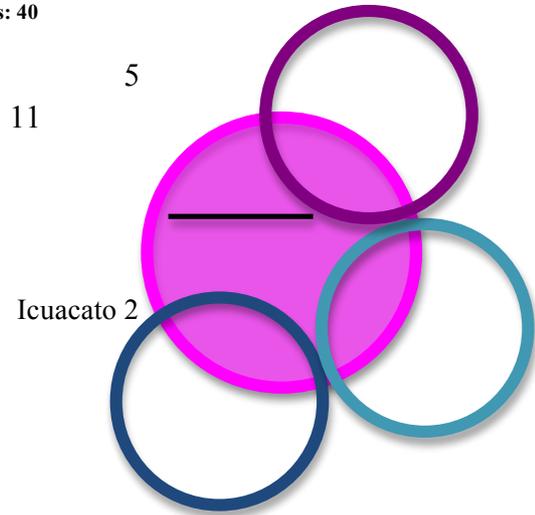
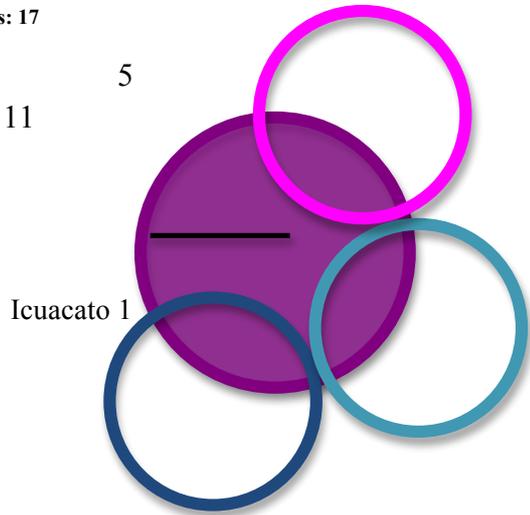


Figura 16. Especies totales, únicas y compartidas entre los sitios Águila 1 (púrpura), Águila 2 (magenta), Icuacato 1 (azul-verde) e Icuacato 2 (azul marino).

Cuadro 22. Matriz de especies compartidas entre sitios.

| | Águila 1 | Águila 2 | Icuacato 1 | Icuacato 2 |
|------------|----------|----------|------------|------------|
| Águila 1 | - | 9 | 12 | 18 |
| Águila 2 | 9 | - | 5 | 10 |
| Icuacato 1 | 12 | 5 | - | 11 |
| Icuacato 2 | 18 | 5 | 11 | - |

Ahora bien, entre las zonas del Águila e Icuacato se compartieron 29 MOTUs, 81 y 60 resultaron únicas para cada zona. Como se ve en la Figura 17; Cuadro 23, donde los colores magenta y púrpura representan a las zonas de estudio Águila (que incluye al sitio Águila 1 y Águila 2) y los colores azul-verde y azul a, los cuales representan a la zona Icuacato (e incluyen a los sitios Icuacato 1 y 2, respectivamente).

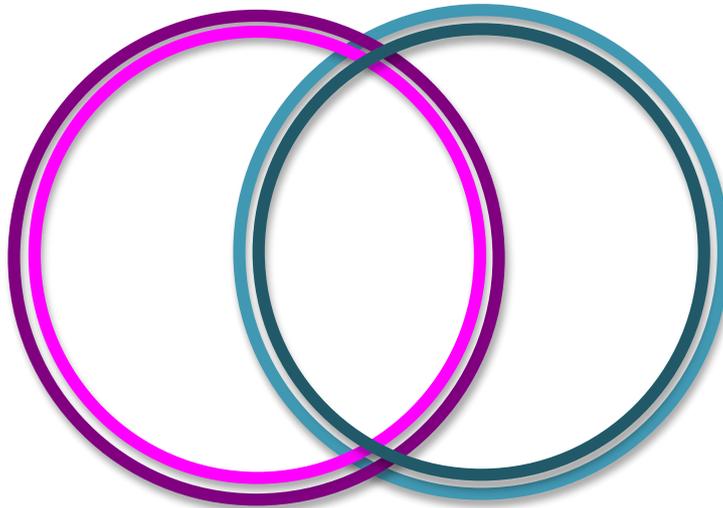


Figura 17. Especies únicas y compartidas entre zonas Águila e Icuacato.

Cuadro 23. Matriz de especies compartidas entre zonas.

| | Águila | Icuacato |
|----------|--------|----------|
| Águila | - | 29 |
| Icuacato | 29 | - |

Los sitios de Águila 1 y 2 presentaron en conjunto 110 MOTUs de los cuales comparten sólo 10 especies, 73 son únicas en el sitio Águila 1 y 27 en Águila 2, lo que se representa en la siguiente figura (18).

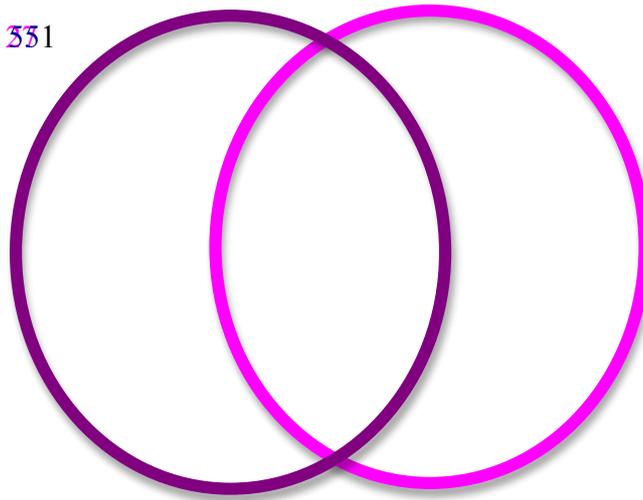


Figura 18. Especies únicas y compartidas entre Águila 1 (púrpura) y Águila 2 (magenta).

Entre los sitios de la zona de Icuacato existieron 88 MOTUs, se compartieron 11 y cada sitio presentó 22 (Icuacato 1) y 55 (Icuacato 2) especies únicas, como se muestra en la Figura 19.

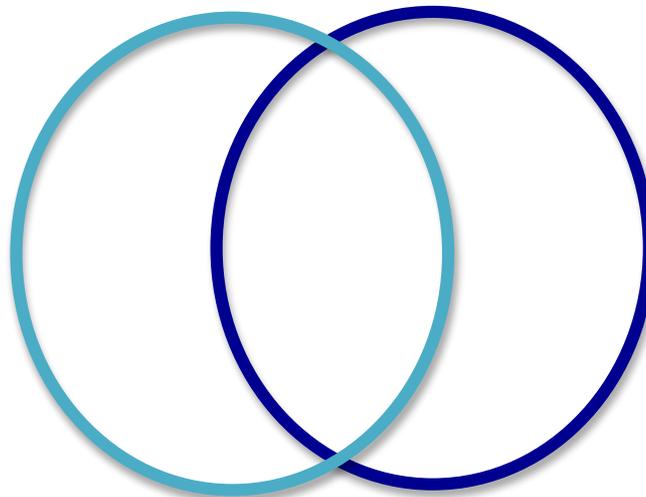


Figura 19. Especies únicas y compartidas entre Icuacato 1 (azul-verde) e Icuacato 2 (azul).

Las únicas tres especies que se compartieron entre los cuatro sitios de muestreo fueron, *Tomentella* sp. 13, *Helotiales* sp. 2 y *Sebacina* sp. 5, que presentaron en total 11, 10 y 7 puntas micorrízicas, y se identificaron en las bases de datos con un similitud genética de 96.4%, 99.2% y 95.8%, respectivamente (Cuadro 24).

7.3 Similitud genética

En el Cuadro 24 se indica el MOTU con su par o pares más cercanos en la base de datos del GeneBak (en el caso de ser dos los resultados se separan con una diagonal). En el cuadro se indica el porcentaje de identidad, si este resultó tener una similitud genética mayor o igual al 97% se marcó con un “si”, lo que indica que el MOTU está reportado para alguna parte del mundo, estos datos fueron utilizados para la evaluación de la hipótesis dos. En el cuadro también se indica el número de acceso del par más cercano así como los criterios que se utilizaron para seleccionar a dicho par. Los resultados para este análisis se concentran en la Figura 20 en donde el 34.7% (59 MOTUs) presenta valores de similitud genética mayores o iguales al 97% y el 65.3% (111 MOTUs) no.

Cuadro 24. Similitud genética de los MOTUs a los pares más cercanos en las bases de datos del NCBI.

| Nombre del MOTU | Porcentaje de identidad (%) | Similitud igual o mayor a 97% | No. de Acceso | Descripción | Valor de e | Valoración total | Publicado |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------|--|------------|------------------|-----------|
| <i>Astraeus hygrometricus</i> | 99.8 | si | AJ629392 | <i>Astraeus hygrometricus</i> | 0.00E+00 | 1181.13 | si |
| Atheliaceae sp. 1 | 94.4 | no | FJ876186 | <i>Atheliaceae sp. fc2465</i> | 5.30E-61 | 243.031 | si |
| Atheliaceae sp. 2 | 93.6 | no | JN943925 | <i>Amphinema sp. 7 UK-2011 cepa TU113101</i> | 6.95E-97 | 363.064 | no |
| Auriculariales sp. 1 | 92.3 | no | HQ441577 | <i>Oliveonia pauxilla</i> voucher | 4.27E-155 | 556.962 | si |
| Boletus sp. 1 | 99.2/97.9 | si | EU819452/GQ166888 | <i>Boletus fraternus</i> voucher JMP0009/ <i>Boletus rubellus</i> voucher F:PRL5575MAN | 0/0 | 702.847/898.592 | si/no* |
| <i>Cenococcum geophilum</i> | 97.5 | si | JQ711896 | <i>Cenococcum geophilum</i> aislado | 0 | 972.458 | si |
| Clavulina sp. 1 | 99 | si | JX287358 | <i>Clavulina sp. BZ24089</i> | 0 | 1297.47 | no* |
| Clavulinaceae sp. 1 | 86.9 | no | JQ638711 | <i>Clavulina subrugosa</i> voucher TENN043395 | 3.40E-118 | 435.083 | si |
| Clavulinaceae sp. 2 | 91.7 | no | GQ981509 | <i>Membranomyces spurius</i> voucher KM131627 | 1.26E-156 | 562.502 | no |
| Cortinarius aff. flexipes | 96.3 | no | FJ717557 | <i>Cortinarius flexipes</i> voucher | 0 | 966.918 | si |
| Cortinarius decipiens | 99.3 | si | FJ717566 | <i>Cortinarius decipiens</i> voucher F17079 | 0.00E+00 | 976.151 | si |
| Cortinarius sp. 1 | 96.8 | no | GQ159893 | <i>Cortinarius casimiri</i> voucher UBC F17150 OC78 | 0.00E+00 | 684.381 | si |
| <i>Elaphomyces muricatus</i> | 97.4 | si | GU550112 | <i>Elaphomyces muricatus</i> | 0.00E+00 | 1031.55 | si |
| Entoloma aff. sinuatum | 96.7 | no | GU289652 | <i>Entoloma sinuatum</i> voucher BHS2009-07 | 0.00E+00 | 1018.62 | no |

| | | | | | | | |
|---------------------------|------------|----|-----------------------|--|---------------------|-----------------|--------|
| <i>Entoloma sp. 1</i> | 86.2 | no | JQ320106 | Entoloma pallidocarpum voucher | 0 | 891.205 | no |
| <i>Genea papillosa</i> | 98.2 | si | JF908020 | Genea papillosa voucher 16982 | 2.32E-75 | 292.891 | no |
| <i>Genea sp. 1</i> | 96.1/91.06 | no | JF908020/ JX679370 | Genea papillosa voucher 16982/Genea hispidula aislado ecmGe2 | 2.15E-75/2.15e-75 | 292.891/292.891 | si/no |
| <i>Genea sp. 2</i> | 97.7/95.5 | si | JX679370/ DQ206860 | Genea hispidula aislado ecmGe2/Genea gardneri voucher Trappe13007 | 1.84e-76/3.93E-83 | 296.584318.744 | no/si |
| <i>Genea sp. 3</i> | 95.3 | no | JF908019 | Genea hispidula voucher 16980 | 2.70E-79 | 305.817 | no |
| <i>Genea sp. 4</i> | 96.4 | no | HQ184958 | Genea sp. BS-2010 | 2.20E-70 | 276.271 | si |
| <i>Genea sp. 5</i> | 94.3 | no | DQ206841 | Genea arenaria voucher Trappe7345 | 3.51E-83 | 318.744 | si |
| <i>Genea sp. 6</i> | 95.2 | no | DQ206841 | Genea arenaria voucher Trappe7345 | 1.64E-86 | 329.824 | si |
| <i>Hebeloma sp. 1</i> | 96.1 | no | DQ974696 | Hebeloma cf. oculatum | 0 | 802.566 | si |
| <i>Hebeloma sp. 2</i> | 97.2 | si | AY948195 | Hebeloma bruchetii cepa PAM03-20 | 0 | 715.774 | si |
| <i>Helotiales sp. 1</i> | 80.7 | no | JX243905 | Helotiales sp. ODKB5 | 3.56E-49 | 204.252 | no |
| <i>Helotiales sp. 2</i> | 99.2 | si | FN669205 | Helotiales sp. P224 | 0.00E+00 | 808.106 | si |
| <i>Helotiales sp. 3</i> | 97.2 | si | KC180681 | Helotiales sp. GPO CO 04 E10 | 0.00E+00 | 676.994 | no |
| <i>Helotiales sp. 4</i> | 89.3/87.4 | no | AF486133/ JN859261 | Leptodontidium orchidicola cepa ZT98 022/ Cadophora sp. REF041 | 0/0 | 756.4/702.847 | si/si |
| <i>Helvella sp. 1</i> | 91.8 | no | FJ859340 | Helvella elastica | 5.62E-125 | 457.243 | no |
| <i>Helvella sp. 2</i> | 92.2 | no | KC122826 | Helvella lactea voucher WCG | 0.00E+00 | 902.285 | si* |
| <i>Helvella sp. 3</i> | 90.7 | no | FJ859338 | Helvella sp. QZ-2009a aislado T680 | 1.51E-145 | 525.569 | no |
| <i>Helvella sp. 4</i> | 90 | no | KC122826 | Helvella lactea voucher WCG 1393 | 0 | | si* |
| <i>Helvella sp. 5</i> | 92 | no | KC122863 | Helvella sp. UC 1999244 | 2.11E-94 | 355.677 | si |
| <i>Hydnum repandum</i> | 97.6 | si | AJ547879 | Hydnum repandum | 0 | 902.285 | si |
| <i>Hygrophorus sp. 1</i> | 91.7 | no | JF908066 | Hygrophorus arbustivus voucher 13486 | 0.00E+00 | 841.346 | si |
| <i>Hysterangium sp. 1</i> | 91.6/91.5 | no | DQ974810/ AY558778 | Hysterangium cf. separabile src649/ Hysterangium sp. TK1765 | 2.68E-74/1.25e-67 | 287.351/265.191 | si/no* |
| <i>Inocybe sp. 1</i> | 96.1/95.4 | no | HE862959/ FN550920 | Inocybe nitidiuscula/Inocybe tarda | 1.57E-119/3.41e-116 | 438.776/427.696 | no/n o |
| <i>Inocybe sp. 2</i> | 93.8/90.7 | no | JQ801411/ EU523591 | Inocybe neobrunnescens var. leucothelota cepa SAT0427406/Inocybe sp. CIF2005-302 | 0/0 | 987.231/787.793 | no*/no |
| <i>Inocybe sp. 3</i> | 91.3 | no | HQ445613 | Inocybe cf. lacera | 1.96E-129 | 472.016 | si |
| <i>Inocybe sp. 4</i> | 89.8 | no | HQ215793 | Inocybe sp. OTU297 | 3.76E-101 | 377.837 | si |
| <i>Inocybe sp. 5</i> | 95.7 | no | EU523591 | Inocybe sp. CIF2005-302 | 0.00E+00 | 732.394 | no* |
| <i>Inocybe sp. 6</i> | 93.3 | no | FJ904153 | Inocybe cf. rimosa | 0.00E+00 | 957.685 | si |
| <i>Inocybe sp. 7</i> | 93.9 | no | AM882976 | Inocybe aff. grammata | 4.84E-164 | 586.508 | si |
| <i>Inocybe sp. 8</i> | 94.1 | no | HQ604621 | HQ604621 Inocybe sororia aislado 2000910-003 voucher UBC F19052 | 0.00E+00 | 708.387 | no* |
| <i>Inocybe sp. 9</i> | 90.7 | no | HQ604462 | Inocybe nitidiuscula aislado 2010325-006 voucher | 0.00E+00 | 929.985 | no |
| <i>Inocybe sp. 10</i> | 99.4 | si | EU523591 | Inocybe sp. CIF2005-302 | 0.00E+00 | 1094.34 | no |
| <i>Inocybe sp. 11</i> | 95/90.1 | no | HE814153/ JF908209 | Inocybe sp. 2488 CG-2012/Inocybe transitoria voucher 21514 | /4.39E-126 | 819.186/460.936 | no/si |
| <i>Inocybe sp. 12</i> | 92.2 | no | AM882974 | Inocybe cf. reisneri LAS97067 | 3.82E-167 | 597.588 | si |

| | | | | | | | |
|---|-----------|----|--------------------------------|--|-------------------|---------------------|------------|
| <i>Inocybe</i> sp. 13 | 89 | no | FJ904151 | Inocybe sororia voucher | 0 | 797.026 | si |
| <i>Inocybe</i> sp. 14 | 86 | no | EU819475 | Inocybe sp. tju1 voucher JMP0033 | 1.41E-155 | 558.808 | si |
| <i>Laccaria</i> aff. <i>amethystina</i> | 97 | si | JX504150 | Laccaria amethystina aislado | 0 | 989.078 | no* |
| <i>Laccaria</i> sp. 1 | 94.7 | no | JX504110 | Laccaria sp. AWW584 | 0 | 813.646 | no* |
| <i>Lactarius subserifluus</i> | 98.6 | si | EU819486 | Lactarius subserifluus voucher JMP0046 | 0.00E+00 | 1303.01 | si |
| <i>Lactarius yazoensis</i> | 99.6/99.1 | si | EU569255 / EU598169 5 | Lactarius sp. MHM308/ Lactarius yazoensis voucher PC BB2004-26 | 0/0 | 1116.5/12 80.85 | si/no * |
| <i>Pachyphloeus citrinus</i> | 97.8 | si | JN102476 | Pachyphloeus citrinus voucher MIN:RH900 | 0.00E+00 | 1044.48 | si |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 1 | 99.7 | si | JN102417 | Pachyphloeus sp. 17 RH- 2012 voucher | 0 | 1127.58 | si |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 2 | 97.5 | si | JN409345 y JN102395 | Pachyphloeus sp. 13 RH- 2012 voucher | 0 | 1029.7 | si |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 3 | 95.2 | no | JN409345 | Pachyphloeus sp. 13 RH- 2012 voucher | 3.64E-112 | 414.77 | si |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 4 | 93.5/87.8 | no | JN102408 /EU54319 8 | Pezizaceae sp. GB366 voucher DUKE:GB366/Pachyphloeus s virescens aislado RH279 | 0/1.13e-132 | 942.912/4 83.096 | si/si |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 5 | 97.7/97.7 | si | JX414223/ JN409341 | Pachyphloeus melanoxanthus voucher MA:56998/Pachyphloeus sp. F13253 voucher BG:F13253Kers 6470 | 1.2E-21/1.20e-21 | 113.766/1 13.766 | si/si |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 6 | 94.6 | no | JN102484 | Pachyphloeus citrinus voucher OSC:32650 | 0.00E+00 | 894.899 | si |
| <i>Pachyphloeus</i> sp. 7 | 94.7 | no | JN102417 | Pachyphloeus sp. 17 RH- 2012 voucher DUKE:ITCV1148 | 0.00E+00 | 715.774 | si |
| <i>Pachyphloeus virescens</i> | 98.2 | si | JX414219 | Pachyphloeus virescens voucher OSC:JT13043 | 0.00E+00 | 1142.35 | si |
| <i>Peziza</i> sp. 1 | 98.2 | si | EU819417 | Peziza cf. succosa | 0.00E+00 | 1158.97 | si |
| Pezizaceae sp. 1 | 92.3 | no | JN102401 | Pezizaceae sp. AMRH67 voucher | 0 | 821.033 | si |
| Pezizaceae sp. 2 | 93.6 | no | EU543200 | Pachyphloeus carneus aislado JT11019 | 1.05E-57 | 233.798 | si |
| Pezizaceae sp. 3 | 98.6 | si | JN102400 | Pezizaceae sp. AMRH59 voucher MIN:AMRH59 | 0 | 1038.94 | si |
| <i>Piloderma</i> sp. 1 | 92.1 | no | DQ46928 8 | Piloderma lanatum voucher JS 22149 | 8.24E-90 | 339.057 | no* |
| Pleosporales sp. 1 | 98.6 | si | FJ490761 | Phoma medicaginis aislado 2738 | 0 | 843.193 | no |
| Pleosporales sp. 2 | 97.4 | si | KC180719 | Pleosporales sp. GPO CO 04 G8 | 0 | 791.486 | no |
| Pleosporales sp. 3 | 91.3 | no | KC180719 | Pleosporales sp. GPO CO 04 G8 | 0.00E+00 | 643.754 | no |
| <i>Pseudotomentella tristis</i> | 97.3 | si | AF274772 | Pseudotomentella tristis specimen-voucher JS20643(O) | 4.45E-139 | 503.409 | si |
| <i>Ramaria</i> sp. 1 | 95.7/92.2 | no | AJ408377 /DQ36561 2 | Ramaria formosa/Ramaria sp. OSC 81384 | 2.01e-32/7.13e-42 | 148.852/1 80.245 | no/si |
| <i>Russula</i> aff. <i>brevipes</i> * | 96.6 | no | DQ65888 8 | Russula chloroides aislado UP528 | 9.78E-161 | 575.428 | si |
| <i>Russula</i> aff. <i>curtipes</i> | 95.3 | no | JF908677 | Russula curtipes voucher 6474 | 0 | 935.525 | si |
| <i>Russula</i> aff. <i>cyanoxanta</i> * | 98.4/98.3 | si | JF834482/ JF908676 | Russula sp. r-02010/ Russula alutacea voucher 6472 | 0/1.01e-171 | 885.665/6 12.361 | no/si |
| <i>Russula</i> aff. <i>olivacea</i> | 97.9/97.4 | si | EU284014 /AF41863 4 | Russula aff. olivacea r03003/Russula olivacea | 0/0 | 1483.9/ 1458.13 | no/si |
| <i>Russula pulverulenta</i> | 98.4 | si | AY06173 6 | Russula pulverulenta | 0.00E+00 | 990.925 | si |
| <i>Russula</i> sp. 1 | 97 | si | DQ42201 | Russula persicina voucher | 0 | 1074.02 | no* |

| | | | | | | | |
|---|-----------|----|---------------------------|--|-----------------------------|---------------------|-----------|
| | | | 9 | UE21.09.2003-01 | | | |
| <i>Russula sp. 2</i> | 99.6 | si | EU569268 | Russula sp. MHM089 | 0 | 911.519 | si |
| <i>Russula sp. 3</i> | 99.4/98.9 | si | EU526012 /EU526006 | Russula densifolia/ Russula cascadensis voucher OSC 1064009 | 5.21E- 179/1.13 e-175 | 636.368/6 25.288 | si/si |
| <i>Russula sp. 4</i> | 96.4 | no | EU569266 | Russula sp. MHM079 | 0 | 828.419 | si |
| <i>Russula sp. 5</i> | 94.3 | no | HQ60485 1 | Russula sp. MLB-2010 aislado 040918-02 voucher | 0 | 998.311 | no* |
| <i>Russula sp. 6</i> | 100 | si | EU569267 | Russula sp. MHM087 | 0.00E+0 0 | 1258.69 | si |
| <i>Russula sp. 7</i> | 99.4 | si | DQ42199 8 | Russula acrifolia voucher UE12.09.2003-3 | 0.00E+0 0 | 647.448 | no |
| <i>Russula sp. 8</i> | 96.5 | si | JQ622387 | Russula sp. clado 16 | 2.27E- 146 | 527.415 | si* |
| <i>Russula sp. 9</i> | 98.2/98.2 | si | HQ60483 0/HQ6048 35 | Russula cerolens aislado 021219-01/Russula cf. pectinata 001114-28 | 0.00E+0 0 | 1245.76/1 245.76 | no/n o |
| <i>Russula sp. 10</i> | 96.3 | no | HQ69352 5 | Russula sp. GL-2010 voucher | 0.00E+0 0 | 952.145 | no |
| <i>Russula sp. 11</i> | 96.6 | no | AF418639 | Russula sp. ue73 | 0.00E+0 0 | 1173.74 | si |
| <i>Russula sp. 12</i> | 94 | no | EU019922 | Russula sp. MEL2238365 | 0.00E+0 0 | 826.573 | si |
| <i>Russula sp. 13</i> | 96.9 | no | EU598167 | Russula sp. BB2004-249 | 0 | 965.071 | no |
| <i>Russula sp. 14</i> | 94 | no | DQ97475 3 | Russula brevipes var. acrior voucher src442 | 2.48E- 10 | 74.9863 | si |
| <i>Russula sp. 15</i> | 92.4 | no | JQ622345 | Russula sp. clade 17 PGA- 2012 | 0.00E+0 0 | 710.234 | si |
| <i>Russula sp. 16</i> | 94.5 | no | DQ65888 8 | Russula chloroides aislado UP528 | 0.00E+0 0 | 723.16 | si |
| <i>Russula sp. 17</i> | 95.1 | no | JF834363 | Russula acrifolia | 0.00E+0 0 | 671.454 | no* |
| <i>Russula sp. 18</i> | 98.5/97.1 | si | JQ622387/ JQ622358 | Russula sp. clado 16 PGA- 2012/Russula amoenolens aislado PRL4211 | 0/0 | 922.598/8 80 | si/si |
| <i>Russula sp. 19</i> | 92.3 | no | EU284012 | Russula aff. olivacea UC 1859941 | 0.00E+0 0 | 1149.74 | no* |
| <i>Russula sp. 20</i> | 97.3 | si | JX425398 | Russula sp. HMAS262353 | 0 | 1086.95 | no |
| <i>Russula sp. 21</i> | 88.2 | no | EU569266 | Russula sp. MHM079 | 0.00E+0 0 | 725.007 | si |
| <i>Scleroderma areolatum</i> | 99.4 | si | GQ16691 0 | Scleroderma areolatum voucher F:PGK193 | 0.00E+0 0 | 1249.46 | no |
| <i>Sebacina epigaea complex sp. 1</i> | 98.2/96.3 | si | EU819519 / JQ665481 | Sebacina aff. epigaea MW 526 voucher RT00038/ Sebacina epigaea voucher TUB 019652 | 0/0 | 970.611/9 66.918 | si/si |
| <i>Sebacina epigaea complex sp. 2</i> | 97.5 | si | EU819519 | Sebacina aff. epigaea MW | 0.00E+0 0 | 1062.94 | si |
| <i>Sebacina incrustans</i> | 99.3/97.5 | si | EF655701 /JQ665535 | Sebacina incrustans aislado IB60213/ Sebacina incrustans voucher TUB | 0/0 | 1044.48/9 72.458 | si/si |
| <i>Sebacina sp. 1</i> | 90.9 | no | AF465191 | Sebacina sp. F6 | 0 | 891.205 | no |
| <i>Sebacina sp. 2</i> | 82.5/82.1 | no | JQ665511/ JF273541 | Sebacina aff. epigaea MW 526 voucher RT00038 | 3.64e- 97/1.34e -81 | 364.91/ 313.204 | si/no |
| <i>Sebacina sp. 3</i> | 97.1 | si | AF440664 | Sebacina sp. MAS1 | 0 | 1002.0 | si |
| <i>Sebacina sp. 4</i> | 85.4 | no | AJ966750 | Sebacina helvelloides | 2.67E- 93 | 351.984 | si |
| <i>Sebacina sp. 5</i> | 95.8 | no | HQ21580 3 | Sebacina sp. OTU318 | 0.00E+0 0 | 876.432 | si |
| <i>Sebacina sp. 6</i> | 94.2 | no | EU819519 | Sebacina aff. epigaea MW 526 voucher RT00038 | 2.20E- 177 | 630.828 | si |
| <i>Sebacina sp. 7</i> | 93.3 | no | FN669250 | Sebacina sp. B300 | 0.00E+0 0 | 741.627 | si |
| <i>Sebacina sp. 8</i> | 88.1 | no | AF490393 | Sebacina aff. epigaea MW 526 | 0 | 750.86 | si |
| <i>Sebacina sp. 9</i> | 96.1 | no | HQ21580 3 | Sebacina sp. OTU318 | 0.00E+0 0 | 785.946 | si |
| <i>Sebacina sp. 10</i> | 96.4 | no | AF465191 | Sebacina sp. F6 | 0.00E+0 0 | 1055.56 | si |
| <i>Sebacina sp. 11</i> | 95.9 | no | FN669250 | Sebacina sp. B300 | 0.00E+0 0 | 976.151 | si |

| | | | | | | | |
|--|-----------|----|-------------------|--|--------------------|-----------------|--------|
| <i>Sebacina</i> sp. 12 | 92.2 | no | EU819519 | Sebacina aff. epigaea MW 526 voucher | 0.00E+00 | 809.953 | si |
| <i>Sebacina</i> sp. 13 | 94.9 | no | DQ974770 | Sebacina sp. src834 | 0.00E+00 | 809.953 | si |
| <i>Sebacina</i> sp. 14 | 96.1 | no | FN669246 | Sebacina sp. B259 | 0 | 994.618 | no |
| <i>Sebacina</i> sp. 15 | 89.1 | no | EU819537 | Sebacina epigaea voucher | 0 | 686.227 | si |
| <i>Sebacina</i> sp. 16 | 97.2 | si | FN669246 | Sebacina sp. B259 | 0 | 1016.78 | si |
| <i>Sebacina</i> sp. 17 | 84.9 | no | EU819519 | Sebacina aff. epigaea MW 526 voucher RT00038 | 9.35E-168 | 599.435 | si |
| <i>Sebacina</i> sp. 18 | 97 | si | DQ974770 | Sebacina sp. src835 | 1.55E-178 | 634.521 | si |
| <i>Sebacina</i> sp. 19 | 84.3 | no | DQ974770 | Sebacina epigaea voucher TUB/ Sebacina sp. EMF40 | 2.60E-143 | 518.182 | si |
| <i>Sebacina</i> sp. 20 | 92.5 | no | EU819519 | Sebacina aff. epigaea MW 526 voucher RT00038 | 0.00E+00 | 688.074 | si |
| Sebacinaceae sp. 1 | 90.4 | no | EF372401 | Sebacinaceae sp. kz24 | 0 | 660.374 | si |
| Sebacinaceae sp. 2 | 85 | no | AY296259 | Sebacinaceae sp. F (JLP 1380) | 6.42E-144 | 520.029 | no* |
| Sebacinales sp. 1 | 98.2 | si | JX561237 | Sebacinales sp. OS122 | 0.00E+00 | 680.687 | si |
| Sebacinales sp. 2 | 98.8 | si | HE814159 | Sebacinales sp. 2 CG-2012 | 0.00E+00 | 878.279 | no |
| <i>Sistotrema</i> sp. 1 | 86.2 | no | AJ606042 | <i>Sistotrema</i> alboluteum | 1.13E-127 | 466.476 | no |
| Sordariomycete sp. 1 | 98.5 | si | JX244023 | Sordariomycetes sp. 211a | 0 | 952.145 | no* |
| Sordariomycete sp. 2 | 84.7 | no | EU082785/HM163194 | Coniochaetaceae sp. RS050/Glomerella magna cepa CMM1885 | 3.96E-101/6.63e-99 | 377.837/370.45 | si/no |
| <i>Thelephora anthocephala</i> | 97.1 | si | DQ974771 | <i>Thelephora</i> anthocephala voucher src614 | 0 | 911.519 | si |
| <i>Thelephora</i> sp. 1 | 90.4 | no | GQ267490 | <i>Thelephora</i> terrestris voucher | 0.00E+00 | 902.285 | si |
| Thelephoraceae sp. 1 | 90 | no | TSU83467 | Thelephoraceae sp. | 0 | 900.439 | si |
| Thelephoraceae sp. 2 | 95.2 | no | HE814154 | Thelephoraceae sp. | 0.00E+00 | 684.381 | no |
| Thelephoraceae sp. 3 | 94.7 | no | JF273548 | Thelephoraceae sp. | 7.01E-64 | 252.265 | no |
| Thelephoraceae sp. 4 | 94.1 | no | AY751562 | Thelephoraceae sp. EC117 A52 | 0.00E+00 | 942.912 | si |
| Thelephoraceae sp. 5 | 92.9 | no | U83472 | Thelephoraceae sp. 'Taylor #5' | 0.00E+00 | 929.985 | si |
| Thelephoraceae sp. 6 | 100/95.1 | si | U83472.1/JF273548 | Thelephoraceae sp. 'Taylor #5' ITS1/Thelephoraceae sp. EMF48/ | 0/0 | 880.126/1029.7 | si/no |
| Thelephoraceae sp. 7 | 93.7 | no | FN669283 | Thelephoraceae sp. B143 | 0.00E+00 | 680.687 | si |
| Thelephoraceae sp. 8 | 94.8 | no | HE814154 | Thelephoraceae sp. 17 CG-2012 | 0.00E+00 | 800.72 | no |
| Thelephoraceae sp. 9 | 90.7 | no | JF273548 | Thelephoraceae sp. EMF48 | 0.00E+00 | 802.566 | no |
| Thelephoraceae sp. 10 | 91.8 | no | FN669259 | Thelephoraceae sp. P212 | 1.25E-77 | 298.431 | si |
| <i>Tomentella</i> aff. <i>ferruginea</i> | 98.8 | si | EU819524 | <i>Tomentella</i> ferruginea voucher RT00044 | 0 | 1134.96 | no* |
| <i>Tomentella atroarenicolor</i> | 97.1 | si | AJ421254 | <i>Tomentella</i> atroarenicolor | 0.00E+00 | 935.525 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 1 | 95.8/95.7 | no | DQ974780/AJ421251 | <i>Tomentella</i> sp. Src822/ <i>Tomentella</i> galzinii | 0/0 | 1013.08/926.292 | si/si |
| <i>Tomentella</i> sp. 2 | 92.6/92.4 | no | JQ711987/HM189968 | <i>Tomentella</i> badia aislado FFP541/ <i>Tomentella</i> sp. 1 BB-2010 voucher BB05 204 Oh 020506 | 0/0 | 992.771/944.758 | si/no* |
| <i>Tomentella</i> sp. 3 | 93.7 | no | DQ974776 | <i>Tomentella</i> fuscocinerea voucher src813 | 0 | 963.225 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 4 | 94.2 | no | AJ534914 | <i>Tomentella</i> sp. J54 | 0 | 1005.7 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 5 | 93.4 | no | AF272941 | <i>Tomentella</i> lapidum | 0 | 760.093 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 6 | 97.3 | si | AJ534913 | <i>Tomentella</i> sp. D14 | 0.00E+00 | 787.793 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 7 | 100 | si | AF272909 | <i>Tomentella</i> ferruginea | 6.84E-54 | 219.025 | si |

| | | | | | | | |
|------------------------------|-----------|----|-------------------|--|-----------|-----------------|-------------|
| <i>Tomentella</i> sp. 8 | 90.2 | no | AJ421255 | <i>Tomentella atroarenicolor</i> | 8.90E-132 | 479.403 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 9 | 96.4 | no | EU570330 | Voucher micorriza (<i>Tomentella</i>) voucher | 0.00E+00 | 979.845 | no |
| <i>Tomentella</i> sp. 10 | 95 | no | DQ974780 | <i>Tomentella</i> sp. src822 | 0.00E+00 | 998.311 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 11 | 93.6 | no | DQ974782 | <i>Tomentella</i> sp. src823 | 0.00E+00 | 872.739 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 12 | 94.3 | no | AJ534912 | <i>Tomentella</i> sp. O41 | 0.00E+00 | 1046.32 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 13 | 96.4 | no | HE814209 | <i>Tomentella</i> sp. 12 CG-2012 | 0.00E+00 | 963.225 | no |
| <i>Tomentella</i> sp. 14 | 91.4 | no | Q272406 | <i>Tomentella</i> sp. 1 RB-2011 voucher AM8BB7F1 | 0.00E+00 | 946.605 | no |
| <i>Tomentella</i> sp. 15 | 99.1 | si | JX030247 | <i>Tomentella</i> sp. 3 SGT-2012 aislado L1Q 9 | 0.00E+00 | 979.845 | no |
| <i>Tomentella</i> sp. 16 | 92.5/88.9 | no | JF273548/GU214812 | Telephoraceae sp. EMF48/ <i>Tomentella</i> fuscocinerea voucher TL6662 | 0/0 | 795.18/678.841 | no/n o |
| <i>Tomentella</i> sp. 17 | 97.6/95.7 | si | EU444548/HQ215809 | Hongo ectomicorrizico sp. EDM21/ <i>Tomentella</i> sp. OTU207 | 0/0 | 869.046/813.646 | no*/ no* |
| <i>Tomentella</i> sp. 18 | 81.7 | no | JQ711813 | <i>Tomentella</i> sp. 2 RT-2012 aislado FFP575 | 3.57E-157 | 564.348 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 19 | 91.1 | no | DQ974780 | <i>Tomentella</i> sp. src822 | 0.00E+00 | 865.352 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 20 | 91.5 | no | DQ974780 | <i>Tomentella</i> sp. src822 | 0 | 767.48 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 21 | 93.9 | no | HQ215810 | <i>Tomentella</i> sp. OTU209 | 0.00E+00 | 846.886 | si |
| <i>Tomentella</i> sp. 22 | 89 | no | AJ534911 | <i>Tomentella</i> sp. O53 | 0.00E+00 | 804.413 | si |
| <i>Tricholoma columbetta</i> | 97.9 | si | EU186277 | <i>Tricholoma columbetta</i> aislado AP54 | 0.00E+00 | 1247.61 | no* |
| <i>Tricholoma populinum</i> | 99.8/98.8 | si | DQ974702/JN019600 | <i>Tricholoma ustale</i> voucher src352/ <i>Tricholoma populinum</i> voucher | 0/0 | 917.059/85.665 | si/si |
| <i>Tuber castilloi</i> | 100/97.8 | si | JN033366/JF419249 | <i>Tuber</i> sp. 36 GB-2011/ <i>Tuber castilloi</i> cepa 6B | 0/0 | 942.912 | no/n o |
| <i>Tuber separans</i> | 98.8 | si | GQ221448 | <i>Tuber separans</i> voucher JT32463 | 0.00E+00 | 1050.02 | no |

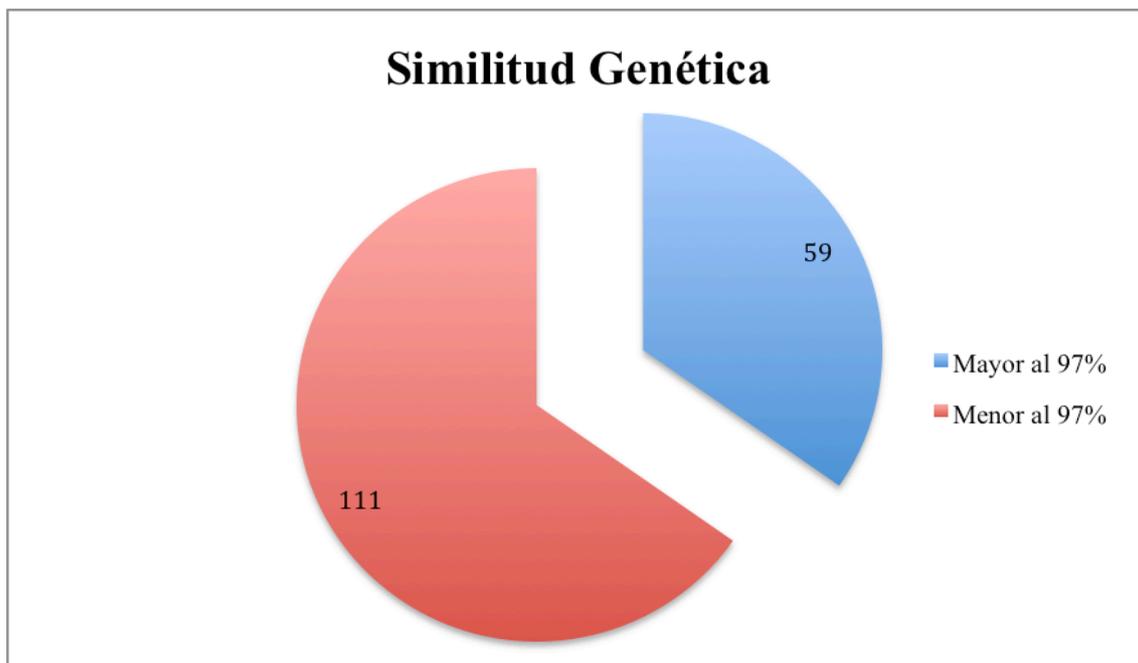


Figura 20. Similitud genética de los MOTUs de la Cuenca de Cuitzeo en la base de datos del NCBI (usando Vouchers únicamente y excluyendo muestras ambientales).

A partir del análisis de similitud genética usando metadatos del primer hit comparando nuestras secuencias con muestras ambientales de la base de datos del GenBank, los resultados fueron que 48.8% (83) de los MOTUs presentaron similitudes genéticas menores al 97% mientras que el 51.1% (87) de los MOTUs presentaron similitudes mayores o iguales al 97%. Como se muestra en la Figura 21.

Solo en cuatro casos la secuencia de la base de datos es 100% similar a la nuestra, las especies en donde se dio esta similitud fueron *Genea* sp. 3, *Russula* aff. *cyanoxanta**, *Russula* sp. 6, y *Russula* sp. 13, es interesante mencionar que estas secuencias de los fueron colectadas en México en asociación con bosques de *Quercus* y están reportadas en el trabajo de Morris et al. (2009). Como se muestra en el Cuadro 25.

Cuando este análisis se enfocó en los metadatos del origen de la secuencia que mejor se empató, los resultados de los metadatos indicaron que en 73 de los casos se pudo identificar el país o región de origen de la muestra, el país del cual se obtuvieron un mayor número de “hits” fue México con 26 de ellos, posteriormente se encontró que Estados Unidos quien fue el país de origen de 18 de las secuencias mejor emparejadas y China presentó cinco secuencias.

Si analizamos los datos usando los continentes como regiones el mejor representado en este análisis fue América (26:México, 18:EUA, 2:Canadá, 1:Belice y 1:Argentina), posteriormente Asia (China:5, Irán:3, Pakistán:2 y Tailandia:1) y por último Europa (Italia: 3, España:1, Lituania:1, Hungría:1, Suecia:1, Finlandia:1, Noruega:1 y Escocia:1). También se asoció una secuencia cuyo mejor empate proviene del Ártico.

Los resultados de esta sección permitieron hacer un breve análisis de los hospederos asociados a la secuencia más parecida a la nuestra en la base de datos del GenBank, estos mostraron que 100 de los metadatos presentaron información asociada de los hospederos. De estos 46 de ellos se encontraron en asociación a especies del género *Quercus*, este fue el hospedero mejor representado, en su mayoría en bosques con varias especies del género presentes, y en algunos casos provenientes de bosques mixtos con especies de *Quercus* involucradas. En 10 de los casos se identificó la especie, en una ocasión correspondió a *Quercus robur*, tres de los MOTUs coincidieron con *Quercus ilex* y *Quercus douglasii* respectivamente y en cuatro ocasiones con *Quercus liaotungensis*.

Dentro de este análisis, la familia de hospederos ectomicorrízicos que mejor se vio representada fue Fagaceae en donde se encontró en su mayoría hospederos del género

Quercus (46) seguido de *Castanea* (seis), *Fagus* (cuatro) y por último *Lithocarpus* (uno).

En 17 de los casos se presentaron secuencias cuyo hospedero correspondió a especies de la familia Orchidaceae, en donde los géneros representados fueron *Hexalectris*, *Corallorhiza*, *Epipactis* y *Cephalanthera*.

Pinaceae también resultó una familia que apareció con cierta frecuencia (10 ocasiones) con géneros como *Pinus*, *Pseudotsuga*, y *Abies*.

Las familia Rosaceae se observó en cuatro casos. Salicaceae estuvo presente en tres oportunidades con los géneros *Salix* y *Populus*. La familia Myrtaceae se presentó en dos ocasiones con hospederos del género *Eucalyptus*. Hospederos de las familias Polygonaceae, Malvaceae, Ericaceae, Betulaceae y Dipterocarpacea también se registraron a partir de los metadatos.

Cuadro 25. Similitud genética de los MOTUs al par más cercano (“hit”) usando muestras ambientales en las bases de datos del NCBI.

| | Nombre del MOTU | Porcentaje de identidad (%) | No. de Acceso | Hospedero vegetal o tipo de vegetación a la que se asocia | País o región de origen |
|----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|---|-------------------------|
| 1 | <i>Helotiales sp. 1</i> | 83 | EU563501 | <i>Quercus spp.</i> | México |
| 2 | <i>Sebacina sp. 4</i> | 84.5 | GU817078 | <i>Bistorta vivipara</i> | |
| 3 | <i>Sebacina sp. 2</i> | 85 | FJ196970 | <i>Quercus spp.</i> | México |
| 4 | <i>Sordariomycete sp. 2</i> | 85.9 | HM030606 | Arbustos de bosques templados | |
| 5 | <i>Helotiales sp. 4</i> | 86 | KF646097 | <i>Rosa rugosa</i> | Lituania |
| 6 | <i>Sebacina sp. 17</i> | 86 | HQ667856 | <i>Hexalectris arizonica</i> | |
| 7 | <i>Sebacina sp. 19</i> | 86.2 | FJ196964 | <i>Quercus spp.</i> | |
| 8 | <i>Tomentella sp. 18</i> | 87.5 | KC966194 | | |
| 9 | <i>Entoloma sp. 1</i> | 88 | AM902088 | | Finlandia |
| 10 | <i>Inocybe sp. 4</i> | 88 | AB218164 | | |
| 11 | <i>Pleosporales sp. 3</i> | 88 | JN859337 | | Hungría |
| 12 | <i>Russula sp. 21</i> | 88.2 | FJ196953 | <i>Quercus spp.</i> | EUA |
| 13 | <i>Inocybe sp. 14</i> | 88.4 | JF960727 | <i>Eucalyptus delegatensis</i> | |
| 14 | <i>Sistotrema sp. 1</i> | 89 | JN032495 | Coníferas | |
| 15 | <i>Pezizaceae sp. 1</i> | 89.5 | JQ976002 | | |
| 16 | <i>Pachyphloeus sp. 5</i> | 89.8 | JN102417 | | |
| 17 | <i>Genea papillosa</i> | 90 | DQ206863 | <i>Quercus spp.</i> | EUA |
| 18 | <i>Helvella sp. 3</i> | 90 | KC110999 | <i>Alnus sp.</i> | Pakistán |
| 19 | <i>Helvella sp. 4</i> | 90 | KC122826 | | |
| 20 | <i>Sebacina sp. 8</i> | 90 | FJ827241 | <i>Potentilla sp.</i> | China |
| 21 | <i>Sebacinaceae sp. 2</i> | 90 | KC965241 | | EUA |
| 22 | <i>Helvella sp. 5</i> | 90.02 | JQ318620 | <i>Quercus liaotungensis</i> | |
| 23 | <i>Tomentella sp. 8</i> | 90.9/90.9 | FJ196996/ HE601894 | <i>Quercus spp./Quercus ilex</i> | |
| 24 | <i>Inocybe sp. 3</i> | 91 | AY310819 | | |
| 25 | <i>Inocybe sp. 9</i> | 91 | HQ604467 | | |
| 26 | <i>Tomentella sp. 22</i> | 91 | FJ196975 | <i>Quercus spp.</i> | México |
| 27 | <i>Tomentella sp. 19</i> | 91.1 | DQ974780 | <i>Quercus douglasii</i> | EUA |

| | | | | | |
|----|---|-----------|-----------------------|---|-----------|
| 28 | <i>Helvella</i> sp. 1 | 92 | KC110999 | <i>Alnus</i> sp. | Pakistán |
| 29 | <i>Helvella</i> sp. 2 | 92 | KC122826 | | |
| 30 | Pezizaceae sp. 3 | 92 | JN102401 | | |
| 31 | <i>Ramaria</i> sp. 1 | 92 | DQ365648 | <i>Pseudotsuga menziesii</i> | |
| 32 | <i>Sebacina</i> sp. 12 | 92 | KC965842 | | EUA |
| 33 | <i>Tomentella</i> sp. 14 | 92 | JQ975982 | <i>Pinus pinaster</i> | |
| 34 | <i>Russula</i> sp. 15 | 92.2 | HE601891 | <i>Quercus ilex</i> | |
| 35 | <i>Hysterangium</i> sp. 1 | 93 | KC152131 | | México |
| 36 | <i>Inocybe</i> sp. 1 | 93 | HQ667837 | <i>Hexalectris arizonica</i> | |
| 37 | <i>Inocybe</i> sp. 6 | 93 | FJ904153 | | |
| 38 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 4 | 93 | JN102408 | | |
| 39 | Thelephoraceae sp. 5 | 93 | AY874384 | <i>Quercus robur</i> | |
| 40 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 2 | 93.4 | FJ904153 | | |
| 41 | <i>Sebacina</i> sp. 20 | 93.7 | HQ667837 | <i>Hexalectris arizonica</i> | |
| 42 | <i>Tomentella</i> sp. 3 | 93.7 | DQ974776 | <i>Quercus</i> spp. | EUA |
| 43 | Thelephoraceae sp. 9 | 93.8 | KF514671 | <i>Corallorhiza odontorhiza</i> y <i>C. wisteriana</i> | |
| 44 | <i>Inocybe</i> sp. 7 | 93.9 | AM882976 | | |
| 45 | Auriculariales sp. 1 | 94 | JF449746 | | |
| 46 | <i>Inocybe</i> sp. 2 | 94 | JQ801411 | <i>Pseudotsuga</i> sp. | |
| 47 | <i>Inocybe</i> sp. 13 | 94 | JQ408777 | <i>Quercus</i> sp., <i>Carya</i> sp., <i>Tsuga</i> sp., y <i>Pinus</i> sp. | EUA |
| 48 | <i>Laccaria</i> sp. 1 | 94 | JX504110 | | |
| 49 | <i>Thelephora</i> sp. 1 | 94 | JQ318667 | <i>Quercus liaotungensis</i> | |
| 50 | <i>Tomentella</i> sp. 5 | 94 | EF411122 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 51 | Thelephoraceae sp. 4 | 94.1 | AY751562/ AY534196 | <i>Pseudotsuga menziesii</i> / | |
| 52 | <i>Genea</i> sp. 2 | 94.8/93.6 | FR852068/ FJ210744 | <i>Fagus</i> sp., <i>Taxus</i> sp., <i>Alnus</i> sp./ <i>Pinus</i> sp.- <i>Quercus ilex</i> | |
| 53 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 6 | 94.6 | JN102476 | | |
| 54 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 7 | 94.7 | JN102417 | | |
| 55 | <i>Russula</i> sp. 16 | 94.7 | FJ378824 | <i>Kobresia</i> sp. | |
| 56 | <i>Russula</i> sp. 12 | 94.8 | GU184059 | | |
| 57 | <i>Genea</i> sp. 1 | 95 | EU024887 | | |
| 58 | <i>Genea</i> sp. 6 | 95 | FJ210744 | <i>Pinus</i> sp.- <i>Quercus ilex</i> | Italia |
| 59 | <i>Sebacina</i> sp. 6 | 95 | HQ667848 | <i>Hexalectris arizonica</i> | |
| 60 | Thelephoraceae sp. 7 | 95 | HQ445015 | <i>Dryas octopetala</i> | |
| 61 | Thelephoraceae sp. 10 | 95 | HQ445052 | <i>Dryas octopetala</i> | Noruega |
| 62 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 3 | 95.2 | JN409345 | | |
| 63 | <i>Tomentella</i> sp. 21 | 95.4 | JX630720 | <i>Dryas integrifolia</i> | |
| 64 | <i>Russula</i> sp. 17 | 95.6 | EU819428 | <i>Castanea dentata</i> | |
| 65 | Thelephoraceae sp. 8 | 95.6 | KF514671 | <i>Corallorhiza odontorhiza</i> y <i>C. wisteriana</i> | |
| 66 | <i>Tomentella</i> sp. 16 | 95.6 | KF514671 | <i>Corallorhiza odontorhiza</i> | |
| 67 | <i>Inocybe</i> sp. 5 | 95.7 | EU523591 | | |
| 68 | Clavulinaceae sp. 1 | 96 | FJ196904 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 69 | <i>Cortinarius</i> aff. <i>flexipes</i> | 96 | AY641471 | <i>Pinus</i> spp. | Escocia |
| 70 | <i>Cortinarius</i> sp. 1 | 96 | GQ159893 | | |
| 71 | <i>Russula</i> sp. 2 | 96 | EU569268 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 72 | Sordariomycete sp. 1 | 96 | FJ882010 | | |
| 73 | Thelephoraceae sp. 1 | 96 | JQ991859 | Dipterocarpaceae | Tailandia |
| 74 | <i>Hebeloma</i> sp. 1 | 96.1 | DQ974696 | <i>Quercus douglasii</i> | EUA |
| 75 | <i>Genea</i> sp. 4 | 96.3 | AY634166 | <i>Epipactis helleborine</i> | |
| 76 | <i>Russula</i> sp. 10 | 96.3 | HQ693525 | | China |
| 77 | <i>Tomentella</i> sp. 20 | 96.3 | KC966194 | | |
| 78 | <i>Russula</i> aff. <i>brevipes</i> * | 96.4 | JQ347192 | <i>Kobresia</i> sp. | |
| 79 | <i>Russula</i> sp. 8 | 96.4 | KF245493 | voucher | |

| | | | | | |
|-----|---------------------------------------|-----------|-----------------------|--|----------------|
| 80 | <i>Tomentella</i> sp. 11 | 96.4 | FR852171 | <i>Fagus</i> sp., <i>Taxus</i> sp., <i>Alnus</i> sp.,/ <i>Pinus</i> sp.- <i>Quercus ilex</i> | Argentina |
| 81 | <i>Entoloma</i> aff. <i>sinuatum</i> | 96.7 | GU289652 | | |
| 82 | <i>Russula</i> sp. 11 | 96.8 | FJ196957 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 83 | <i>Sebacina</i> sp. 7 | 96.9 | HQ667874 | <i>Hexalectris spicata</i> | |
| 84 | Helotiales sp. 3 | 97 | HF674642 | <i>Fagus sylvatica</i> | |
| 85 | <i>Inocybe</i> sp. 11 | 97 | HE820520 | | |
| 86 | Pezizaceae sp. 2 | 97 | JN704837 | <i>Pinus montezumae</i> | México |
| 87 | <i>Sebacina</i> sp. 15 | 97 | FR852356 | <i>Hyrcanian</i> spp. | Irán |
| 88 | <i>Tomentella</i> sp. 13 | 97 | JQ318661 | <i>Quercus liaotungensis</i> | China |
| 89 | Pleosporales sp. 2 | 97.1 | EF655686 | <i>Polygonum viviparum</i> | Austria |
| 90 | <i>Hebeloma</i> sp. 2 | 97.2 | AY309962 | | |
| 91 | <i>Russula</i> sp. 20 | 97.3 | JX425398 | | China |
| 92 | <i>Thelephora anthocephala</i> | 97.4 | EF411082 | | México |
| 93 | <i>Tomentella atroarenicolor</i> | 97.4 | HE601894 | <i>Quercus ilex</i> | EUA |
| 94 | <i>Tomentella</i> sp. 4 | 97.4 | JF506825 | <i>Quercus ilex</i> | |
| 95 | <i>Sebacina</i> sp. 5 | 97.5 | JQ318607 | <i>Quercus liaotungensis</i> | China |
| 96 | <i>Russula</i> aff. <i>olivacea</i> | 97.7 | HF674534 | <i>Fagus sylvatica</i> | Italia |
| 97 | <i>Pachyphloeus citrinus</i> | 97.8 | JN102476 | | |
| 98 | <i>Russula</i> sp. 14 | 97.8 | FJ196949 | <i>Quercus</i> spp. | |
| 99 | <i>Boletus</i> sp. 1 | 97.9 | GQ166888 | <i>Quercus</i> spp. | |
| 100 | Clavulinaceae sp. 2 | 97.9 | EU668944 | <i>Pyrola rotundifolia</i> | |
| 101 | <i>Tricholoma columbetta</i> | 97.9 | EU186277 | | |
| 102 | <i>Astraeus hygrometricus</i> | 98 | DQ421116 | | |
| 103 | <i>Cenococcum geophilum</i> | 98 | DQ273316 | <i>Lithocarpus densiflorus</i> | EUA |
| 104 | <i>Hydnum repandum</i> | 98 | HE611086 | <i>Abies alba</i> y <i>Pinus sylvestris</i> | España |
| 105 | <i>Peziza</i> sp. 1 | 98 | EU819417 | <i>Castanea dentata</i> | EUA |
| 106 | <i>Pseudotomentella tristis</i> | 98 | JX030242 | <i>Castanea dentata</i> | |
| 107 | <i>Russula pulverulenta</i> | 98 | JX625303 | | |
| 108 | <i>Sebacina</i> sp. 3 | 98 | AB568450 | <i>Cephalanthera longibracteata</i> | Japón |
| 109 | Sebacinaceae sp. 1 | 98 | FJ196970 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 110 | Thelephoraceae sp. 6 | 98 | KF514671 | | |
| 111 | <i>Tomentella</i> sp. 1 | 98 | GU328537 | | |
| 112 | <i>Tomentella</i> sp. 6 | 98 | FR852130 | <i>Hyrcanian forest</i> | Irán |
| 113 | <i>Inocybe</i> sp. 8 | 98.2 | EU819417 | <i>Castanea dentata</i> | |
| 114 | <i>Russula</i> sp. 9 | 98.2 | HQ604830 | | |
| 115 | <i>Piloderma</i> sp. 1 | 98.3 | AY656928 | <i>Quercus</i> spp. | |
| 116 | <i>Tomentella</i> sp. 2 | 98.3 | AY833052 | <i>Cephalanthera damasonium</i> | |
| 117 | <i>Russula</i> sp. 1 | 98.4 | FJ196956 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 118 | <i>Sebacina</i> sp. 18 | 98.4 | FJ196967 | <i>Quercus</i> spp. | |
| 119 | <i>Tuber separans</i> | 98.5 | EU563484 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 120 | Pleosporales sp. 1 | 98.6 | FJ4907661 | | |
| 121 | <i>Sebacina</i> sp. 1 | 98.6 | HQ667869 | <i>Hexalectris spicata</i> | Irán |
| 122 | <i>Lactarius subserifluus</i> | 98.6/98.6 | EU819486/ JN003629 | <i>Castanea dentata</i> / <i>Carpinus</i> y <i>Quercus</i> | EUA/ México |
| 123 | Atheliaceae sp. 1 | 98.7 | JX630410 | <i>Salix arctica</i> | Ártico |
| 124 | Atheliaceae sp. 2 | 98.8 | EF619845 | <i>Pinus taeda</i> | |
| 125 | <i>Clavulina</i> sp. 1 | 98.9 | JX287358 | | Belice |
| 126 | <i>Sebacina epigaea complex</i> sp. 2 | 98.9/98.9 | KC965842/ HQ667859 | - / <i>Hexalectris arizonica</i> | |
| 127 | <i>Genea</i> sp. 5 | 99 | KC152114 | | México |

| | | | | | |
|-----|--|-----------|------------------------------------|--|--------|
| 128 | <i>Inocybe</i> sp. 10 | 99 | GQ166872 | <i>Quercus</i> spp. | EUA |
| 129 | <i>Inocybe</i> sp. 12 | 99 | AM882960 | | Suecia |
| 130 | <i>Laccaria</i> aff. <i>amethystina</i> | 99 | KC152153 | | México |
| 131 | <i>Pachyphloeus</i> <i>virescens</i> | 99 | FJ197015 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 132 | <i>Russula</i> aff. <i>curtipes</i> | 99 | KC152216 | | México |
| 133 | <i>Russula</i> sp. 4 | 99 | EU563492 | <i>Quercus</i> spp. | |
| 134 | <i>Russula</i> sp. 18 | 99 | KF245493 | | EUA |
| 135 | <i>Russula</i> sp. 19 | 99 | FJ196944 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 136 | <i>Scleroderma</i> <i>areolatum</i> | 99 | EU819438 | <i>Castanea dentata</i> / <i>Quercus</i> spp. | |
| 137 | <i>Sebacina</i> <i>incrustans</i> | 99 | KC965379 | | Canadá |
| 138 | <i>Sebacina</i> sp. 11 | 99 | HQ667884 | <i>Hexalectris spicata</i> | |
| 139 | <i>Sebacina</i> sp. 13 | 99 | FJ196963 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 140 | <i>Sebacina</i> sp. 14 | 99 | EU563483 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 141 | <i>Sebacina</i> sp. 16 | 99 | EU668224 | | |
| 142 | <i>Sebacinales</i> sp. 1 | 99 | KC965251 | | EUA |
| 143 | <i>Sebacinales</i> sp. 2 | 99 | HE814159 | | |
| 144 | <i>Thelephoraceae</i> sp. 2 | 99 | KF514671 | <i>Corallorhiza odontorhiza</i> | |
| 145 | <i>Tomentella</i> aff. <i>ferruginea</i> | 99 | KF514687 | | EUA |
| 146 | <i>Tomentella</i> sp. 9 | 99 | JX630568 | | Canadá |
| 147 | <i>Tomentella</i> sp. 12 | 99 | JX316494 | <i>Salix humboldtiana</i> | |
| 148 | <i>Tomentella</i> sp. 15 | 99 | HE820675 | | EUA |
| 149 | <i>Tomentella</i> sp. 17 | 99 | FJ196977 | <i>Quercus</i> spp. | |
| 150 | <i>Tuber castilloi</i> | 99 | AY634176 | <i>Epipactis helleborine</i> | |
| 151 | <i>Thelephoraceae</i> sp. 3 | 99.1 | EF619802 | <i>Pinus taeda</i> | EUA |
| 152 | <i>Russula</i> sp. 5 | 99.2 | EF655686 | <i>Polygonum viviparum</i> | |
| 153 | <i>Sebacina</i> sp. 10 | 99.3 | GQ985423 | <i>Pinus tabulaeformis</i> | |
| 154 | <i>Hygrophorus</i> sp. 1 | 99.4 | FJ196924 | <i>Quercus</i> spp. | |
| 155 | <i>Russula</i> sp. 3 | 99.4 | EU526012 | <i>Pseudotsuga menziesii</i> | EUA |
| 156 | <i>Russula</i> sp. 7 | 99.5 | EU819428 | <i>Castanea dentata</i> | |
| 157 | <i>Lactarius yazooensis</i> | 99.6 | FJ196936 | <i>Quercus</i> spp. | |
| 158 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 1 | 99.7 | FJ196956 | | México |
| 159 | <i>Sebacina epigaea</i> complex sp. 1 | 99.7 | HQ667856 | <i>Hexalectris arizonica</i> | |
| 160 | <i>Tomentella</i> sp. 10 | 99.7 | KC966194 | | |
| 161 | <i>Elaphomyces</i> <i>muricatus</i> | 99.8 | EU597039 | <i>Tilia cordata</i> | |
| 162 | <i>Tricholoma populinum</i> | 99.8 | DQ974702 | <i>Quercus douglasii</i> | |
| 163 | <i>Helotiales</i> sp. 2 | 99.9 | GU256216 | <i>Quercus</i> spp. | Italia |
| 164 | <i>Cortinarius decipiens</i> | 99.4/99.3 | FN669184/ DQ481833 | <i>Populus tremula</i> / <i>Tsuga heterophylla</i> | |
| 165 | <i>Sebacina</i> sp. 9 | 99.9/99.9 | GU256216/ GQ221644 | <i>Quercus</i> spp./ <i>Pseudotsuga</i> spp.- <i>Quercus</i> spp.- <i>Lithocarpus</i> spp. | |
| 166 | <i>Tomentella</i> sp. 7 | 99/99/99 | FJ210777/ EF644149/ HQ667922 | <i>Pinus</i> sp.- <i>Quercus ilex</i> / <i>Populus tremula</i> / <i>Hexalectris revoluta</i> | |
| 167 | <i>Genea</i> sp. 3 | 100 | FJ197018 | <i>Quercus</i> spp. | |
| 168 | <i>Russula</i> aff. <i>cyanoxanta</i> * | 100 | FJ196946 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 169 | <i>Russula</i> sp. 6 | 100 | EU569267 | <i>Quercus</i> spp. | México |
| 170 | <i>Russula</i> sp. 13 | 100 | FJ196950 | <i>Quercus</i> spp. | México |

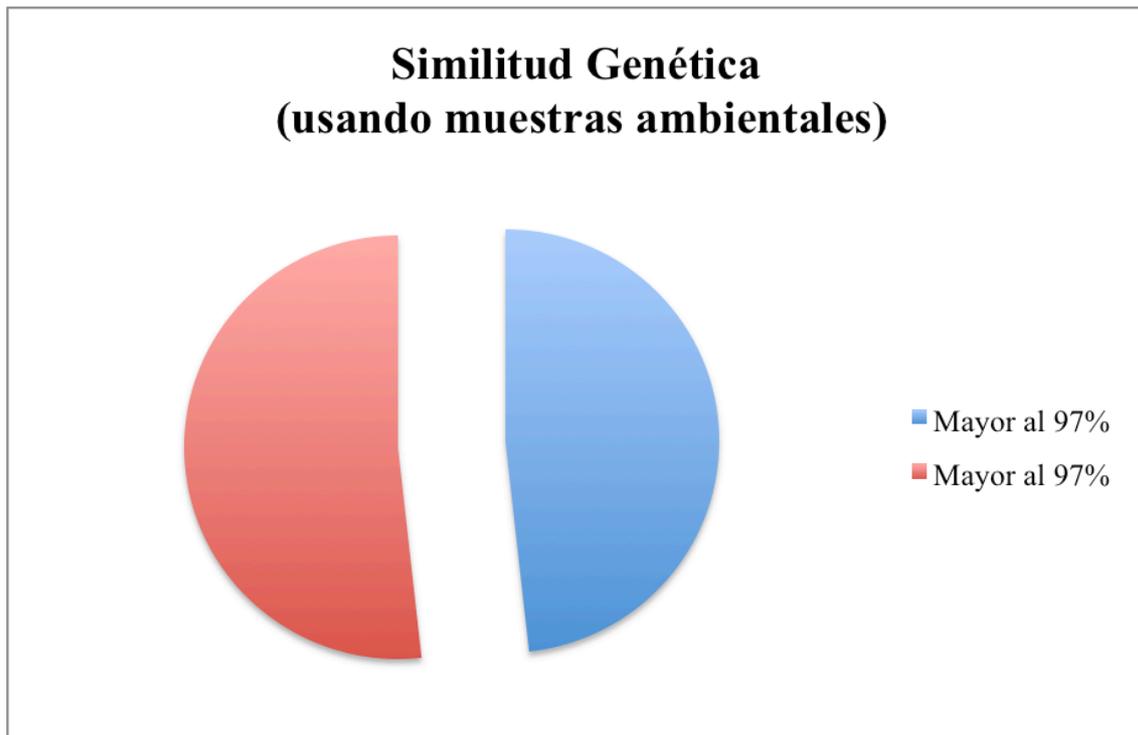


Figura 21. Similitud genética de los MOTUs al par más cercano (“hit”) usando muestras ambientales en las bases de datos del NCBI.

6.4 Comparación de la comunidad de HEM asociada a encinos de la Cuenca de Cuitzeo Michoacán con las reportadas en algunas partes del mundo

Al hacer el análisis de la comparación de la comunidad de HEM entre la Cuenca de Cuitzeo con otras comunidades del mundo, los resultados mostraron que la comunidad con la que se comparten más especies es la reportada en Morris et al. (2009) de Guerrero, México, con 22 especies en común donde las especies arbóreas dominantes correspondieron a *Quercus crassifolia* y *Quercus laurina*. En el trabajo de Smith et al. (2007b), cuya vegetación corresponde a *Quercus douglasii*, *Quercus wislizeni* y *Pinus sabiniana*, comparte ocho especies. Las comunidades descritas en Morris et al. (2008a) (Guerrero, México, *Quercus crassifolia*), Wang et al. (2011) (Beijin, China, *Quercus liaotungensi*) y Argüelles (2013) (Estado de México, México, *Abies religiosa*), presentan siete especies en común con cada uno de los estudios. Adicionalmente se comparten cinco MOTUs con la comunidad descrita para un sitio donde la vegetación es dominada por *Castanea dentata* y *Quercus spp.* en Wisconsin E.U.A (Palmer et al., 2008), posteriormente tres especies coinciden con la comunidad reportada para un bosque con vegetación predominante de *Quercus rubra* y *Q. prinus* de los Montes Apalaches en Carolina del Norte Estados Unidos (Walker et al., 2005), y dos especies

en común para los trabajos de Reverchon et al. (2012) y Garibay-Orijel et al. (2013) respectivamente. Se compartió una especie con la comunidad descrita en un bosque dominado por *Quercus garryana* del estado de Oregon en Estados Unidos (Moser et al., 2009), y por último se compartió sólo un MOTU con la comunidad de un bosque de *Quercus rubra* reportada en el trabajo de Karpati et al. (2011). Aunque también se analizaron las comunidades dominadas por especies de encinos encontradas por Dickie et al. (2009) en Minesota Estados Unidos y Benucci et al. (2010) en el centro de Italia, no se encontró ninguna coincidencia específica.

En el Cuadro 26 se muestran el hospedero u hospederos a los que se asociaba cada comunidad, cuantas especies, OTUs, taxa, morfotipos o tipos reportaron según lo que se estableció para cada trabajo. En la Figura 22 se observan las comunidades comparadas en un mapa en donde se asocia el número de especies compartidas.

Cuadro 26. Especies compartidas entre las comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados principalmente a encinos.

| Autores | Especies compartidas | Especies reportadas | Lugar | Coordenadas | Especie(s) vegetal(es) asociada |
|------------------------------|----------------------|--|---|--|---|
| Morris et al. (2009) | 22 | 154 taxa | México, Guerrero | 18° 36' N 99° 36' O | <i>Quercus crassifolia</i> y <i>Quercus laurina</i> |
| Smith et al. (2007b) | 8 | 161 especies | E.U California | 39° 17' N 121° 17' O | <i>Quercus douglasii</i> , <i>Quercus wislizeni</i> y <i>Pinus sabiniana</i> |
| Morris et al. (2008b) | 7 | 44 taxa | México, Guerrero | 18° 36' N 99° 36' O | <i>Quercus crassifolia</i> |
| Wang et al. (2011) | 7 | 66 | China Beijin | 39° 58' N 115° 26' E | <i>Quercus liaotungensi</i> |
| Arguelles (2013) | 7 | 87 | México, Estado de México | – | <i>Abies religiosa</i> |
| Palmer et al. (2008) | 5 | 88 (especies secuenciadas y 11 con esporomas no incluidas en la comparación) | Wisconsin E.U.A | – | <i>Castanea dentata</i> y <i>Quercus spp.</i> |
| Walker et al. (2005) | 3 | 75 tipos ITS | E.U.A, Carolina del Norte | 35° 02' N 83° 27' O | <i>Quercus rubra</i> y <i>Q.</i> <i>prinus</i> |
| Reverchon et al. (2012) | 2 | 42 OTUs | Corredor Biológico Sierra del Chichinautzin, neotropico, México | - | <i>Pinus montezumae</i> |
| Garibay-Orijel et al. (2013) | 2 | 27 OTUs | Faja volcánica transmexicana, México | - | <i>Pinus montezumae</i> |
| Moser et al. (2009) | 1 | 26 | E.U.A, Oregon | 42° 03' N 123° 39' O, 42° 02' N 123° 39' O, 42° 17' N 123° 41' O, 42° 17' N 123° 42' O, | <i>Quercus garryana</i> |
| Karpati et al. (2011) | 1 | 34 (30 secuencias con las que se comparó) | E.U.A, Nueva York | 40° 31' N, 74° 26' O, 40° 28' N, 74° 25' ' O, 40° 33' N, 74° 37' O, 40° 30' N, 74° 21' O, 40° 35' N, 73° 59' O, 40° 39' N', 74° 6' O | <i>Quercus rubra</i> |
| Dickie et al. (2009) | 0 | 16 (se compararon sólo con secuencias) | E.U.A Minesota | – | <i>Quercus spp.</i> |
| Benucci et al. (2010) | 0 | 29 especies | Italia, Spoleto (centro de Italia) | 42° 42' N 12° 43' O | <i>Quercus pubescens</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Ostrya carpinifolia</i> , <i>Quercus ilex</i> |

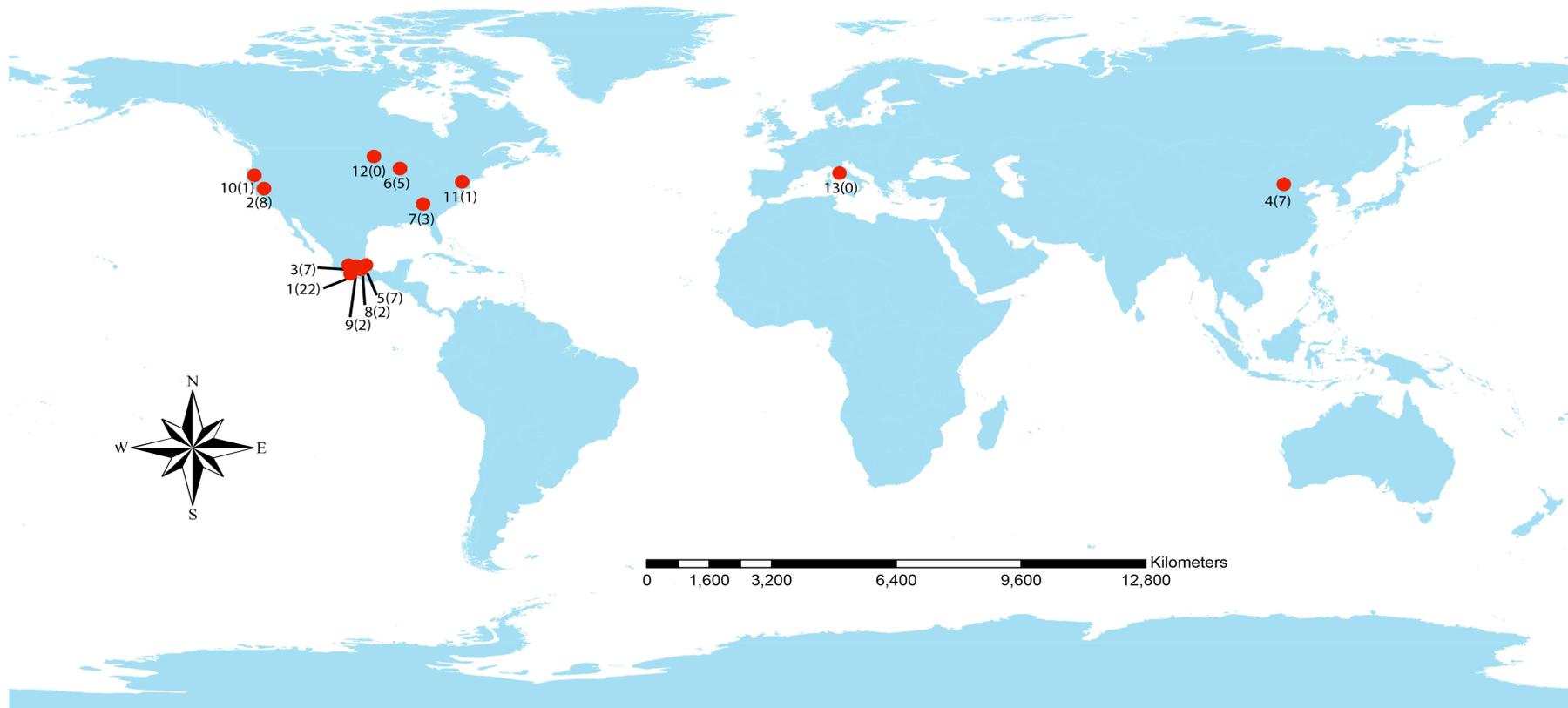


Figura 22. Mapa de especies compartidas entre la comunidad de HEM de la Cuenca de Cuitzeo con otras comunidades del mundo asociadas principalmente a bosques de encinos.

Cada punto rojo indica una comunidad de HEM, el primer número identifica a la comunidad y el segundo número que se encuentra entre paréntesis indica el número de especies compartidas. 1: Morris et al. (2009), 2: Smith et al. (2007b), 3: Morris et al. (2008b), 4: Wang et al. (2011), 5: Arguelles (2013), 6: Palmer et al. (2008), 7: Walker et al. (2005), 8: Reverchon et al. (2012), 9: Garibay-Orijel et al. (2013), 10: Moser et al. (2009), 11: Karpati et al. (2011), 12: Dickie et al. (2009), 13: Benuccci et al. (2010)

En el Cuadro 27 se presenta la información detallada del análisis de MOTUs compartidos cuando se comparó con otras comunidades del mundo.

Cuadro 27. MOTUs compartidos con cada comunidad comparada.

| Contig o muestra de referencia | Número de puntas micorrízicas que presentó la muestra | MOTU que coincidió | % de similitud con la secuencia emparejada | Nombre asignado por el trabajo con el que se comparó |
|--------------------------------|---|--|--|---|
| Morris et al. (2009) | | | | |
| 1313 ITS4 | 1 | <i>Piloderma</i> sp. 1 | 99.2 | Uncultured ectomycorrhiza Atheliaceae |
| Contig 37 | 6 | <i>Hygrophorus</i> sp. 1 | 99.7 | Uncultured ectomycorrhiza Hygrophorus clone |
| Contig 15 | 10 | Helotiales sp. 2 | 99.6 | Uncultured ectomycorrhiza fungus clone M30D10 |
| Contig 40 | 5 | <i>Lactarius yazooensis</i> | 99.8 | Uncultured ectomycorrhiza Lactarius clone |
| Contig 95 | 1 | <i>Russula</i> sp. 13 | 100 | Uncultured ectomycorrhiza Russula clone |
| Contig 17 | 7 | <i>Tuber separans</i> | 99.1 | Uncultured ectomycorrhiza Tuber clone |
| SuperContig 1 | 17 | <i>Russula</i> sp. 6 | 100 | Uncultured ectomycorrhiza Russula clone |
| Contig 86 | 2 | <i>Tomentella</i> aff. <i>ferruginea</i> | 99.6 | Uncultured ectomycorrhiza Thelephoraceae clone M44C6 |
| Contig 59 | 3 | <i>Tomentella</i> sp. 1 | 99.7 | Uncultured ectomycorrhiza Thelephoraceae clone M25B2 |
| 1563 ITS1F | 1 | <i>Tomentella</i> sp. 17 | 99.3 | Uncultured ectomycorrhiza Thelephoraceae clone M74C11 |
| Contig 65 | 2 | <i>Scleroderma areolatum</i> | 100 | Uncultured ectomycorrhiza Scleroderma clone |
| Contig 79 | 1 | <i>Russula</i> sp. 20 | 99.6 | Uncultured ectomycorrhiza Russula clone |
| Contig 49 | 5 | <i>Russula</i> sp. 4 | 99.3 | Uncultured ectomycorrhiza Russula clone |
| Contig 72 | 3 | <i>Russula</i> aff. <i>cyanoxantha</i> * | 100 | Uncultured ectomycorrhiza Russula clone |

| | | | | |
|---------------|---|---------------------------------------|------|---|
| 918 ITS4 | 1 | <i>Russula</i> sp. 14 | 98.9 | Uncultured ectomycorrhiza Russula clone |
| SuperContig 7 | 3 | <i>Russula</i> sp. 1 | 99.2 | Uncultured ectomycorrhiza Russula clone |
| Contig 80 | 1 | <i>Pachyphloeus virescens</i> | 99.8 | Uncultured ectomycorrhiza Pezizaceae clone |
| Contig 28 | 5 | <i>Genea</i> sp. 3 | 100 | Uncultured Genea clone |
| Contig 13 | 8 | <i>Sebacina epigaea</i> complex sp. 2 | 99.3 | Uncultured Sebaciniales clone M65A2 |
| Contig 24 | 5 | <i>Sebacina incrustans</i> | 99.5 | Uncultured Sebaciniales clone M29B12 |
| Contig 68/102 | 3 | <i>Sebacina</i> sp. 13 | 99.9 | Uncultured Sebaciniales clone M46B5 |
| Contig 101 | 1 | <i>Sebacina</i> sp. 3 | 99.4 | Uncultured Sebaciniales clone M32F2 |

Smith et al. (2007b)

| | | | | |
|---------------|----|-------------------------------|------|-------------------------------|
| Contig 80 | 1 | <i>Pachyphloeus virescens</i> | 98.3 | Uncultured Pezizaceae |
| Contig 105 | 1 | <i>Cenococcum geophilum</i> | 98.9 | Cenococcum geophilum isolate |
| SuperContig 8 | 10 | <i>Pachyphloeus</i> sp. 1 | 100 | Uncultured Pyronemataceae |
| Contig 24 | 5 | <i>Sebacina incrustans</i> | 97.4 | Uncultured Sebaciniales clone |
| Contig 40 | 5 | <i>Lactarius yazoensis</i> | 97.9 | Uncultured Lactarius |
| Contig 89 | 1 | <i>Sebacina</i> sp. 14 | 97.4 | Uncultured Sebaciniales |
| Contig 74 | 6 | <i>Tomentella</i> sp. 7 | 98.4 | Uncultured Thelephoraceae |
| 1386 ITS4 | 1 | <i>Tricholoma populinum</i> | 99.6 | Tricholoma ustale voucher |

Morris et al. (2008b)

| | | | | |
|-----------|---|---------------------------------------|------|---|
| Contig 80 | 1 | <i>Pachyphloeus virescens</i> | 98.3 | Uncultured Pezizaceae |
| Contig 13 | 8 | <i>Sebacina epigaea</i> complex sp. 2 | 98.8 | Uncultured Sebaciniales clone |
| Contig 37 | 6 | <i>Hygrophorus</i> sp. 1 | 98.8 | Uncultured ectomycorrhiza Hygrophorus |
| Contig 89 | 1 | <i>Sebacina</i> sp. 14 | 98.4 | Uncultured Sebaciniales clone |
| Contig 40 | 5 | <i>Lactarius yazoensis</i> | 97.8 | Uncultured ectomycorrhiza Lactarius alnicola clone |

| | | | | |
|----------------|---|--------------------------------|------|---|
| SuperContig 31 | 2 | <i>Thelephora anthocephala</i> | 97.3 | Uncultured ectomycorrhiza Thelephora clone |
| Contig 105 | 1 | <i>Cenococcum geophilum</i> | 98.9 | Cenococcum geophilum |

| Wang et al. (2011) | | | | |
|---------------------------|----|---------------------------------------|------|-----------------------------------|
| Contig 14 | 7 | <i>Sebacina</i> sp. 5 | 97.2 | Uncultured Sebacina clone |
| Contig 35 | 6 | <i>Sebacina</i> sp. 10 | 99 | Uncultured Sebacina clone QL029 |
| Contig 92 | 1 | <i>Sebacina</i> sp. 16 | 97.2 | Uncultured Sebacina clone QL022 |
| Contig 63 | 2 | <i>Russula pulverulenta</i> | 97.7 | Uncultured Russula clone QL021 |
| Contig 3 | 23 | <i>Sebacina epigaea complex</i> sp. 1 | 98.5 | Uncultured Sebacina clone |
| 1197 ITS1F | 1 | <i>Russula</i> sp. 7 | 99.2 | Uncultured Russula clone QL029 |
| Contig 74 | 6 | <i>Tomentella</i> sp. 7 | 98.6 | Uncultured Tomentella clone QL078 |

| Arguelles 2013 | | | | |
|-----------------------|----|--------------------------------------|------|------------------------------------|
| Contig 27 | 8 | <i>Russula</i> aff. <i>olivaceae</i> | 99.6 | Uncultured Russula olivaceae AAM |
| Contig 6 | 11 | <i>Tomentella</i> sp. 13 | 98.8 | Uncultured Tomentella sp. 6 AAM |
| Contig 17 | 7 | <i>Tuber separans</i> | 97.9 | Uncultured Tuber separans AAM |
| Contig 89 | 1 | <i>Sebacina</i> sp. 14 | 98.0 | Uncultured Sebacina sp. 3 AAM |
| Contig 24 | 5 | <i>Sebacina incrustans</i> | 97.6 | Uncultured Sebacina incrustans AAM |
| Contig 280 | 1 | Sebacinales sp. 1 | 97.8 | Uncultured Sebacinaceae sp. 2 AAM |
| 1197 ITS1F | 1 | <i>Russula</i> sp. 29 | 98 | Russula acrifolia AAM |

| Palmer et al. (2008) | | | | |
|-----------------------------|----|--|------|-------------------------------|
| Contig 65 | 2 | <i>Scleroderma areolatum</i> | 99.2 | Scleroderma areolatum voucher |
| Contig 95 | 1 | <i>Russula</i> sp. 13 | 99.7 | Russula mustelina voucher |
| Contig 86 | 2 | <i>Tomentella</i> aff. <i>ferruginea</i> | 98.6 | Tomentella ferruginea voucher |
| Contig 42 | 3 | <i>Peziza</i> sp. 1 | 97.7 | Peziza sp. tjl1 voucher |
| Contig 3 | 23 | <i>Sebacina epigaea complex</i> sp. 1 | 98 | Sebacina aff. epigaea |

| Walker et al. (2005) | | | | |
|-----------------------------|--|--|--|--|
|-----------------------------|--|--|--|--|

| | | | | |
|-----------|---|-------------------------|------|--|
| Contig 59 | 3 | <i>Tomentella sp. 1</i> | 98.2 | Uncultured mycorrhizal fungus TOMENT1 |
| Contig 89 | 1 | <i>Sebacina sp. 14</i> | 98.2 | Uncultured mycorrhizal fungus Tremell1 |
| 1313 ITS4 | 1 | <i>Piloderma sp. 1</i> | 98.3 | Uncultured mycorrhizal TREMELL1 |

Reverchon et al. (2012)

| | | | | |
|-----------|---|------------------------------|------|-------------------------------|
| Contig 19 | 6 | <i>Cortinarius decipiens</i> | 99 | Uncultured Cortinarius clone |
| Contig 89 | 1 | <i>Sebacina sp. 14</i> | 99.5 | Uncultured Sebacinaceae clone |

Garibay-Orijel et al. (2013)

| | | | | |
|-----------|---|-----------------------------|------|-------------------------|
| Contig 17 | 7 | <i>Tuber separans sp. 2</i> | 97.7 | Uncultured Tuber clone |
| Contig 96 | 1 | Pezizaceae sp. 2 | 97.3 | Uncultured Peziza clone |

Moser et al. (2009)

| | | | | |
|-----------|---|-------------------------------|------|--|
| Contig 39 | 7 | <i>Russula aff. brevipes*</i> | 97.5 | Uncultured ectomycorrhiza Russulaceae |
|-----------|---|-------------------------------|------|--|

Karpati et al. (2011)

| | | | | |
|------------|---|------------------------|------|--|
| Contig 104 | 1 | <i>Tuber castilloi</i> | 99.8 | Uncultured ectomycorrhizal fungus type |
|------------|---|------------------------|------|--|

Dickie et al. (2009)

No presentó ninguna especie compartida

Benucci et al. (2011)

No presentó ninguna especie compartida

8. DISCUSIÓN

Eficiencia en la amplificación y secuenciación

El porcentaje de amplificación y secuenciación de las micorrizas de encino fue de 34.6%, es decir sólo la tercera parte de las muestras recolectadas, esto pudo deberse a múltiples factores, entre ellos, el tiempo (aproximadamente dos años) que pasó entre la recolecta en campo y el procesamiento de las mismas. Adicionalmente las muestras ambientales suelen ser complejas y carecen de pureza, este factor influye fuertemente en la amplificación, ya que la PCR es una prueba sensible a inhibidores que pueden contener las raíces, a manera de metabolitos secundarios, resinas, taninos y colorantes naturales así como partículas de suelo que podrían impedir la amplificación (García-Guzmán, 2009). Otro elemento que añade complejidad a la muestra es que esta posee el ADN del hongo junto con el de la planta.

Aunque en los trabajos existentes no se reporta el porcentaje de amplificación, encontramos que en el realizado por Morris et al. (2008b) reportaron un porcentaje de amplificación superior al 75%, explicando que utilizaron distintas reacciones de amplificación jugando con las cantidades y concentraciones de cada componente de la reacción de PCR, en los casos en los que la reacción de amplificación “estándar” no funcionó.

Adicionalmente lo que dificulta la comparación de datos, es que cada trabajo utiliza técnicas particulares como, identificación de morfotipos o RFLP y secuenciación, o RFLP y clonación después de la amplificación, en los casos en donde se recurre a la clonación se secuencian un número variable de clones, por lo que estos resultados no son comparables con los de esta tesis.

Por otra parte, Morris et al. (2008b) reportaron que la diversidad subterránea de los HEM se manifestaba a escalas espaciales pequeñas, donde las interacciones entre especies fueron comunes, es decir que en ocasiones cuando secuenciaron una micorriza obtuvieron más de una banda, en el estudio se quería conocer qué especies de HEM podían ocurrir en un sólo individuo de *Quercus crassifolia* y encontraron que el 26% de los ápices micorrízicos presentaban dos HEM o más por ápice, y hasta el 31% cuando se incluyó a los no ectomicorrízicos. Este fenómeno se ha atribuido a que los hongos compiten para colonizar las raíces y adquirir el carbono de la planta (Morris et al., 2008b) y se ha argumentado que la competencia entre especies de HEM puede jugar un rol en la estructura de la comunidad (Kennedy y Bruns, 2005). En el trabajo de Morris y

colaboradores (2008a) resolvieron este problema mediante la clonación de productos amplificados con dobles bandas, mientras que para el trabajo que aquí se presenta las dobles bandas fueron descartadas, lo que evidentemente repercutió en el porcentaje de eficiencia final. Aun así como se pudo ver en los resultados se obtuvo una diversidad alta.

8.1 La diversidad de la comunidad de HEM asociada a encinos de la Cuenca de Cuitzeo

La comunidad de HEM asociada a encinos en la Cuenca de Cuitzeo, Michoacán, consistió en 170 MOTUs. En México, el único trabajo que se ha reportado en un ecosistema similar es el de Morris et al. (2009) con 154 especies en un bosque de *Quercus crassifolia* y *Q. laurina*. En este trabajo encontramos 170 y no existen trabajos publicados que hayan reportado un número mayor de MOTUs de HEM en un bosque de encino. Sin embargo, hay resultados similares reportados para otros bosques de *Quercus* del mundo, por ejemplo: *Q. douglasii* en EUA 161 especies (Smith et al., 2007b), *Q. douglasii* y *Q. wislizeni* en EUA 140 especies (Morris et al., 2008b), *Q. ilex* en Francia 140 especies (Richard et al., 2005), y en bosques mixtos, en Californian 101 especies (Izzo et al., 2005), en un prado arbolado en Estonia 172 especies (Tedersoo et al., 2006), *Pinus sabiniana*, *Quercus douglasii* y *Q. wislizeni*, en EUA 225 especies (Smith et al., 2009).

Aunque sabemos poco de la simbiosis entre los HEM y las raíces de los encinos mexicanos (Varela y Estrada-Torres, 1997, Morris et al., 2008), la alta diversidad podría estar atribuida a distintos factores como son el particionamiento del nicho (Dickie et al., 2002 en Morris et al., 2008b), la calidad del hábitat (Tedersoo et al., 2006), la sucesión (Twieg et al., 2007 en Morris et al., 2008b), el hospedero ectomicorrízico (Tederso et al., 2006, Ishida et al., 2007) y la interacción entre especies (Bruns, 1995). En el caso de este estudio los bosques de encino en la Cuenca de Cuitzeo no son monoespecíficos, y poseen especies de *Quercus* distintas (*Quercus deserticola*, *Q. castanea*, *Q. obtusata*, *Q. magnolifolia*, *Q. rugosa* y *Q. laeta*) lo que podría promover el mantenimiento de la diversidad de HEM. En este trabajo se genera evidencia de que estos bosques son un ecosistema diverso en HEM. Este hecho corrobora la primer hipótesis propuesta.

Otro dato que nos habla de la diversidad de hongos asociados a los encinos es el obtenido por los MOTUs no ectomicorrízicos en la Cuenca de Cuitzeo, que aunque

claramente no son el objeto de estudio en esta tesis, se obtuvieron al generar las secuencias de los ápices de las raíces, en donde se contempla un total de 187 MOTUs con 17 especies no reportadas previamente como ectomicorrízicas que representarían el 9% del total de MOTUs, es probable que en la mayoría de los trabajos de HEM estos datos sean descartados por lo que no aparecen en las publicaciones. Sin embargo, esta información también habla de las interacciones que las especies están experimentando en las raíces y es importante retomarla para tener un punto de referencia. Por ejemplo Morris et al. (2008b) reportaron nueve especies no ectomicorrízicas, lo que representó el 16.9% de la diversidad total encontrada en las micorrizas de un individuo de *Quercus crassifolia* en Guerrero, México.

Los estimadores Jackknife 1 y Chao 1 sugieren que es posible obtener entre 170 y 297 especies. Adicionalmente, las curvas de rarefacción de especies indican que todavía falta mucho por muestrear de la comunidad. Para lograr conocer el resto de la diversidad se puede hacer un esfuerzo en dos frentes, en campo y en laboratorio. En campo los resultados hacen pensar que podrían explorarse distintas condiciones que permitan capturar una diversidad más apegada a la real, el muestreo podría mejorar intensificándose, abarcando distintas temporadas, distintas profundidades de los horizontes del suelo, añadiendo la recolecta e identificación de cuerpos fructíferos, esporas o identificando molecularmente el micelio. Adicionalmente, en el laboratorio podría hacerse un esfuerzo extra para al obtener una doble banda, separarla, o al obtener una banda débil cambiar las condiciones de amplificación para mejorar la nitidez de la misma, indicando mejoras en la amplificación y con ello lograr secuenciar la muestra, o incluso probar iniciadores distintos en las muestras problemáticas. Una estrategia distinta podría ser la secuenciación de ADN total de suelo, la secuenciación independiente de la PCR, o la utilización de secuenciación de nueva generación. Este conjunto de soluciones podrían definitivamente dar un mejor estimador del número de especies. Sin embargo la tendencia en los estudios de este tipo, con muestras ambientales, es la de no obtener la diversidad real sino solo una fracción de ella.

Análisis de rarefacción

La curva de rarefacción para los datos de la Cuenca de Cuitzeo indica que el esfuerzo de muestreo fue insuficiente para caracterizar completamente la composición de especies asociadas a encinos. Tedersoo et al. (2006) plantean esto como un caso típico de ecosistemas templados, proponiendo que el muestreo en estos ecosistemas

probablemente nunca ha alcanzado la mitad de las especies de la comunidad de HEM debido a la pobre resolución del uso de especie cuando se utilizan técnicas de identificación controversiales y a un esfuerzo de muestreo insuficiente, por lo que la mayoría de las especies raras continúan por debajo del límite de detección; este hecho también se ha discutido en Peay et al. (2008) quienes mencionan que a pesar de los esfuerzos de muestreo hay proyectos de secuenciación del suelo a gran escala que no han logrado llegar a las estimaciones asintóticas de riqueza fúngica (O'Brien et al., 2005, Fierer et al., 2007) y concluyen que las especies documentadas en el estudio parecen ser sólo una pequeña fracción del total de las mismas, a pesar de los esfuerzos de muestreo. Estos dos argumentos refuerzan la idea de que en la Cuenca de Cuitzeo hay una gran diversidad de HEM, por lo que en proyectos futuros deberá aumentarse el esfuerzo de muestreo. Es probable que el ciclo de vida de los hongos también tenga que ver en los resultados de diversidad que se obtienen, es decir que es importante tomar en cuenta de qué forma y en qué momento se capte a qué etapa del ciclo de vida de un hongo, y esto también nos lleva a la selección de las técnicas de estudio de los mismos las cuales influyen en captar la diversidad.

Distribución de la riqueza de especies entre sitios

A partir de las muestras tomadas para las dos zonas, la que presentó mayor diversidad fue la de Águila con 119 respecto a Icuacato con 99, el sitio que presentó la riqueza de especies más alta fue Águila 1 con 83 especies, seguido de Icuacato 2 con 66 especies, Águila 2 presentó 36 especies y finalmente Icuacato 1 sólo 33 de las mismas.

Como se ve, la distribución de la riqueza de especies no es equitativa entre los sitios y esto puede deberse a la eficiencia de amplificación y secuenciación que presentó cada conjunto de datos por sitio, que aunque se muestrearon de la misma forma, la eficiencia fue menor en aquellos en donde se reportó menor riqueza de especies, ya que mientras en Águila 1 se secuenciaron 224 micorrizas, en Icuacato 2 fueron 172 micorrizas, en Águila 2 se secuenciaron 108 de éstas, y en Icuacato 1 sólo 52.

Es probable que las diferencias de diversidad entre especies puedan atribuirse al esfuerzo de muestreo inequitativo, pero se ha sugerido (Tedersoo et al., 2006) que la calidad del hábitat puede estar jugando un rol sustancial influenciando la frecuencia y la abundancia de las especies dominantes, se conjetura que un conjunto diverso de hábitats y hospederos probablemente contribuyen a una alta riqueza de especies en un sitio de estudio determinado.

8.2 La estructura de la comunidad

En este trabajo la estructura de la comunidad estuvo conformada por un grupo reducido de especies dominantes con abundancias altas, y un grupo amplio de especies raras con abundancias bajas, de estas últimas el 48% de las especies estuvieron representadas por un sólo MOTU, es decir una única micorriza, patrón que es común en las comunidades de HEM (Horton y Bruns, 2001, Taylor, 2002, Smith et al., 2002, Walker et al., 2005, Walker et al., 2008, Wang y Gou, 2010, Wang et al., 2011).

Los 170 MOTUs de la comunidad obtenidos en la cuenca se repartieron en dos phyla, 38 fueron Ascomycota y 132 Basidiomycota, en conjunto correspondieron a 22 familias en los casos en los que la identificación permitió obtener esta información. Las más abundantes fueron Russulaceae, Sebacinaceae Thelephoraceae, Inocybaceae y Pyronemataceae, las primeras cuatro han sido frecuentemente reportadas como familias abundantes en otros bosques de encino (Smith et al., 2007, Courty et al., 2008, Walker et al., 2008, Morris et al., 2009, Jumpponen et al., 2010 y Wang et al., 2012). Sin embargo, en el presente estudio la familia Pyronemataceae resultó abundante en cuanto al número de micorrizas por MOTU, con 32 en total, aunque sólo estuvo representada por el género, *Genea*, con siete especies, de las que sólo pudo identificarse a nivel específico a *Genea papillosa*, las otras seis especies presentaron similitudes genéticas menores al 97% cuando se compararon con las bases de datos del Genbank.

Aunque en algunos trabajos se reporta a la familia Pyronemataceae como diversa o abundante, poco se discute la importancia de esta observación, por ejemplo una especie de la familia Pyronemataceae ha sido reportada como presente hasta en el 56% de las parcelas de un estudio realizado en un prado arbolado de Estonia (Tedersoo et al., 2006), también se señala, como particularmente diversa con 17 especies en asociación a *Quercus douglasii* en Smith et al. (2007b), y como frecuente en *Q. wislizeni* y *Quercus douglasii* en California en Morris et al. (2008a). Fue reportada como dominante en especial con el HEM *Wilcoxina* sp. en un bosque de pino (*Pinus thunbergii*) en Japón observándose en las raíces de *Epipactis helleborine* una orquídea micoheterotrófica de muy amplia distribución en donde los simbiontes fúngicos juegan un papel importante en el establecimiento de la orquídea (Ogura-Tsujita y Yukawa, 2008).

En especial los HEM dentro de Pyronemataceae parecen parcialmente adaptados a los ambientes ásperos siendo abundantes en las raíces en bosques de gran altitud, estacionalmente secos (Bidartondo et al., 2001, Izzo et al., 2005a) y en varios tipos de

bosque después de un incendio (Warcup 1990a, Grogan et al., 2000, Fujimura et al., 2005, Smith et al., 2006).

Dentro de Pyronemataceae de hábitos epigeos (por ejemplo: *Wilcoxina*, *Sphaerosporella*) e hipogeos (por ejemplo: *Genea*, *Genabea*, *Myrmecocystis*, *Geopora cooperi*) se ha reportado que el género *Genea* forma ectomicorrizas con plantas leñosas y tiene una amplia variedad de simbiontes ectomicorrízicos incluyendo *Quercus*, *Larix*, *Pinus*, *Tsuga*, *Abies*, *Pseudotsuga*, *Betula*, *Fagus*, *Carpinus*, *Cistus*, *Nothofagus*, *Lithocarpus* y *Corylus* (Ceruti et al., 1967, Fontana y Centrella, 1967, Froidevaux, 1977, Stewart y Heblack, 1979, Kropp y Trappe, 1982, Zhang, 1991, Alvarez et al., 1993, Smith et al., 2006). *Genea* se caracteriza porque sus ascomas producen compuestos aromáticos volátiles en la madurez, lo que sugiere la dependencia de animales que realizan micofagia para la dispersión de esporas (Parques, 1921, Maser et al., 1978, Smith et al., 2006). Aunque el género *Genea* ha sido considerado ectomicorrízico (Fontana y Centrella, 1967, Smith et al., 2006), sólo recientemente se ha confirmado como simbionte ectomicorrízico por la secuenciación de la región del ITS de raíces colonizadas (Izzo et al., 2005b, Tedersoo et al., 2006). Cuando se estudió la comunidad de HEM asociados a suelos serpentinos y no serpentinos asociados a *Quercus garryana* en Oregon se encontró a *Genea harknessii* como una de las seis micorrizas más abundantes y frecuentes (Moser et al., 2009) y *Genea* también estuvo presente en bosques dominados por *Quercus suber* de la cuenca mediterránea de Portugal (Azul et al., 2010).

En el estudio realizado por Smith et al. (2006) se combinan los datos morfológicos y moleculares obtenidos a partir de colecciones de campo y especímenes de herbario para aclarar la situación taxonómica y justificar el hábito ectomicorrízico en varias especies de *Genea* y *Genabea*, verificando el estado ectomicorrízico con *Quercus* spp. haciendo coincidir sus secuencias de ascomas con las de ectomicorrizas. Se menciona que son géneros que sorprendentemente no se han encontrado con más frecuencia en las raíces en estudios de comunidades de HEM y que es posible que *Genea* y *Genabea* han sido pasadas por alto en el pasado porque, si bien son comunes en muchos núcleos de raíz, no son abundantes en cualquier núcleo dado. *Genea* y *Genabea* estuvieron presentes en más del 35% de los núcleos de las raíces, pero sólo representaron el 3.2% de todos los clones seleccionados con RFLP.

Comparando este resultado con los datos aquí presentados, para el caso del género *Genea* este tuvo una abundancia un poco mayor siendo del 5.7%. En Smith et al. (2006)

se menciona que es probable que los pocos reportes de este género en las comunidades de HEM se deba a que los métodos de investigación son más eficaces en la detección de hongos Basidiomycota epigeos e hipogeos que en Ascomycota. Muchos estudios identifican los HEM a partir de ápices de raíces individuales utilizando RFLP que hacen coincidir con los patrones de los cuerpos fructíferos, pero los hongos hipogeos y epigeos ectomicorrízicos Ascomycota están insuficientemente representados en los RFLP y en las secuencias de bases de datos públicas (Izzo et al., 2005b, M. Smith comentario personal). Además señalan que Ascomycota tiene hifas menos eminentes y rara vez producen rizomorfos (Danielson 1984, Berndt et al., 1990, Warcup, 1990a, Smith y Lee, 1997, Smith et al., 2006). Esto significa que los HEM Ascomycota probablemente contienen menos cantidad de rADN que los Basidiomycota, por lo tanto podrían ser más difíciles de amplificar por medio de PCR, por lo que se hacen recomendaciones metodológicas para aumentar la detección de los HEM de Ascomycota. Además sugieren que *Genea* y *Genabea* son más abundantes y diversos como simbiontes ectomicorrízicos de *Quercus* en California. Los estudios morfológicos de ascomas recolectados en campo y especímenes de herbario revelaron inesperadamente una alta diversidad de *Genea* y *Genabea*, la secuenciación del ITS del rADN detectó linajes crípticos obtenidos a partir de micorrizas. Atribuyen la diversidad oculta a varios factores como: la producción de ascomas irregular en el clima mediterráneo del lugar, el pequeño número de caracteres morfológicos medibles y el tamaño pequeño, la coloración oscura y el hábito hipógeo de la fructificación de *Genea* y *Genabea*, y concluyen que ocho de las 36 especies reconocidas de *Genea*, *Genabea* y *Gilkeya* se reproducen en California, por lo que argumentan que posiblemente el oeste de América del Norte podría ser un “hot spot” de la diversidad del grupo de hipogeos de Pyronemataceae. Sin embargo, proponen como explicación alternativa, que los hábitats estacionalmente secos, como los bosques de roble de esta región, podrían albergar una gran cantidad de hongos poco visibles, adaptados a la sequía, que aún permanecen desconocidos para la ciencia. Cualquiera que sea el caso, sugieren que el uso exitoso de las técnicas morfológicas y moleculares será imprescindible para detectar y comprender la diversidad de hongos crípticos en el futuro.

Los argumentos presentados anteriormente y los datos presentados en este trabajo sugieren que *Genea* es un género diverso, que se asocia fuertemente con encinos, lo que parece respaldar la hipótesis de que la zona de Norte América desde California hasta Michoacán (y podría ser que incluso en localidades más al sur que permanecen sin ser

muestreadas) podría ser un centro de diversificación del género *Genea*. El hecho de que esté no sea un grupo importante dentro de la comunidad de HEM encontrada en Taxco Guerrero en un bosque humedo por Morris et al. (2009) podría indicarnos que este género se presenta en localidades con climas secos, mediterráneos o de transición como se da en la Cuenca de Cuitzéo en donde el clima va de templado-seco al templado-húmedo (Carlón et al., 2009).

Otros ascomicetes importantes dentro de la comunidad de HEM fueron *Pachyphloeus* y *Tuber* que representaron un porcentaje importante de la misma, *Pachyphloeus* fue el sexto género mejor representado con 19 micorrizas (3.4%) y *Tuber* el décimo con 8 micorrizas (1.4%), incluso *Pachyphloeus* sp. 1 fue la cuarta especie más abundante con 9 micorrizas en la zona del Águila.

En el caso de los taxa del género *Tuber* que también han sido reportados como importantes miembros de la comunidad en algunos trabajos de HEM de encinos, el género en este estudio sólo se presentó como *Tuber castilloi* con siete micorrizas repartidas en dos sitios y *Tuber separans* con una micorriza en otro sitio, aunque el género estuvo presente en tres de los cuatro sitios, su abundancia no fué particularmente alta (1.4%), mientras que como ya se dijo, en algunos estudios ha sido reportada como especie dominante (Valentine et al., 2004, Walker et al., 2005, Mosser et al., 2009, Morris et al., 2009, Garibay-Orijel et al., 2013).

Un grupo interesante identificado en la comunidad estudiada fue el del género *Pachyphloeus*, que presentó nueve taxa utilizando el criterio de similitud genética del 97%, representó el 3.4% de la abundancia de micorrizas y el 5.29% de las especies totales, pese a no ser cifras muy altas, el total de especies reportadas para el mundo es de 12, aunque en la base de datos del NCBI existen algunas otras muestras ambientales identificadas sólo a nivel genérico. Otro aspecto interesante es que sólo *Pachyphloeus citrinus* y *Pachyphloeus virescens*, pudieron ser identificados con epíteto específico, aunque algunos de nuestros MOTUs se emparejaron con similitudes altas, en las bases de datos el nombre asignado al mejor empate y secuencias más similares, sólo aportó información del género, a pesar de ser un voucher (en el caso del mejor empate). Por lo que este trabajo genera evidencia de que este género está fuertemente asociado a encinos mexicanos, en especial a encinos presentes en la Cuenca de Cuitzeo. Sin embargo es posible que el umbral de delimitación de especie (97%) no sea útil en este género o que la región utilizada (empleando los iniciadores ITS1F-ITS4) no aporte la resolución necesaria para identificar a nivel específico, es decir que exista demasiada

variación en la región de los ITS entre la especie y que estemos obteniendo dos MOTUs que en realidad son una misma especie, sin embargo al comparar las secuencias de esta tesis contra vouchers esta hipótesis es poco probable, a no ser que también existan huecos en la identificación morfológica en donde las claves tengan problemas en la identificación y delimitación del género. Esta información no se ha generado aún, pero está en proceso de generarse y es justamente el grupo de Rosanne Healy quienes han estudiado este tema y escrito el único trabajo que existe sobre el género *Pachyphloeus* (Healy et al., 2009) en donde a partir de ejemplares recolectados en áreas de Estados Unidos y México, hacen un análisis molecular en el que aparecen cuatro clados fuertemente soportados por la prueba de bootstrap, dos de ellos incluyen especies recolectadas en México e Iowa, una de estas especies se describe como nueva y se distingue de otras especies de *Pachyphloeus* por la combinación de colores en el peridio que va del rojizo al café y recibe el nombre de *Pachyphloeus marroninus*. Cabe destacar que en éste análisis se muestra la estrecha relación entre las especies de Iowa y las mexicanas, el clado está bien soportado, pero la variación entre secuencias podría estar indicando un complejo de especies crípticas.

Existen 14 nombres reportados en el Index Fungorum y 13 para MycoBank, para *Pachyphloeus*, sin embargo Healy et al., reportaron en 2009 que el género contiene 12 especies descritas y una variedad (*P. austro-oregonensis*, *P. carneus*, *P. citrinus*, *P. conglomeratus*, *P. lateritius*, *P. ligericus*, *P. macrosporus*, *P. melanoxanthus*, *P. melanoxanthus* var. *xanthocarnosus*, *P. prieguensis*, *P. saccardoi*, *P. thysellii*, y *P. virescens*), y que los sitios sin estudios de hongos hipógeos en Iowa de los años 1997 hasta el 2000 revelaban especies no descritas anteriormente (Healy 2002, 2003 y datos no publicados). Algunos ejemplares de México analizados a partir de 1970 al 2008 produjeron muchos nuevos registros y especies sin describir (Trappe y Guzmán, 1971, Hosford y Trappe, 1980, Cázares et al., 1992, y datos sin publicar, Healy et al., 2009). Se muestra que además las comparaciones morfológicas y moleculares entre las colecciones similares de *Pachyphloeus* de Iowa y México indicaron que algunas de las especies no descritas estaban estrechamente relacionadas, la primera de esas especies: *Pachyphloeus marroninus*, se describe en el trabajo de Healy et al. (2009).

Los análisis filogenéticos y la revisión de ejemplares mostraron que algunos nombres del género han sido mal aplicados y la agrupación en los clados reveló diversidad que podría mostrar más especies de las que hasta ahora se han contemplado. Otro aspecto interesante es que en el Clado 2 donde se encuentra la especie *Pachyphloeus*

marroninus, existen diferencias ligeras en las secuencias provenientes de las colecciones mexicanas con las de Iowa, lo que hizo que los autores pusieran un especial cuidado en las diferencias morfológicas, los resultados indicaron que había diferencias en las esporas y los colores del peridio, que sugieren podría tratarse de un complejo de especies crípticas que requieren análisis de colecciones adicionales.

Los autores concluyen diciendo que “solo aquellos que buscan trufas las encuentran” y que en general los sitios de recolección de especies pueden encontrarse geográficamente distantes, sin embargo destacan que son los encinos el tipo de árboles que se asocian más frecuentemente a las especies del género *Pachyphloeus* (Fogel y States, 2002, Montecchi y Sarasini, 2000) y son de hecho las especies de árboles predominantes para las colecciones de Iowa y México.

Adicionalmente se señala en Frank et al. (2006) quienes demostraron la relación micorrízica entre *P. austro-oregonensis* con *Quercus garryana* y encontraron ADN de estas especies en las heces de ratones *Peromyscus maniculatus*, el hecho que ha sugerido que debido a la amplia distribución de esta especie de ratón, que abarca los bosques y praderas de Canadá y México Central, éste podría ser el principal modo de dispersión de la trufa a través de la micofagia (Trappe y Claridge, 2005 en Frank et al., 2006). Por último Healy et al. (2009) indican que la trufa *P. marroninus* existe en bosques de robles de Iowa y México, aunque mencionan que faltan datos de los bosques entre los sitios de recolección debido a la falta de búsqueda de los mismos. Estos autores destacan que los encinos se extienden de forma contigua desde Canadá hasta México, e incluso las comunidades de roble discontinuas en México son remanentes de bosques más extensos del Terciario y el Cuaternario (Valiente-Banuet et al., 2006, Healy et al., 2009). De ahí que la actual distribución discontinua de *P. marroninus* probablemente sea un reflejo de una distribución históricamente continua. Por otra parte, el transporte de portadores de esporas por pequeños mamíferos que son cazados por aves rapaces podría ser el factor responsable de la dispersión a larga distancia entre los bosques de encino separados por barreras geográficas más marcadas (Trappe y Claridge, 2005 en Frank et al., 2006 y en Healy et al., 2009).

Es interesante que en la Cuenca de Cuitzeo tanto el género *Pachyphloeus* como la familia Pyronemataceae la cual fue importante en la comunidad por el género *Genea*, pertenecen al orden Pezizales el cual en general ha reportado un número bajo de HEM en estudios de comunidades en términos de diversidad y biomasa (Avis et al., 2003, Richard et al., 2005, Walker et al., 2005) y en algunos de ellos se ha sugerido que los

HEM del orden Pezizales son poco frecuentes en bosques no perturbados, pero que se adaptan bien a ambientes extremos xerófilos y que proliferan después de perturbaciones (Warcup, 1990, Taylor y Bruns, 1999, Horton y Bruns, 2001, Fujimura et al., 2005).

En general el reconocimiento de los taxa de Ascomycota como importantes en las comunidades de HEM se ha incrementado (Tedersoo et al., 2006, Smith et al., 2007b, Morris et al., 2008a) lo que coincide con lo reportado en este trabajo que también demuestra la importancia de la familia Pyronemataceae, y la aporta evidencia que sugiere que no solo es diversa sino que juega un rol ecológico relevante en el ecosistema (Morris et al., 2008a).

Adicionalmente los resultados de nuestro trabajo podrían estar apuntando más hacia la hipótesis de que América del Norte podría ser un sitio de alta diversificación para la familia Pyronemataceae ya que en la Cuenca de Cuitzeo se reportó una riqueza de ocho MOTUs y la cuarta abundancia más alta en la comunidad de HEM, y cabe destacar que la región presenta una transición del clima templado-seco al templado-húmedo, con una precipitación promedio de 1000 mm aproximadamente y temperatura media anual de 15° C (Carlón et al., 2009), lo que disminuye las probabilidades de validación de la hipótesis alternativa propuesta por Smith et al. (2006).

Por otra parte la especie más abundante de la comunidad fue *Sebacina* sp. 1 la cual estuvo presente en las dos zonas de estudio y en todos los sitios, la asignación taxonómica se realizó utilizando como primera referencia el número de acceso AF465191 *Sebacina* sp. F6 con quien tuvo una similitud genética de 90.9% y un valor de e igual a cero y un puntaje total de 891.2 (como se muestra en el Cuadro 24 de los resultados), el autor que registró la secuencia es M. Selosse y el título del proyecto fue Sebacinoides simbioses de *Neottia nidus-avis* (de la familia de orquidáceas) aunque este trabajo no está publicado. La secuencia fue obtenida directamente a partir de tejido de carpóforo colectado del bosque de Belleme Fancia, y presentó la mayor similitud genética cuando se utilizó un filtro para discriminar los vouchers de las muestras ambientales. Ahora bien cuando se retiró el filtro en la búsqueda, la secuencia más parecida coincide en un 98%, con un valor de e de cero y un puntaje total de 1155, esta secuencia proviene de micorrizas asociadas a *Hexalectris spicata* (que pertenece a Orchidiaceae), este trabajo es de Kennedy et al. (2011) (como se muestra en el Cuadro 28), en el mismo porcentaje de similitud que la anterior, encontramos una secuencia con el número de acceso KC965241, aislada a partir de suelo del Ártico de Norte América, posteriormente con un 97.5% de similitud genética encontramos a una secuencia

obtenida de micorrizas de *Salix arctica* una especie circunpolar, en Canadá por Timling et al. (2012), posteriormente con un 97% de similitud aparece una secuencia obtenida por Morris et al. (2009) proveniente de micorrizas de *Quercus crassifolia* y *Quercus laurina* de Guerrero México. A partir de este punto las secuencias de las bases de datos comienzan a disminuir en similitud y con 95% se encuentra una *Sebacina* asociada a *Hexalectris arizonica* secuenciada a partir de la micorriza por Kenedy et al. (2011), y finalmente encontramos dos secuencias provenientes de Alemania, la primera asociada a *Dryas octopetala* (FJ792845) obtenida por Weiss et al. (2012) y la segunda asociada a *Fagus sylvatica* (KF498578) ambas obtenidas a partir de micorrizas. Algunos trabajos reportan que las especies de Sebacinaceae son comunes para los bosques caducifolios y mixtos de América del Norte y Europa (Avis et al., 2003, Weiß et al., 2004, Richard et al., 2005), y este fenómeno coincide con el encontrado en términos generales para la comunidad de la Cuenca de Cuitzeo, destaca que esta zona es rica en orquídeas, estas han sido reportadas como plantas que comúnmente se encuentran en bosques muy arbolados y que se asocian a esta familia de HEM en particular (Kukk y Kull, 1997).

Es interesante que secuencias muy similares se hayan encontrado en hospederos tan diferentes como las *Quercus*, *Salix*, *Hexalectris* y *Fagus*, Weiß et al. (2011) y Selosse et al. (2009), han demostrado que los Sebacinales además de ser ectomicorrízicos son endófitos ubicuos en un gran número de plantas.

En el Cuadro 28 a continuación se muestra la información de las secuencias más similares genéticamente encontradas utilizando el algoritmo de búsqueda BAST en la base de datos del NCBI incluyendo a las muestras ambientales.

Cuadro 28. Similitud genética de los MOTUs más cercanos a *Sebacina* sp. 1 en las bases de datos.

| % de similitud genética | Valor de E | % de cobertura | Valoración total | Número de acceso | Hospedero | Notas | Ubicación geográfica | Artículo y autores | Nombre del proyecto | Publicado |
|-------------------------|------------|----------------|------------------|------------------|--|--------------------|----------------------------------|--|--|------------------------------------|
| 98 | 0 | 96 | 1155 | HQ667869 | <i>Hexalectris spicata</i> Orchidaceae: Epidendroideae | - | Norte de México y Estados Unidos | Kennedy A.H., Taylor D.L. y Watson L.E. | Mycorrhizal specificity in the fully mycoheterotrophic <i>Hexalectris</i> Raf. (Orchidaceae: Epidendroideae) | 2011.Mol. Ecol. 20 (6), 1303-1316. |
| 98 | 0 | 96 | 1146 | KC965241 | - | Aislado de suelo | Artico de América del Norte | Timling I. y Taylor D.L. | Soil fungal communities of zonal patterned-ground ecosystems across the North American Arctic | Sometido 23-abril-2013 |
| 97.5 | 0 | 86 | 1024 | JX630924 | <i>Salix arctica</i> | Canada: Albert Bay | Artico de América del Norte | Timling I., Dahlberg A., Walker D.A., Gardes M., Charcosset J.Y. Welker J.M. y Taylor,D.L. | Distribution and drivers of ectomycorrhizal fungal communities across the North American Arctic | 2012. Ecosphere 3 (11), 111. |
| 97 | 0 | 86 | 1024 | FJ196970 | <i>Quercus</i> | - | Mexico: Guerrero | Morris M.H., Perez M.A., Smith M.E. y Bledsoe | Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with | 2009. FEMS Microbiol. Ecol. |

| | | | | | | | | | | |
|----|---|-----|------|----------|------------------------------|--|---|---|--|-------------------------------------|
| | | | | | | | | C.S. | two co-occurring oaks (<i>Quercus</i> spp.) in a tropical cloud forest | |
| 95 | 0 | 95 | 1027 | HQ667842 | <i>Hexalectris arizonica</i> | - | - | Kennedy A.H., Taylor D.L. y Watson L.E. | Mycorrhizal specificity in the fully mycoheterotrophic <i>Hexalectris</i> Raf. (Orchidaceae: Epidendroideae) | 2011. Mol. Ecol. 20 (6), 1303-1316. |
| 94 | 0 | 99 | 1007 | FJ792845 | <i>Dryas octopetala</i> | Muestra ambiental Sebacina micobionte de <i>Dryas octopetala</i> | Tübingen, Alemania | Weiss M., Sykorova Z., Garnica S., Riess K., Martos F., Krause C., Oberwinkler F., Bauer R. y Redecker D. | Sebacinales Everywhere: Previously Overlooked Ubiquitous Fungal Endophytes | 2011.PLoS ONE 6 (2) |
| 93 | 0 | 100 | 998 | KF498578 | <i>Fagus sylvatica</i> | Obtenido de raíces finas | De un bosque en Alemania enTuttlingen, Swabian Jura | Leberecht M. y Polle A. | Local microbial communities influence nitrogen uptake of European beech (<i>Fagus sylvatica</i>) | No publicado |

El hecho de que este MOTU solo se haya logrado identificar a nivel de género, podría indicar que esta y otras especies podrían constituir taxa sin describir, es decir nuevos para la ciencia, hecho que destaca la inminente y clara importancia que tienen las especies de hongos anamórficos o con fructificaciones no evidentes en estos ecosistemas (Garibay-Orijel et al., 2013), además se ha sugerido que la familia Sebacinaceae puede tener una alta diversidad críptica (Tedersoo et al., 2006). La segunda especie más abundante fué *Sebacina epigaea complex* sp. 1 presente en tres sitios, es interesante que este MOTU se destaca además de por su abundancia, y buena distribución en nuestra zona de estudio, por estar presente en otras comunidades del mundo como son la reportada por Wang et al. (2011) en China donde la vegetación estuvo dominada por *Quercus liaotungensis* y en Norte América por Palmer et al. (2008) esta última obtenida a partir de plantaciones de *Castanea dentata*, *Quercus* spp. y otras especies, con un análisis como el que se propone en esta tesis que fue el de MOTUs compartidos el cual se discute más adelante, puede obtenerse información tan relevante como lo es la distribución de una especie que en esta comunidad es importante, y aunque esta información es limitada a los estudios de HEM generados en el mundo, y con los que se compara nuestra comunidad, puede dar pistas de la distribución y asociaciones a los hospederos. En el caso del complejo *Sebacina epigaea complex* sp. 1 podemos asumir que se distribuye tanto en China, como en Norte América y Michoacán, México. Cabe destacar que el trabajo de Palmer et al. (2008) se añadió al análisis porque al revisar las bases de datos y dar nombres a los MOTUs, aparecieron algunas coincidencias con este trabajo que aunque no es sobre una comunidad dominada por *Quercus* spp. sino por *Castanea dentata* se registraron estas observaciones que motivaron al análisis posterior, análisis que efectivamente reveló coincidencias como esta.

Por último, en este tema encontramos que la especie que tuvo el tercer lugar en la abundancia fue *Russula* aff. *curtipes* la cual se localizó solo en el sitio Águila 2.

Las especies más abundantes reportadas en este trabajo no coinciden con algunas de las señaladas en otros estudios de HEM asociadas a encinos, ya que por ejemplo en bosques de encino en condiciones “naturales” se encontró a *Cenococcum geophilum* ubicuamente presente en la representación de la diversidad de bosques maduros en los Apalaches (Walker et al., 2005, Walker et al., 2008), y a través de los horizontes del suelo en un bosque templado, como una de las cuatro especies más abundantes (Courty et al., 2008), y como la especie dominante en bosques de *Quercus* de diferentes edades

(Richard et al., 2005, He et al., 2007, Wang et al., 2012). En Jumpponen et al. (2010) se ha dicho que el género *Quercus* se caracteriza por asociarse con *C. geophilum* en abundancias altas, pero el complejo de especies *C. geophilum* es mucho más frecuentemente encontrado en condiciones de estrés como se reporta en las siguientes situaciones en bosques de encino: asociado a zonas en recuperación de minería (Gebhardt et al., 2007), en sitios con suelos serpentinos y no serpentinos, ricos en hierro, magnesio y metales pesados (Moser et al., 2009), en bosques donde se experimentó con adición de nitrógeno (Avis et al., 2003), donde hubo fuegos (de Román y de Miguel, 2005), en algunas condiciones de uso de suelo y sequías (Azúl et al., 2010), en encinos de sabana con cobertura discontinua (Valentine et al., 2004, Dickie et al., 2009). Adicionalmente Dickie et al. (2009) reportaron que los encinos de sabana soportan una comunidad ectomicorrízica única altamente diversa en ascomicetes dominando *Cenococcum geophilum*, a comparación de la de los encinos de bosques adyacentes, en donde la ausencia de fuegos ha mantenido el bosque. Paralelamente este fenómeno ha sido detectado también en *Pinus montezumae* por Reverchon y colaboradores (2010) quienes encontraron a *C. geophilum* en el sitio más joven de una cronosecuencia volcánica dominada por *Pinus montezumae*, en donde se presentó una baja capacidad de retención de agua, y en Tedersoo et al. (2006) quienes también lo encontraron como dominado en un prado arbolado con cuyo suelo presentaba poca materia orgánica y condiciones de desecación.

Estos resultados en conjunto pueden deberse a que el complejo de especies *C. geophilum* está especialmente adaptado para colonizar sitios con condiciones estresantes, en especial de sequía, ya que posee paredes celulares gruesas y melanizadas, (di Pietro et al., 2007), ya que la melanina cumple la función de proteger al hongo contra las condiciones de estrés medioambiental incluida la desecación (Butler y Day, 1998), por lo que este complejo de especies juega un papel muy importante en ecosistemas forestales sometidos a estrés o sequía (Wu et al., 2005, Corrêa y Martins-Loução, 2011). Sin embargo, en la comunidad de HEM de la Cuenca de Cuitzeo sólo se encontró a la especie *C. geophilum* en un sitio (Aguila 1) con una sola micorriza, por lo que es probable que los bosques asociados a encinos en esta área en particular, en donde los sitios muestreados se encuentran en algún grado de conservación amortigüen el efecto dominante de *C. geophilum*, repartiendo la dominancia en otras especies, adicionalmente la alta diversidad de HEM presentada en la zona sugiere que los sitios

de la Cuenca no están perturbados y la cobertura vegetal cumpla la importante función de reducir la desecación.

La composición de especies entre zonas y sitios

Es interesante que dentro de las zonas de estudio Águila e Icuacato en la Cuenca de Cuitzeo existe mucha heterogeneidad en cuanto a la composición de especies, ya que sólo se comparten 29 MOTUs, de un total de 170 identificados en la comunidad. Esto puede deberse a las distintas condiciones ambientales que se dan en cada zona que favorecen o perjudican el desarrollo de determinadas especies, a la variación entre sitios, indicando la importancia del hábitat y a la existencia de procesos locales. Esto ha sido mencionado por Tedersoo et al. (2012) y Morris et al. (2008a) quienes han atribuido la heterogeneidad en la composición de especies a la distancia entre localidades y factores de micronicho como lo son las condiciones ambientales que provee un determinado hospedero lo que afecta el entorno y el suelo. Morris et al. (2008a) sugieren que las comunidades de *Q. wislizeni* y *Q. douglasii* podrían estar difiriendo entre sí por la influencia que ejerce el hospedero (en la generación de las condiciones ambientales variables) en la comunidad de HEM, y como primer factor por las distintas concentraciones de P extraíble presente en el suelo que podría estar creando nichos para las distintas especies de hongos, cabe destacar que en este caso las comunidades estudiadas que se compararon eran de un sitio con *Quercus* deciduos (*Q. wislizeni*) y de hoja perene (*Q. douglasii*), lo que genera situaciones contrastantes. Pero mencionan que aún no está claro cómo estos factores pudieran estar relacionados, sin embargo la investigación muestra diferencias significativas en las comunidades de HEM en dos especies de árboles congéneres, lo que indica que árboles filogenéticamente similares pueden crear nichos ecológicos distintos para los hongos.

La identificación y las bases de datos

La diversidad de hongos mexicanos ha sido poco estudiada desde el punto de vista de la aplicación de técnicas moleculares, por lo que al ingresar las secuencias en las bases de datos muchas veces no se puede llegar a una afiliación taxonómica específica, debido a la baja similitud genética que se obtiene con la secuencia con mayor identidad en GenBank. Este es el caso de 111 de los 170 MOTUs que se obtuvieron en este estudio como se muestra en la Figura 20 de los resultados, que al compararse obtuvieron similitudes genéticas por debajo del 97%. Adicionalmente la mayoría de los resultados

ahí existentes corresponden a secuencias europeas o norteamericanas, esto también dificulta la asignación de un nombre apropiado que coincida con las de la zona de toma de la muestra (García-Guzmán, 2009).

Por otra parte se ha discutido en Tedersoo et al. (2006) que la mayoría de las especies de Thelephoraceae y Sebacinaceae secuenciadas basadas en la región del ITS2 no corresponden a los cuerpos fructíferos, lo que sugiere una diversidad críptica alta en estas familias. Son precisamente estas las familias dominantes en la comunidad de HEM de la Cuenca de Cuitzeo.

Aunque actualmente el estudio de los HEM es cada vez más sofisticado y las bases de datos moleculares se están enriqueciendo con algunos trabajos recientes de ecología de comunidades de HEM en México (por ejemplo: Reverchon et al., 2012, Arguelles, 2013), tradicionalmente este grupo de hongos se ha estudiado por medio de las estructuras de reproducción sexual o esporomas, lo que ha sesgado el conocimiento de su biodiversidad, pues es justamente la estructura de la interacción la que debe ser evaluada, esto es la ectomicorriza (Garibay-Orijel et al., 2013). El uso de datos moleculares nos dan una enorme información sobre la ecología, distribución, afinidad al hospedero, y a medida que ésta se va completando aporta más datos interesantes, a pesar de esto es necesario que los datos se complementen con colecciones existentes así como con trabajos de caracterización de esporomas que muestren una gran diversidad incluyendo aquellos esporomas hipogeos o inconspicuos (Garibay-Orijel et al., 2013).

8.3 Similitudes genéticas

De la información obtenida en este estudio sólo el 34.7% de los MOTUs (59), presentó similitudes genéticas por arriba del umbral sugerido para delimitar a nivel de especie, mientras que el 65.3% (111 MOTUs) presentó similitudes menores a este límite. Sólo 30 MOTUs pudieron identificarse a nivel de especie, y 10 de ellos consisten en afinidades o complejos de especies, 6 de estas 30 taxa encontraron una secuencia genéticamente similar (por arriba del 97%) en la base de datos de Bold Systems, que precisamente alberga información de hongos de la zona. Esto por un lado demuestra la gran ventaja de generar información para cada sitio y por otro nos permite ver la falta de datos para el lugar, sin embargo aunque se sabe poco de la microbiota correspondiente a cada especie de encino, hay trabajos taxonómicos que sugieren que los hongos asociados a ellos son diversos (Smith et al., 2006) y en este trabajo se genera evidencia

que puede sugerir un alto número de endemismos (Morris et al., 2009, Smith et al., 2006), así como taxa nuevos para la ciencia en hongos anamórficos o con fructificaciones poco evidentes.

Cabe destacar que el umbral del 97% de similitud genética es un criterio de delimitación estándar establecido a priori, que aunque es conservador, puede subestimar la diversidad de algunos grupos y sobre estimar la de otros, esto lo convierte en conveniente pero controversial (Peay et al., 2008, Tedersoo et al., 2006) lo cual también sugiere que hay mucho trabajo por hacer respecto a mejorar este criterio para la delimitación de especies, en donde se produzca suficiente información para generar uno más apropiado para cada género, que nos permita descifrar la diversidad y mejorar los límites de delimitación de cada especie, por lo que se debe seguir haciendo taxonomía tradicional con esporomas, caracterización de micorrizas, esporas y aislados axénicos cuando sea posible, combinándolo con identificación molecular para así tener un panorama más completo y romper el paradigma de la identificación proponiendo nuevas especies usando uno o más de estos criterios.

A partir del análisis de similitud genética usando metadatos del primer “hit” comparando nuestras secuencias con muestras ambientales de la base de datos del GenBank, los resultados fueron que 48.8% (83) de los MOTUs presentaron similitudes genéticas menores al 97%, es decir, casi el 50% de los MOTUs de HEM asociados a encinos reportados para la Cuenca de Cuitzeo parecen no estar presentes en las bases de datos, factor que podría deberse a que estas están incompletas, pero que también podría indicar que son especies de hongos que no aparecen en Estados Unidos ni Europa, regiones en donde se conoce y se ha secuenciado gran parte de la diversidad de HEM. Aunque aún la distribución de estas especies “aparentemente endémicas” no se conoce, existe evidencia que señala que no han sido secuenciadas en otra parte del mundo, por lo que será deseable que futuros trabajos evalúen con este y otros métodos la región de endemismo de estos organismos.

Estos tipo de datos podrían ir constituyendo los valores de endemismo en hongos ectomicorrízicos, pues el valor del 48.8% presentado en este trabajo coincide con los reportados para plantas vasculares (40-60%), mamíferos (32%) y coníferas (60-70%) para México (SEMARNAT, 2014). Como ya se ha mencionado ampliamente en este trabajo un elemento importante a considerar es la definición del umbral de delimitación de especie que sería importante que se definiese para cada grupo.

La notable presencia de la familia Orchidaceae (17 casos) en el análisis de similitud usando muestras ambientales, puede deberse a que los bosques de encino suelen albergar una gran diversidad de orquídeas, y estas parecen estar conectadas a las redes ectomicorrízicas (Selosse et al., 2006) y por ello compartir con los encinos a los HEM.

Como se ve en el cuadro 25 de los resultados, la familia Fagaceae fue la que tubo un mayor número de representantes en el análisis de similitud usando muestras ambientales ya que 58 de los “hits” asociados a un MOTU de la comunidad de HEM de la Cuenca de Cuitzeo, se relacionó con un MOTU en la base de datos del GenBank, cuyo hospedero vegetal perteneció a la familia Fagaceae. Si sólo contemplamos a aquellos “hits” donde pudo asociarse al hospedero como el 100% (114), entonces el 50.8% (58) pertenecerían a aquellos asociados a algún hospedero de la familia Fagaceae (*Quercus*, *Castanea*, *Fagus* y *Lithocarpus*), esto refuerza la idea de la afinidad al hospedero expuesta en Murata et al. (2013).

Ahora bien, si sólo se analizan los datos de los “hits” que se asociaron bosques de especies de encino o mixtos que incluían encino, encontramos que el 61.2% es decir 30 de los caso la similitud es mayor al 97% mientras que sólo el 38.8% es decir 19 de los casos presentaron similitudes genéticas menores al 97%. Esta proporción está prácticamente invertida a la que se presenta cuando se analizan los datos de la similitud genética usando vouchers (65.3% obtuvo similitudes genéticas menores al 97%) y distinta a cuando se analizó comparando con secuencias ambientales (48.8% obtuvo similitudes genéticas menores al 97%). Estos datos sugieren que los HEM podrían tener una afinidad marcada a hospederos ectomicorrízicos del género *Quercus*, así como un alto nivel de endemismos, que en este caso podría ser un endemismo con correlación hospedero simbiote-hongo ectomicorrízico. No es irracional pensar que especies de HEM podrían haber especiado a la par que sus hospederos del género *Quercus* en México. Sería interesante hacer este tipo de análisis de manera más profunda en estudios futuros, en especial en México o Asia, ambos centros de diversificación del género *Quercus*.

8.4 MOTUs compartidos entre las comunidades

En ocasiones la comparación de los resultados de este trabajo con otros existentes sobre el género *Quercus* u otro hospedero ectomicorrízico se dificultó pues cada uno tiene un enfoque y un método en particular, lo cual repercute en los resultados obtenidos en

cuanto a la diversidad, a pesar de las diferencias metodológicas, el trabajo en donde hubo más especies compartidas fue el de Morris et al. (2009) con 22 taxa como se mostró en los Cuadros 25 y 26 de los resultados, es muy probable que esto se deba a que se comparten MOTUs distribuidos en la misma zona geográfica, que cambian mientras aumenta la distancia entre las localidades, y aumentan las barreras biogeográficas, este sitio es el más cercano geográficamente cuyo hospedero también son los encinos.

La segunda comunidad con la que se comparte un mayor número de taxa es la reportada por Smith et al. (2007b) ubicada en California, es probable que las especies que se estén compartiendo tengan una amplia distribución y que sean afines a *Quercus* o generalistas como se discutió en Smith et al. (2009).

El caso en donde se comparten siete especies, sucede con la comunidad asociada a un solo individuo de *Q. crassifolia* que se ubica en Guerrero México (Morris et al., 2008b), en donde para el número de datos reportados (44 taxa) se comparte un número de especies significativo que equivale al 15.9% del total de los MOTUs reportados para este sitio.

Uno de los casos más interesantes es el que ocurrió cuando se comparó la comunidad de la Cuenca de Cuitzeo con la reportada para el trabajo realizado por Wang et al. (2011) donde la especie dominante de un bosque de encinos en China fue *Quercus liaotungensi*, como se muestra en el Cuadro 26 de los resultados, un aspecto característico en este cruce de datos fue que 4 especies del género *Sebacina* coincidieron sugiriendo la importancia de las especies del mismo en los bosques de encino en el mundo, y aunque este tema está prácticamente inexplorado la presente evidencia sugiere que es relevante y podría estar explicado por patrones de distribución de las especies, preferencias al hospedero, es importante mencionar que las similitudes genéticas en ocasiones son muy altas hasta del 99% para el caso de *Sebacina* sp. 10 y que en general estos MOTUs estuvieron presentes en la comunidad pero no fueron dominantes ya que presentaron entre ocho y una punta micorrízica.

Por otra parte, era de esperarse que los resultados generados por Argüelles (2013) mostraran más coincidencias debido a que los sitios de muestreo se encuentran incluso más próximos que los de Guerrero, aunque las especies compartidas deben ser probablemente de hábitos generalistas y poco específicas al hospedero ya que se encuentran en *Abies religiosa*, otro detalle relevante en esta comparación es que los reactivos, el método utilizado para el procesamiento de las muestras, los datos tomados

de cada muestra, el programa para la edición de las secuencias (Geneious Pro 5.5.6) fue el mismo, aunque el sitio de procesamiento difirió, pero el conjunto de variables similares pudo ser un factor que contribuyó a las coincidencias entre las comunidades de HEM.

Las especies que se comparten entre varios sitios podrían darnos información de cuáles son los HEM que son generalistas y que podrían usarse en términos de reforestación.

El único trabajo en donde se realiza un análisis parecido al de este estudio, aunque el método no se especifica, es en el de Smith et al. (2009), por lo que la información de él porque se están compartiendo las especies entre las comunidades permanece sin ser comprendido, en este trabajo argumentan que un muestreo más amplio podría detectar un mayor número de especies de HEM que podrían compartirse ocasionalmente entre los hospederos de distintas especies como por ejemplo entre *Quercus* y *Pinus*.

Cabe destacar que no todos los artículos tienen disponibles las secuencias, en algunos ni siquiera aparecen los números de acceso para buscarlos en las bases de datos, por lo que es importante que en la generación del conocimiento de vanguardia como es el referente a los HEM, sea accesible y público en las bases de datos, esto permitirá ir aclarando el panorama en temas como este y dar pistas importantes sobre la distribución, biogeografía, hábitos generalistas o especialistas de los taxa de HEM, así como preferencias al hospedero por ejemplo. Esto además confirma la necesidad de conocer la composición en especies de HEM de las comunidades en su medio natural para entender mejor los patrones en la ecología de las mismas (Reverchon et al., 2012).

8.5 Los bosques de encinos como un ecosistema clave en el mantenimiento de la biodiversidad

En Michoacán los bosques de encino están desafortunadamente sujetos a una gran presión debido a la expansión urbana y a la extracción de leña y carbón (Arizaga et al., 2009), por lo que el entendimiento de la diversidad que albergan es muy importante, más aún cuando ésta favorece su establecimiento, crecimiento y les da ventajas adaptativas.

Este trabajo sienta las bases para comenzar a entender la diversidad de HEM, pues da a conocer que los bosques de encino soportan una gran riqueza de taxa de HEM, en donde probablemente muchos de ellos son exclusivos para la zona, por lo que la continuación de la generación del conocimiento de este grupo de hongos asociados a encinos es

fundamental, ya que este tipo de vegetación suele albergar una gran diversidad de especies no solo referente a los HEM. Además de ser considerado un género cuyo centro de diversificación es México (Govaerts y Frondin, 1989, Nixon, 1993, Valencia, 2004), este grupo vegetal se encuentra ampliamente distribuido desde las montañas tropicales hasta los bosques templados del país; estos tienen un papel muy importante en la retención del suelo y la humedad, además de ser importantes plantas leñosas ecológicamente y económicamente (Nixon, 1993).

Por lo tanto, el estudio de la ecología molecular de los HEM en México tiene un gran potencial, pues este grupo tiene gran importancia forestal, y muchos de estos hongos no han sido estudiados previamente en nuestro país por lo que la generación de este tipo de información sienta las bases para el entendimiento de la diversidad, distribución, sistemática y ecología de estos hongos, elementos esenciales para aplicar planes adecuados de la reforestación, uso del bosque no maderable, restauración y actividad forestal. Adicionalmente esta información puede ser útil en la generación de paquetes tecnológicos de vanguardia en el desarrollo forestal de México.

9. CONCLUSIONES

- En este trabajo realizado en la Cuenca de Cuitzeo en Michoacán se recolectaron 1671 micorrizas y con una eficiencia final del 34.59% se lograron amplificar y secuenciar 578 ectomicorrizas, con las que se obtuvieron 880 secuencias de la región de los ITS.
- A partir de ellas se identificaron 170 MOTUs de HEM asociados a encinos y 17 MOTUs no ectomicorrízicos, también presentes en las raíces de árboles del género *Quercus*. La mayoría de las especies identificadas fueron raras y estuvieron representadas por un MOTU único, estas en conjunto equivalieron al 48.8% del total de especies en la comunidad.
- La riqueza se distribuyó entre los cuatro sitios de estudio de manera inequitativa siendo Águila 1 el sitio más diverso con 83 taxa de HEM, y 5 de no ectomicorrízicos, siguió el sitio Icuacato 2 en donde se encontraron 66 HEM y 4 no ectomicorrízicos, posteriormente en Águila 1 se obtuvieron 36 MOTUs ectomicorrízicos y 8 que no le son, hecho relevante pues fue el sitio con mayor diversidad de hongos no ectomicorrízicos detectados en las micorrizas, por último el sitio que presentó menor diversidad fue Icuacato 1 con 33 taxa de HEM únicamente.
- La comunidad de HEM se representó por 22 familias, las mejor representadas resultaron ser: Thelephoraceae (37 especies), Russulaceae (28 especies), Sebacinaceae (25 especies), Inocybaceae (14 especies) y Pezizaceae (13 especies). Las más abundantes fueron Russulaceae (22.8%), Sebacinaceae (22.4%), Thelephoraceae (18.5%), Inocybaceae (6.4%) y Pyronemataceae (5.7%), que en conjunto sumaron el 75.8%.
- Las especies encontradas se repartieron en 27 géneros, los que resultaron más diversos dentro de la comunidad fueron *Russula* (26 especies), *Tomentella* (24 especies), *Sebacina* (23 especies), *Inocybe* (14 especies) y *Pachyphloeus* (9 especies). Los que tuvieron una abundancia mayor fueron *Sebacina* (21.7%), *Russula* (20.8%), *Tomentella* (13.8%), *Inocybe* (6.4%), *Genea* (5.7%), *Pachyphloeus* (3.4%), *Clavulina* (2.3%) y *Cortinarius* (1.9%), estos ocho grupos representaron el 76% de la comunidad de HEM.
- Las especies más abundantes en la comunidad fueron *Sebacina* sp. 1 con 35 micorrizas y 68 secuencias que estuvo presente en los sitios Águila 1, Águila 2 e

Icuacato 1, el segundo MOTU con mayor abundancia fue *Sebacina epigaea complex* sp. 1 con 23 micorrizas y 26 secuencias y se presentó en tres de los cuatro sitios, la excepción se dio en Águila 1, la tercera especie más abundante de la comunidad fue *Russula* aff. *curtipes* con 19 micorrizas todas secuenciadas en ambos sentidos, lo que sumó un total de 38 secuencias, esta se presentó sólo en el sitio Águila 2.

- Entre las zonas del Águila e Icuacato se compartieron 29 MOTUs, 81 y 60 respectivamente resultaron únicas para cada zona. Estos datos indican una alta diversidad Beta.
- Cuando se realizó el análisis de similitud genética usando únicamente vouchers, el 65.3% (111 MOTUs) obtuvo similitudes por debajo del 97% de afinidad genética, mientras que cuando se realizó la comparación usando muestras ambientales de las bases de datos el 48.8% (83 MOTUs) presentaron similitudes genéticas menores al 97%. Estos resultados hablan de la falta de datos e información en las bases públicas para esta región geográfica, adicionalmente los resultados podrían sugerir que en la zona y en asociación con los bosques de encino podrían estar ocurriendo un buen número de endemismos.
- La comunidad de HEM asociados a bosques de encino de la Cuenca de Cuitzeo, Michoacán compartió especies con 11 comunidades reportadas para el mundo, en diferentes bosques templados principalmente de Norte América. La comunidad con la que se compartieron un mayor número de especies fue la reportada por Morris et al. (2009) asociada a *Quercus* en Guerrero México, con la que se coincidió en 22 especies de HEM, es muy probable que esto se deba a que los MOTUs que comparten entre si, estén distribuidos en la misma zona geográfica, y a que no existen barreras biogeográficas importantes, adicionalmente los mecanismos de dispersión de las especies compartidas entre las comunidades son efectivos por lo que tienen un amplio rango de distribución.

10. LITERATURA CITADA

- Agerer, R. 1987–1995. Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn- Verlag, Eduard Dietenberger, Schwäbisch Gmünd, Germany.
- Aguilar R., A. Ghilardi, E. Vega, M. Skutsch y K. Oyama. 2012. Sprouting productivity and allometric relationships of two oak species managed for traditional charcoal making in central Mexico. *Biomass and Bioenergy*. 36:192-207.
- Alexopoulos C. J., C.W. Mims y M. Blackwell. 1996. Introductory mycology. 4ta ed. John Wiley & Sons. New York. United States of America. 868 p.
- Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J.H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST - a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.
- Amaranthus M.P. 1998. The Importance and conservation of ectomycorrhizal fungal diversity in forest ecosystems: Lessons from Europe and the Pacific Northwest. General Technical Report. Portland, OR, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 15 p.
- Argüelles Moyao A. 2013. Efecto del suelo del bosque de *Abies religiosa* en la comunidad de hongos ectomicorrízicos en el Zarco, San Pedro Atlapulco, estado de México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 101 p.
- Arizaga S., M. Cruz, J. Salcedo-Cabrales y M.A. Bello-González. 2009. Manual de biodiversidad de los encinos michoacanos. Instituto Nacional de Ecología. México D.F.
- Arnold A.E. y F. Lutzoni. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?. *Ecology*. 88:541-549.
- Avis P.G., D.J. McLaughlin, B.C. Dentinger y P.B. Reich. 2003. Long-term increase in nitrogen supply alters above and below-ground ectomycorrhizal communities and increases dominance of *Russula* spp. in a temperate oak savanna. *New Phytologist*. 160:239-253.
- Azul A.M., J.P. Sousa, R. Agerer, M.P. Martín y H. Freitas. 2010. Land use practices and ectomycorrhizal fungal communities from oak woodlands dominated by *Quercus suber* L. considering drought scenarios. *Mycorrhiza*. 20:73-88.
- Baxter J.W., T.A.S. Pickett, M.M. Carreiro, y J. Dighton 1999. Ectomycorrhizal diversity and community structure in oak forest stands exposed to contrasting

- anthropogenic impacts. *Canadian Journal of Botany*. 77: 771–782.
- Bergero R., S. Perotto, M. Girlanda, G. Vidano y A.M. Luppi. 2000. Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of a Mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Molecular Ecology*. 9:1639-1649.
- Bidartondo M.I., J. Baar y T.D. Bruns. 2001. Low ectomycorrhizal inoculum potential and diversity from soils in and near ancient forests of bristlecone pine (*Pinus longaeva*). *Canadian Journal of Botany*. 79:293-299.
- Brundett M.C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*. 154: 275-304.
- Butler M.J. y A.W. Day. 1998. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*. 44:1115-1136.
- Carlón A.T., M.E. Mendoza, E.L. Granados y L.M.M. Manilla. 2009. Hydrogeographical regionalisation: an approach for evaluating the effects of land cover change in watersheds. A case study in the Cuitzeo Lake Watershed, Central Mexico. *Water Resources Management*, 23: 2587-2803.
- Ciardo D.E., Schär G. y Böttger E.C. 2006. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medical important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:77-84.
- Corrêa A., M.A. Martins-Loução. 2011. Capítulo 17. C: N Interactions and the Cost: Benefit Balance in Ectomycorrhizae. En: Rai M., A. Varma. 2011. *Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae*. Springer. NY. EUA. 458 p.
- Courty P.E., A. Franc, J.C. Pierrat y J. Garbaye. 2008. Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:5792-5801.
- Deacon J. W. 1998. *Modern Mycology*. 3ra edición. Blackwell Science. Cambridge. Great Britain. 303 p.
- de Román M. y A.M. de Miguel. 2005. Post-fire, seasonal and annual dynamics of the ectomycorrhizal community in a *Quercus ilex* L. forest over a 3-year period. *Mycorrhiza*. 15: 471-482.
- Deacon J. W. 1998. *Modern Mycology*. 3ra edición. Blackwell Science. Cambridge. Great Britain. 303 p.

- di Pietro M., J.L. Churin y J. Garbaye. 2007. Differential ability of ectomycorrhizas to survive drying. *Mycorrhiza*. 17: 547-550.
- Dickie I.A., B. Xu y R.T. Koide. 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP. *New Phytologist*. 156:527-535.
- Dickie I.A., B.T.M. Dentinger, P.G. Avis, D.J. McLaughlin y P.B. Reich. 2009. Ectomycorrhizal fungal communities of oak savanna are distinct from forest communities. *Mycologia*. 101:473-483.
- Drummond A.J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, J. Heled, M. Kearse, R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer y A. Wilson. 2011. Geneious v5.5, Available from <http://www.geneious.com>.
- Finlay R.D. y D.J. Read. 1986. The structure and function of vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. *New Phytologist*. 103:157-165.
- Fogel R. y J. States. 2002. Materials for a hypogeous mycoflora of the great basin and adjacent cordilleras of the western United States. VIII: *Pachyphloeus lateritius* sp. nov. and *Cazia quericola* sp. nov. (Ascomycota, Pezizales). *Mycotaxon* 81:83-89.
- Frank J.L., D. Southworth y J.M. Trappe. 2006. NATS truffle and truffle-like fungi 14: *Pachyphloeus austro-oregonensis*, a new species from southern Oregon. *Mycotaxon* 98:253-259.
- Fujimura K., J.E. Smith, T.R. Horton, N.S. Weber y J.W. Spatafora. 2005. Pezizalean mycorrhizas and sporocarps in ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) after prescribed fires in Eastern Oregon. *Mycorrhiza*. 15:79-86.
- Fujisawa T. y T.G. Barraclough. 2013. Delimiting species using single locus data and the generalized mixed Youle coalescent (GYMC) approach: A revised method and evaluation and simulated datasets. *Systematic Biology*. 62:707-724.
- García-Guzmán O.M. 2009. Caracterización molecular de hongos asociados a raíces de la región de los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 111 p.
- Gardes M. y T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2:113-118.
- Garibay-Orijel R. 2007. Diversidad genética de las ectomicorrizas de la Cuenca de Cuitzeo, Michoacán. II simposio de biodiversidad fúngica, México, D.F.

- Garibay-Orijel R., E. Morales-Marañón, M. Domínguez-Gutiérrez y A. Flores-García. 2013. Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84:153-169.
- Garibay-Orijel R., P. Kennedy, T. D. Bruns y K. Oyama 2008. Evidence of high genetic diversification in neotropical ectomycorrhizae. 21th new Phytologist symposia. "The ecology of ectomycorrhizal fungi". Montpellier, Francia.
- Gebhardt S., K. Neubert, J. Wöllecke, B. Münzenberger y R.F. Hüttel. 2007. Ectomycorrhiza communities of red oak (*Quercus rubra* L.) of different age in the Lusatian lignite mining district, East Germany. *Mycorrhiza*. 17:279-290.
- Gibbs R.A. y M. Cockerill. 1995. Sequencher 4.8. Gene Codes Corporation, Ann Arbor.
- Giomas G., D. Sisti, A. Zambonelli, A. Amicucci, M. Cecchini, O. Comandini y V. Stocchi. 2009. Comparative study and molecular characterization of ectomycorrhizas in *Tilia americana* and *Quercus pubescens* with *Tuber brumale*. *FEMS Microbiology Letters*. 216:9-14.
- González R. 1993. La diversidad de los encinos mexicanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 44:125-142.
- Guzmán G. y L. Villarreal. 1984. Estudios sobre los hongos líquenes y mixomicetos del Cofre de Perote, Veracruz, I: Introducción a la micoflora de la región. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. 19: 107-124.
- He X.H., W.R. Horwath, R.J. Zasoski, Z. Aanderud y C.S. Bledsoe. 2007. Nitrogen sink strength of ectomycorrhizal morphotypes of *Quercus douglasii*, *Q. garryana*, and *Q. agrifolia* seedlings grown in a California oak woodland. *Mycorrhiza*. 18:33-41.
- Healy R.A. 2002. Spore wall development and septal pore ultrastructure in three species of *Pachyphloeus*. Tesis de Maestría. Ames: Department of Botany, Iowa State University. 116 p.
- Healy R.A. 2003. *Mattiolomyces tiffanyae*, a new truffle from Iowa, with ultrastructural evidence for its classification in the Pezizaceae. *Mycologia* 95:765-772.
- Healy R.A., G. Bonito y G. Guevara. 2009. The truffle genus *Pachyphloeus* in the U.S. and Mexico: phylogenetic analysis and a new species. *Mycotaxon*. 107:61-71.

- Horton T.R. y T.D. Bruns. 1998. Multiple host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) and bishop pine (*Pinus muricata* D. Don). *New Phytologist*. 139:331-339.
- Horton T.R. y T.D. Bruns. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black-box. *Molecular Ecology*. 10:1855-1871.
- Index Fungorum: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>
- INEGI. 2010. Censo general de población y vivienda 2010. INEGI, México, D.F.
- Ingleby K., V.T.X. Thanh y P.H. Mason. 2004. Manual for the collection, identification and use of edible mycorrhizal mushrooms associated with forest trees. Centre of Ecology and Hydrology, Penicuik, Vietnam.
- Ishida T.A., K. Nara y T. Hogetus. 2007. Host effect on ectomycorrhizal fungal communities: insights from eight host species in mixed conifer-broadleaf forest. *New phytologist*. 174:430-440.
- Izzo A.D., J. Agbowo y T.D. Bruns. 2005a. Detection of plot level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytologist*. 166: 619-630.
- Izzo A.D., M. Meyer, J.M. Trappe, M. North y T.D. Bruns. 2005b. Hypogeous ectomycorrhizal fungal species on roots and in small mammal diet in a mixed-conifer forest. *Forest Science*. 51:243-254.
- Jumpponen A., K.L. Jones, D. Mattox y C. Yaege. 2010. Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus* spp. ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Molecular Ecology*. 19:41-53.
- Karpati A.S., N.S. Handel, J. Dighton y T.R. Horton. 2011. *Quercus rubra*-associated ectomycorrhizal fungal communities of disturbed urban sites and mature forests. *Mycorrhiza*. 21:537-547.
- Kennedy P. G., R. Garibay-Orijel, L.M. Higgins, R. Ángeles-Argáiz. 2011. Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza*. 6:559-568.
- Kernaghan G., P. Widden, Y. Bergeron, S. Légaré y D. Paré. 2003. Biotic and abiotic factors affecting ectomycorrhizal diversity in boreal mixed-woods. *Oikos*. 102:497-504.
- Krebs C. 1999. *Ecological Methodology*. 2nd edition. Addison-Wesley Educational

- Publishers, Inc. EUA. 624 p.
- Kukk T. y K. Kull. 1997. Puisniidud. *Estonia Maritima* 2:1-249.
- López E., G. Bocco, M.E. Mendoza, A. Velázquez, y R. Aguirre. 2006. Peasant emigration and land-use change at the watershed level. A GIS-based approach in Central Mexico. *Agricultural Systems*, 90: 62-78.
- Manos P.S., J.J. Doyle y K.C. Nixon. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 12:333-349.
- Mc Aleece N., P. Lambsshead, G. Paterson y J. Gage. 1997. Biodiversity Professional V2.0. The Natural History Museum and the Scottish Association for Marine Science, Oban, Argyll.
- Mendoza M.E., E.L. Granados, D. Geneletti, D.R. Pérez-Salicrup y V. Salinas. 2011. Analysing land cover and land use change processes at watershed level: A multitemporal study in the Lake Cuitzeo Watershed, Mexico (1975-2003). *Applied Geography* .31: 237-250.
- Metzker L.M. 2010. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*.11:31-46.
- Molina R., H. Massicotte y J.M. Trappe. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. En el libro editado por Allen M.F. *Mycorrhizal Functioning, an Integrative Plant Fungal Process*. Chapman and Hall, New York. 357-423.
- Montecchi A. y M. Sarasini. 2000. *Funghi Ipogei d'Europa*. Trento (Italy): Associazione Micologica Bresadola. 714 p.
- Montecchio L., R. Causin, S. Rossi y S. Mutto-accordi. 2004. Changes in ectomycorrhizal diversity in a declining *Quercus ilex* coastal forest. *Phytopathologia Mediterranea*. 43: 26-34.
- Moore D., G.D. Robson y A.P.J. Trinci. 2011. *21st Century Guidebook to fungi*. 1ra edición. Cambridge University Press. Cambridge. Great Britain. 627 p.
- Morris Hamilton M. 2007. Diversity, Composition and Structure of Ectomycorrhizal Fungal Communities on roots of *Quercus* spp. in California and Mexico. University of California Davis. Tesis de Doctorado. 125 p.
- Morris M.H., M.A. Pérez-Pérez, M.E. Smith y C.S. Bledsoe. 2008b. Multiple species of ectomycorrhizal fungi are frequently detected on individual oak root tips in a tropical cloud forest. *Mycorrhiza*. 18:375-383.

- Morris M.H., M.A. Pérez-Pérez, M.E. Smith y C.S Bledsoe. 2009. Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a tropical cloud forest. *Microbiology Ecology*. 60:274-287.
- Morris M.H., M.E. Smith, D.M. Rizzo, M. Rejmáneke y C.S. Bledsoe. 2008a. Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in California woodland. *New Phytologist*. 178:167-176.
- Moser A.M., J.L. Frank, J.A. D’Allura y D. Southworth. 2009. Ectomycorrhizal communities of *Quercus garryana* are similar on serpentine and nonserpentine soils. *Plant Soil*. 315:185-194.
- Murata M., A. Kinoshita y K. Nara. 2013. Revisiting the host effect on ectomycorrhizal fungal communities: implications from host–fungal associations in relict *Pseudotsuga japonica* forests. *Mycorrhiza*. 23:641-653.
- Mycobank: <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx>
- Nantel P. y P. Neumann. 1992. Ecology of ectomycorrhizal basidiomycete communities on a local vegetation gradient. *Ecology*. 73:99-117.
- National Center for Biotechnology Information. 2014. NCBI Taxonomy. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>
- Newton A.C. 1992. Towards a functional classification of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2:75-79.
- Nixon K. C. 2002. The oak (*Quercus*) biodiversity of California and adjacent regions. USDA Forest Service General Technical Report. PSW-GTR-184.
- Nixon K. C. 1993. The genus *Quercus* in Mexico. En: T. P Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa, eds. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. New York, NY, USA: Oxford University Press. 447-458.
- Ogura-Tsujita Y. y T. Yukawa. 2008. *Epipactis helleborine* shows strong mycorrhizal preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting geographic distributions in Japan. *Mycorrhiza*. 18:331-338.
- Peay K.G., M. Garbelotto y T. D. Bruns. 2009. Spore heat resistance plays an important role in disturbance mediated assemblage shift of ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus muricata* seedlings. *Journal of Ecology*. 97:537-547.
- Peay K. G., P. G. Kennedy y T. D. Bruns. 2008. Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience*. 9:799-810.

- Peay K. G., P.G. Kennedy y T.D. Bruns. 2011. Rethinking ectomycorrhizal succession: are root density and hyphal exploration types drivers of spatial and temporal zonation?. *Fungal ecology*. 3:233-240.
- Peay K.G., T.D. Bruns, P.G. Kennedy, S.E. Bergemann y M. Garbelotto. 2007. A strong species-area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecology letters*. 10:470-480.
- Pérez-Moreno J. y D.J. Read. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles de la naturaleza. *Interciencia. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 239-247.
- Read D. 1998. Plants on the web. *Nature*. 396: 22-23.
- Reverchon F., Mdp. Otraga-Larrocea, G. Bonilla-Rosso y J. Pérez-Moreno. 2012. Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. *FEMS Microbiology Ecology*. 80:479-487.
- Reverchon F., M.P. Ortega-Larrocea, J. Pérez-Moreno, V.M. Peña-Ramirez y C. Siebe. 2010. Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, México. *Canadian Journal of Forest Research*. 40:1165-1174.
- Richard F., S. Millot, M. Gardes y M.A. Selosse. 2005. Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist*. 166:1011-1023.
- Rinaldi A.C., O. Comadini y T.W. Kuyper. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*. 33:1-45.
- Sanger F., Nicklen S. y A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74: 5463-5467.
- Såstad S.M. 1995. Fungi-vegetation relationships in a *Pinus sylvestris* forest in central Norway. *Canadian Journal of Botany*. 73:807-816.
- Schulz B. y C. Boyle. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*. 109: 661-686.

- Schmit J. P., J.F. Murphy y G.M. Mueller. 1999. Macrofungal diversity of a temperate oak forest: a test of species richness estimators. *Canadian Journal of Botany*. 77:1014-1027.
- Shannon C.E. y W. Weaver. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Selosse M.A., F. Richard, X. He y S.W. Simard. 2006. Mycorrhizal networks: desliasions dangereuses?. *Trends in ecology and evolution*. 11:621-628.
- SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2004. Instituto Nacional de Ecología. *Diversidad Ecológica y Biológica de México*.
- Simard S.W., D.A. Perry, M.D. Jones, D.D. Myrold, D.M. Durall y R. Molina. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388:579-582.
- Simon L., J. Bousquet, R.C. Levesque y M. Lalonde. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363:67-69.
- Smith M.E. y D.H. Pfister. 2009. Tuberculate ectomycorrhizae of angiosperms: the Interaction between *Boletus rubropunctus* (Boletaceae) and *Quercus* species (Fagaceae) in the United States and Mexico. *American Journal of Botany*. 96:166-175.
- Smith M.E., G.W. Douhan y D.M. Rizzo. 2007a. Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus* woodland. *Mycorrhiza*. 18:15-22.
- Smith M.E., G.W. Douhan y D. M. Rizzo. 2007b. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist*. 174: 847-863.
- Smith S.E. y D. J. Read. 2008. Chapter 6. Structure and development of ectomycorrhizal roots. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd Edition. Academic press. Londres. RU. 787 p.
- Stephenson S. 2010. *The kingdom fungi. The biology of mushrooms, molds, and lichens*. Timer Press. Portland. United States of America. 272 p.

- Taylor. D.L. y M. K. McCormick. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*. 177:1020-1033.
- Taylor D.L y T.D. Bruns. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology*. 8:1837-1850.
- Taylor J.W., D.J. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D.M. Geiser, D.S. Hibbett y M.C. Fisher. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 31:21-32.
- Tedersoo L., M. Bahram, M. Toots, A.G. Diédhiou, T.W. Henkel, R. Kjøller, M.H Morris, K. Nara, E. Nouhra, K.G. Peay, S. Pöhlme, M. Ryberg, M.E Smith y U. Kõljalg. 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*. 21:4160-4170.
- Tedersoo L., T. Suvi, E. Larsson y U. Kõljalg. 2006. Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. *Mycological Research*. 110:734-748.
- Tedersoo L, T. Suvi, K. Beaver y U. Kõljalg. 2007. Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and host shifts from the native *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpiniaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). *New Phytologist*. 175:321-333.
- Tedersoo L., T.W. May y M.E. Smith. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*. 20:217-263.
- Torres Gómez M. 2012. Disponibilidad de macromicetos silvestres comestibles en dos unidades del paisaje en un Parque Nacional en el eje Neovolcánico. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 92 p .
- Tovar J.A. y R. Valenzuela. 2006. Los hongos del parque nacional Desierto de los Leones. En J.A. Tovar, R. Valenzuela (Eds.). *Los Hongos del Parque de los Leones*. Gobierno del Distrito Federal/Secretaría del Medio Ambiente/Parque Nacional Desierto de los Leones. México D.F. 37-82.
- Valencia A. S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 78:33-53.
- Valentine L.L., T.L. Fiedler, A.N. Hart, C.A. Petersen, H.K. Berninghausen, y D.

- Southworth. 2004. Diversity of ectomycorrhizas associated with *Quercus garryana* in southern Oregon. *Canadian Journal of Botany*. 82: 123-135.
- Van der Heijden M.G.A., J.N. Klirnomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken y J.R. Sanders. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystems variability and productivity. *Nature*. 396:96-72.
- Varela L. y A. Estrada-Torres. 1997. Diversity and potential use of mycorrhizae for sustainable development in Mexico. En: Palm M. y I. Chapela (editores). *Mycology in sustainable development: expanding concepts, vanishing borders*. Parkway. Boon. NC.160-182.
- Walker J.F., O.K. Jr. Miller y J.L. Horton. 2005. Hyper-diversity of ecto-mycorrhizal fungus assemblages on oak seedlings in mixed forests in the southern Appalachian Mountains. *Molecular Ecology*. 14:829-838.
- Walker J.F., O.K. Jr. Miller, y J.L. Horton. 2008. Seasonal dynamics of ectomycorrhizal fungus assemblages on oak seedlings in the southeastern Appalachian Mountains. *Mycorrhiza* 18:123-132.
- Wang Q., X.H. He y L.D. Guo. 2012. Ectomycorrhizal fungus communities of *Quercus liaotungensis* Koidz of different ages in a northern China temperate forest. *Mycorrhiza*. 22:461-470.
- Warcup J.H. 1990. Occurrence of ectomycorrhizal and saprophytic discomycetes after a wildfire in a eucalypt forest. *Mycological Research*. 94:1065-1069.
- Weiß M., M.A. Selosse, K.H. Rexer, A. Urban y F. Oberwinkler. 2004. Sebaciales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research*. 108:1003-1010.
- Wu B., K. Nara, y T. Hogetsu. 2005. Genetic structure of *Cenococcum geophilum* populations in primary successional volcanic deserts on Mount Fuji as revealed by microsatellite markers. *New Phytology*. 165: 285-293.
- Zacarias-Eslava L.E, G. Cornejo-Tenorio, J. Cortés-Flores, N. González-Castañeda y G. Ibarra-Manriquez. 2011. Composición, estructura y diversidad del cerro El Águila, Michoacán. México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82: 854-869.

