



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA TIERRA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA

CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS
ASOCIADAS A *Pinus montezumae* A LO LARGO DE UNA CRONOSECUENCIA
VOLCÁNICA, SIERRA DEL CHICHINAUTZIN, MORELOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA TIERRA

P R E S E N T A:

FRÉDÉRIQUE REVERCHON

DIRECTORA DE TESIS : MA. DEL PILAR ORTEGA LARROCEA



MÉXICO D.F. MAYO 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

Este trabajo fue dirigido por la Dra. Ma. Del Pilar Ortega Larrocea del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico (Departamento de Edafología) del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Fue asesorado por la Dra. Christina Siebe Grabach del Laboratorio de Edafología Ambiental del mismo Instituto, y por el Dr. Jesús Pérez Moreno, del Laboratorio de Microbiología (Departamento de Edafología e Hidrología) del Colegio de Posgraduados.

Fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo los proyectos IN 225703, IN 230507 y IN 119609. Durante parte de su desarrollo se contó con la beca para estudios de doctorado de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) y con un apoyo para estudiantes de doctorado del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México. La impresión de esta tesis fue en parte financiada por el Programa de Posgrado en Ciencias de la Tierra.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme recibido durante estos cinco años.

Agradezco a la Dra. Ma. Del Pilar Ortega Larrocea, por su guía y tiempo en la dirección de esta tesis. Espero que este trabajo pionero en el laboratorio la inspire para seguir trabajando con ectomicorrizas y que nuestra colaboración durante estos años no le haya quitado las ganas de recibir estudiantes franceses.

De la misma manera, agradezco a los miembros de mi Comité Tutorial: a la Dra. Christina Siebe Grabach por su apoyo durante la realización de este trabajo, y al Dr. Jesús Pérez Moreno por su eternal entusiasmo y por todas las ganas que me dio de seguir trabajando con los hongos.

A los doctores Jorge Gama, Lorenzo Vázquez y Roberto Garibay por sus valiosas

observaciones y su participación como miembros del jurado. A Roberto en especial por su ayuda con la edición de las secuencias y por haberme invitado a sufrir muestreando hongos a 4000 m de altura.

Al Instituto de Geología por las instalaciones y las camionetas para salir al campo.

Agradezco el apoyo en el laboratorio de la M. en C. Mónica Rangel para montar las técnicas de biología molecular, los experimentos en el invernadero y para ayudarme a usar adecuadamente los microscopios y los equipos del laboratorio.

A Víctor Peña Ramírez por su valiosísima ayuda durante todo el tiempo de esta tesis, tanto en el campo como en el proceso de escritura. Espero se acuerde mucho tiempo de nuestras expediciones a la Sierra del Chichinautzin.

Al Dr. Peter Kennedy por su ayuda con los protocolos de biología molecular y su disponibilidad para contestar los numerosos correos que le mandé.

A la M. en C. Kumiko Shimada, a Lucero y a Don Roberto por la ayuda con el análisis de mis muestras de suelo. Me encantó estar en el laboratorio con ustedes.

A Germán Bonilla por su ayuda con los análisis estadísticos y bioinformáticos.

A los ejidos de Topilejo y Cuajomulco por los permisos de colecta.

Al Ing. Javier Alarcón Segura del vivero San Luis Tlaxiatemalco por proporcionarnos las semillas de *Pinus montezumae* y la información que necesitábamos.

A la Dra. Laura Márquez Valdelamar del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología por la ayuda con las secuencias.

A todo el grupo de los microcósmicos con quién compartí este espacio durante cinco años: Mónica, Jani, Gaby, Jorge, Mario, Iris, Sandra, Liliana, Jesús, David, Lorena, Abril, Mary, Nicolas, Lyse y Sébastien. Gracias por el buen humor, la ayuda y el ánimo.

A todos los que me acompañaron durante los tres años de muestreo para recolectar hongos, tomar muestras de suelo o regar mis plantas: Germán, Víctor, Karina, Rafa, Sergio, Omar, Debbie, Marie, Claudia, Jani, Gaby, Haruki, Edgar, Arvid, Daniel, Mónica, Lyse, Sébastien, Cecilia, Juan, Raúl, Héctor, Jorge. Un agradecimiento especial a Andrés (Grüt del bosque) sin quién no hubiera podido terminar mi trabajo de campo ni llegar a salvo al Instituto.

Finalmente agradezco el apoyo de mis amigos (acá y allá) y de mi familia (allá). Ya saben que no necesitan tener su nombre aquí para ser importantes para mí.

Índice

Resumen	1
Abstract	4
Résumé	6
Prólogo	9
Introducción	11
Capítulo I	21
Cambios en la producción de esporocarpos de hongos ectomicorrízicos a través de un gradiente de calidad de suelo en bosques templados neotropicales dominados por <i>Pinus montezumae</i> , Sierra del Chichinautzin, Morelos	
Capítulo II	53
Las comunidades de hongos saprófitos son distintas en diversidad y composición de especies a lo largo de una cronosecuencia volcánica en la Sierra del Chichinautzin, México	
Capítulo III	64
Estructura de la comunidad de hongos ectomicorrízicos asociados a árboles adultos de <i>Pinus montezumae</i> en una cronosecuencia de suelos volcánicos, Sierra del Chichinautzin, Morelos	
Capítulo IV	71
Comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados a plántulas de <i>Pinus montezumae</i> sembradas en bioensayos e in situ en suelos de la Sierra de Chichinautzin, Morelos	
Discusión general	106
Apéndice A	115

Número de esporocarpos de especies ECM recolectados durante tres temporadas de lluvias consecutivas (2005-2007) en los tres sitios de muestreo

Apéndice B **119**

Variables ecológicas en la producción de esporocarpos de especies ECM recolectados durante tres temporadas de lluvias consecutivas (2005-2007) en los tres sitios de muestreo

Apéndice C **124**

Descripción de los morfotipos ECM asociados a *Pinus montezumae* en los tres sitios de estudio

Apéndice D **127**

Extracción de ADN a partir de ápices ectomicorrízicos con el kit REDExtract-N-Amp Plant PCR

Apéndice E **132**

Amplificación de ADN por PCR a partir de ápices ectomicorrízicos con el PCR mix del kit RedExtract-N-Amp Plant PCR

Apéndice F **138**

Limpieza de los productos de PCR con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de Promega

Resumen

El objetivo principal del presente trabajo fue analizar los cambios en las comunidades de hongos ectomicorrízicos (ECM) asociadas a *Pinus montezumae* a lo largo de una cronosecuencia de suelos volcánicos. El área de estudio se ubica en la Sierra del Chichinautzin, localizada en la parte central del Eje Neovolcánico Transversal, entre el Distrito Federal y el estado de Morelos. La Sierra del Chichinautzin se compone de numerosos conos volcánicos de distintas edades cuyas erupciones han dado origen a suelos volcánicos con diferentes grados de evolución, formando una cronosecuencia. Se ha demostrado que la productividad forestal aumentan conforme se va desarrollando el suelo y por lo tanto, es de suponer que las comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados a estos árboles cambien de igual manera a lo largo de la cronosecuencia. Se seleccionaron tres volcanes de edades y consecuentemente de calidad de suelo contrastantes: el volcán Chichinautzin (1835 años A.P.), el volcán Guespalapa (4200 años A.P.) y el volcán Pelado (10,000 años A.P.). En cada uno de los tres sitios de estudio, se seleccionaron cinco individuos adultos de *P. montezumae* y se establecieron cuadrantes de muestreo alrededor de estos árboles. Durante tres temporadas de lluvias consecutivas, se recolectaron semanalmente los esporocarpos de hongos ECM dentro de estos cuadrantes y se muestrearon anualmente las especies asociadas a las raíces de estos árboles a través de la recolección de cuatro cilindros de suelo por árbol de estudio. Adicionalmente, se recolectaron los esporocarpos de hongos saprófitos dado que estos hongos desempeñan un papel muy importante en la degradación de la materia orgánica y en los procesos ecológicos que se llevan a cabo en el suelo. Los hongos ECM asociados a las raíces de plántulas de *P. montezumae* fueron analizados mediante un experimento de bioensayos y la siembra de semillas de esta especie *in situ*, alrededor de los árboles adultos de estudio.

La producción y la diversidad de esporocarpos de hongos ECM estuvieron influenciadas por las características edáficas de los sitios. El sitio más joven presentó la abundancia y la riqueza de esporocarpos más altas a pesar del menor contenido en nutrimentos de su suelo. Las especies de los géneros *Inocybe* y *Laccaria* fueron las que más fructificaron en los tres sitios. La mayoría de las especies fueron exclusivas de un sitio y esta tasa de exclusividad fue mayor en el sitio joven. En el caso de los hongos saprófitos, no se encontraron diferencias significativas en términos de abundancia y riqueza entre los tres sitios. Sin embargo, el alto porcentaje de especies exclusivas de un sitio demostró que la composición de especies fue muy dependiente del sitio y por lo tanto de las características edáficas. La diversidad más alta encontrada en el sitio joven puede constituir un mecanismo de protección contra las condiciones estresantes existiendo en este sitio, dado que especies diferentes tienen distintas funciones ecológicas que pueden llevar a una degradación más eficiente de los sustratos recalcitrantes.

En cuanto a las comunidades de hongos ECM asociadas con los árboles adultos de *P. montezumae*, no se encontraron diferencias significativas en abundancia, riqueza y diversidad entre sitios, probablemente debido a que estos hongos dependen más del hospedero que de los factores edáficos. Las diferencias en la distribución de los morfotipos responden a preferencias distintas por los microambientes que existen en cada sitio, lo que enfatiza la importancia de los hongos ECM para el crecimiento y la supervivencia de los árboles en sitios con condiciones estresantes. La comparación de las comunidades de hongos ECM asociadas a individuos adultos y a plántulas de *P. montezumae* mostró que las plántulas están asociadas a unas cuantas especies dominantes mientras que la comunidad ECM asociada a los árboles adultos es más diversa. Se encontraron 13 morfotipos comunes a los tres experimentos dentro de los cuales se pudieron identificar *Cenococcum geophilum*, Thelephoraceae 1 y 2, *Tomentella* sp.1, *Clavulina* sp.1, Sebacinales y Sebacinaceae 1 y Atheliaceae 2. Los índices de similitud parecen indicar que la micorrización de las plántulas en el sitio antiguo proviene de las redes miceliales establecidas, mientras que las condiciones más estresantes que prevalecen en los sitios jóvenes de la cronosecuencia favorecen la micorrización de las plántulas a partir de las estructuras de resistencia en el suelo.

Se encontró una baja correspondencia entre las especies ECM presentes en forma de esporocarpos y las especies asociadas a las raíces del hospedero. La producción de esporocarpos pareció estar más influenciada por las condiciones edáficas que la de los ápices ECM aunque ambos fueron compuestos por especies diferentes de acuerdo al sitio, lo que confirma la importancia de los parámetros edáficos para la estructura de la comunidad. Se observó que los taxa más abundantemente representados en las raíces de las plántulas de *P. montezumae* fueron Thelephoraceae, Atheliaceae, Sebacinaceae e *Inocybe*. De éstos, solamente *Inocybe* fue recolectado en campo como esporocarpo, y fue el género más abundante en los tres sitios de estudio. Se recomienda probar la eficiencia como inóculo de aquellas especies generalistas presentes a lo largo de la cronosecuencia para ayudar a mejorar sustantivamente las estrategias de reforestación en la zona. Estas especies, como *Inocybe cookei*, *I. fastigiata*, *Laccaria laccata* o *L. bicolor*, podrían actuar como amortiguadores contra condiciones extremas o perturbaciones eventuales y asegurar la resiliencia y la productividad en ambientes forestales dinámicos.

Abstract

The main objective of this study was to analyse the changes in ectomycorrhizal (ECM) fungal communities associated with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence. The study area is located at Sierra del Chichinautzin, in the central part of the Trans-Mexican Volcanic Belt, at the southern margin of Mexico City. The Sierra is composed of numerous monogenetic volcanoes of different ages which form a chronosequence of volcanic soils. Three volcanoes of contrasting ages were selected: the Chichinautzin volcano (1835 years B.P.), the Guespalapa volcano (4200 years B.P.) and the Pelado volcano (10,000 years B.P.). Volcanic soils at these sites present different stages of pedogenesis and therefore contrasting soil qualities. It has been demonstrated that forest productivity increases with soil development. Therefore, ECM fungal communities associated with those trees may change as well across the chronosequence. At each site, five adult trees of *P. montezumae* were selected and sampling plots were established around them. During three consecutive rainy seasons, ECM sporocarps were surveyed weekly within these plots and ECM root tips were sampled annually through the collection of four soil cores per tree. Saprophytic sporocarps were surveyed too since they play an important role for organic matter degradation and soil ecological processes. ECM fungal species associated with *P. montezumae* seedlings were also analysed through a bioassay experiment and the sowing of seedlings *in situ*.

ECM sporocarp production and diversity were influenced by soil characteristics at each site. The highest abundance and richness were found at the youngest site which was the less fertile. *Inocybe* and *Laccaria* species were the most abundant fruiters at the three sites. The majority of species were site-exclusive, site-exclusiveness being higher at the youngest site. In the case of saprophytic fungi, no significant differences were observed for abundance or richness between sites. However, the large proportion of site-exclusive species showed that

species composition depended on the site and therefore on soil characteristics. The highest diversity found at the young, less fertile site may represent an “insurance” mechanism against harsh conditions, since different species are likely to play various ecological functions which may lead to a more efficient degradation of recalcitrant substrates.

No differences were found in abundance, richness nor diversity at the belowground level between the three sites, probably because ECM fungi are more dependent upon the host than upon soil factors. Differences in morphotype distribution respond to different preferences for the existing microniches at each site, which emphasizes the importance of ECM fungi for tree growth and survival at stressful sites. The comparison between ECM fungal communities associated with adult trees and the ones associated with seedlings showed that seedlings form a symbiosis with a few dominant fungal species whereas ECM fungal communities associated with mature trees are more diverse. Thirteen morphotypes were common to the three experiments and some of them were identified as *Cenococcum geophilum*, Thelephoraceae 1 and 2, *Tomentella* sp.1, *Clavulina* sp.1, Sebacinales and Sebacinaceae 1, and Atheliaceae 2. Similarity indexes seemed to show that seedlings established at the oldest site were inoculated from the existing mycelial networks whereas stressful conditions at the young sites of the chronosequence favoured inoculation from soil resistant propagules.

A poor correspondence was found between species composition of ECM sporocarps and ECM root tips. Sporocarp production seemed to be more influenced by soil conditions than ECM root tips, although both were composed of different species according to the site. This confirms the importance of soil parameters for community structure. The most abundant taxa associated with *P. montezumae* seedlings were Thelephoraceae, Atheliaceae, Sebacinaceae and *Inocybe*. *Inocybe* was the only one to be collected as sporocarp and was also the most abundant genus at the three study sites. A final recommendation would be to test generalist species, sampled at the three sites of the chronosequence, for inoculum efficiency, in order to improve reforestation strategies in the area. Those species, like *Inocybe cookei*, *I. fastigiata*, *Laccaria laccata* or *L. bicolor*, could function as buffers against adverse conditions or possible perturbations and ensure the resiliency and the productivity in dynamic forest ecosystems.

Résumé

L'objectif principal de ce travail a été d'analyser les changements dans les communautés de champignons ectomycorhiziens (ECM) associées à *Pinus montezumae* le long d'une chronoséquence de sols volcaniques. La zone d'étude est la Sierra del Chichinautzin, localisée dans la partie centrale de l'Axe Néovolcanique Transversal, entre le District Fédéral et l'état de Morelos. La Sierra del Chichinautzin est composée de divers cônes volcaniques d'âges différents, dont les éruptions ont donné lieu à des sols volcaniques de stades évolutifs distincts, formant une chronoséquence. Il a été démontré que la productivité des forêts augmente avec l'évolution des sols et en conséquence, il est probable que les communautés de champignons ectomycorhiziens associées à ses arbres varient également le long de la chronoséquence. Trois volcans d'âge différent et donc de qualité de sol différente ont été sélectionnés : le volcan Chichinautzin (1835 ans A.P.), le volcan Guespalapa (4200 ans A.P.) et le volcan Pelado (10,000 ans A.P.). Cinq individus de *P. montezumae* ont été sélectionnés dans chacun des sites et des parcelles ont été établies autour de ces arbres. Pendant trois périodes de pluies consécutives, les sporocarpes de champignons ECM ont été cueillis chaque semaine à l'intérieur de ces parcelles, et les mycorhizes ont été échantillonnées annuellement grâce à la collecte de quatre cylindres de sol par arbre. Les sporocarpes de champignons saprophytes ont également été collectés étant donné leur rôle important dans la dégradation de la matière organique et les processus écologiques du sol. Les champignons ECM associés aux racines des plantules de *P. montezumae* ont été analysés au travers du montage de bioessais et la semence de graines de cette espèce *in situ*, autour des arbres adultes.

La production et la diversité des sporocarpes de champignons ECM ont été influencées par les caractéristiques du sol sur chaque site. Le site le plus jeune a présenté l'abondance et la richesse de sporocarpes les plus grandes malgré son contenu plus faible en nutriments.

Les espèces appartenant aux genres *Inocybe* et *Laccaria* sont celles qui ont produit le plus de fructifications sur les trois sites. La majorité des espèces ont été exclusives d'un site et ce taux d'exclusivité a été le plus haut pour le plus jeune site. Dans le cas des champignons saprophytes, aucune différence significative n'a été trouvée en termes d'abondance ou de richesse entre les trois sites. Cependant, la grande proportion d'espèces exclusives d'un site a montré que la composition en espèces est fortement dépendante du site et donc des facteurs du sol. La plus grande diversité a été trouvée au plus jeune site, ce qui peut constituer un mécanisme de protection contre les conditions difficiles qui y existent. Étant donné que des espèces différentes ont des fonctions écologiques distinctes, cela peut occasionner une dégradation plus efficace des substrats récalcitrants.

Aucune différence n'a été observée en termes d'abondance, richesse et diversité au niveau des communautés de champignons ECM associées aux arbres adultes, ce qui est probablement dû au fait que ces champignons sont plus dépendants de leur hôte que des caractéristiques du sol. Les différences dans la distribution des morphotypes sont le résultat de préférences distinctes pour les micro-environnements qui existent sur chaque site, ce qui souligne l'importance de ces champignons pour la croissance et la survie des arbres dans les sites aux conditions difficiles. La comparaison entre les communautés de champignons ECM associées aux individus adultes et celles associées aux plantules de *P. montezumae* a montré que les plantules forment une symbiose avec quelques espèces dominantes tandis que les communautés associées aux adultes sont plus diverses. Treize morphotypes communs aux trois expériences ont été trouvés, parmi lesquels ont été identifiés *Cenococcum geophilum*, Thelephoraceae 1 et 2, *Tomentella* sp.1, *Clavulina* sp.1, Sebaciales et Sebacinaceae 1, et Atheliaceae 2. Les indices de similitude semblent indiquer que la mycorhization des plantules sur le site le plus ancien provient des réseaux mycéliques tandis que les conditions plus difficiles qui existent dans les sites les plus jeunes favorisent la mycorhization des plantules à partir des structures de résistance présentes dans le sol.

Une faible correspondance a été trouvée entre les espèces présentes sous forme de sporocarpes et celles présentes au niveau des racines de l'hôte. La production de sporocarpes semble être plus influencée par les facteurs du sol que celle des mycorhizes, bien que les deux soient composés d'espèces différentes en fonction du site. Cela confirme

l'importance des facteurs du sol pour la structure de la communauté. Les familles les plus représentées au niveau des plantules ont été Thelephoraceae, Atheliaceae, Sebacinaceae et le genre *Inocybe*. Seul *Inocybe* a été collecté sous forme de sporocarpe et ce genre constitue le plus abondant sur les trois sites. Il est recommandé de tester l'efficacité des espèces généralistes, c'est-à-dire présentes le long de la chronoséquence, pour la production d'inoculum, ce qui pourrait aider à améliorer substantiellement les programmes de reforestation dans la zone d'étude. Des espèces comme *Inocybe cookei*, *I. fastigiata*, *Laccaria laccata* ou *L. bicolor* pourraient fonctionner comme des tampons contre des conditions extrêmes ou d'éventuelles perturbations, et assurer la résilience et la productivité des écosystèmes forestiers dynamiques.

Prólogo

Este trabajo se divide en cuatro capítulos correspondiendo a cuatro artículos de investigación.

Una introducción general presenta los antecedentes relativos a los suelos volcánicos y a la ecología de los hongos ectomicorrízicos (ECM). Por otra parte, se realizó una revisión bibliográfica de varios trabajos sobre comunidades de hongos ECM asociadas al género *Pinus* con el propósito de establecer un método de muestreo adaptado a las condiciones particulares de los suelos volcánicos bajo estudio. Se concluye discutiendo la problemática del esfuerzo de muestreo en el caso de los hongos ectomicorrízicos.

En el primer capítulo de esta tesis se examinaron los cambios en la distribución y en la composición en especies de los esporocarpos de hongos ECM a lo largo de la cronosecuencia y se analizaron los factores del suelo y del árbol hospedero que pueden estar involucrados en estos cambios.

El segundo capítulo es un artículo publicado en la revista *Annals of Microbiology* (2010), titulado *Saprophytic fungal communities change in diversity and species composition across a volcanic soil chronosequence at Sierra del Chichinautzin, Mexico*. Analiza la distribución de los cuerpos fructíferos de los hongos saprófitos a lo largo de la cronosecuencia, dado que estos hongos desempeñan un papel muy importante en la degradación de la materia orgánica y en los procesos ecológicos que se llevan a cabo en el suelo.

En el tercer capítulo se comparó la distribución de las micorrizas formadas por los hongos ECM en las raíces de árboles adultos de *Pinus montezumae* en los tres sitios, después de tres años consecutivos de muestreo. Se analizaron los cambios en la

composición en morfotipos ECM a lo largo de la cronosecuencia de acuerdo a la calidad del suelo y se discutió la importancia de los factores edáficos para la estructura de la comunidad de hongos ECM.

En el cuarto capítulo, se presentan los resultados de dos diseños experimentales destinados a estudiar las micorrizas que se forman en las raíces de plántulas de *Pinus montezumae*. Se discutieron las limitaciones inherentes a los estudios *in situ* de los hongos ECM y las nuevas perspectivas aportadas por la aplicación de la biología molecular al campo de la micología.

Finalmente, en la discusión general, se evaluaron los principales resultados y su importancia ecológica y se analizaron las implicaciones que tiene este trabajo para futuras investigaciones.

Introducción

En México se calcula que los suelos originados a partir de materiales ígneos y cenizas volcánicas abarcan una superficie de aproximadamente 31,560 km², lo que representa el 2% del territorio nacional (INEGI 1999). En la mayor parte de esta superficie se desarrollan bosques de distinto grado de madurez cubiertos por especies arbóreas dominadas por el género *Pinus*. Este género es el más importante en la economía forestal debido a que contribuye con el 80% de la producción nacional de madera (Ricker et al. 1999). El género *Pinus* juega además un papel ecológico primordial dado que México es uno de sus centros de diversidad (Perry 1991). Sin embargo, algunos problemas como la tala y los incendios forestales han causado daños severos en la conservación y explotación de los bosques. El género *Pinus* es micótrofo obligado (Pérez-Moreno y Read 2004), es decir que necesita de la asociación simbiótica con hongos del suelo (micorrizas) para su establecimiento y desarrollo. Por lo tanto, el estudio de las relaciones simbióticas de estos árboles con hongos ectomicorrízicos es de gran interés para llevar a cabo la rehabilitación de los bosques.

El área de estudio se ubica en la Sierra del Chichinautzin, localizada en la parte central del Eje Neovolcánico Transversal, entre el Distrito Federal y el estado de Morelos. El campo volcánico consiste en 221 conos monogenéticos de ceniza asociados a flujos de lava, escudos lávicos y tefras, cuyas edades varían entre 50,000 y 1670 años ante presente (A.P.) (Siebe et al. 2004, 2005). Los suelos que se forman después de las erupciones se desarrollan bajo condiciones similares de vegetación, topografía y clima y por lo tanto forman lo que se denomina cronosecuencia volcánica (Huggett 1998). Al comienzo, después del proceso eruptivo, los suelos que se desarrollan a partir de cenizas volcánicas permanecen fisiológicamente someros. En esta etapa, la cantidad de agua disponible que brindan a las plantas es baja debido a que las texturas son gruesas y el horizonte orgánico incipiente. Conforme los suelos evolucionan, las propiedades edáficas cambian: aumentan la

profundidad del suelo, la capacidad de retención de agua, el contenido en nitrógeno y la cantidad de materia orgánica, lo cual genera condiciones más favorables para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, el desarrollo de los suelos conlleva a la formación de arcillas minerales de bajo orden estructural como el alofano y la ferrihidrita que retienen el fósforo, haciéndolo menos disponible (Shoji et al. 1993). Se ha demostrado que las tasas de crecimiento de los árboles y por ende la productividad forestal aumentan conforme se va desarrollando el suelo y va aumentando la calidad de sitio (Pritchett y Fisher 1987; Peña-Ramírez et al. 2009). Por lo tanto, es de suponer que las comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados a estos árboles cambien de igual manera a lo largo de la cronosecuencia de suelos volcánicos.

Las ectomicorrizas son asociaciones que se establecen entre algunos hongos, principalmente Basidiomicetos y Ascomicetos, y la mayoría de las gimnospermas de los bosques del mundo. Los hongos ectomicorrízicos tienen una participación importante en la productividad, diversidad y establecimiento de los mismos (Pérez-Moreno y Read 2004). Incrementan el área fisiológicamente activa en las raíces, aumentando la captación de agua y nutrimentos del suelo (e.g. fósforo, nitrógeno, potasio y calcio), la tolerancia de las plantas a cambios en la temperatura y la acidez causada por la solubilidad del aluminio, magnesio y azufre (Smith y Read 2008). Los hongos ECM reciben a cambio carbohidratos y vitaminas del hospedero. Las ectomicorrizas también proveen protección contra ciertos hongos patógenos y nemátodos radicales al competir con ellos por el mismo nicho ecológico y gracias a la habilidad inhibidora de algunas especies de hongos ECM (Marx 1973; Selosse et al. 2004).

Estudiar la estructura de las comunidades de hongos ECM resulta ecológicamente importante ya que la composición y distribución de las comunidades ECM tiene un papel importante para cada uno de los mayores componentes del ecosistema: plantas, suelo e inclusive atmósfera (Treseder 2005). Las funciones ecológicas de los hongos ECM consisten principalmente en movilizar y transferir nutrimentos del suelo a la planta, sobre todo en cuanto al nitrógeno orgánico (Smith y Read 2008). Existen variaciones en el tipo y en la cantidad de enzimas extracelulares que las especies ECM exudan en el suelo para mineralizar la materia orgánica (Read y Pérez-Moreno 2003), lo que modifica la disponibilidad de los distintos nutrimentos que van a influir en la nutrición de las plantas y

por lo tanto en su crecimiento. El conocimiento sobre las dinámicas espaciales y temporales que generan cambios en la estructura de las comunidades ECM sigue siendo limitado y es todavía más escaso en países tropicales, donde los bosques de gimnospermas no son la vegetación predominante. Entender estas dinámicas (variabilidad espacial y temporal) es necesario para evaluar la escala y la duración del efecto ecológico de cualquier especie fúngica, es decir, cómo contribuyen y en qué medida al desarrollo de sus hospederos y a los ciclos de los nutrientes en el suelo.

Las comunidades de hongos ectomicorrízicos (ECM) pueden ser representadas por las raíces micorrizadas o por los esporocarpos y la recolecta de cada fase genera percepciones diferentes de la misma comunidad (Horton y Bruns 2001). La falta de correspondencia entre las dos fases se debe a que las especies que fructifican no corresponden a las especies que predominan en las raíces, siendo diferentes las estrategias de propagación. Las especies más abundantes en las raíces invierten más energía en el crecimiento vegetativo y la competencia por colonizar al hospedero que en la reproducción (Gardes y Bruns 1996). Por lo tanto, es preciso muestrear las dos fases (vegetativa y sexual) de la comunidad ECM (Fig. 1).



Figura 1. Representación de las fases de los hongos ECM. A: esporocarpo (*Amanita muscaria*); B: raíz ectomicorrizada (*Pinus montezumae* con *Cenococcum geophilum*); C: micelio externo. La primera fase puede ser epigea o hipogea según las especies involucradas y las otras dos son generalmente hipogreas. Fotos: *Frédérique Reverchon*.

Existe una gran heterogeneidad en la distribución de especies ECM asociadas a las raíces del hospedero debido a variaciones en las preferencias y tolerancias de las especies para diferentes ambientes, a la variabilidad espacial y temporal de este ambiente o a patrones temporales de producción de raíces (Koide et al. 2007). Por lo tanto, la planeación de un muestreo representativo que abarque la mayor parte de la diversidad es muy compleja y requiere de una investigación previa de los trabajos existentes para conocer los métodos más empleados para el muestreo de raíces. Los resultados de la búsqueda bibliográfica se presentan en el Cuadro 1, donde se demuestra que varios métodos pueden ser aplicados de acuerdo al objetivo que se persiga y que existen grandes diferencias en el tamaño de las muestras de suelo recolectadas para ápices ECM o en el área muestreada para esporocarpos.

La frecuencia del muestreo es claramente importante para la evaluación de la diversidad de una comunidad ECM, particularmente cuando se trata de documentar aquella dada por los esporocarpos. Nara et al. (2003) establecieron que muestreos semanales eran necesarios para obtener representatividad en cuanto a la producción y a la composición en especies de los esporocarpos. De los estudios reportados en el Cuadro 1, solamente Gardes y Bruns (1996) muestrearon cuadrantes semanalmente para la recolecta de estructuras reproductivas. Finalmente, un dilema común en el muestreo de esporocarpos es el de frecuencia vs. área de muestreo, dado que limitaciones prácticas impiden muestrear tan frecuentemente sitios más amplios.

En cuanto a los ápices ectomicorrízicos, el Cuadro 1 ilustra que el volumen de suelo analizado para ápices ECM no está directamente relacionado con el número de morfotipos encontrados. Por ejemplo, Gardes y Bruns (1996) muestrearon cerca de 8000 cm³ de suelo y encontraron 20 morfotipos ECM diferentes, mientras que Visser (1995) muestreó un volumen de suelo cinco veces menor encontrando una riqueza dos veces mayor (39 morfotipos). Este fenómeno se debe probablemente a la distribución agregada de los ápices ECM (Taylor y Bruns 1999). En el presente estudio, se procuró establecer un método de muestreo más completo muestreando tanto las estructuras de reproducción sexual como las de crecimiento vegetativo (micorrizas) durante tres años consecutivos.

Cuadro 1. Síntesis bibliográfica de los principales métodos de muestreo utilizados en estudios de comunidades ECM en bosques de pinos.

Referencia	Bioma	Método de muestreo	Método de análisis	No. especies esporocarpos / morfotipos	Objetivo del estudio
Visser (1995)	Bosque de <i>Pinus banksiana</i> , Canadá.	Recolección de esporocarpos en un área de 1 ha en 4 sitios con árboles de distintas edades. 4 años de muestreo.	Caracterización morfológica de esporocarpos.	72 (ECM + saprófitos)	Sucesión de comunidades ECM.
		Recolección de 5 cilindros de suelo (5.5 cm de diámetro, 20 cm de profundidad), cada 10 m sobre un transecto de 50 m.	Caracterización morfológica de morfotipos.	39	
Gardes y Bruns (1996)	Bosque de <i>Pinus muricata</i> , California, USA.	Recolección de esporocarpos en 3 sitios de 2 m de diámetro durante 3 años.	Caracterización morfológica de esporocarpos.	10 (ECM)	Estructura de comunidad ECM.
		Recolección de 4 cilindros de suelo (4 cm de diámetro, 40 cm de profundidad) en 4 bloques experimentales de 1 x 1.5 m.	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	20	
Gehring et al. (1998)	Bosque de <i>Pinus edulis</i> , Arizona, USA.	Recolección de raíces micorrizadas de 50 árboles en 6 sitios de aproximadamente 0.5 km ² cada uno.	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	51	Estructura de comunidad ECM en ambientes extremos.
Horton y Bruns (1998)	Bosque mixto de <i>Pseudotsuga menziesii</i> y <i>Pinus muricata</i> , California, USA.	Recolección de 25 cilindros de suelo (10 cm de diámetro, 40 cm de profundidad), en un área de 125 m ² .	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	16	Especificidad de hospedero de hongos ECM.
Baar et al. (1999)	Bosque de <i>Pinus muricata</i> , California, USA.	Recolección de 29 plántulas examinadas para micorrizas en 5 parcelas de 1 m de diámetro. Recolección de 3 cilindros de suelo (10 cm de diámetro, 40 de profundidad) por parcela.	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	11	Colonización por propágulos resistentes al fuego.
Jonsson et al. (1999)	Bosque de <i>Pinus sylvestris</i> , Suecia.	Recolección de esporocarpos muestreados en 10 círculos de 100 m ² .	Caracterización morfológica de esporocarpos.	62 (ECM)	Continuidad de hongos ECM entre plántulas y árboles maduros.
		Recolección de 171 plántulas y de 25 cilindros de suelo (2.8 cm de diámetro, 15 cm de profundidad) en 3 sitios de 1 ha.	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	42	

Referencia	Bioma	Método de muestreo	Método de análisis	No. especies esporocarpos / morfotipos	Objetivo del estudio
Taylor y Bruns (1999)	Bosque de <i>Pinus muricata</i> , California, USA.	15 cilindros de suelo (10 cm de diámetro, 40 cm de profundidad) en un área de 625 m ² .	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	37	Comparación de comunidades de bosques maduros y de propágulos resistentes.
Grogan et al. (2000)	Bosque de <i>Pinus muricata</i> , California, USA.	Recolección de 6 cilindros de suelo (2 cm de diámetro, 10 cm de profundidad) en 14 parcelas (1.4 x 1.4 m). Recolección de 3 plántulas examinadas para micorrizas por parcela.	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	30	Estructura de comunidad ECM después de un fuego.
Wurzburger et al. (2001)	Bosque de <i>Pinus muricata</i> y <i>Pinus contorta</i> ssp. <i>bolanderi</i> , California, USA.	Recolección de fragmentos de raíces micorrizadas en pequeñas muestras tomadas en el horizonte O (cada muestra de aproximadamente 1000 cm de raíces finas) en 3 sitios (14 muestras en total).	Identificación molecular de los hongos en los ápices micorrízicos.	16	Caracterización de comunidad ECM.
Trudell y Edmonds (2004)	Bosque de coníferas, Washington, USA.	Recolección de esporocarpos en 2 áreas; 15 sitios en cada área (400 m ²).	Caracterización morfológica de esporocarpos.	214 (ECM + Saprófitos)	Correlación de comunidades ECM con nitrógeno y humedad.
Saari et al. (2005)	Bosque de <i>Pinus sylvestris</i> var. <i>scotica</i> , Escocia, UK.	Recolección de 10 cilindros de suelo (4 cm de diámetro, 15 cm largo) a lo largo de transectos entre 5 pinos (40 cilindros en total).	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	17	Vinculación entre raíces ECM y árboles individuales para estudiar interacciones.
Iwański y Rudawska (2007)	Bosque de <i>Pinus sylvestris</i> , Finlandia.	Recolección de 30 plántulas en un cuadrante de 100 x 100 m.	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	16	Caracterización de las comunidades de hongos ECM en plántulas.
Urban et al. (2008)	Bosque de <i>Pinus sylvestris</i> y <i>Pinus petraea</i> , Austria.	Recolección de 7 muestras de suelo (7 x 8 cm) a lo largo de un transecto de 150 x 20 m.	Caracterización morfológica e identificación molecular de los morfotipos.	29	Estructura de comunidad ECM en suelos contaminados.

El objetivo principal de este trabajo fue el de generar conocimiento original sobre cómo se estructuran las comunidades de hongos ECM en un bosque templado neotropical bajo una cronosecuencia edafológica. Los objetivos específicos fueron analizar si los cambios en las propiedades del suelo explicaban los cambios observados en la diversidad de las comunidades de hongos ECM, a nivel de esporocarpos y de ápices ECM asociados a las raíces de *P. montezumae*. Además, se pretendió saber y si la composición en especies de estas comunidades variaba de acuerdo a la calidad de suelo. Es probable que las condiciones edafológicas contrastantes existentes a lo largo de la cronosecuencia generen cambios en la estructura de las comunidades de hongos ECM y que los suelos con mayor calidad propicien una diversidad más alta dentro de la comunidad. Por otra parte, la cobertura discontinua de las rocas volcánicas por suelos volcánicos jóvenes crea una gran heterogeneidad espacial (Aplet et al. 1998) que a su vez puede promover la riqueza de especies de hongos ECM presentes. Por lo tanto, es preciso estudiar cómo las variables edáficas influyen la distribución y composición de las comunidades de hongos ECM en la Sierra del Chichinautzin y por ello fue importante establecer un método de muestreo adecuado para considerar la heterogeneidad inherente a este tipo de edafoecosistema.

Literatura citada

- Aplet, G.H., Hughes, R.F., Vitousek, P.M. 1998. Ecosystem development on Hawaiian lava flows: biomass and species composition. *J. Veg. Sci.* **9**: 17-26.
- Baar, J., Horton, T.R., Kretzer, A.M., Bruns, T.D. 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand replacing wildfire. *New Phytol.* **143**: 409-418.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Can. J. Bot.* **74**: 1572-1583.
- Gehring, C.A., Theimer, T.C., Whitham, T.G., Keim, P. 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology*, **79**: 1562-1572.
- Grogan, P., Baar, J., Bruns, T.D. 2000. Below-ground ectomycorrhizal community structure in a recently burned bishop pine forest. *J. Ecology*, **88**: 1051-1062.

- Horton, T.R., Bruns, T.D. 1998. Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*). *New Phytol.* **139**: 331-339.
- Horton, T.R., Bruns, T.D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol. Ecol.* **10**: 1855-1871.
- Huggett, R.J. 1998. Soil chronosequences, soil development, and soil evolution: a critical review. *Catena*, **32**: 155-172.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 1999. Mapa de suelos dominantes de la República Mexicana.
- Iwański, M., Rudawska, M. 2007. Ectomycorrhizal colonization of naturally regenerating *Pinus sylvestris* L. seedlings growing in different micro-habitats in boreal forest. *Mycorrhiza*, **17**: 461-467.
- Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Kårén, O., Zackrisson, O. 1999. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytol.* **142**: 151-162.
- Koide, R.T., Shumway, D.L., Xu, B., Sharda, J.N. 2007. On temporal partitioning of a community of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* **174**: 420-429.
- Marx, D.H. 1973. Growth of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal shortleaf pine seedlings in soil with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopath.* **63**:18-23.
- Nara, K., Nakaya, H., Hogetsu, T. 2003. Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytol.* **158**: 193-206.
- Peña-Ramírez, V.M., Vázquez-Selem, L., Siebe, C. 2009. Soil organic carbon stocks and forest productivity in volcanic ash soils of different age (1835 – 30,500 years B.P.) in Mexico. *Geoderma*, **149**: 224-234.
- Pérez-Moreno, J., Read, D.J. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, **29**: 239-247.
- Perry, J.P. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Oregón.
- Pritchett, W.L., Fisher, R.F. 1987. *Properties and management of forest soils*. Segunda edición. John Wiley & Sons, 494 pp.

- Read, D.J., Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? *New Phytol.* **157**: 475-492.
- Ricker, M., Bye, R., Ibarra-Manríquez G., Martínez M., Siebe, C., Palacios, J. L., Valenzuela, R. Ángeles, G. 1999. Diversidad y manejo de los bosques mexicanos: Aspectos microeconómicos. *Investigación Económica*, **LIX**: 77-109.
- Saari, S.K., Campbell, C.D., Russell, J., Alexander, I.J., Anderson, I.C. 2005. Pine microsatellite markers allow roots and ectomycorrhizas to be linked to individual trees. *New Phytol.* **165**: 295-304.
- Selosse, M.A., Baudoin, E., Vandenkoornhuysse, P. 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies*, **327**: 639-648.
- Shoji, S., Nanzyo, M., Dahlgren, R.A. 1993. *Volcanic Ash Soils: Genesis, Properties and Utilization. Developments in Soil Science 21.* Elsevier, Amsterdam.
- Siebe, C., Rodríguez-Lara, V., Schaaf, P., and Abrams, M. 2004. Radiocarbon ages of Holocene Pelado, Guespalapa, and Chichinautzin scoria cones, south of Mexico City: Implications for archaeology and future hazards. *Bull. Volcanol.* **66**: 203-225.
- Siebe, C., Arana-Salinas, L., Abrams, M., 2005. Geology and radiocarbon ages of Tlálóc, Tlacotenco, Cuauhtzin, Hijo del Cuauhtzin, Teuhtli, and Ocusacayo monogenetic volcanoes in the central part of the Sierra Chichinautzin, Mexico. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* **141**(3-4): 225-243.
- Smith, S.E., Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis. Tercera edición.* Academic Press, Londres.
- Taylor, D.L., Bruns, T.B. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Mol. Ecol.* **8**: 1837-1850.
- Treseder, K.K. 2005. Unearthing ectomycorrhizal dynamics. *New Phytol.* **166**: 358-359.
- Trudell, S.A., Edmonds, R.L. 2004. Macrofungus communities correlate with moisture and nitrogen abundance in two old-growth conifer forests, Olympic National Park, Washington, USA. *Can. J. Bot.* **82**: 781-800.

- Urban, A., Puschenreiter, M., Strauss, J., Gorfer, M. 2008. Diversity and structure of ectomycorrhizal and co-associated fungal communities in a serpentine soil. *Mycorrhiza*, **18**: 339-354.
- Visser, S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* **129**: 389-401.
- Wurzburger, N., Bidartondo, M.I., Bledsoe, C.S. 2001. Characterization of *Pinus* ectomycorrhizas from mixed conifer and pygmy forests using morphotyping and molecular methods. *Can. J. Bot.* **79**: 1211-1216.

CAPÍTULO I

Cambios en la producción de esporocarpos de hongos ectomicorrízicos a través de un gradiente de calidad de suelo en bosques templados neotropicales dominados por *Pinus montezumae*, Sierra del Chichinautzin, Morelos

Resumen

Los cambios en la distribución de esporocarpos de hongos ectomicorrízicos (ECM) asociados a *Pinus montezumae* Lamb. var. *montezumae* fueron estudiados a través de una cronosecuencia de suelos volcánicos, en la Sierra del Chichinautzin, Morelos, México. Se examinaron las relaciones entre la producción de esporocarpos de especies ECM y algunos parámetros edáficos (contenido en carbono, nitrógeno y fósforo) y variables de crecimiento del árbol hospedero (diámetro, altura, área basal y cobertura foliar). Los sitios de estudio estuvieron localizados en tres volcanes de distinta edad, donde los esporocarpos ECM fueron recolectados durante tres temporadas de lluvias consecutivas (2005–2007). El Análisis de Correspondencia Canónica (CCA por sus siglas en inglés) y el análisis de correlación no resaltaron un factor único que pudiera explicar la composición de las comunidades de macrohongos, pero determinaron que las variables edáficas y del hospedero en conjunto influenciaron la producción y la diversidad de los esporocarpos. En general, la abundancia de las especies de hongos ECM estuvo negativamente

correlacionada con la calidad de suelo. La riqueza total estuvo negativamente correlacionada con los contenidos en C y N del suelo y con el área basal del árbol. El sitio más joven presentó la abundancia y la riqueza de esporocarpos más altas, especialmente de hongos de temprana etapa, a pesar del menor contenido en nutrientes de su suelo y de las tasas de crecimiento más bajas de sus árboles. Es posible que la presencia de hongos ECM en este sitio sea determinante para el buen desarrollo de los árboles, dado que este sitio es capaz de sostener un bosque maduro a pesar de sus condiciones limitantes. Las especies de los géneros *Inocybe* y *Laccaria* fueron las que más fructificaron en los tres sitios. La mayoría de las especies (51.4%), especialmente *Tricholoma* spp. y *Cortinarius* spp., fueron exclusivas de un sitio, siendo esta tasa de exclusividad mayor en el sitio joven. Existieron respuestas específicas a las variables ambientales estudiadas: algunas especies del género *Inocybe* fueron más influenciadas por factores edáficos mientras que otras fueron más afectadas por las variables de crecimiento de los hospederos. Las especies generalistas presentes en los tres sitios, como *Laccaria bicolor* o *Laccaria laccata*, están más adecuadas a las condiciones existentes a lo largo de la cronosecuencia estudiada y podrían estar utilizadas como inóculo potencial para la producción de plántulas de *P. montezumae* en el marco de programas de reforestación.

1. Introducción

Los hongos ectomicorrízicos (ECM) aportan nutrientes del suelo a sus hospederos y reciben a cambio carbohidratos (Göttlicher et al. 2008; Smith y Read 2008). Por lo tanto, representan una interfase entre el suelo y el árbol hospedero (Smits et al. 2008). Las comunidades de hongos ECM se pueden estudiar a través de la recolecta de esporocarpos o de un muestreo de ápices ECM, aunque la producción de cuerpos fructíferos no representa directamente las tasas de micorrización de los árboles (Gardes y Bruns 1996). Sin embargo, son unos indicadores prácticos para la evaluación de la biodiversidad de los bosques (Kranabetter et al. 2005) y de la productividad del suelo (Kranabetter et al. 2009). Los esporocarpos de las especies ECM tienen típicamente una alta diversidad (Richard et al. 2004), su distribución es sensible a la calidad del suelo (Trudell y Edmonds 2004), a la edad del bosque y a la composición en especies arbóreas (Twieg et al. 2007; Rinaldi et al.

2008). Adicionalmente, pueden ser identificados con precisión con un conocimiento taxonómico adecuado y pueden ser recolectados a través de áreas muy grandes. En este estudio, se utilizaron los esporocarpos de hongos ECM como medida de la composición en especies de la comunidad ectomicorrízica y para evaluar sus relaciones con los parámetros edáficos.

Aún cuando muchos hongos ECM producen fructificaciones visibles (Nara et al. 2003), la composición en especies de las comunidades de macrohongos silvestres y los factores que influyen su distribución no son todavía muy comprendidos (Trudell y Edmonds 2004), especialmente en regiones tropicales. México se considera como el segundo centro de evolución y diversidad de pinos, con el 40% de las especies conocidas del género (Perry 1991). Sin embargo, existen pocos estudios publicados para México sobre los hongos ECM asociados al género *Pinus* (Zamora-Martínez y Nieto de Pascual-Pola 1995; Valdés y Córdova 2003; Montoya et al. 2004; Garibay-Orijel et al. 2009), a pesar de la alarmante tasa de deforestación en el país que debería generar incentivos para un mejor entendimiento de los mecanismos que vinculan los hongos ECM y el establecimiento y supervivencia de sus hospederos. Es igualmente importante explicar los patrones de distribución de los hongos ECM en relación con su función ecológica, dado que las especies fúngicas difieren en cuanto a su contribución a la productividad forestal (Wallander 2000; Kjølner y Clemmensen 2009). Es preciso establecer las relaciones entre la producción de esporocarpos por las comunidades de hongos ECM y los factores del suelo y del hospedero, para poder mejorar el manejo y la regeneración del bosque (Trudell y Edmonds 2004).

El contenido en nitrógeno del suelo es uno de los factores edáficos que influyen la composición en especies de los cuerpos fructíferos. Lilleskov et al. (2001), en un estudio de los esporocarpos de las comunidades ECM en Alaska, notaron que la riqueza en especies y la abundancia de esporocarpos fueron afectadas por el incremento del N mineral del horizonte orgánico del suelo. La composición en especies de esporocarpos cambió a lo largo del gradiente en la concentración de N dado que las especies “nitrófilas” (*Laccaria* spp.) fueron favorecidas comparado con las especies “nitrofóbicas” (*Cortinarius* spp., *Russula* spp., *Tricholoma* spp.). Los géneros nitrofóbicos se encontraron típicamente en etapas de sucesión tardía, con tasas de mineralización de nutrientes más bajas. Una disminución natural de la frecuencia de los esporocarpos se describe durante la sucesión del

bosque (Baar y ter Braak 1996), conforme se acumulan la hojarasca y la materia orgánica y se cierra el dosel (Dighton y Mason 1985).

La importancia de las etapas sucesionales de los hospederos para la composición de especies de la comunidad ECM se examinó en varios trabajos (Visser 1995; Senn-Irlet y Bieri 1999; Durall et al. 2006; Twieg et al. 2009) y las especies fúngicas se separaron en “asociadas a etapas tempranas” o “asociadas a etapas tardías”. Sin embargo, la influencia de los procesos de desarrollo del suelo y de la calidad de éste en la sucesión de las especies de esporocarpos raramente ha sido estudiada. Por lo tanto, en este estudio se analizó la influencia del grado de desarrollo de los horizontes orgánicos del suelo en la distribución de los esporocarpos de especies ECM a través de una cronosecuencia de suelos volcánicos. Peña-Ramírez et al. (2009) demostraron que la calidad del suelo aumenta a lo largo de la cronosecuencia, y esta también influencia el crecimiento de los árboles (Crews et al. 1995). En consecuencia, las hipótesis que dieron origen a este trabajo fueron que la distribución de los esporocarpos depende de los factores edáficos y que la frecuencia de los esporocarpos aumenta conforme vaya incrementando la calidad de suelo. El objetivo de esta investigación fue la determinación de los cambios en la composición de los esporocarpos de especies ECM a través la cronosecuencia de suelos y la evaluación de las relaciones entre las especies de esporocarpos y un conjunto de parámetros edáficos (carbono, nitrógeno y fósforo) y de variables de crecimiento de los árboles (diámetro, altura, área basal y cobertura foliar).

2. Métodos

2.1. Área de estudio

El área de estudio se localiza en la Sierra del Chichinautzin, en el Eje Neovolcánico Transversal, entre el estado de Morelos y el sur de la Ciudad de México. La Sierra del Chichinautzin se compone de numerosos conos volcánicos de distintas edades (Márquez et al. 1999) cuyas erupciones han dado origen a suelos volcánicos con diferentes grados de evolución, formando una cronosecuencia. La precipitación promedio anual reportada en la zona varía entre 1000 mm y 1200 mm, con una marcada estacionalidad (80% de las lluvias

ocurren entre junio y octubre). Sin embargo, la estación climática de la Conagua localizada cerca de los sitios de estudio registró precipitaciones de 1722 mm in 2005, 1933 mm in 2006 y 1497 mm in 2007 (Fig. 1). La temperatura anual media varía entre 10 y 14°C, dependiendo de la altitud (Silva et al. 1999). La vegetación dominante en la Sierra es el bosque maduro de pino-encino (Velázquez 1994), con una proporción creciente de especies de pinos conforme aumenta la altitud, especialmente de *Pinus montezumae* Lamb. var. *montezumae* después de 2000 m.s.n.m. (Perry 1991).

Peña-Ramírez et al. (2009) describieron la existencia de un gradiente en la calidad de sitio a lo largo de la cronosecuencia volcánica, que aumenta conforme evolucionan la profundidad, relacionada con el espesor de las capas de ceniza que recubren las lavas de cada volcán, y las propiedades edáficas. Dentro de este gradiente, se seleccionaron tres volcanes de edades y consecuentemente de calidad de suelo contrastantes: el volcán Chichinautzin (1835 años A.P.), que será denominado como sitio joven, el volcán Guespalapa (4200 años A.P.) o sitio de edad intermedia y el volcán Pelado (10,000 años A.P.) o sitio antiguo. Las erupciones fueron fechadas por el método de radiocarbono (Siebe et al. 2004). Estos volcanes se encuentran relativamente cercanos (menos de 5 km entre cada uno), y se localizan dentro del Corredor Biológico de la Sierra del Chichinautzin (Fig. 2). Se seleccionó un sitio de estudio en cada volcán (Fig. 3). Todos los sitios se encontraron a la misma altitud, 3100 m.s.n.m., con orientación sur – sureste y pendiente baja (menos de 10°), en lugares poco o nada perturbados. Los bosques fueron dominados por árboles de *P. montezumae*. Estos bosques presentaban aproximadamente la misma edad y la tasa de regeneración del bosque no excedió los 150 años: un estudio dendrocronológico (Peña-Ramírez, com. pers.) mostró que la edad promedio de los árboles de *P. montezumae* en el Chichinautzin fue de 100 años, 105 años en el Guespalapa y 90 años en el Pelado. Por otro lado, las propiedades edáficas se han estudiado a detalle para cada sitio (ver Peña-Ramírez et al. 2009) y las características superficiales de suelo donde se llevó a cabo el muestreo y que determinan las diferencias en la calidad de suelo a través de la cronosecuencia se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Edad, clasificación, profundidad del suelo y características relevantes del horizonte Ah en los tres sitios de muestreo (datos modificados de Peña-Ramírez et al. 2009).

	Chichinautzin	Guespalapa	Pelado
Coordenadas (UTM)	X: 482,041 Y: 2,109,907	X: 482,037 Y: 2,112,505	X: 475,922 Y: 2,114,796
Edad del suelo (años A.P.)	1835 ± 55	2835 ± 75 a 4690 ± 90	9620 ± 160 a 10,900 ± 280
Clasificación del suelo (WRB 2006)	Mollic Leptosol	Lepti-vitric Andosol	Eutrisilic Andosol
Profundidad fisiológica del suelo (cm)	6/35	35.5	179
Profundidad del horizonte Ah(cm)	6	27	42.5
pH (H ₂ O)*	4.8	5.7	6.1
Densidad aparente (g·cm ⁻³)*	0.56	0.86	0.61
C (kg m ⁻²)*	6.6	10.8	19.3
N (kg m ⁻²)*	0.5	0.7	1.2
P disponible (g m ⁻²)*	1.3	1.1	0.6
Agua disponible (L m ⁻² **	28.2	95.4	301.6

A.P.: Antes del Presente. Fecha de la última erupción y principio de la formación del suelo. Las fechas corresponden a fechas ¹⁴C no calibradas (Siebe et al. 2004).

* Calculado para el horizonte Ah solamente.

** Calculado para la totalidad de la profundidad fisiológica.

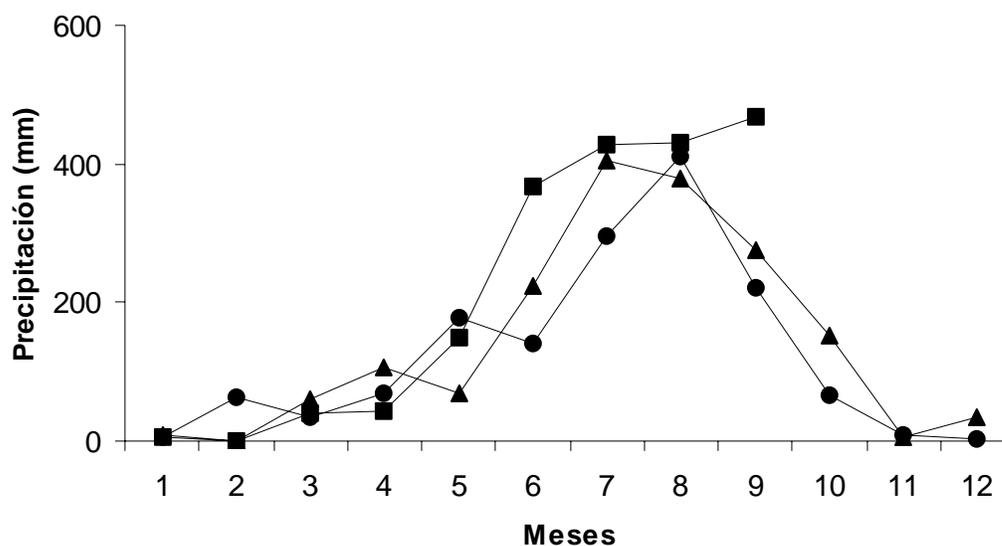


Figura 1. Precipitación mensual en los tres sitios de estudio (estación climática no. 9022 de la Comisión Nacional del Agua). Los triángulos representan el año 2005, los cuadros 2006 y los círculos 2007. Algunos datos del 2006 no fueron registrados por la estación (septiembre a diciembre 2006).

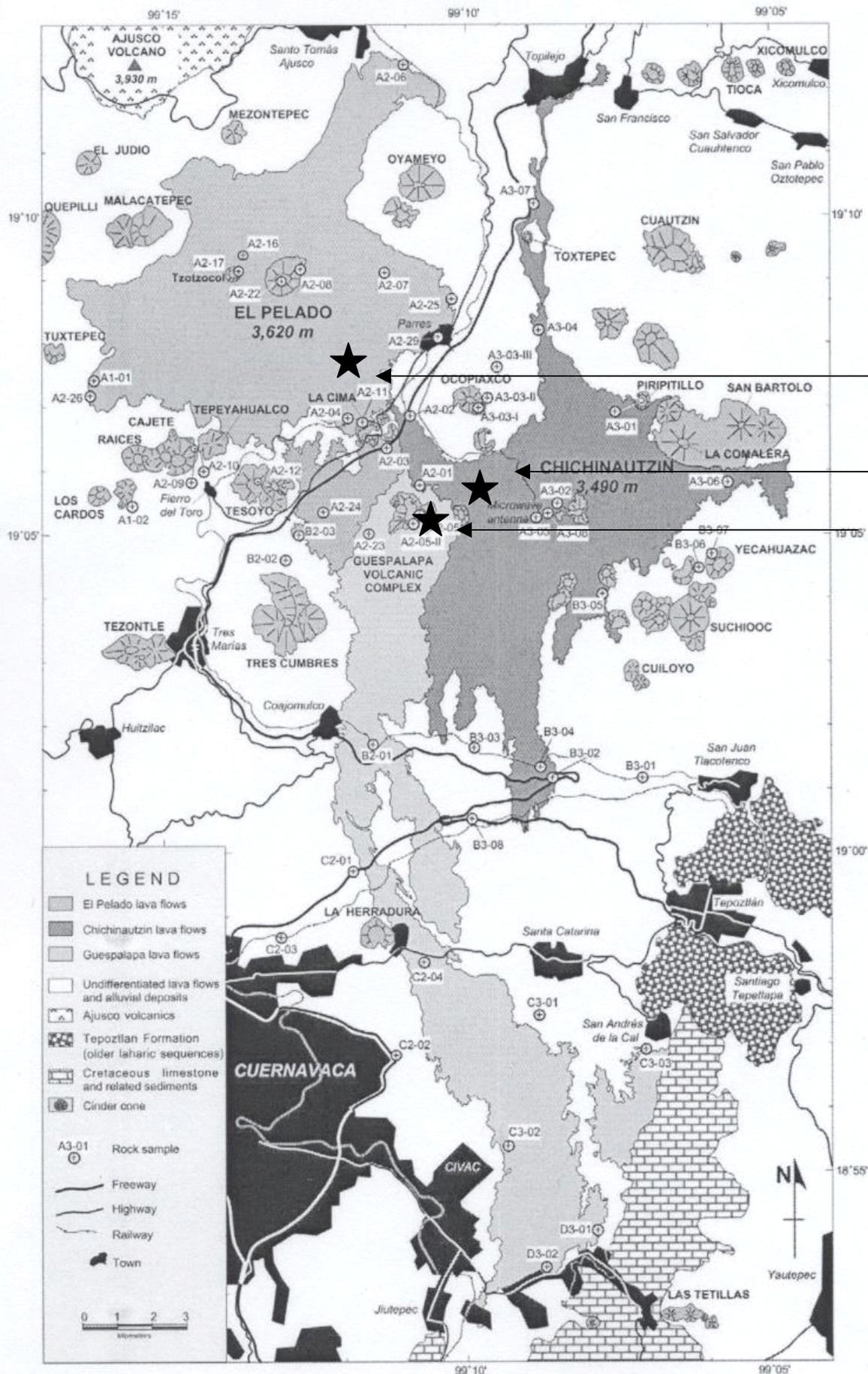


Figura 2. Mapa de la ubicación de los tres volcanes de estudio (tomado de Siebe et al. 2004).

Sitio antiguo, volcán Pelado,

Sitio joven, volcán Chichinautzin,

Sitio de edad intermedia, volcán Guespalapa.

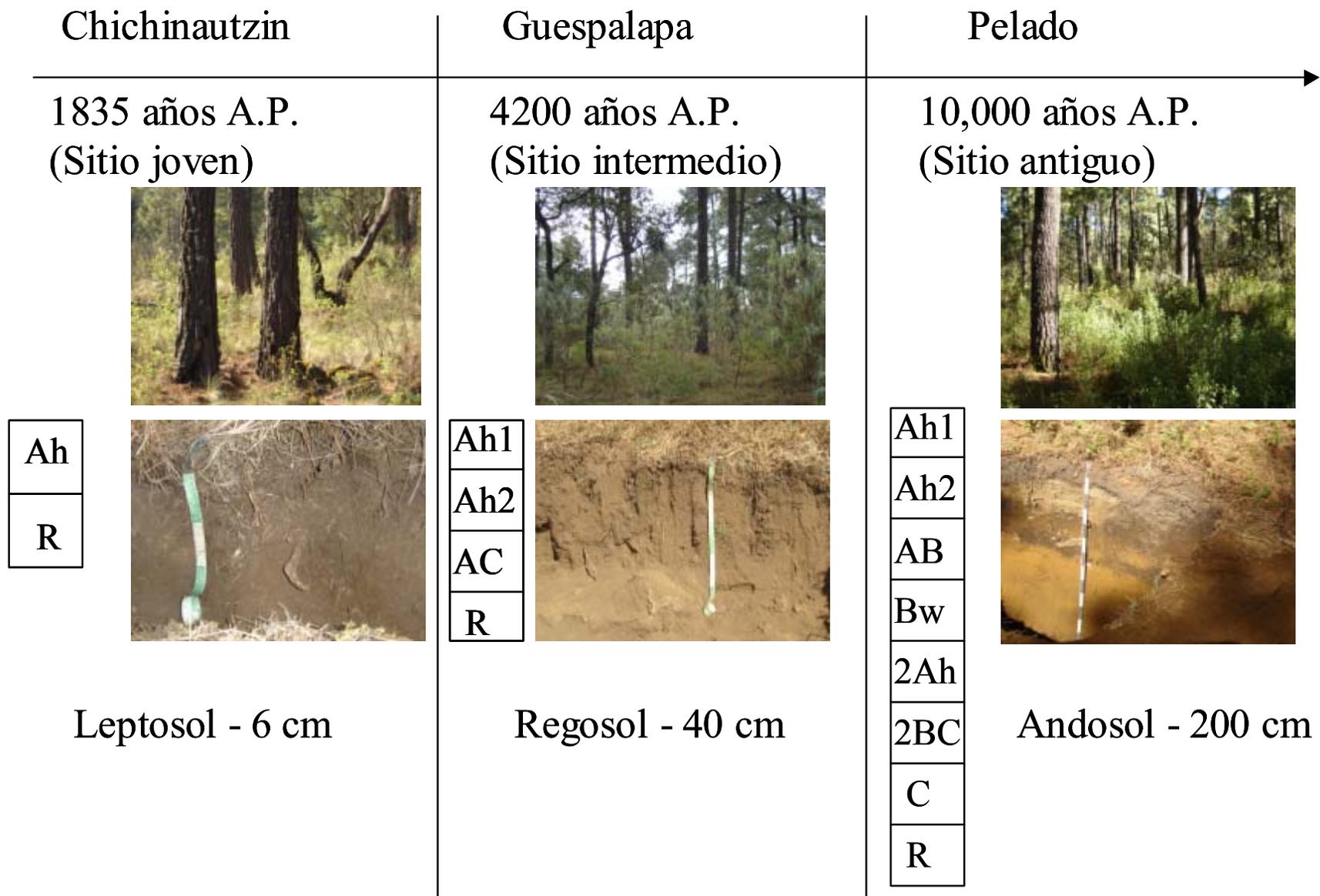


Figura 3. Esquema de la cronosecuencia de suelos volcánicos en la Sierra del Chichinautzin, Morelos: sitios de estudio y descripción del perfil. *Fotos: Víctor Peña-Ramírez.*

2.1. Análisis de las variables ambientales

En cada uno de los tres sitios de estudio, localizados en los flujos de lava de conos volcánicos de distinta edad, se seleccionaron cinco individuos adultos de *Pinus montezumae* y se establecieron cuadrantes de muestreo (10 × 10 m) alrededor de estos árboles. Los árboles fueron seleccionados por estar relativamente aislados de otros árboles ECM y así evitar la interacción de múltiples raíces (Jonsson et al. 1999). La densidad arbórea fue de 160 árboles / ha en el sitio joven, 148 en el sitio de edad intermedia y 560 árboles en el sitio antiguo. Estos árboles pertenecieron en su mayoría al género *Pinus* (especies *herreriae*, *montezumae*, *patula*), con presencia de individuos de *Quercus laurina*, *Abies religiosa* y *Alnus firmifolia* (Peña-Ramírez, com. Pers.). Se midieron el diámetro, altura, área basal y cobertura foliar de los árboles de *P. montezumae* seleccionados y se evaluó su edad por medio de un estudio dendrocronológico (Peña-Ramírez et al. 2009). Estas variables fueron ponderadas por la edad del árbol para obtener las variables de crecimiento. Para poder establecer correlaciones precisas entre la distribución de los esporocarpos y las propiedades edáficas de los sitios, se muestrearon cuatro cilindros de suelo (2.5 cm de diámetro × 20 cm de largo) en los puntos cardinales de cada cuadrante durante el primer año de muestreo (Fig. 4). En el sitio más joven, la profundidad regular del suelo no alcanzó los 6 cm (cf. Cuadro 1), por lo cual cilindros de 5 × 5 cm se utilizaron para obtener el mismo volumen de suelo muestreado. Esta modificación metodológica constituyó una alternativa obligada por la escasa profundidad del horizonte orgánico, vinculado con la alta presencia de rocas, en el sitio más joven. Las muestras se tomaron en el horizonte orgánico del suelo, después de remover la capa de hojarasca. Las 60 muestras de suelo se secaron y tamizaron a 2 mm. Se determinó la concentración de fósforo disponible de cada muestra (Bray y Kurtz 1945), así como el nitrógeno total y el carbono total con un analizador Perkin Elmer 2400.

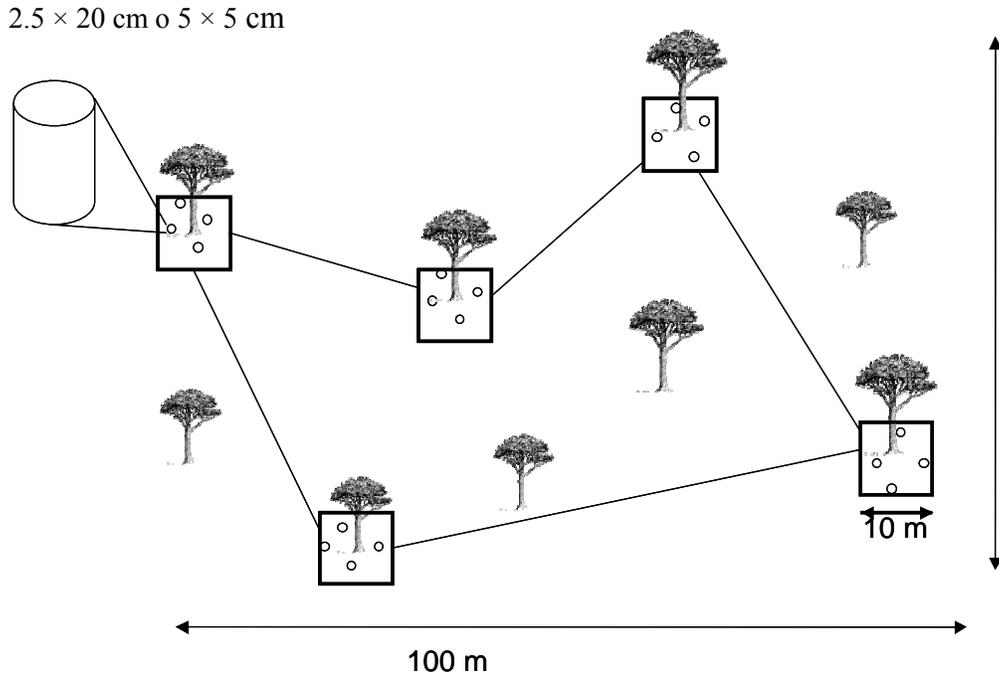


Figura 4. Tamaño y distribución de los cuadrantes (10 × 10 m) y transectos (± 50 m) para el muestreo de esporocarpos y de cilindros para el muestreo de ápices a lo largo de una cronosecuencia volcánica en la Sierra del Chichinautzin, México.

2.2. Muestreo de esporocarpos

Los esporocarpos ECM fueron recolectados cada semana durante tres temporadas de lluvias consecutivas (de junio a octubre, 2005-2007), dentro de los cuadrantes y en los transectos entre ellos (Fig. 4), con el propósito de capturar la mayor variabilidad espacial y temporal (Brown et al. 2006). Estos transectos variaron entre 30 y 70 m dado que el muestreo fue sesgado hacia la edad de los hospederos, y midieron 3 m de ancho. El área total muestreada fue de aproximadamente 2000 m² en los tres sitios. El muestreo de tres años permitió disminuir el sesgo causado por la variabilidad anual en los patrones de fructificación de los hongos (Koide et al. 2007; Krpata et al. 2007). El peso fresco de los esporocarpos recolectados en dos de los cinco cuadrantes de muestreo se registró cada semana para evaluar su biomasa fresca. La abundancia (número de ejemplares) de los esporocarpos y la riqueza (número de especies) se midieron en cada sitio. Los géneros fúngicos fueron identificados como ECM según los criterios descritos por Molina et al. (1992). Los esporocarpos se determinaron taxonómicamente a partir de sus características

morfológicas, macroscópicas y microscópicas. Los ejemplares se secaron y se almacenaron en el Micario del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico, en el Instituto de Geología, UNAM (números de acceso MCCECTC 001 a 1807).

2.3. Análisis estadísticos y de diversidad

Para examinar las diferencias en cuanto a la abundancia y riqueza de las comunidades de esporocarpos ECM, se utilizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las pruebas de Fisher LSD y de Mann-Whitney. El índice de diversidad de Shannon (Shannon y Weaver 1949) permitió evaluar la diversidad de la comunidad. Este índice se utiliza comúnmente para medir la diversidad ectomicorrízica, tanto de los esporocarpos como de los ápices (Giachini et al. 2004; Martín-Pinto et al. 2006; Twieg et al. 2009). Su fórmula es $H = - \sum (p_i) (\log p_i)$, donde H es la diversidad de especies y p_i es la proporción de individuos en el total de la muestra que pertenecen a la especie i.

Se evaluó la similitud entre las comunidades de esporocarpos ECM en los tres sitios gracias al índice de Sørensen, cuya fórmula es $CC = 2c / (s_1 + s_2)$, donde s_1 es el número de especies comunes a ambas comunidades y s_1 y s_2 son el número de especies en la comunidad 1 y la 2.

Se calculó el valor de importancia ecológica (VIE) de cada especie de acuerdo a la fórmula propuesta por Garibay-Orijel et al. (2009). El VIE toma en cuenta la abundancia relativa, la estimación de la producción de biomasa y las frecuencias relativas temporales y espaciales según la fórmula:

$$VIE_{sp_i} = AR_{sp_i} + EBR_{sp_i} + FTR_{sp_i} + FER_{sp_i}$$

donde VIE es el valor de importancia ecológica de una especie “i”, AR es la abundancia relativa, EBR la estimación de producción de biomasa relativa, FTR la frecuencia temporal relativa y FER la frecuencia espacial relativa de la especie. Dado que la biomasa se midió solamente en dos de los cinco cuadrantes por sitio, el VIE se calculó considerando únicamente estos seis cuadrantes. La EBR_{sp_i} se obtuvo dividiendo la estimación de la producción de biomasa total de una especie (Ebt_{sp_i}) por la suma de las Ebt de todas las especies. La EBT_{sp_i} se calculó: $EBT_{sp_i} = [(\sum p_{hi}) \div (N_{phsp_i})] (AA_{tsp_i})$, donde $\sum p_{hi}$ fue la sumatoria de los pesos húmedos de la especie “i”, N_{phsp_i} fue el número de medidas de

pesos húmedos de la especie “i” y AA_{tsp_i} fue la abundancia absoluta total de dicha especie. La frecuencia temporal de una especie se obtuvo dividiendo el número de fechas en que se recolectaron esporocarpos de la especie por el número de fechas totales de recolecta. La FTR de una especie se obtuvo dividiendo su frecuencia temporal por la suma de las frecuencias temporales de todas las especies. De igual manera, la frecuencia espacial de una especie se obtuvo dividiendo el número de cuadrantes en los cuales se recolectaron esporocarpos de la especie por el número total de sitios de muestreo (6 en total donde se midió la biomasa). La FER de una especie se obtuvo dividiendo su frecuencia espacial por la suma de las frecuencias espaciales de todas las especies.

Para examinar las relaciones entre los factores edáficos, las variables de crecimiento de los árboles y la distribución de los esporocarpos de las especies ECM con mayor valor de importancia ecológica, se utilizaron análisis de correlaciones y de Correspondencia Canónica (CCA por sus siglas en inglés). Este último explica la distribución de las especies abundantes en función de variables ambientales, y es una técnica de ordenación que se aplica comúnmente en los estudios de comunidades (Jongman et al. 1995; Legendre y Gallagher 2001). Correlaciones de Spearman fueron usadas previamente al análisis de CCA para comprobar si los factores de suelo y las variables de crecimiento del hospedero estaban correlacionados. Contrariamente a lo esperado, no se encontraron correlaciones significativas entre los dos tipos de variables ambientales y por lo tanto, se incluyeron ambos en el CCA. Sin embargo, el contenido total en C del suelo y el área basal del árbol no fueron incluidos dado que correlacionaron significativamente con otras variables ambientales. La significancia de las tendencias sugeridas por el CCA se comprobó mediante círculos de equilibrio en la grafica de ordenación y por correlaciones entre las variables del suelo y del árbol hospedero y las abundancias de las especies ECM con mayor VIE. El ANOVA de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples se usaron también para examinar las diferencias entre cada factor edáfico y cada variable de crecimiento del árbol. Todos los análisis estadísticos se implementaron con el programa STATISTICA 7.0, excepto el CCA que se implementó con el programa R (<http://www.r-project.org>) (Ihaka y Gentleman 1996).

3. Resultados

3.1. Variables ambientales

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de los análisis de suelo para cada cuadrante de muestreo. Las variables edáficas medidas (Cuadros 1 y 2) muestran que los indicadores de calidad de suelo (profundidad, espacio radical, capacidad de retención de agua, reservas de N) aumentaron con la edad del mismo y que por lo tanto existe un gradiente de calidad de suelo a lo largo de la cronosecuencia. En los sitios más jóvenes, el fósforo disponible (g/m^2) fue significativamente más alto. Al contrario, los contenidos en carbono y nitrógeno del horizonte orgánico fueron significativamente menores en el Chichinautzin que en los dos sitios más antiguos.

Las variables de crecimiento del hospedero fueron cuantificadas en un estudio previo de Peña-Ramírez et al. (2009) y se presentan en el Cuadro 3. Las variables fueron ponderadas con la edad del árbol para calcular índices de crecimiento. La altura y el área basal fueron significativamente más bajas en el sitio más joven, donde la calidad de suelo es menor. En este sitio, el espacio radical fue muy pequeño (menos de 10 cm) y variables como la capacidad de retención de agua o la cantidad de C y N en el horizonte orgánico del suelo fueron más bajas que en los otros sitios (Cuadro 2). No se encontraron diferencias significativas entre sitios para el diámetro o la cobertura foliar, pero los árboles fueron significativamente más altos en el sitio antiguo. Un gradiente de crecimiento de árboles se observó a través la cronosecuencia volcánica dado que estas variables aumentaron con la fertilidad del horizonte orgánico del suelo.

3.2. Comunidades de esporocarpos ECM

Un total de 153 especies ECM se registró en los tres sitios durante los tres años de muestreo. Estos datos se obtuvieron a partir de la recolección de 2795 esporocarpos ECM. La producción de esporocarpos ECM resultó ser diferente entre los sitios de muestreo, ya que tanto su biomasa como su abundancia varió entre los sitios (Cuadro 4). La biomasa de los esporocarpos ECM fue más alta en el sitio antiguo, a pesar de que su abundancia fue

mayor en el sitio joven: más de la mitad de los esporocarpos recolectados se encontraron en este sitio (52%). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre sitios en cuanto a riqueza. El cálculo del radio Abundancia / Biomasa para los 6 cuadrantes en donde se midió la biomasa mostró que los hongos ECM presentes en el sitio antiguo invierten más en su reproducción (radio más bajo) que los hongos de los dos sitios más jóvenes. La diversidad más baja se encontró en el sitio de edad intermedia (Cuadro 4).

Los tres sitios presentaron diferencias en cuanto a la composición de especies de la comunidad de esporocarpos ECM (Fig. 5), dado que más de la mitad de las especies de esporocarpos ECM (51.6%) fueron exclusivas de un sitio. Al contrario, solamente 19% de las especies se encontraron en los tres sitios. Géneros como *Inocybe* o *Laccaria* fueron abundantes en todos los sitios, representando respectivamente 29 y 17% de la abundancia total. Otros géneros como *Cortinarius* o *Tricholoma* parecieron ser más dependientes del sitio, con altas proporciones de especies exclusivas de un sitio (59 y 73% respectivamente, ver Apéndice A). La mayor proporción de especies exclusivas de un sitio se encontró en el sitio joven (38.5% contra 27.5% para el sitio de edad intermedia y 23.1% para el sitio antiguo).

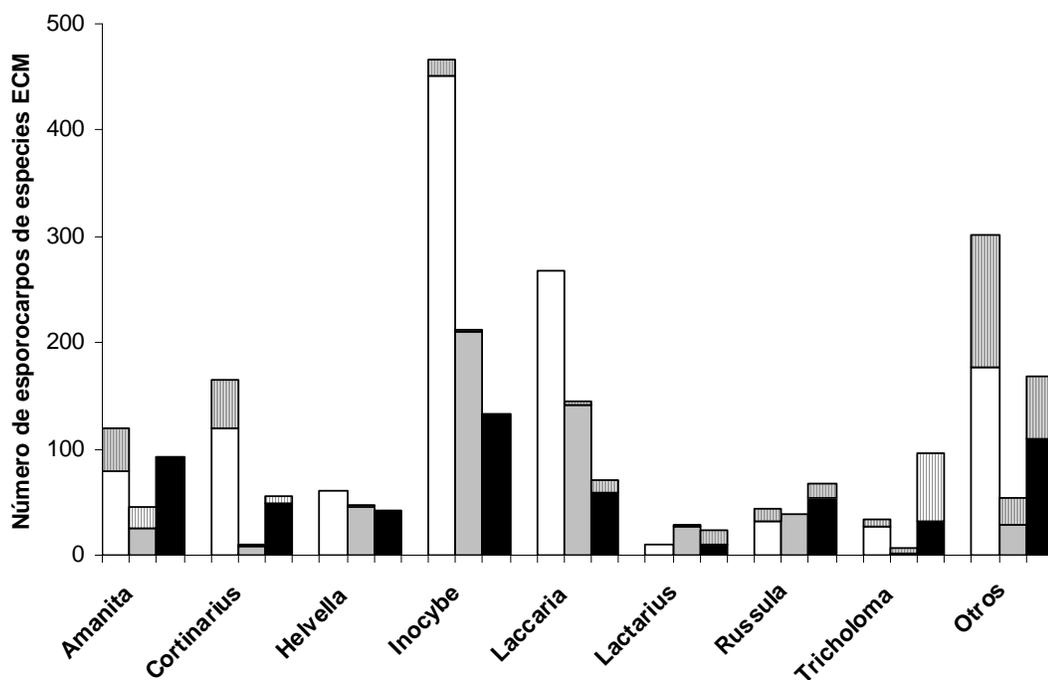


Figura 5. Número de esporocarpos ECM recolectados por género y por sitio (blanco: 1,835 años A.P.; gris: 4,200 años A.P.; negro: 10,000 años A.P.) Las barras rayadas representan las especies exclusivas de un sitio.

Cuadro 2. Contenidos en C, N y P del horizonte orgánico del suelo por cuadrante (C1 - C5) y promedio \pm error estándar en los tres sitios de estudio.

Cuadrantes	Chichinautzin*					Guespalapa**					Pelado**				
	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
C (kg/m ²)	8.9	6.2	7.6	6.5	9.2	16.1	20.2	14.3	15.1	23.1	16.7	13.2	18.5	11.8	16.8
Promedio por sitio	7.68 ± 0.63^a					17.8 ± 1.13^b					15.4 ± 1.36^b				
N (kg/m ²)	0.49	0.36	0.46	0.32	0.47	0.96	1.23	0.87	0.89	1.24	0.89	0.8	1.06	0.74	0.97
Promedio por sitio	0.42 ± 0.03^a					1.04 ± 0.05^b					0.89 ± 0.06^b				
C:N	18.4	17.2	17.5	18.3	17.3	16.6	16.4	16.2	16.8	18.5	18.3	16.4	17.3	15.1	17
Promedio por sitio	17.7 ± 0.78^a					16.9 ± 0.31^a					16.8 ± 0.45^a				
P (g/m ²)	1.76	0.59	3.48	1.49	3.35	2.55	1.14	2	2.59	3.65	1.16	1.31	2.45	0.69	1.28
Promedio por sitio	2.13 ± 0.37^{ab}					2.39 ± 0.29^a					1.38 ± 0.19^b				

*Muestras de suelo tomadas a una profundidad de 0-5 cm.

**Muestras de suelo tomadas a una profundidad de 0-20 cm.

Diferentes letras entre los promedios indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Cuadro 3. Variables de crecimiento y su promedio (\pm error estándar) de los individuos de *Pinus montezumae** por cuadrantes (C1 – C5) en los tres sitios de estudio (modificado de Peña-Ramírez et al. 2009).

	Chichinautzin					Guespalapa					Pelado				
	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
Edad de los árboles (años)	88	109	94	48	85	126	88	90	91	93	69	102	89	95	95
Diámetro de los árboles (cm)	43.0	41.3	55.8	42.8	47.7	61.3	54.4	75.2	60.7	57.9	53.7	54.7	58.4	64.0	76.9
Diámetro / edad	0.49	0.38	0.59	0.89	0.46	0.49	0.62	0.84	0.67	0.62	0.78	0.54	0.66	0.67	0.81
Promedio por sitio	0.58 ± 0.09^a					0.65 ± 0.06^a					0.69 ± 0.05^a				
Área basal de los árboles (m ²)	0.15	0.13	0.24	0.14	0.18	0.29	0.23	0.44	0.29	0.26	0.23	0.23	0.27	0.32	0.46
Área basal / edad	0.002	0.001	0.003	0.003	0.002	0.002	0.003	0.005	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.005
Promedio por sitio	0.0021 ± 0.0003^a					0.0032 ± 0.0005^{ab}					0.0034 ± 0.0004^b				
Altura de los árboles (m)	14.7	10.1	18.1	14.6	18.6	22.6	18.1	18.7	17.6	23.6	29.5	30.8	32.8	30.7	34.6
Altura / edad	0.17	0.09	0.19	0.30	0.22	0.18	0.21	0.21	0.19	0.25	0.43	0.30	0.37	0.32	0.36
Promedio por sitio	0.19 ± 0.03^a					0.21 ± 0.01^a					0.36 ± 0.02^b				
Cobertura foliar de los árboles (m ²)	82.5	33.7	103.9	99.4	75.4	112.2	50.9	70.9	79.3	113.1	109.4	71.6	87.4	120.8	189.9
Cobertura foliar / edad	0.94	0.31	1.10	2.07	0.89	0.89	0.58	0.79	0.87	1.22	1.58	0.70	0.98	1.27	2.00
Promedio por sitio	1.06 ± 0.29^a					0.87 ± 0.10^a					1.31 ± 0.23^a				

* Las variables de crecimiento de los hospederos se midieron en un árbol por cuadrante. Diferentes letras entre los promedios indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Cuadro 4. Biomasa promedio por cuadrante, abundancia y riqueza totales, radio Abundancia / Biomasa y diversidad de las comunidades de esporocarpos ECM en los tres sitios de estudio.

	Biomasa de esporocarpos (g) (por cuadrante)	Abundancia total: número de esporocarpos recolectados anualmente	Riqueza total: número de especies de esporocarpos recolectados anualmente	Radio anual Abundancia / Biomasa*	Índice de diversidad anual de Shannon
Chichinautzin	23.3 ± 10.5^a	489 ± 78^a	64 ± 4^a	0.460 ± 0.065^a	1.47 ± 0.026^{ab}
Guespalapa	21.0 ± 4.7^a	195 ± 50^b	36 ± 3^a	0.315 ± 0.117^a	1.30 ± 0.075^a
Pelado	37.3 ± 0.9^b	250 ± 35^b	49 ± 5^a	0.123 ± 0.004^b	1.49 ± 0.044^b

Nota: Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores son promedios anuales \pm el error estándar.

* Calculado para los 6 cuadrantes donde se midió la biomasa.

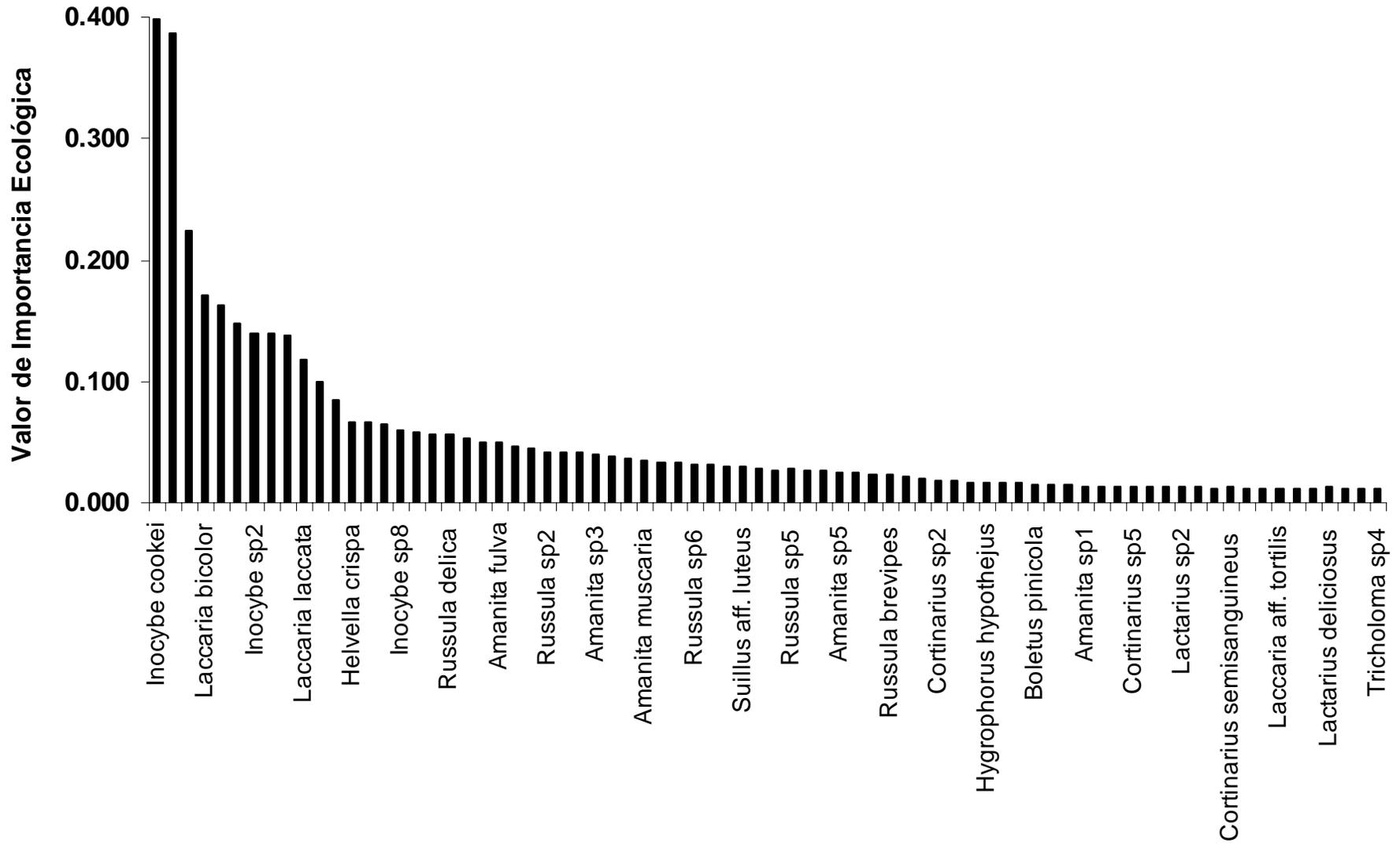


Figura 6. Valor de importancia ecológica de las especies de hongos ECM medido a partir de los esporocarpos de las especies recolectadas en 6 cuadrantes de muestreo.

Los resultados de los cálculos de las diferentes variables ecológicas evaluadas para cada una de las especies que se recolectaron en los cuadrantes donde se midió la biomasa se presentan en el Apéndice B. Las especies con mayor valor de importancia ecológica fueron *Inocybe cookei* Bres., *Cortinarius* sp. 3, *Inocybe* sp. 4, *Laccaria bicolor* (Maire) y *Inocybe* sp. 6. Se consideraron como dominantes aquellas especies con VIE > 0.1. De las 11 especies dominantes, 6 pertenecieron al género *Inocybe* y 2 al género *Laccaria* (Fig. 6). A nivel de sitio, algunas especies exclusivas comunes (ver Apéndice A) fueron *Gomphus floccosus* (Schwein.) Singer y *Amanita muscaria* (L.) Lam. en el Chichinautzin; *Amanita* sp. 1 y *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan en el Guespalapa; y *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm. y *Cantharellus cibarius* Fr. para el Pelado.

Los índices de Sørensen establecieron una secuencia de similitud “sitio joven - sitio antiguo” (0.51) > “sitio joven – sitio intermedio” (0.46) > “sitio intermedio – sitio antiguo” (0.45). Las comunidades de esporocarpos ECM fueron más parecidas en cuanto a su riqueza en los dos sitios más contrastantes. Sin embargo, este índice no considera la composición de especies de la comunidad por lo cual es necesario explorar los cambios en la distribución de estas especies a un nivel más fino.

3.3. Análisis multivariado de la composición de especies de esporocarpos ECM

Los resultados del CCA permitieron obtener un mejor entendimiento de los efectos de las variables del suelo y del árbol hospedero sobre la distribución de los esporocarpos de hongos ECM en la Sierra del Chichinautzin (Fig. 7). Para implementar este análisis, se consideraron las abundancias de las 11 especies dominantes (VIE > 0.1), promediadas para los tres años de muestreo.

Los dos ejes del diagrama explicaron 39.3% y 21.7% de la distribución de los esporocarpos de especies ECM respectivamente. El ratio C:N y el contenido en N del suelo fueron las variables ambientales con los puntajes más altos para el eje CCA1 (-0.72 y 0.70 respectivamente), con especies a la izquierda positivamente relacionadas con el ratio C:N y negativamente con el contenido total en N del horizonte orgánico del suelo y por lo tanto más abundantes en el sitio joven. El diámetro y la cobertura foliar ponderados por la edad de los árboles hospederos obtuvieron los puntajes más altos para el eje CCA2 (-0.79 para

ambos), con especies arriba del diagrama negativamente relacionadas con el crecimiento de los hospederos. Los diferentes sitios no se agruparon en el diagrama de acuerdo a su composición de géneros ECM. Las especies que contribuyeron significativamente a la construcción del diagrama fueron *Cortinarius* sp. 3, *Inocybe cookei*, *Inocybe fastigiata*, *Inocybe* sp. 2, *Inocybe* sp. 4, *Inocybe* sp. 6, *Inocybe* sp. 7, *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata* y *Lyophyllum decastes*. La abundancia de *Inocybe fastigiata* parece estar influenciada positivamente por el N total del horizonte orgánico, dado que su vector está casi paralelo al eje “N”. Al contrario, la distribución de *Lyophyllum decastes* parece más relacionada con las tasas de crecimiento de los árboles.

El diagrama demuestra que existen diferentes respuestas a las variables de suelo y de árbol dentro de los mismos géneros fúngicos, dado que especies perteneciendo al mismo género no se encontraron agrupadas en la ordenación. Estos resultados demostraron que algunos géneros presentan variaciones inter-específicas en cuanto a sus respuestas a las variables ambientales (*Inocybe*).

Se utilizaron correlaciones de Spearman para corroborar las tendencias sugeridas por el CCA. La riqueza en especies estuvo significativa y negativamente correlacionada con los contenidos totales en C y N del suelo, lo que indica que la riqueza de los esporocarpos aumentó cuando la calidad de suelo disminuyó. Se encontraron de igual manera correlaciones significativas entre las variables edáficas y la abundancia de algunas especies fúngicas. *Inocybe* sp. 4 correlacionó negativamente con los contenidos en C y N del horizonte orgánico, *Inocybe fastigiata* negativamente con el contenido en P disponible y *Laccaria laccata* positivamente con éste. Los resultados de las correlaciones se presentan en el Cuadro 5.

La abundancia y riqueza total fueron negativamente correlacionadas con el área basal del hospedero. Se encontraron también correlaciones significativas a nivel de especie para *Helvella macropus*, *Inocybe cookei*, *Inocybe fastigiata*, *Inocybe* sp. 2, *Inocybe* sp. 3 e *Inocybe* sp. 4, *Inocybe* sp. 6 e *Inocybe* sp. 7. (Cuadro 5).

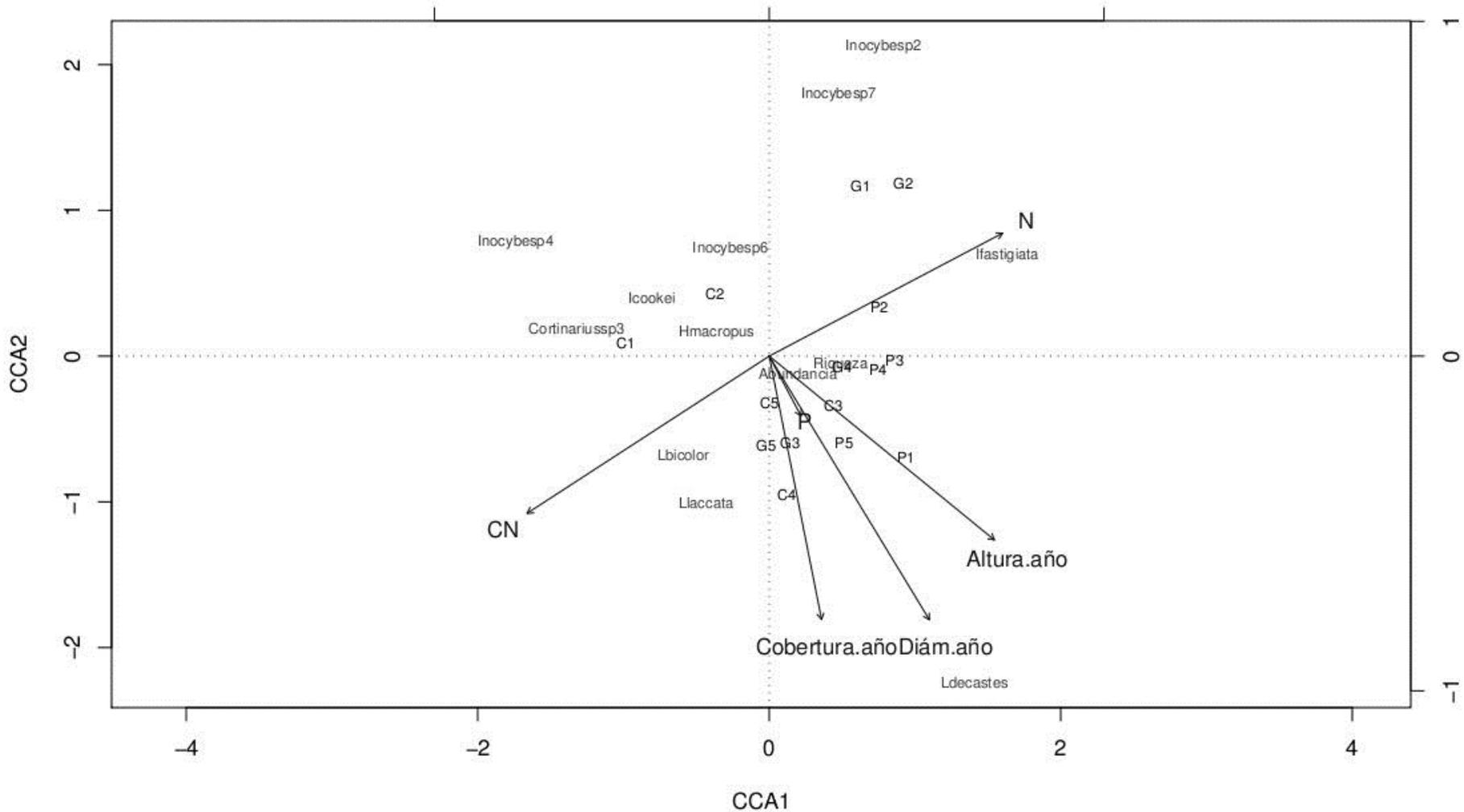


Figura 7. Diagrama basado en el CCA de las especies de esporocarpos de hongos ECM asociados a *Pinus montezumae* con respecto a: N total, P disponible y C:N en el horizonte orgánico del suelo, y variables de crecimiento del árbol como cobertura foliar, diámetro y altura, ponderados por la edad del hospedero. Las letras representan los sitios (C: Chichinautzin; G: Guespalapa; P: Pelado) y los números representan cada uno de los 5 cuadrantes por sitio.

Cuadro 5. Valores R de las correlaciones de Spearman de las especies de esporocarpos ECM dominantes con las variables del suelo y del hospedero.

	C total del suelo (kg/m ²)	N total del suelo (kg/m ²)	C:N del suelo	P disponible del suelo (g/m ²)	Diámetro del árbol (cm/año)	Área basal del árbol (m ² /año)	Altura del árbol (m/año)	Cobertura foliar del árbol (m ² /año)
Abundancia total	-0.491	-0.477	-0.108	0.272	-0.376	-0.611*	-0.254	-0.208
Riqueza total	-0.723*	-0.690*	0.040	0.230	-0.428	-0.640*	-0.464	-0.209
<i>Inocybe cookei</i>	-0.320	-0.271	-0.217	-0.100	-0.646*	-0.681*	-0.477	-0.430
<i>Cortinarius</i> sp. 3	-0.079	-0.108	-0.021	0.268	-0.094	-0.113	0.236	0.194
<i>Inocybe</i> sp. 4	-0.634*	-0.640*	-0.175	0.482	-0.325	-0.584*	-0.442	-0.053
<i>Laccaria bicolor</i>	-0.228	-0.241	0.165	0.417	0.027	-0.248	-0.304	-0.061
<i>Inocybe</i> sp. 6	-0.026	0.069	-0.230	-0.057	-0.490	-0.498	-0.476	-0.620*
<i>Inocybe fastigiata</i>	0.328	0.310	-0.362	-0.535*	-0.025	0.113	0.262	-0.531*
<i>Inocybe</i> sp. 2	0.193	0.224	-0.222	-0.056	-0.520*	-0.399	-0.173	-0.355
<i>Lyophyllum decastes</i>	0.186	0.093	-0.247	0.309	0.247	0.247	0.433	0.309
<i>Helvella macropus</i>	-0.203	-0.119	0.286	0.045	-0.365	-0.324	-0.636*	-0.523*
<i>Laccaria laccata</i>	-0.363	-0.349	0.302	0.529*	-0.061	-0.284	-0.460	0.061
<i>Inocybe</i> sp. 7	-0.114	-0.021	-0.293	-0.229	-0.414	-0.268	-0.695*	-0.479

Las variables de árboles están ponderadas por edad.

* Correlaciones significativas $p < 0.05$.

4. Discusión

4.1. Variables ambientales

El contenido más alto en P disponible del horizonte orgánico del suelo observado en el sitio más joven es característico de los suelos volcánicos jóvenes. Las etapas tempranas de una cronosecuencia volcánica se caracterizan típicamente por una cantidad más alta de P en el suelo, liberado a partir de la intemperización rápida del vidrio volcánico (Shoji et al. 1993). De manera contraria, los contenidos de C y N generalmente aumentan conforme el suelo se va desarrollando (Peña-Ramírez et al. 2009).

La altura y el diámetro de los hospederos, estandarizados por edad, fueron menores en el sitio joven, probablemente debido a las menores cantidades de C y N en el horizonte

orgánico, al poco espacio radical y a la baja capacidad de retención de agua en este sitio que limitan su crecimiento. El perfil de suelo en el Chichinautzin es muy heterogéneo y además presentó una elevada cantidad de rocas que impidió el desarrollo de las raíces. Peña-Ramírez et al. (2009) describieron un mejoramiento de la calidad de sitio conforme se va desarrollando el suelo, y por lo tanto un aumento de los índices de crecimiento de los árboles y de la productividad forestal. Mantener constante la especie de los hospederos a través de los sitios y ponderar las variables de crecimiento de los árboles con la edad de cada individuo permitió estimar el efecto de la calidad del suelo sobre el crecimiento de los árboles. Muchos estudios de comunidades fúngicas se enfocaron a analizar el efecto de la sucesión de los hospederos sobre la distribución de los hongos ECM (Visser 1995; Taylor y Bruns 1999; Twieg et al. 2007) pero pocos han considerado las diferencias en la dinámica de crecimiento de los árboles entre sitios. La composición y diversidad de las comunidades de hongos ECM no sólo difiere con la edad de los bosques sino también con sus tasas de crecimiento (Senn-Irlet y Bieri 1999).

4.2. Comunidades de esporocarpos ECM

Se encontraron diferencias significativas en la abundancia total y biomasa por cuadrante de los esporocarpos ECM en los tres sitios de la cronosecuencia. Dado que las condiciones climáticas fueron relativamente similares entre los tres sitios y que la especie y la edad del hospedero se mantuvieron constantes, las propiedades edáficas pueden ser las posibles determinantes de las diferencias encontradas. Estos resultados coincidieron con los de Trudell y Edmonds (2004) quienes encontraron que la producción de esporocarpos está influenciada por factores del suelo como la humedad o el contenido en nitrógeno, aún cuando no encontraron ninguna correlación entre estas variables y la riqueza en especies de la comunidad de esporocarpos ECM. La abundancia más alta se encontró en el sitio joven, mientras que la mayor biomasa se observó en el sitio antiguo. La cantidad de carbono total del horizonte Ah del suelo fue mayor en el caso del sitio antiguo (Cuadro 1) y, junto con la cantidad de agua disponible en este sitio, podría explicar la mayor biomasa de esporocarpos encontrada en el volcán Pelado. Tóth y Feest (2007) describieron que una producción alta de esporocarpos significa que las especies fúngicas poseen suficientes nutrientes y

energía para reproducirse sexualmente. Esta energía puede provenir del hospedero en forma de fotosintatos o del carbono del suelo cuando las especies de hongos tienen la capacidad de degradar el carbono de otras fuentes (Nara et al. 2003). El ratio Abundancia / Biomasa, menor en el sitio antiguo, corroboró que las especies presentes en el sitio antiguo invirtieron más energía en su reproducción sexual que las especies de los sitios más jóvenes. Por otra parte, el número más alto de esporocarpos se recolectó en el sitio más joven, que fue también el menos fértil. Adicionalmente, es preciso reconocer que los cambios en la distribución de las especies de hongos ECM pueden ser atribuidos en parte a la gran variabilidad temporal y espacial de los esporocarpos (Koide et al. 2007; Krpata et al. 2007), aunque el muestreo de los cuerpos fructíferos durante tres años consecutivos permitió reducir este sesgo.

Existe una discrepancia entre la densidad arbórea de los tres sitios que pudo haber sesgado cualquier comparación. En el sitio antiguo, la alta densidad arbórea puede haber ocasionado una ruptura en la red ectomicorrízica y por lo tanto, los esporocarpos muestreados pueden provenir de un micelio asociado a otro árbol que no sea el individuo de *P. montezumae* seleccionado al centro del cuadrante de muestreo. Sin embargo, analizar las comunidades de hongos ECM *in situ* siempre tiene sus limitaciones y se procuró escoger los árboles de estudio lo más aislados posible de cualquier otro árbol ectomicorrízico.

Durall et al. (2006) establecieron que un rango de 70 a 241 taxones de esporocarpos se describieron en estudios pluri-anales de hongos ECM en la parte oeste de América del Norte. En el presente trabajo se encontraron 153 especies de esporocarpos, en un área de muestreo relativamente reducida. De estas especies, solamente el 60% se pudo determinar a nivel de especie, debido a la falta de monografías para el país que impide la identificación de algunas especies. Es preciso llevar a cabo más estudios en estos ecosistemas dado que la mayoría de éstos se han enfocado a hongos comestibles, siendo la recolecta de hongos una actividad de prima importancia en México (Zamora y Nieto de Pascual-Pola 1995; Pérez-Moreno et al. 2008; Garibay-Orijel et al. 2009). Adicionalmente, la mayoría de las claves de identificación están hechas para hongos de Europa o América del Norte y esto constituye una limitante para la determinación de las especies fúngicas en países tropicales, lo cual explica que muchas especies listadas en el Apéndice A fueron determinadas a nivel de género solamente.

4.3. Análisis multivariados de la composición de la comunidad de esporocarpos ECM

Se encontraron correlaciones significativamente negativas entre la riqueza total y los contenidos del suelo en C y N. Las abundancia y riqueza totales fueron también negativamente correlacionadas con el área basal de los árboles, lo que contradice los resultados encontrados por Nara et al. (2003). Es interesante notar que la riqueza de la comunidad ECM fue más alta en el sitio joven, donde la calidad del suelo y las tasas de crecimiento de los árboles fueron menores, aún cuando las especies fúngicas ECM dependen del carbono proviniendo del hospedero para producir sus fructificaciones (Göttlicher et al. 2008). Sin embargo, Gehring et al. (1998) describen varios casos de efectos independientes de factores abióticos sobre las plantas hospederas y sus hongos ECM asociados. Por ejemplo, Villeneuve et al. (1989) encontraron que la riqueza en especies de esporocarpos no disminuía cuando las condiciones ambientales se volvían más estresantes. No obstante, la comparación de nuestros resultados con los de otros estudios se dificulta dado que los factores edáficos que otros trabajos consideran son muchas veces resultado de cambios por influencia antropogénica (Lilleskov et al. 2001; Tarvainen et al. 2003). Esta discrepancia confirma la necesidad de examinar la composición en especies de las comunidades de esporocarpos en ecosistemas naturales para poder concebir más patrones en ecología de comunidades.

Trudell y Edmonds (2004) encontraron que la humedad y el contenido en nitrógeno eran los dos factores principales responsables de las diferencias entre las comunidades de macrohongos en bosques de coníferas. Sin embargo, en el presente trabajo, sólo *Inocybe* sp. 4 fue significativamente correlacionado con el contenido en N del horizonte orgánico. No se encontró ningún factor dentro de los medidos que explicara con mayor peso la distribución de los esporocarpos de especies ECM y ésta parece más bien influenciada por una combinación de variables. Las tasas de crecimiento de los hospederos y el grado de desarrollo del suelo en conjunto influenciaron la sucesión y producción de esporocarpos (Nara et al. 2003) y parecieron explicar mejor la composición de la comunidad juntos que cuando son considerados individualmente (Jongman et al. 1995). El diagrama de ordenación de Baar y ter Braak (1996) sugirió que cantidades menores de nutrimentos y materia orgánica eran favorables para los hongos ECM. En este estudio, también se

encontró que la abundancia y la riqueza de esporocarpos fueron más altas en el sitio con menor desarrollo. La mayoría de las especies mostró estar negativamente correlacionada con variables de crecimiento de los árboles (*Inocybe* spp. y *Helvella macropus*) y por lo tanto produjeron más estructuras reproductivas en condiciones de estrés. Los contenidos más bajos de nutrientes y agua así como las tasas más lentas de crecimiento de los árboles descritas para el inicio de la cronosecuencia podrían ser compensados por la presencia de los hongos ECM, dado que la concentración foliar en nutrientes de los individuos de *P. montezumae* no fue diferente a lo largo de los sitios (Peña-Ramírez et al. 2009).

El cómo se distribuyen las especies de esporocarpos ECM todavía no es muy entendido, especialmente en regiones neotropicales donde pocos estudios fueron llevados a cabo para analizar las comunidades fúngicas (Liang et al. 2007). Adicionalmente, los factores responsables de la estructuración de las comunidades de hongos ECM parecen variar de un estudio a otro por las diferencias en los métodos de muestreo empleados, en los ecosistemas analizados o por la variabilidad inherente a la producción de esporocarpos. Se requiere más investigaciones acerca de la influencia de las propiedades edáficas, como el analizar el efecto de otros nutrientes, de la mineralización de N o de P, o del espesor y el pH del horizonte orgánico del suelo (Baar y ter Braak 1996; Liang et al. 2007). Enfocarse en especies particulares para estudiar más precisamente su distribución podría ayudar a esclarecer con mayor exactitud los principales factores que determinan los patrones de fructificación de las especies de hongos ECM.

5. Conclusiones

Se ha demostrado que existe un gradiente en la calidad de suelo y consecuentemente en las tasas de crecimiento de los árboles a lo largo de la cronosecuencia volcánica. La calidad del suelo no sólo determina el desarrollo de los árboles y la productividad del bosque, sino que también influencia la composición en especies de la comunidad de esporocarpos ECM. La riqueza en especies estuvo negativamente correlacionada con los contenidos en C y N del suelo y con el área basal del hospedero. La composición de especies de los esporocarpos de hongos ECM fue diferente a lo largo de la cronosecuencia de suelos.

Especies de los géneros *Inocybe* y *Laccaria* fructificaron abundantemente en los tres sitios y especies de los géneros *Amanita* y *Tricholoma* fueron abundantes en el sitio antiguo. Una gran proporción de estas especies fue exclusiva de un sitio (51.6%) y algunos géneros como *Tricholoma* presentaron hasta 73% de exclusividad con un sitio, lo que confirma la importancia de variables edáficas como el carbono, el nitrógeno o el fósforo en la producción de esporocarpos epigeos. Los análisis de CCA y correlación no establecieron un factor único que explique distribución de los macrohongos, pero establecieron que las variables de suelo y de árbol en conjunto influenciaron la producción de los esporocarpos.

Todavía faltan monografías que describan los macrohongos de México para poder alcanzar una mejor determinación taxonómica de las especies recolectadas en campo. Sin embargo, se pudieron identificar especies generalistas, presentes en los tres sitios, como *Laccaria bicolor* o *Laccaria laccata*, que parecen estar adaptadas a las condiciones de sitio existentes a lo largo de la cronosecuencia estudiada. En el caso de que puedan establecer una simbiosis exitosa con plántulas de *P. montezumae* o de otras especies de pino nativas de la zona, podrían usarse como inoculante en los programas de reforestación llevados a cabo en la región. Adicionalmente, es preciso corroborar cuáles son las especies presentes a nivel de las raíces del hospedero, ya que son aquellas las que participan más activamente al aporte de nutrimentos y de agua para el árbol. La riqueza hipogea asociada a las raíces de los árboles adultos de *Pinus montezumae* se analiza en el tercer capítulo.

Literatura citada

- Baar, J., ter Braak, C.J.F. 1996. Ectomycorrhizal sporocarp occurrence as affected by manipulation of litter and humus layers in Scots pine stands of different age. *Appl. Soil Ecol.* **4**: 61-73.
- Bray, R.H., Kurtz, L.T. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* **59**: 39-45.
- Brown, N., Bhagwat, S., Watkinson, S. 2006. Macrofungal diversity in fragmented and disturbed forests of the Western Ghats of India. *J. Appl. Ecol.* **43**: 11-17.

- Crews, T.E., Kirayama, K., Fownes, J., Riley, R., Herbert, D., Mueller-Dombois, D., Vitousek, P. 1995. Changes in soil phosphorous fractions and ecosystem dynamics across a long chronosequence in Hawaii. *Ecology*, **76**(5): 1407-1424.
- Dighton, J., Mason, P.A. 1985. Mycorrhizal dynamics during forest tree development. *En Developmental Biology of Higher Fungi. Editado por D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Woods, J.C. Frankland.* Cambridge University Press, Cambridge, Gran Bretaña, pp. 117-139.
- Durall, D.M., Gamiet, S., Simard, S.W., Kudrna, L., Sakakibara, S.M. 2006. Effects of clearcut logging and tree species composition on the diversity and community composition of epigeous fruit bodies formed by ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* **84**: 966-980.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Can. J. Bot.* **74**: 1572-1583.
- Garibay-Orijel, R., Martínez-Ramos, M., Cifuentes, J. 2009. Disponibilidad de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Rev. Mex. Biodiv.* **80**: 521-534.
- Gehring, C.A., Theimer, T.C., Whitham, T.G., Keim, P. 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology*, **79**(5): 1562-1572.
- Giachini, A.J., Souza, L.A.B., Oliveira, V.L. 2004. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. *Mycorrhiza*, **14**: 375-381.
- Göttlicher, S.G., Taylor, A.F.S., Grip, H., Betson, N.R., Valinger, E., Högberg, M.N., Högberg, P. 2008. The lateral spread of tree root systems in boreal forests: Estimates based on ¹⁵N uptake and distribution of sporocarps of ectomycorrhizal fungi. *For. Ecol. Manage.* **255**: 75-81.
- Ihaka, R., Gentleman, R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* **5**: 299-314.
- Jongman, R.H.G., ter Braak, C.J.F., van Tongeren, O.F.R. 1995. Data analysis in community and landscape ecology. Cambridge University Press, Cambridge.

- Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Karén, O., Zackrisson, O. 1999. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytol.* **142**: 151-162.
- Kjøller, R., Clemmensen, K.E. 2009. Belowground ectomycorrhizal fungal communities respond to liming in three southern Swedish coniferous forest stands. *For. Ecol. Manage.* **257**: 2217-2225.
- Koide, R.T., Shumway, D.L., Xu, B., Sharda, J.N. 2007. On temporal partitioning of a community of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* **174**: 420-429.
- Kranabetter, J.M., Frieser, J., Gamiet, S., Kroeger, P. 2005. Ectomycorrhizal mushroom distribution by stand age in western hemlock - lodgepole pine forests of northwestern British Columbia. *Can. J. For. Res.* **35**: 1527-1539.
- Kranabetter, J.M., Frieser, J., Gamiet, S., Kroeger, P. 2009. Epigeous fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi as indicators of soil fertility and associated nitrogen status of boreal forests. *Mycorrhiza*, **19**: 535-548.
- Krpata, D., Mühlmann, O., Kuhnert, R., Ladurner, H., Göbl, F., Peintner, U. 2007. High diversity of ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos uva-ursi* in subalpine and alpine zones: Potential inoculum for afforestation. *For. Ecol. Manage.* **250**: 167-175.
- Legendre, P., Gallagher, E.D. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, **129**: 271-280.
- Liang, Y., Guo, L.D., Du, X.J., Ma, K.P. 2007. Spatial structure and diversity of woody plants and ectomycorrhizal fungus sporocarps in a natural subtropical forest. *Mycorrhiza*, **17**: 271-278.
- Lilleskov, E.A., Fahey, T.J., Lovett, G.M. 2001. Ectomycorrhizal fungal aboveground community change over an atmospheric nitrogen deposition gradient. *Ecol. Appl.* **11**: 397-410.
- Márquez, A., Verma, S.P., Anguita, F., Oyarzun, R., Brandle, J.L. 1999. Tectonics and volcanism of Sierra Chichinautzin: extension at the front of the Central Trans-Mexican Volcanic Belt. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* **93**: 125-150.

- Martín-Pinto, P., Vaquerizo, H., Peñalver, F., Olaizola, J., Oria-de-Rueda, J.A. 2006. Early effects of a wildfire on the diversity and production of fungal communities in Mediterranean vegetation types dominated by *Cistus ladanifer* and *Pinus pinaster* in Spain. *For. Ecol. Manage.* **225**: 296-305.
- Molina, R., Massicotte, H., Trappe, J.M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. *En Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process. Editado por M.F. Allen. Chapman and Hall, Nueva York*, pp. 357-423.
- Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A., Cifuentes, J., Caballero, J. 2004. Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity*, **17**: 115-143.
- Nara, K., Nakaya, H., Hogetsu, T. 2003. Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytol.* **158**: 193-206.
- Peña-Ramírez, V.M., Vázquez-Selem, L., Siebe, C. 2009. Soil organic carbon stocks and forest productivity in volcanic ash soils of different age (1835 – 30,500 years B.P.) in Mexico. *Geoderma*, **149**: 224-234.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Yescas-Pérez, A., Delgado-Alvarado, A., Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. *Econ. Bot.* **62**(3): 425-436.
- Perry, J.P. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Oregon.
- Richard, F., Moreau, P.A., Selosse, M.A., Gardes, M. 2004. Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Can. J. Bot.* **82**: 1711-1729.
- Rinaldi, A.C., Comandini, O., Kuyper, T.W. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*, **33**: 1-45.
- Senn-Irlet, B., Bieri, G. 1999. Sporocarp succession of soil-inhabiting macrofungi in an autochthonous subalpine Norway spruce forest of Switzerland. *For. Ecol. Manage.* **124**: 169-175.
- Shannon, C.E., Weaver, W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Shoji, S., Nanzyo, M., Dahlgren, R.A. 1993. *Volcanic Ash Soils: Genesis, Properties and Utilization*. *Developments in Soil Science* 21. Elsevier, Amsterdam.

- Siebe, C., Rodríguez-Lara, V., Schaaf, P., and Abrams, M. 2004. Radiocarbon ages of Holocene Pelado, Guespalapa, and Chichinautzin scoria cones, south of Mexico City: Implications for archaeology and future hazards. *Bull. Volcanol.* **66**: 203-225.
- Silva, L., Romero, F.J., Velázquez, A., and Almeida-Leñero, L. 1999. La vegetación de la región de la montaña del sur de la Cuenca de México. *En Biodiversidad de la Región de Montaña del Sur de la Cuenca de México. Editado por A. Velázquez, y L.J. Romero.* Universidad Autónoma Metropolitana. Secretaría del Medio Ambiente, D. F., Mexico, pp. 65-92.
- Smith, S.E., Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, third ed. Academic Press, Londres.
- Smits, M.M., Bonneville, S., Haward, S., Leake, J.R., 2008. Ectomycorrhizal weathering, a matter of scale? *Mineral. Mag.* **72**(1): 131-134.
- Tarvainen, O., Markkola, A.M., Strömmer, R. 2003. Diversity of macrofungi and plants in Scots pine forests along an urban pollution gradient. *Basic Appl. Ecol.* **4**: 547-556.
- Taylor, D.L., Bruns, T.B. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Mol. Ecol.* **8**: 1837-1850.
- Tóth, B.B., Feest, A. 2007. A simple method to assess macrofungal sporocarp biomass for investigating ecological change. *Can. J. Bot.* **85**: 652-658.
- Trudell, S.A., Edmonds, R.L. 2004. Macrofungus communities correlate with moisture and nitrogen abundance in two old-growth conifer forests, Olympic National Park, Washington, USA. *Can. J. Bot.* **82**: 781-800.
- Twieg, B.D., Durall, D.M., Simard, S.W. 2007. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytol.* **176**: 437-447.
- Twieg, B.D., Durall, D.M., Simard, S.W., Jones, M.D. 2009. Influence of soil nutrients on ectomycorrhizal communities in a chronosequence of mixed temperate forests. *Mycorrhiza*, **19**: 305-316.
- Valdés, M., Córdova, J. 2003. Understory vegetation and ectomycorrhizal sporocarp diversity in response to pine regeneration methods in Oaxaca, Mexico. *West. J. Appl. For.* **18**(2): 101-108.
- Velázquez, A. 1994. Multivariate analysis of the vegetation of the volcanoes Tláloc and Pelado, Mexico. *J. Veg. Sci.* **5**: 263-270.

- Visser, S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* **129**: 389-401.
- Villeneuve, N., Grandtner, M.M., Fortin, J.A. 1989. Frequency and diversity of ectomycorrhizal and saprophytic macrofungi in the Laurentide Mountains of Quebec. *Can. J. of Bot.* **67**: 2616–2629.
- Wallander, H. 2000. Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil*, **218**: 249-256.
- Zamora-Martínez, M.C., Nieto de Pascual-Pola, C. 1995. Natural production of wild edible mushrooms in the southwestern rural territory of Mexico City, Mexico. *For. Ecol. Manage.* **72**: 13-20.

CAPÍTULO II

Las comunidades de hongos saprófitos son distintas en diversidad y composición de especies a lo largo de una cronosecuencia volcánica en la Sierra del Chichinautzin, México

Saprophytic fungal communities change in diversity and species composition across a volcanic soil chronosequence at Sierra del Chichinautzin, Mexico

Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Pérez-Moreno, J. 2010. *Annals of Microbiology* (en prensa).

Los hongos saprófitos son unos de los descomponedores más activos de la hojarasca del bosque y su diversidad está influenciada por la heterogeneidad espacial de los sustratos. En este trabajo se examinaron los cambios en la estructura y composición de la comunidad de hongos saprófitos en una cronosecuencia de suelos volcánicos en la Sierra del Chichinautzin, Morelos. Los hongos saprófitos fueron recolectados durante tres años consecutivos en los tres sitios de muestreo previamente descritos. Su recolecta se efectuó de la misma forma que la de los esporocarpos de hongos ectomicorrízicos. No se encontraron diferencias significativas en términos de abundancia y riqueza entre los tres sitios. Sin embargo, la diversidad fue más alta en el sitio más joven y menos fértil. El alto porcentaje de especies exclusivas de un sitio demostró que la composición de especies fue muy dependiente del sitio y por lo tanto de las características edáficas. Especies diferentes tuvieron respuestas diferentes a las variables del suelo. La diversidad más alta encontrada en el sitio joven puede constituir un mecanismo de protección contra las condiciones estresantes existiendo en este sitio, dado que especies diferentes tienen distintas funciones ecológicas y pueden llevar a una degradación más eficiente de los sustratos recalcitrantes.

Saprophytic fungal communities change in diversity and species composition across a volcanic soil chronosequence at Sierra del Chichinautzin, Mexico

Frédérique Reverchon ·
Pilar María del Ortega-Larrocea · Jesús Pérez-Moreno

Received: 22 October 2009 / Accepted: 22 January 2010
© Springer-Verlag and the University of Milan 2010

Abstract Saprophytic fungi are one of the most active decomposers of forest litter, and their diversity may be influenced by the spatial heterogeneity of substrates. We examined the changes in saprophytic community structure and composition across a volcanic soil chronosequence, at Sierra del Chichinautzin, Mexico. Saprophytic fungi were collected for three consecutive years at three sampling sites with contrasting soil properties in a volcanic soil chronosequence ranging from 1,835 years B.P. to 10,000 years B.P. Although no significant differences were found in terms of abundance and richness between the three sites, Shannon diversity was higher at the youngest, less-fertile site. The high percentage of site-exclusive species showed that species composition was strongly dependent on the site and therefore on soil parameters. Different saprophytic species had divergent responses to soil variables, but most fungal taxa correlated negatively with the edaphic factors we measured. The highest diversity found at the young, less fertile site may represent an “insurance” mechanism against harsh conditions, since different species are likely to play

various ecological functions which may lead to a more efficient degradation of recalcitrant substrates.

Keywords Saprophytic fungi · Volcanic soil chronosequence · Fungal diversity · Community structure

Introduction

Saprophytic fungi are one of the most active decomposers of forest litter and therefore play an important role in the cycling of carbon, nitrogen, and other soil nutrients (Smith and Read 2008). Basidiomycetes are reported to be especially important for organic matter decomposition as they produce a wide range of ligninocellulolytic enzymes (Dix and Webster 1995). Although most substrates can be decomposed by many fungal species, the decomposition ability of each species varies depending on environmental conditions (Deacon 1985; Schimel et al. 1999) and on interactions with other fungi (Robinson et al. 1993; Kuyper and Verschoor 1995). It is acknowledged that the presence of specific taxa depends on the type and quality of litter available (Steffen et al. 2000), although scarce information has been provided about the association of particular saprophytic species with particular types of soil.

Species composition of saprophytic fungal communities could determine the extent of organic matter decomposition, since different fungal species perform different ecological functions (Setälä and McLean 2004; Deacon et al. 2006) and occupy complementary niches (Hedger 1985). Different microhabitats or substrates could influence, in turn, the diversity of decomposer fungi (Lodge and Cantrell 1995; Laessøe et al. 1996), especially since soil nutrients are often patchily distributed (Boddy et al. 2009). This patchy distribution is particularly critical in volcanic soils

F. Reverchon · P. María del Ortega-Larrocea
Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma
de México (UNAM),
04510 México, DF, México

J. Pérez-Moreno
Microbiología, Edafología, Colegio de Posgraduados,
Campus Montecillo, Km36.5 Carretera México-Texcoco,
56230 Montecillo, México

F. Reverchon (✉)
Departamento de Edafología, Instituto de Geología,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),
Apartado Postal 70-296,
04511 México, DF, México
e-mail: frederique_reverchon@hotmail.com

presenting a high spatial heterogeneity (Aplet et al. 1997). The discontinuous cover of young volcanic soils by lava flows creates a large amount of microniches, which in turn could enhance fungal diversity (Lodge 1997; Sulkava and Huhta 1998).

Owing to the lack of mutualistic interaction with higher plants, saprophytes are expected to be more dependent upon their respective substrates than are mycorrhizal fungi (Gebauer and Taylor 1999) and could therefore be influenced by abiotic factors such as soil nutrients or soil moisture (Zakaria and Boddy 2002; Richard et al. 2004). In order to examine the effect of soil factors on saprophyte fungal communities, we assessed the abundance, richness and diversity patterns of those communities across a volcanic soil chronosequence, where the different stages of pedogenesis generated contrasting soil properties. As soil develops, its nutrient status changes and soil quality as a whole improves (Peña-Ramírez et al. 2009). Since the mycelium of these fungi typically extend at the soil-litter interface (Boddy et al. 2009), these changes could influence the structure and species composition of the saprophytic fungal communities.

Methods

Study sites

This study was carried out at the Sierra del Chichinautzin Volcanic Field, located in the Trans-Mexican Volcanic Belt, at the southern margin of the Mexico City area. The Sierra is composed of numerous monogenetic volcanoes of different ages (Márquez et al. 1999), forming a chronosequence of volcanic soils. Three volcanoes of contrasting ages were selected: the young Chichinautzin volcano (1,835 years B.P.), the middle-aged Guespalapa volcano (4,200 years B.P.) and the oldest Pelado volcano (10,000 years B.P.). These volcanoes are closely spaced (less than 5 km) and are part of the Sierra del Chichinautzin Protected Area (Corredor Biológico de la Sierra del Chichinautzin). At each volcano, a study site was chosen. These study sites and their characteristics have been extensively described (see Peña-Ramírez et al. 2009). Volcanic soils at these sites present different stages of pedogenesis and therefore contrasting soil qualities (Table 1). Other site characteristics were kept similar in order to examine exclusively the influence of soil parameters: the altitude at the three sites was 3,100 m.a.s.l. and the slopes were less than 10° with southern orientation. Rainfall in the region shows a marked seasonality (80% of rains occur during the rainy season, between June and October). The dominant vegetation in the area is a pine–oak natural forest (Velázquez 1994) and the tree community at the three study sites is dominated by mature individuals of *Pinus montezu-*

mae Lamb. var. *montezumae*. Four soil samples were taken in the soil organic horizon at the cardinal points of each plot in order to establish precise relationships between sporocarp distribution and soil properties. Soil sampling was performed in the first year of survey, through 2.5-cm-diameter×20-cm-length soil cores. However, since soil depth at the youngest site did not reach 6 cm, 5×5 cm cores were used for sampling in order to obtain the same soil volume. All the soil samples were dried and sieved (<2 mm). Plant available phosphorus (P) concentration was determined in each sample (Bray and Kurtz 1945); total nitrogen (N) and carbon (C) analyses were performed with a Perkin Elmer 2400 analyser. Relevant site characteristics and properties of the soil organic horizon at each study sites are presented in Table 1.

Sampling of saprophytic sporocarps

Five plots (10×10 m) were established at each site in order to sample saprophytic sporocarps. These plots were separated from each other by approximately 100 m. Sporocarps were collected weekly on forest litter and decaying logs inside the plots and along transects between them during three consecutive rainy seasons (2005–2007), these transects varying from 30 to 70 m. We used both macroscopic and microscopic characteristics for sporocarp identification (Bon 2004). Abundance and species richness were measured at each site. Voucher specimens were dried and stored in the Herbarium of the Laboratorio Microcosmos Bioedáfico, at the Instituto de Geología, UNAM.

Diversity assessment and statistical analysis

We examined differences in sporocarp abundance and richness between sites using one-way ANOVA and Mann-Whitney *U* tests. The analyses were based on the abundance and richness patterns of saprophytic communities in the five plots established at each site. Species composition of fungal communities was assessed through rank-abundance curves of the dominant saprophytic species at each site. We defined as abundant species with a relative abundance higher than 1%. Shannon diversity index was used to evaluate and compare the diversity of saprophytic sporocarp communities across the soil chronosequence. Canonical correspondence analysis (CCA) was used to assess the relationships between dominant fungal species and soil factors at the site level. An equilibrium circle was used on the ordination plot to determine whether fungal genera significantly influenced the overall fungal distribution. The patterns revealed by CCA were thereafter tested for significance by Spearman correlation analysis. Due to practical limitations, soil variables were measured during the first sampling year only. Therefore, CCA and correlation analysis were performed with the 2005 sporocarp data

Table 1 General site characteristics (modified from Peña-Ramírez et al. 2009) and selected soil variables of the plots surveyed for saprophytic sporocarps at the three study sites

	Young site					Middle-aged site					Old site				
Age of land surface (years B.P. ^a)	1,835±55					2,835±75 to 4,690±90					9,620±160 to 10,900±280				
UTM Coordinates	X: 482,041, Y: 2,109,907					X: 482,037, Y: 2,109,903					X: 475,922, Y: 2,114,796				
Soil classification (WRB 2006)	Mollic Leptosol					Lepti-vitric Andosol					Eutrisilic Andosol				
Total soil depth (cm)	6–35					30–41					193–200				
Available water (L m ⁻²)	28.2					95.4					301.6				
Soil organic horizon depth (cm)	5					27					43				
Soil organic horizon properties by plot	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
C (kg m ⁻²)	8.9	6.2	7.6	6.5	9.2	16.1	20.2	14.3	15.1	23.1	16.7	13.2	18.5	11.8	16.8
Mean per site ^b	7.68±0.63 a					17.8±1.13 b					15.4±1.36 b				
N (kg m ⁻²)	0.49	0.36	0.46	0.32	0.47	0.96	1.23	0.87	0.89	1.24	0.89	0.8	1.06	0.74	0.97
Mean per site ^b	0.42±0.03 a					1.04±0.05 b					0.89±0.06 b				
C:N	18.4	17.2	17.5	18.3	17.3	16.6	16.4	16.2	16.8	18.5	18.3	16.4	17.3	15.1	17
Mean per site ^b	17.7±0.78 a					16.9±0.31 a					16.8±0.45 a				
P (g m ⁻²)	1.76	0.59	3.48	1.49	3.35	2.55	1.14	2	2.59	3.65	1.16	1.31	2.45	0.69	1.28
Mean per site ^b	2.13±0.37 ab					2.39±0.29 a					1.38±0.19 b				

^aB.P. Before Present. Last eruption date and start of soil formation. The dates correspond to non-calibrated ¹⁴C dates (Siebe et al. 2004)

^bDifferent letters in columns indicate significant differences (Mann-Whitney *U* Test, *p*<0.05)

exclusively, since soil factors at such a small scale are likely to vary from one year to another. Statistical analyses were conducted using the R software (<http://www.r-project.org>) (Ihaka and Gentleman 1996).

Results

A total of 1,331 specimens were collected during the 3 years of sampling and 72 saprophytic species were identified (Table 2). From these 72 species, 38 were found at the youngest site, 29 at the middle-aged site and 37 at the oldest site of the soil chronosequence. All but three species were Basidiomycetes. Most of the collected species were litter decomposers, although some woody-debris saprotrophs were collected from the forest floor. These belong to the genera *Cyathus*, *Gymnopilus*, *Hypholoma*, *Pholiota* and *Pluteus*.

Of particular importance was the case of *Auriscalpium vulgare* Gray which grows specifically on pine cones and needles. This species was found to be present at all three sites, as expected given the predominance of pine species in the tree community, and to fruit abundantly at the old site. A total of 158 specimens of *A. vulgare* were collected at the old site during the three sampling years, against 5 at the young site and 19 at the middle-aged site. *Auriscalpium vulgare* is known to be widely distributed in Europe and

Asia, as well as in North and Central America (Petersen and Cifuentes 1994). Because of its substrate specificity and lack of interaction with the soil organic horizon (Bon 2004), we did not consider this species in the present analysis.

No significant differences were found in either abundance or richness between the saprophytic sporocarp communities, although more specimens were collected at the middle-aged site, where 489 sporocarps were sampled, against 416 at the young site and 427 at the old site (Table 3). However, Shannon diversity index results were different between the study sites, being significantly lower at the middle-aged site and higher at the youngest site. Since the Shannon index considers both richness and species relative abundance, it is important to examine more precisely the differences between saprophytic communities at the three sites in terms of species composition.

Site-exclusive species (species found exclusively at one site) were the most abundant and represented 67% of total richness, whereas 16 species (22%) were shared by two sites and only 8 species (11%) were common to all three sites. Site-exclusiveness was especially important at Chichinautzin as half the saprophytic species were only found at the youngest site. These belonged to the fungal genera *Galerina*, *Hygrocybe* and *Mycena*, whereas species such as *Cyathus olla* (Batsch) Pers. and *Cyathus striatus* (Huds.) Willd. were exclusive to the middle-aged site and *Marasmius*

Table 2 Saprophyte sporocarp species, sampled during three consecutive rainy seasons at the three study sites

	Young site			Middle-aged site			Old site		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007
<i>Agaricus</i> sp. ^a			1						
<i>Agrocybe</i> sp. ^a								1	
<i>Clitocybe</i> aff. <i>costata</i> Kühner & Romagn. ^a		1							
<i>Clitocybe</i> aff. <i>dealbata</i> (Sowerby) Gillet ^a				4					
<i>Clitocybe gibba</i> (Pers.) P. Kumm.	2	3	16	14	4	5	2	1	
<i>Clitocybe</i> aff. <i>squamulosa</i> (Pers.) Fr.	1								1
<i>Clitocybe</i> sp.	2		13		1				
<i>Collybia</i> sp.	6			5	1		5	4	6
<i>Coprinopsis atramentaria</i> (Bull.) Readhead, Vilgalys & Moncalvo ^a								1	
<i>Coprinus comatus</i> (O.F. Müll.) Pers.					3	1		8	
<i>Coprinus</i> aff. <i>cortinatus</i> J.E. Lange ^a							4		
<i>Coprinus</i> sp.				4	2				12
<i>Cyathus olla</i> (Batsch) Pers. ^a				10	58				
<i>Cyathus striatus</i> (Huds.) Willd. ^a				100					
<i>Galerina</i> aff. <i>hypnorum</i> (Schrank) Kühner ^a	5	38	30						
<i>Geoglossum cookeanum</i> Nannf. ^a	2								
<i>Gymnopilus penetrans</i> (Fr.) Murrill					13			2	
<i>Gymnopilus</i> aff. <i>spadiceus</i> Romagn. ^a	4								
<i>Gymnopilus</i> sp.			1						2
<i>Gymnopus acervatus</i> (Fr.) Murrill ^a		3							
<i>Gymnopus</i> aff. <i>confluens</i> (Pers.) Antonín, Halling & Noordel. ^a								2	
<i>Gymnopus dryophilus</i> (Bull.) Murrill	5	5	14	5	3	1	16	43	28
<i>Gymnopus erythropus</i> (Pers.) Antonín, Halling & Noordel. ^a		1							
<i>Gymnopus</i> aff. <i>fusipes</i> (Bull.) Gray						2		5	
<i>Gymnopus</i> aff. <i>peronatus</i> (Bolton) Antonín, Halling & Noordel. ^a							2		
<i>Gymnopus</i> aff. <i>perforans</i> (Hoffm.) Antonín & Noordel. ^a									4
<i>Hygrocybe miniata</i> (Fr.) P. Kumm. ^a		1	10						
<i>Hygrocybe persistens</i> var. <i>konradii</i> (R. Haller Aar.) Boertm. ^a	1								
<i>Hygrocybe</i> sp.	12	3	6	6			12	4	
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i> (Wulfen) Maire	1			3	10		99	25	18
<i>Hypholoma fasciculare</i> var. <i>fasciculare</i> (Huds.) P. Kumm.		3	5	10	80	74	17	10	10
<i>Hypholoma</i> sp.				1			12		
<i>Lepiota</i> sp.	7				1	9	1	8	19
<i>Lepista flaccida</i> (Sowerby) Pat. ^a					3				
<i>Lycoperdon mammiforme</i> Pers.	5	5	6	7	4	6			
<i>Lycoperdon perlatum</i> Pers.	3	4	2			3			
<i>Lycoperdon pyriforme</i> Schaeff. ^a	5								
<i>Lycoperdon umbrinum</i> Pers. ^a							1		
<i>Marasmius</i> aff. <i>alliaceus</i> (Jacq.) Fr. ^a					1	1			
<i>Marasmius</i> aff. <i>androsaceus</i> (L.) Fr. ^a								6	
<i>Marasmius oreades</i> (Bolton) Fr. ^a							2	6	
<i>Marasmius</i> sp.		2			2	1		1	
<i>Micromphale</i> aff. <i>brassicolens</i> var. <i>brassicolens</i> (Romagn.) P.D. Orton ^a	11								
<i>Mycena</i> aff. <i>epipterygia</i> (Scop.) Gray ^a								3	1
<i>Mycena</i> aff. <i>filopes</i> (Bull.) P. Kumm.		3	2					1	5
<i>Mycena</i> aff. <i>galericulata</i> (Scop.) Gray ^a								2	

Table 2 (continued)

	Young site			Middle-aged site			Old site		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007
<i>Mycena</i> aff. <i>maculata</i> P. Karst. ^a								7	
<i>Mycena</i> aff. <i>metata</i> (Secr. ex Fr.) P. Kumm. ^a	2								
<i>Mycena</i> aff. <i>pura</i> (Pers.) P. Kumm.		1	1				4		
<i>Mycena</i> sp.1					5	2	2		
<i>Mycena</i> sp.2		1					3		
<i>Mycena</i> sp.3 ^a	12	10							
<i>Mycena</i> sp.4 ^a	4								
<i>Mycena</i> sp.5 ^a							1		
<i>Mycena</i> sp.6				1			1		
<i>Mycena</i> sp.7 ^a				2					
<i>Mycena</i> sp.8 ^a		2							
<i>Mycena</i> sp.9 ^a		49	2						
<i>Mycena</i> sp.10 ^a					4				
<i>Panaeolus</i> sp. ^a		1							
<i>Peziza</i> sp. ^a		1							
<i>Pholiota cerifera</i> P. Karst. ^a				9					
<i>Pholiota</i> sp. ^a							3		
<i>Pluteus cervinus</i> (Schaeff.) P. Kumm. ^a								1	
<i>Pluteus</i> sp. ^a									1
<i>Psathyrella</i> sp. ^a				3					
<i>Ramaria stricta</i> (Pers.) Quél. ^a							2		
<i>Rhodocollybia</i> aff. <i>butyracea</i> (Bull.) Lennox			3			3			
<i>Stropharia</i> sp. ^a			3						
<i>Trichoglossum hirsutum</i> var. <i>hirsutum</i> (Pers.) Boud. ^a	17	30	15						
<i>Tricholomopsis rutilans</i> (Schaeff.) Singer ^a		2							
<i>Tricholomopsis</i> sp. ^a				1					

Numbers represent the number of sporocarp specimens collected at each study site, each year, for each saprophytic species

^a Site-exclusive species

androsaceus (L.) Fr., *Marasmius oreades* (Bolton) Fr. or *Pluteus* spp. were only collected at the old site.

The discrepancy between species composition at the three study sites may be observed by examining the abundance of the main saprophytic fungal genera (Fig. 1). The young site was dominated by *Galerina* spp. and *Mycena* spp., whereas *Cyathus* spp. and *Hypholoma* spp. were the most abundant at the middle-aged site, and *Gymnopus* spp. and *Hygrophoropsis* spp. dominated at the old site.

Dominant species were defined as those with a relative abundance above 1%. Relative abundance curves of dominant species at each site showed that the number of dominant species was higher at the young site (17 dominant species at Chichinautzin against 14 at both Guespalapa and Pelado), generating stronger dominance patterns at the two oldest sites of the volcanic soil chronosequence (Fig. 2b

and c). At the middle-aged site, *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm. was the most dominant species and represented 34% of total abundance, whereas *Hygrophoropsis aurantiaca* (Wulfen) Maire represented 33% of total abundance of saprophytic species at the oldest site. In contrast, the first dominant species only represented 18% at the youngest site (*Galerina hypnorum* (Schrank) Kühner; Fig. 2a). The first three dominant species represented 68% at the middle-aged site, against 45% at the youngest site and 62% at the oldest site. Only four of the dominant saprophytic species were common to the three sites of the chronosequence: *Collybia* sp., *Gymnopus dryophilus* (Bull.) Murrill, *Hygrocybe* sp. and *Hypholoma fasciculare* (Fig. 2).

The results of CCA ordination provided further insights into the effects of soil variables on the saprophytic sporocarp community at Sierra del Chichinautzin (Fig. 3). The first and second axis of the biplot explain 47.3 and

Table 3 Annual abundance, richness and diversity of the community of saprophyte sporocarps at the three sites

Sites	Abundance (number of specimens)	Richness (number of species)	Shannon diversity index
Young site	135±18 a	20±1.5 a	1.06±0.06 a
Middle-aged site	163±27 a	15±1.7 a	0.71±0.08 b
Old site	145±27 a	17±3.3 a	0.91±0.09 ab

Different letters in columns indicate significant differences (Mann–Whitney *U* Test, $p < 0.05$)

29.1% of species variability, respectively. Soil P was the constraining variable with the highest score for the X axis (-0.84), with taxa to the right negatively correlated with the available P content of the soil organic horizon and consequently more abundant at the oldest site. The highest biplot score was obtained by soil C content for the second axis (0.69), with taxa to the top positively correlated with C content in the soil organic horizon and therefore associated to older sites. The diagram suggests that genera as *Hygrocybe*, *Gymnopus* or *Lepiota* are more dependent upon soil C and N contents and are more abundant when concentrations of these elements are smaller. In contrast, *Mycena* would be more dependent upon available P content, since its vector is almost parallel to the “P” axis. The equilibrium circle showed that the genera *Clitocybe*, *Cyathus*, *Galerina*, *Gymnopus*, *Hygrocybe*, *Hygrophoropsis*, *Hypholoma*, *Lepiota* and *Mycena* contributed significantly the the ordination biplot.

Spearman correlations showed no significant relationship between total abundance or richness and any of the measured soil variables. However, Shannon diversity index correlated significantly ($p = 0.016$) with soil P content, as shown in Fig. 4. More precise correlations at the genus and species levels showed that saprophytic fungi respond differently to soil factors (Table 4). *Lepiota* sp. was the only species to be negatively correlated with C, N and P

contents of the soil organic horizon, as it was suggested by the CCA biplot. *Hygrophoropsis aurantiaca* correlated significantly with soil available P. The genus *Hypholoma* as a whole was significantly and negatively correlated with the soil C:N ratio whereas *Hypholoma fasciculare* was not. On the other hand, *Clitocybe gibba* (Pers.) P. Kumm. correlated with the C:N ratio whereas the genus *Clitocybe* did not. Saprophytic fungal species distribution is influenced by soil factors, and specific responses exist to the different edaphic variables under study.

Discussion

Saprophytic communities at the three sites were mainly composed of rare taxa, with a small number of frequent species, which is in agreement with the findings of previous studies (Rubino and McCarthy 2003; Richard et al. 2004). These rare species are particularly relevant for decomposition processes and ecosystem functioning (Deacon et al. 2006). Most of the sampled species were basidiomycetes (96%). This proportion reflects the abundance of basidiomycetes in coniferous forests, where the accumulation of favorable substrates is likely to enhance the diversity of decomposer species (Ohlson et al. 1997). The conspicuous sporocarps of basidiomycete fungi may have biased the

Fig. 1 Saprophytic macrofungi community composition by genus at the three study sites during three consecutive years. White bars represent the young site, gray bars the middle-aged site, black bars the old site

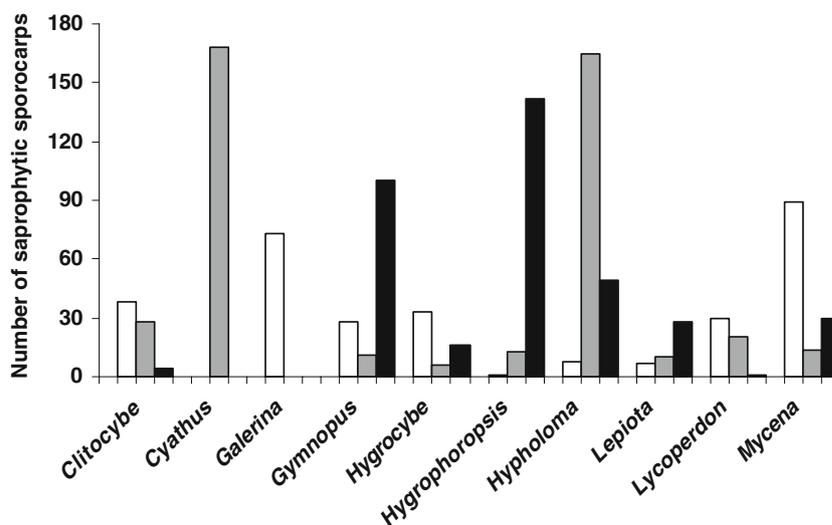
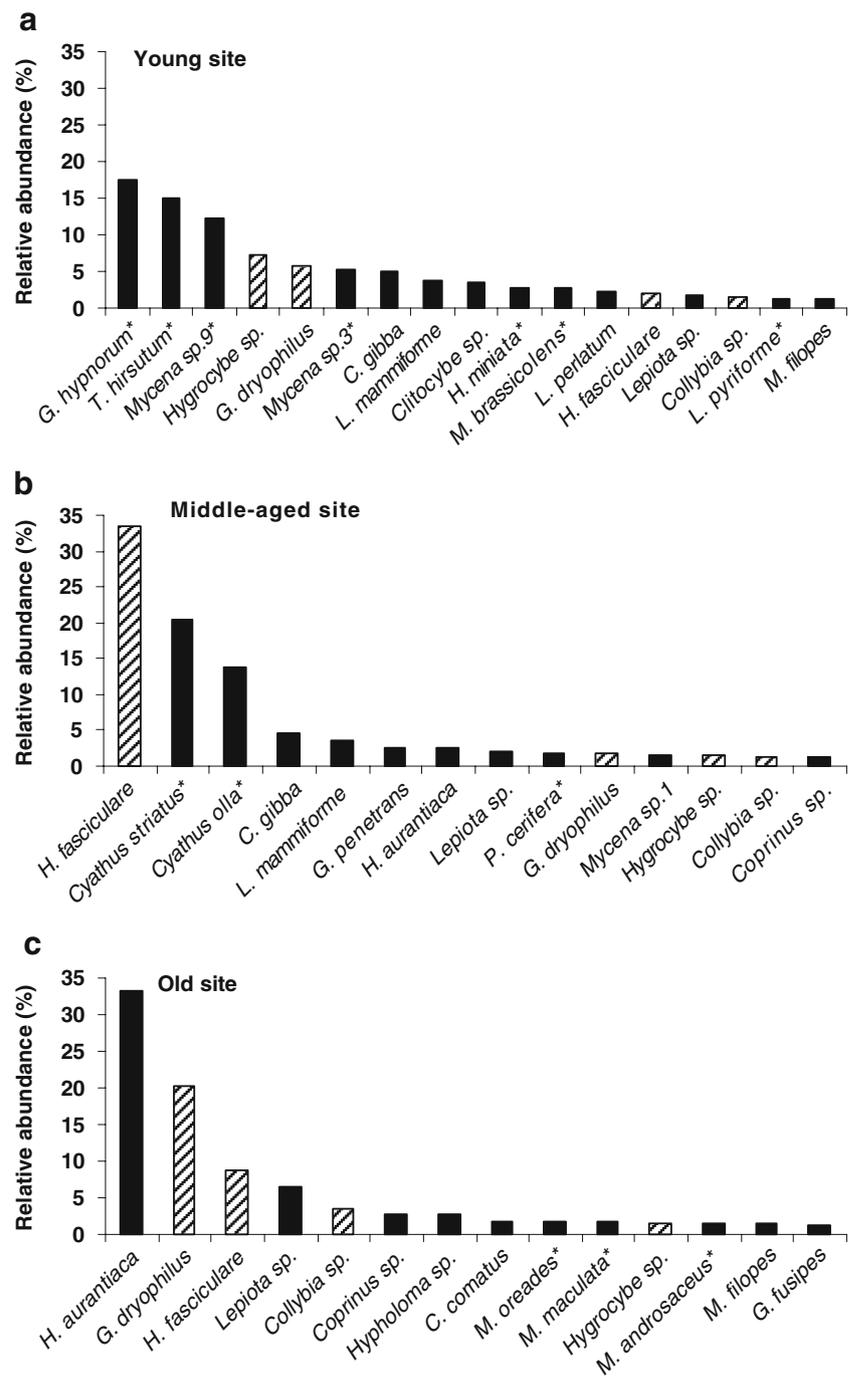


Fig. 2 Species relative abundance of saprophyte sporocarps at the three study sites. *Dashed bars* represent species common to the three sites. *C. gibba*: *Clitocybe gibba*; *C. comatus*: *Coprinus comatus*; *C. olla*: *Cyathus olla*; *C. striatus*: *Cyathus striatus*; *G. hypnorum*: *Galerina hypnorum*; *G. penetrans*: *Gymnopilus penetrans*; *G. spadiceus*: *Gymnopilus spadiceus*; *G. dryophilus*: *Gymnopilus dryophilus*; *G. fusipes*: *Gymnopilus fusipes*; *H. miniata*: *Hygrocybe miniata*; *H. aurantiaca*: *Hygrophoropsis aurantiaca*; *H. fasciculare*: *Hypholoma fasciculare*; *L. mammiforme*: *Lycoperdon mammiforme*; *L. perlatum*: *Lycoperdon perlatum*; *L. pyriforme*: *Lycoperdon pyriforme*; *M. androsaceus*: *Marasmius androsaceus*; *M. oreades*: *Marasmius oreades*; *M. brassicolens*: *Micromphale brassicolens*; *M. filopes*: *Mycena filopes*; *M. maculata*: *Mycena maculata*; *Myc. sp. 1*: *Mycena sp. 1*; *Myc. sp. 3*: *Mycena sp. 3*; *Myc. sp. 4*: *Mycena sp. 4*; *Myc. sp. 9*: *Mycena sp. 9*; *P. cerifera*: *Pholiota cerifera*; *T. hirsutum*: *Trichoglossum hirsutum*



sampling towards this particular fungal class, although basidiomycete mycelia is reported to be ubiquitous in forest soils (Cairney 2005) and is therefore likely to play an important role in nutrient and carbon cycling processes (Dighton 2003).

The lack of significant differences in fungal abundance and richness between sites may be explained by the fact that saprophytic species are dependent on the type of litter covering the forest soil, and thus on the dominant species of

the tree community (Senn-Irlet and Bieri 1999). In this study, we selected study sites dominated by *P. montezumae* in order to examine the changes in saprophytic communities due to soil factors only, and this may have led to this relative structure similarity. Precipitation and microclimate conditions were relatively constant across the three sites (Peña-Ramírez, unpublished data) and any change in sporocarp production is likely to be attributed to soil parameters. Diversity patterns and species composition

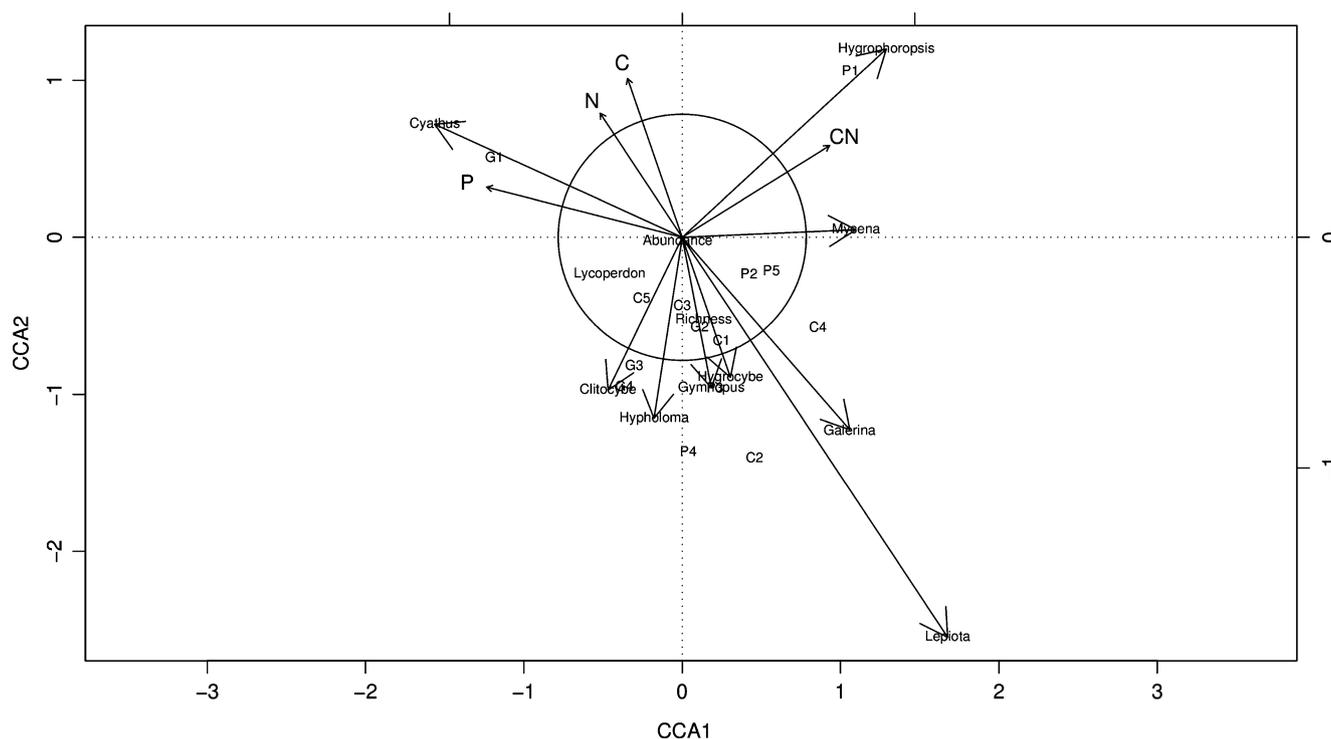


Fig. 3 CCA ordination biplot of saprophytic fungal genera based on their abundance at the three study sites, constrained by soil factors. Genera outside the equilibrium circle contribute significantly to the

diagram. Letters represent the study sites (*C* Chichinautzin, *G* Guespalapa, *P* Pelado) and numbers represent the sampling plots (five plots per site)

varied across the soil chronosequence: the young site was dominated by species belonging to the genera *Galerina* and *Mycena*, whereas *Cyathus* spp. and *Hypholoma* spp. dominated at the middle-aged site and *Hygrophoropsis aurantiaca* was the most abundant species at the old site. These differences in species composition emphasize the importance of soil factors on fungal community composition. Soil humification processes and thickness of the litter layer are particularly relevant for terrestrial saprophytic fungi (Mihál and Bučinová 2005). Soil nutrient status has been shown to affect mycelial development and hence sporocarp occurrence (Donnelly and Boddy 1998; Zakaria

and Boddy 2002; Harold et al. 2005). The soil organic horizon may be especially relevant since saprophytic fungi are reported to typically extend their mycelia at the soil–litter interface (Boddy et al. 2009). The nutrient status of soil environment through which decomposer fungi grow may determine their diversity as it influences mycelial outgrowth and network formation (Donnelly and Boddy 1998; Zakaria and Boddy 2002). In this study, only soil P content was found to correlate significantly with the Shannon diversity index, which corroborates the potential importance of saprophytic hyphae for P mobilization and phosphate hydrolysis. Nevertheless, fungal diversity increased when available P contents were lower, suggesting that more decomposer species are required when P is scarce in order to solubilize it, as saprophytic fungi tend to incorporate hydrolyzed phosphate into their biomass (Dighton 1983).

Whether saprophytic species diversity reflects functional diversity is still unknown, although it is widely believed that many decomposer species are functionally redundant (Andrén et al. 1995; Deacon et al. 2006). An increased number of species may lead to an increased number of ecological functions and thus a more efficient degradation of recalcitrant substrates (Setälä and McLean 2004). However, a single species may play diverse roles and hence there may be no relationship between species diversity and functional diversity for fungal species (van

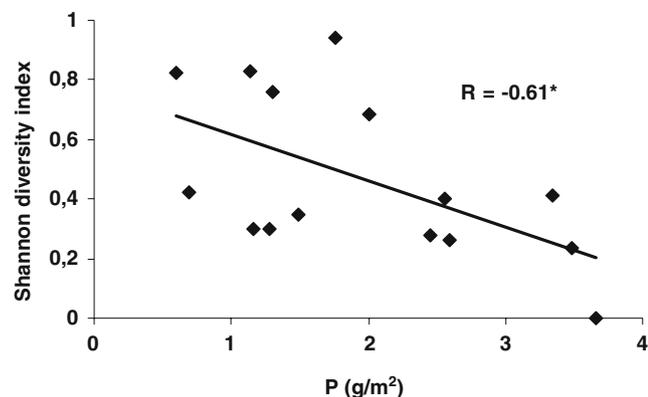


Fig. 4 Shannon diversity index by sampling plot in correlation with soil P (g/m^2). *R* Spearman correlation coefficient, *significant

Table 4 Spearman correlation R values as traducing the relationship between saprophytic sporocarp genera and species with soil variables

	Soil C content (kg/m ²)	Soil N content (kg/m ²)	Soil P content (g/m ²)	Soil C:N ratio
Total abundance	-0.179	-0.172	-0.293	-0.236
Total richness	-0.313	-0.262	-0.459	-0.287
Shannon diversity	-0.332	-0.282	-0.611*	-0.418
<i>Clitocybe</i> spp.	-0.145	-0.095	-0.109	-0.492
<i>Clitocybe gibba</i>	0.023	0.067	-0.204	-0.577*
<i>Cyathus</i> spp.	0.124	0.186	0.186	-0.186
<i>Cyathus striatus</i>	0.124	0.186	0.186	-0.186
<i>Galerina hypnorum</i>	-0.247	-0.186	0.000	0.371
<i>Gymnopus</i> spp.	0.044	0.083	-0.353	-0.254
<i>Gymnopus dryophilus</i>	0.115	0.148	-0.217	-0.062
<i>Hygrocybe</i> spp.	-0.309	-0.274	-0.451	-0.097
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	0.087	0.053	-0.591*	-0.101
<i>Hypholoma</i> spp.	0.115	0.147	-0.344	-0.655*
<i>Hypholoma fasciculare</i>	0.232	0.271	-0.138	-0.454
<i>Lepiota</i> sp.	-0.600*	-0.595*	-0.541*	-0.079
<i>Lycoperdon</i> spp.	-0.131	-0.113	0.171	-0.171
<i>Lycoperdon mammiforme</i>	-0.045	-0.016	0.166	-0.166
<i>Mycena</i> spp.	-0.125	-0.161	-0.226	0.351
<i>Mycena</i> sp.6	0.045	0.091	0.045	-0.318

*Significant correlation at $p < 0.05$

der Heijden et al. 1998). Deacon et al. (2006) emphasized the importance of species composition of the community rather than its richness or diversity, as this study suggests, since species interactions may enhance the decomposition of organic matter.

All the significant correlations between species abundance and soil variables were negative, which is consistent with the largest diversity values found at the youngest, less fertile site. The CCA biplot showed that most fungal taxa were distributed where soil C and N contents were lower, which is consistent with previous works reporting that a higher fungal diversity may lead to increased decomposition rates, and thus to lower organic matter contents (Deacon 1985; Robinson et al. 1993; Setälä and McLean 2004). However, different fungal species have divergent responses to soil factors, as also shown by the CCA diagram and by correlation analysis.

The highest species diversity of the decomposer community at the young site may have been enhanced by its greater spatial heterogeneity. A heterogeneous soil environment, typically found in young volcanic soils (Aplet et al. 1997) and generated by the large amount of volcanic rocks, creates an important number of microniches where more species should be able to find resources and suitable abiotic conditions (Sulkava and Huhta 1998). It may also have led to the important number of site-exclusive species at the young site. Similar patterns were observed in ectomycor-

rhizal (ECM) fungal communities (Reverchon et al., in preparation), since ECM species richness and number of site-exclusive species were higher at Chichinautzin. Increased species number in diverse communities may act as “insurance” against harsh environmental conditions (Naeem, 1998) as those present at the young, heterogeneous, and less fertile site.

Conclusion

Saprophytic fungal communities vary according to soil factors across the volcanic soil chronosequence. They were found to be more diverse at the youngest site, where spatial heterogeneity was larger and soil nutrient status lower than at the older sites. However, fungal responses to soil factors differed according to the species considered, which generated changes in community composition at the three sites. The high percentage of site-exclusive species showed that species composition was strongly dependent upon the site and thus upon soil parameters. The highest diversity found at the young, less fertile site may represent an “insurance” mechanism against harsh conditions, since different species are likely to play various ecological functions which may lead to a more efficient degradation of recalcitrant substrates. Understanding the factors involved in the distribution and diversity of decomposer fungi results will be useful for conservation

and inventory purposes, and this is especially relevant for young volcanic soils, where published information on how fungal communities are organized is scarce.

Acknowledgements This work was supported by a grant from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) of the Universidad Nacional Autónoma de México (Project numbers IN 225703, 230507 and 119609). We thank the representatives of Topilejo and Cuajomulco communities for authorizing the field work and all the persons that helped with the sporocarp sampling during three years. Victor Peña-Ramírez and Christina Siebe provided the soil results and Kumiko Shimada helped with the soil characterization.

References

- Andrén O, Clarholm M, Bengtsson J (1995) Biodiversity and species redundancy among litter decomposers. In: Collins HP, Robertson GP, Klug MJ (eds) *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*. Kluwer, Dordrecht, pp 141–151
- Aplet GH, Hughes RF, Vitousek PM (1997) Ecosystem development on Hawaiian lava flows: biomass and species composition. *J Veg Sci* 9:17–26
- Boddy L, Hynes J, Bebbler DP, Fricker MD (2009) Saprotrophic cord systems: dispersal mechanisms in space and time. *Mycoscience* 50:9–19
- Bon M (2004) *Champignons de France et d'Europe occidentale*. Flammarion, France
- Bray RH, Kurtz LT (1945) Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci* 59:39–45
- Cairney JWG (2005) Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. *Mycol Res* 109:7–20
- Deacon JW (1985) Decomposition of filter paper cellulose by thermophilic fungi acting singly, in combination, and in sequence. *Trans Br Mycol Soc* 85:663–669
- Deacon LJ, Pryce-Miller EJ, Frankland JC, Bainbridge BW, Moore PD, Robinson CH (2006) Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biol Biochem* 38:7–20
- Dighton J (1983) Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 71:455–462
- Dighton J (2003) *Fungi in Ecosystem Processes*. Marcel Dekker, New York
- Dix NJ, Webster J (1995) *Fungal ecology*. Chapman & Hall, London
- Donnelly DP, Boddy L (1998) Developmental and morphological responses of mycelial systems of *Stropharia caerulea* and *Phanerochaete velutina* to soil nutrient enrichment. *New Phytol* 138:519–531
- Gebauer G, Taylor AFS (1999) ¹⁵N natural abundance in fruit bodies of different functional groups of fungi in relation to substrate utilization. *New Phytol* 142:93–101
- Harold S, Tordoff GM, Jones TH, Boddy L (2005) Mycelial responses of *Hypholoma fasciculare* to collembola grazing: effect of inoculum age, nutrient status and resource quality. *Mycol Res* 109(8):927–935
- Hedger J (1985) Tropical agarics, resource relations and fruiting periodicity. In: Moore D, Casselton LA, Wood DA, Frankland JC (eds) *Developmental Biology of Higher Plants*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 41–86
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 5:299–314
- Kuyper TW, Verschoor BC (1995) Enhancement of nitrification rates in vitro by interacting species of saprotrophic fungi. *Mycol Res* 99:1128–1130
- Laessle T, Ryvarden L, Watling R, Whalley AJS (1996) Saprotrophic fungi of the Guinea - Congo Region. *Proc R Soc Edinburgh* 104B:335–347
- Lodge DJ (1997) Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. *Biodivers Conserv* 6:681–688
- Lodge DJ, Cantrell S (1995) Fungal communities in wet tropical forests: variation in time and space. *Can J Bot* 73:S1391–S1398
- Márquez A, Verma SP, Anguita F, Oyarzun R, Brandle JL (1999) Tectonics and volcanism of Sierra Chichinautzin: extension at the front of the Central Trans—Mexican Volcanic belt. *J Volcanol Geotherm Res* 93:125–150
- Mihál I, Bučinová K (2005) Species diversity, abundance and dominance of macromycetes in beech forest stands. *J For Sc* 51(5):187–194
- Naeem S (1998) Species redundancy and ecosystem reliability. *Conserv Biol* 12:39–45
- Ohlson M, Söderström L, Hörnberg G, Zackrisson O, Hermansson J (1997) Habitat qualities versus long-term continuity as determinants of biodiversity in boreal old-growth swamp forests. *Biol Conserv* 81:221–231
- Peña-Ramírez VM, Vázquez-Selem L, Siebe C (2009) Soil organic carbon stocks and forest productivity in volcanic ash soils of different age (1835–30, 500 years B.P.) in Mexico. *Geoderma* 149:224–234
- Petersen RH, Cifuentes J (1994) Notes on mating systems of *Auriscalpium vulgare* and *A. villipes*. *Mycol Res* 98:1427–1430
- Richard F, Moreau PA, Selosse MA, Gardes M (2004) Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Can J Bot* 82:1711–1729
- Robinson CH, Dighton J, Frankland JC, Coward PA (1993) Nutrient and carbon dioxide release by interacting species of straw-decomposing fungi. *Plant Soil* 151:139–142
- Rubino DL, McCarthy BC (2003) Composition and ecology of macrofungal and myxomycete communities on oak woody debris in a mixed-oak forest of Ohio. *Can J For Res* 33:2151–2163
- Schimel JP, Gullede JM, Clein-Curley JS, Lindstrom JE, Braddock JF (1999) Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. *Soil Biol Biochem* 31:831–838
- Senn-Irlet B, Bieri G (1999) Sporocarp succession of soil-inhabiting macrofungi in an autochthonous subalpine Norway spruce forest of Switzerland. *For Ecol Manag* 124:169–175
- Setälä H, McLean MA (2004) Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. *Oecologia* 139:98–107
- Siebe C, Rodríguez-Lara V, Schaaf P, Abrams M (2004) Radiocarbon ages of Holocene Pelado, Guespalapa, and Chichinautzin scoria cones, south of Mexico City: Implications for archaeology and future hazards. *Bull Volcanol* 66:203–225
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Academic, London
- Steffen KT, Hofrichter M, Hatakka A (2000) Mineralisation of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and lignolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:819–825
- Sulkava P, Huhta V (1998) Habitat patchiness affects decomposition and faunal diversity: a microcosm experiment on forest floor. *Oecologia* 116:390–396
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69–72
- Velázquez A (1994) Multivariate analysis of the vegetation of the volcanoes Tláloc and Pelado, Mexico. *J Veg Sci* 5:263–270
- World Reference Base (WRB) 2006 World Reference Base for Soil Resources, second edn. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Rome
- Zakaria AJ, Boddy L (2002) Mycelial foraging by *Resinicium bicolor*: interactive effects of resource quantity, quality and soil composition. *FEMS Microbiol Ecol* 40:135–142

CAPÍTULO III

Estructura de la comunidad de hongos ectomicorrízicos asociados a árboles adultos de *Pinus montezumae* en una cronosecuencia de suelos volcánicos, Sierra del Chichinautzin, Morelos

Resumen

Se analizó la estructura de las comunidades de hongos ectomicorrízicos (ECM) asociados a las raíces de individuos adultos de *Pinus montezumae*, a través de una cronosecuencia de suelos volcánicos en la Sierra del Chichinautzin, Morelos. Estas comunidades son diversas y su distribución responde tanto a la especie o edad de su hospedero como a los factores edáficos de su ambiente. Se muestrearon, durante tres años consecutivos y por medio de cilindros, las raíces finas de 15 árboles de *P. montezumae* creciendo en tres suelos de propiedades contrastantes. Se caracterizaron morfológicamente los ápices ECM y se evaluaron las abundancia, riqueza y diversidad totales, así como la composición de morfotipos de la comunidad. No se encontraron diferencias significativas en abundancia, riqueza y diversidad entre sitios, probablemente debido a que estos hongos dependen más del hospedero que de los factores edáficos. Sin embargo, la riqueza por árbol fue más alta en el sitio joven, que fue el menos fértil y el más seco de la cronosecuencia. Se encontraron diferencias en la abundancia y riqueza entre los diferentes años de muestreo, lo que resalta la variabilidad inter-anual de estas comunidades y la necesidad de tomar esta variación en cuenta en futuras investigaciones. La riqueza total en morfotipos, al igual que

la riqueza de los esporocarpos, estuvo correlacionada con el contenido en N del horizonte orgánico del suelo, lo que confirma la importancia de este nutrimento para la distribución de los hongos ECM. Los morfotipos respondieron de manera diferente a las variables ambientales analizadas, algunos de ellos estuvieron correlacionados con los parámetros edáficos y otros con las variables de crecimiento de *P. montezumae*. Las diferencias en la distribución de los morfotipos responden a preferencias distintas por los micronichos debidos a la heterogeneidad espacial que existe en cada sitio. Este estudio enfatiza la importancia de los hongos ECM para el crecimiento y la supervivencia de los árboles en sitios con condiciones estresantes.

1. Introducción

Las comunidades de hongos ECM asociadas a las raíces de los árboles son muy diversas (Morris et al. 2008; Smith y Read 2008). Varios mecanismos están involucrados en el mantenimiento de esta diversidad: partición de nicho (Dickie et al. 2002), especificidad de hospedero (Ishida et al. 2007), sucesión (Visser 1995; Twieg et al. 2007) o interacción de especies (Bruns 1995; Koide et al. 2005). Bosques templados con monodominancia (un solo hospedero para los hongos ECM) pueden tener más de 90 especies de hongos ECM (Smith et al. 2007) y cada árbol puede asociarse con más de 15 especies distintas (Saari et al. 2005). La distribución de las especies de hongos ECM y la estructura de la comunidad ECM asociada a las raíces de los árboles del bosque dependen de muchos factores. Estos incluyen la composición en especies de la comunidad de plantas, la estructura del bosque (Ishida et al. 2007), la edad de los hospederos (Visser 1995, Twieg et al. 2007) y los nutrimentos del suelo (Twieg et al. 2009). A su vez, comunidades diversas de hongos ECM tienen efectos positivos sobre la productividad de sus hospederos (Jonsson et al. 2001) debido a que varias especies desempeñan diferentes funciones ecológicas, ocupan diferentes nichos ambientales y tienen diferentes tasas de traslocación de nutrimentos (Dickie et al. 2002; Courty et al. 2005).

Entender cómo se distribuyen las comunidades de hongos ECM en función de los nutrimentos del suelo es todavía difícil, particularmente porque la mayoría de los estudios enfocados a estudiar las relaciones entre un factor edáfico particular y la estructura de la

comunidad se han llevado a cabo en sistemas perturbados (Lilleskov et al. 2002; Avis et al. 2008; Cavender-Bares et al. 2009). Las características edáficas que más se han analizado son: el contenido en nitrógeno y su disponibilidad (Lilleskov et al. 2002; Trudell y Edmonds 2004; Parrent et al. 2006; Kranabetter et al. 2009), la calidad de la hojarasca (Conn y Dighton 2000), el fósforo disponible (Twieg et al. 2009) y la humedad del suelo (Trudell y Edmonds 2004). Pocos estudios se han realizado en ecosistemas naturales, donde una multitud de factores ambientales puede intervenir y los gradientes de nutrientes son menos marcados. Se ha descrito recientemente que la distribución de las especies de hongos ECM está influenciada por la disponibilidad de los nutrientes del suelo (Twieg et al. 2009) y ésta es generalmente más alta en los horizontes orgánicos que en el suelo mineral. La fertilidad del suelo, sin tener necesariamente impacto en la riqueza total de especies, podría más bien provocar cambios en la distribución de géneros fúngicos ECM como *Cortinarius* o *Tricholoma* (Trudell y Edmonds 2004). Estudiar los cambios en las comunidades de hongos ECM a través de suelos contrastantes podría revelar tanto especies generalistas como especializadas para condiciones particulares (Gehring et al. 1998; Kernaghan y Harper 2001; Robertson et al. 2006; Toljander et al. 2006) y esclarecer la importancia de la calidad del suelo para estas comunidades. La cronosecuencia volcánica bajo estudio, con sus condiciones climáticas similares y sus sitios contrastantes, provee el marco ideal para determinar los parámetros edáficos que más influyen la distribución de los hongos ECM. Esta información es particularmente relevante en suelos volcánicos jóvenes, cuya profundidad a veces no llega a los 10 cm y que a pesar de esta limitación para el desarrollo del sistema radical permiten el establecimiento de bosques maduros. Por tanto, la función de las raíces micorrizadas en escasos centímetros de suelo puede jugar un papel vital en el sostenimiento de una comunidad vegetal madura.

Los estudios de cronosecuencias de suelos volcánicos mostraron que la intemperización progresiva del vidrio volcánico y la evolución de las propiedades físicas y químicas del suelo, como la profundidad del perfil, la capacidad de retención de agua y el contenido en nutrientes, generan un gradiente en el grado de desarrollo del suelo y por lo tanto influyen las tasas de crecimiento de los árboles (Crews et al. 1995; Jahn y Stahr 1996; Peña-Ramírez et al. 2009). Estos cambios en la productividad del bosque podrían determinar a su vez la distribución de las especies de hongos ECM (Rosling et al. 2003;

Baier et al. 2006). Bajo esta hipótesis, el siguiente trabajo tuvo como objetivo la caracterización de las comunidades de hongos ECM asociadas a árboles adultos de *P. montezumae* en tres suelos volcánicos de calidad contrastante. Se describen las relaciones entre algunos parámetros edáficos y las comunidades ECM en los tres sitios, incluyendo mediciones de abundancia, riqueza y diversidad y análisis de composición de especies. Se discuten las diferencias inter-sitios e inter-anales de la distribución de los ápices ECM asociados a las raíces de *P. montezumae*.

2. Métodos

2.1. Muestreo de las raíces ECM y caracterización morfológica de los ápices ECM

La zona de estudio y los cuadrantes de muestreo fueron previamente descritos en la sección Métodos del capítulo I.

Los cilindros que se utilizaron para muestrear las raíces ECM de árboles adultos de *P. montezumae* fueron de las mismas dimensiones que los cilindros usados para la caracterización de las variables edáficas en cada cuadrante de muestreo: 2.5 cm de diámetro \times 20 cm de largo en los dos sitios más antiguos de la cronosecuencia y 5 \times 5 cm en el sitio joven donde la profundidad no alcanzó los 10 cm, para obtener el mismo volumen de muestra (sección 2.1, capítulo I). Se recolectaron cuatro cilindros por unidad de muestreo, en los cuatro puntos cardinales rodeando el tronco del hospedero para capturar la variabilidad espacial (Fig. 4, capítulo I) y considerar los micronichos edáficos posiblemente colonizados por diferentes hongos (Bruns 1995). Los cilindros se almacenaron a 4°C mientras fueron procesados. Los ápices ECM se analizaron aleatoriamente dentro de las dos semanas consecutivas al muestreo, fueron separados de las raíces, enjuagados en agua y segregados por morfotipo bajo microscopía estereoscópica. Se diferenciaron de acuerdo a los criterios descritos en el “Colour Atlas of Ectomycorrhizae” (Agerer 1987-2002), con base a su color, textura, forma, patrón de ramificación, presencia de rizomorfos, longitud y diámetro de los ápices terminales no ramificados. En términos generales, la mayoría de los ápices ECM presentaron la dicotomía característica del género *Pinus* (Wurzburger et al. 2001). Tres ápices por morfotipo descrito se congelaron en nitrógeno líquido previa

eliminación de la materia orgánica adyacente y se almacenaron a -70°C para su posterior determinación molecular.

El muestreo de las comunidades ECM subterráneas se realizó durante tres temporadas de lluvias consecutivas (2005-2007). Paralelamente, en el primer año, se recolectaron muestras de suelo con cilindros de las mismas dimensiones, en los mismos puntos, con la finalidad de abarcar las micro-variaciones en las propiedades edáficas del sitio. Estas muestras de suelo fueron analizadas para determinar el contenido total de carbono (C), nitrógeno (N) y el fósforo (P) disponible del horizonte orgánico. El procesamiento y el análisis de las muestras de suelo fueron descritos en el capítulo I (Cuadro 2, capítulo I).

2.2. Análisis estadísticos y de diversidad

Para cada experimento se midió la abundancia (total y relativa) y la riqueza de las comunidades de ápices ECM en los tres sitios de estudio. Se evaluó la diversidad asociada a los árboles adultos para cada sitio gracias al índice de Shannon (Shannon y Weaver 1949). Las diferencias entre los tres sitios e inter-anales se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y pruebas de Fisher LSD y de Mann-Whitney. Para comparar las comunidades de hongos ECM de los tres sitios, se utilizó el índice de similitud de Sørensen. Se llevó a cabo un Análisis de Correspondencia Canónica (CCA por sus siglas en inglés), con el fin de determinar la importancia de los factores edáficos y de las variables de crecimiento del hospedero en la distribución de los morfotipos ECM. La significancia de las tendencias sugeridas por el CCA se comprobó mediante círculos de equilibrio en la gráfica de ordenación y por correlaciones de Spearman entre las variables del suelo y del árbol hospedero y las abundancias totales de los morfotipos ECM. Las variables que se usaron en el CCA fueron las mismas que las que se incluyeron en el CCA para determinar la distribución de los carpóforos de especies ECM (capítulo I). Todos los análisis estadísticos se implementaron con el programa STATISTICA 7.0, excepto el CCA que se implementó con el programa R (<http://www.r-project.org>) (Ihaka y Gentleman 1996).

3. Resultados

3.1. Comunidades de hongos ECM

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la abundancia total (número de ápices ECM recolectados por sitio) y a la riqueza total (número de morfotipos ECM por sitio) de las comunidades ECM subterráneas entre los tres sitios, a pesar de las disparidades existentes en las calidades de suelo (Cuadro 1). La diversidad más baja se encontró en el sitio de edad intermedia, aunque las diferencias entre sitios para el índice de diversidad de Shannon tampoco fueron significativas. Sin embargo, la riqueza por árbol resultó ser significativamente diferente entre el sitio joven y el sitio de edad intermedia (Fig. 1), siendo más alta en el Chichinautzin.

Cuadro 1. Abundancia, riqueza y diversidad de las comunidades ECM (promedio anual \pm error estándar) asociadas a las raíces de los individuos adultos de *P. montezumae* en los tres sitios de la cronosecuencia. Diferentes letras significan diferencias significativas (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

	Número total de ápices ECM	Número total de morfotipos ECM	Índice de diversidad de Shannon
Chichinautzin	687 ± 258^a	17 ± 2^a	1.04 ± 0.032^a
Guespalapa	657 ± 116^a	12 ± 2^a	0.85 ± 0.105^a
Pelado	569 ± 147^a	19 ± 3^a	1.02 ± 0.048^a

Los índices de Sørensen establecieron una secuencia de similitud “sitio joven - sitio antiguo” (0.75) > “sitio joven – sitio intermedio” (0.70) > “sitio intermedio – sitio antiguo” (0.63). Las comunidades de hongos ECM fueron más parecidas en cuanto a su riqueza en los dos sitios más contrastantes. Sin embargo, este índice no considera la composición de especies de la comunidad por lo cual es necesario explorar los cambios en la distribución de estas especies a un nivel más fino.

Diferencias inter-anales en la abundancia y la riqueza de ápices ECM se encontraron entre los años 2005 y 2006 y entre los años 2005 y 2007 para la abundancia. No se observaron diferencias significativas en la diversidad de la comunidad ECM a través de los años de muestreo (Cuadro 2).

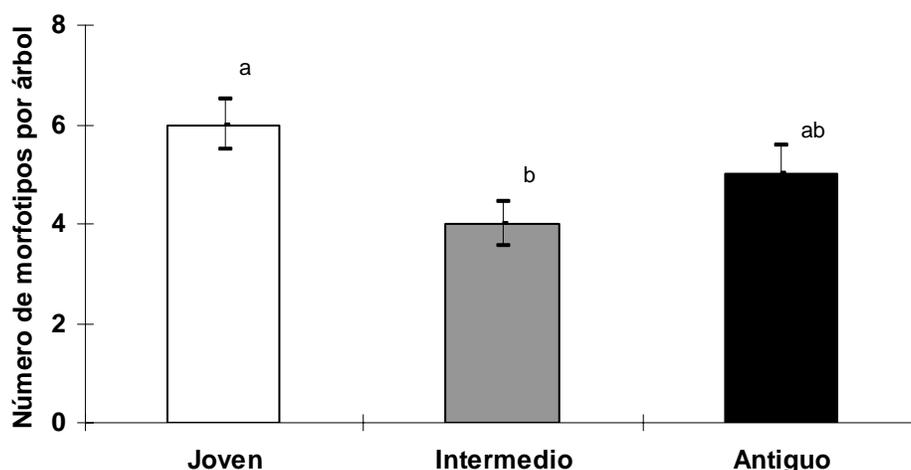


Figura 1. Promedio anual del número de morfotipos ECM encontrados por unidad de muestreo, en cada sitio de estudio. Diferentes letras significan diferencias significativas (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Cuadro 2. Abundancia, riqueza y diversidad de las comunidades ECM (promedio anual \pm error estándar) asociadas a las raíces de *P. montezumae* a lo largo de tres años de muestreo (2005-2007). Diferentes letras significan diferencias significativas (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

	Número total de ápices ECM	Número total de morfotipos ECM	Índice de diversidad de Shannon
2005	981 ± 111^a	20 ± 4^a	1.06 ± 0.046^a
2006	508 ± 34^b	13 ± 2^b	0.93 ± 0.148^a
2007	425 ± 44^b	14 ± 0^{ab}	0.97 ± 0.013^a

Se examinaron un total de 5740 ápices ECM a lo largo de los tres años de muestreo para los tres sitios de estudio. Se determinaron 40 morfotipos diferentes después de la caracterización morfológica (Figura 2 y Apéndice C). Solamente 15% de los morfotipos fueron exclusivos de un sitio, mientras que 34 de los 40 morfotipos (85%) fueron encontrados en por lo menos dos sitios (Cuadro 3). Las abundancias relativas de los 15 morfotipos más encontrados se ilustran en la figura 3 incisos a al c. Los tres morfotipos más abundantes fueron los morfotipos no. 30, 15 y 23 y representaron 10.0, 9.4 y 8.9% respectivamente de la abundancia total. Tres de los morfotipos dominantes fueron comunes a los tres sitios: morfotipos no. 15, 23 y 24. Los morfotipos exclusivos de un sitio solamente fueron abundantes en el sitio antiguo (morfotipos 8, 18 y 28). Sin embargo, la composición en morfotipos de la comunidad ECM varió a través de la cronosecuencia.

Cuadro 3. Abundancias de los morfotipos ECM asociados a las raíces de árboles adultos de *P. montezumae*, recolectados durante tres años consecutivos (2005-2007) en los tres sitios de estudio.

Morfotipo ECM	Chichinautzin			Guespalapa			Pelado		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007
1*	151	5	11	1	-	6	6	-	-
2	-	2	-	-	-	-	-	-	-
3	4	-	-	42	-	-	-	-	9
4*	28	-	8	4	9	166	-	1	45
5	-	-	-	44	-	-	-	2	14
6*	-	-	-	-	-	6	-	6	106
7	1	-	-	6	-	-	36	-	-
8	-	-	-	-	-	-	32	-	-
9*	-	-	76	-	-	-	103	-	10
10	94	-	-	-	-	-	9	-	-
11*	104	42	-	-	-	-	52	-	-
12	10	9	20	-	-	-	2	-	12
13*	118	-	11	-	-	-	2	-	4
14*	-	-	-	153	-	-	-	1	4
15*	220	44	-	106	27	53	7	82	-
16	-	-	-	-	11	29	3	-	6
17	4	19	-	-	4	-	2	21	-
18	-	-	-	-	-	-	25	33	43
19	18	-	7	-	-	-	-	-	9
20	-	-	-	-	-	-	2	-	-
21	-	-	-	-	-	14	60	-	10
22	8	-	-	-	-	-	-	31	-
23*	82	94	45	162	10	15	80	25	-
24*	-	44	43	21	144	87	46	24	51
25*	13	10	33	67	-	32	18	10	-
26	-	14	-	-	-	-	-	22	-
27*	114	-	-	-	-	23	74	133	-
28	-	-	-	-	-	-	79	-	-
29	-	24	-	-	-	-	7	67	-
30*	19	-	-	100	278	-	178	24	-
31*	12	-	19	93	-	14	-	-	-
32	80	-	-	-	-	-	2	-	-
33	-	-	-	-	58	-	2	-	-
34*	95	18	2	-	-	10	-	-	-
35	21	-	-	-	-	-	12	-	-
36	-	77	16	-	-	-	0	-	12
37	-	24	-	-	32	-	15	-	-
38*	-	36	-	88	-	19	-	6	1
39*	-	-	93	-	-	38	-	-	30
40	5	-	13	-	-	-	-	-	-

* Morfotipos abundantes (abundancia relativa > 2%) considerados en el análisis de CCA.

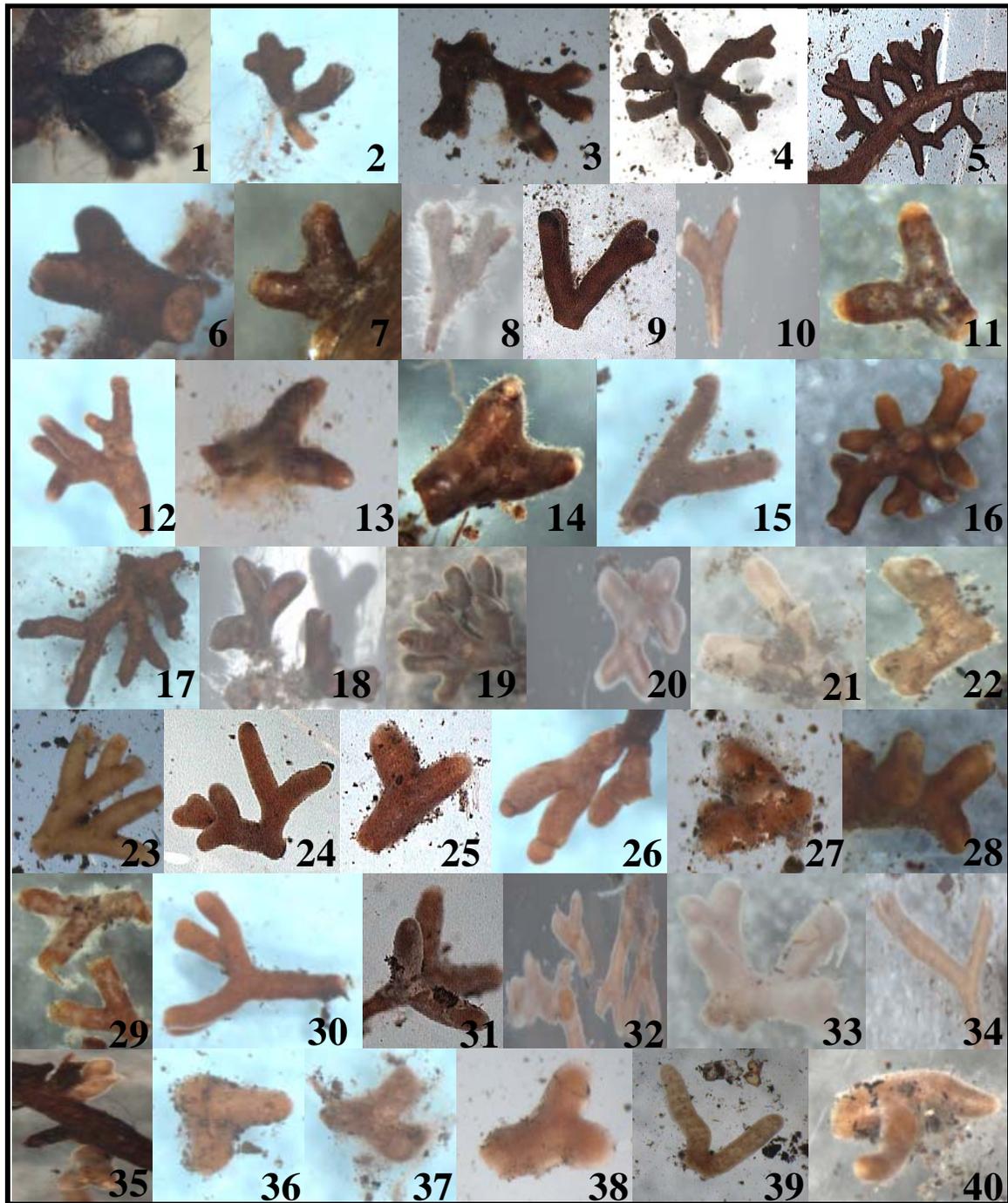


Figura 2. Microfotografías de los morfotipos ECM asociados a árboles adultos de *P. montezumae* en los tres sitios de estudio de la Sierra del Chichinautzin, Morelos.

Morfotipo no. 1 *Cenococcum geophilum* ($\times 25$); no. 2 ($\times 32$); no. 3 afín a *Lactarius* sp. ($\times 25$); no. 4 ($\times 20$); no. 5 ($\times 12.5$); no. 6 ($\times 25$); no. 7 ($\times 32$); no. 8 afín a *Tomentella* sp. ($\times 20$); no. 9 ($\times 25$); no. 10 ($\times 40$); no. 11 afín a *Laccaria* sp. ($\times 25$); no. 12 ($\times 25$); no. 13 ($\times 32$); no. 14 ($\times 32$); no. 15 ($\times 32$); no. 16 ($\times 25$); no. 17 ($\times 25$); no. 18 ($\times 32$); no. 19 ($\times 20$); no. 20 ($\times 25$); no. 21 ($\times 20$); no. 22 ($\times 25$); no. 23 afín a *Inocybe* sp. ($\times 20$); no. 24 ($\times 20$); no. 25 ($\times 25$); no. 26 ($\times 25$); no. 27 ($\times 25$); no. 28 ($\times 25$); no. 29 afín a *Hebeloma* sp. ($\times 32$); no. 30 ($\times 20$); no. 31 ($\times 20$); no. 32 ($\times 25$); no. 33 ($\times 25$); no. 34 ($\times 16$); no. 35 ($\times 20$); no. 36 ($\times 25$); no. 37 ($\times 25$); no. 38 ($\times 32$); no. 39 parecido ($\times 25$); no. 40 ($\times 25$).

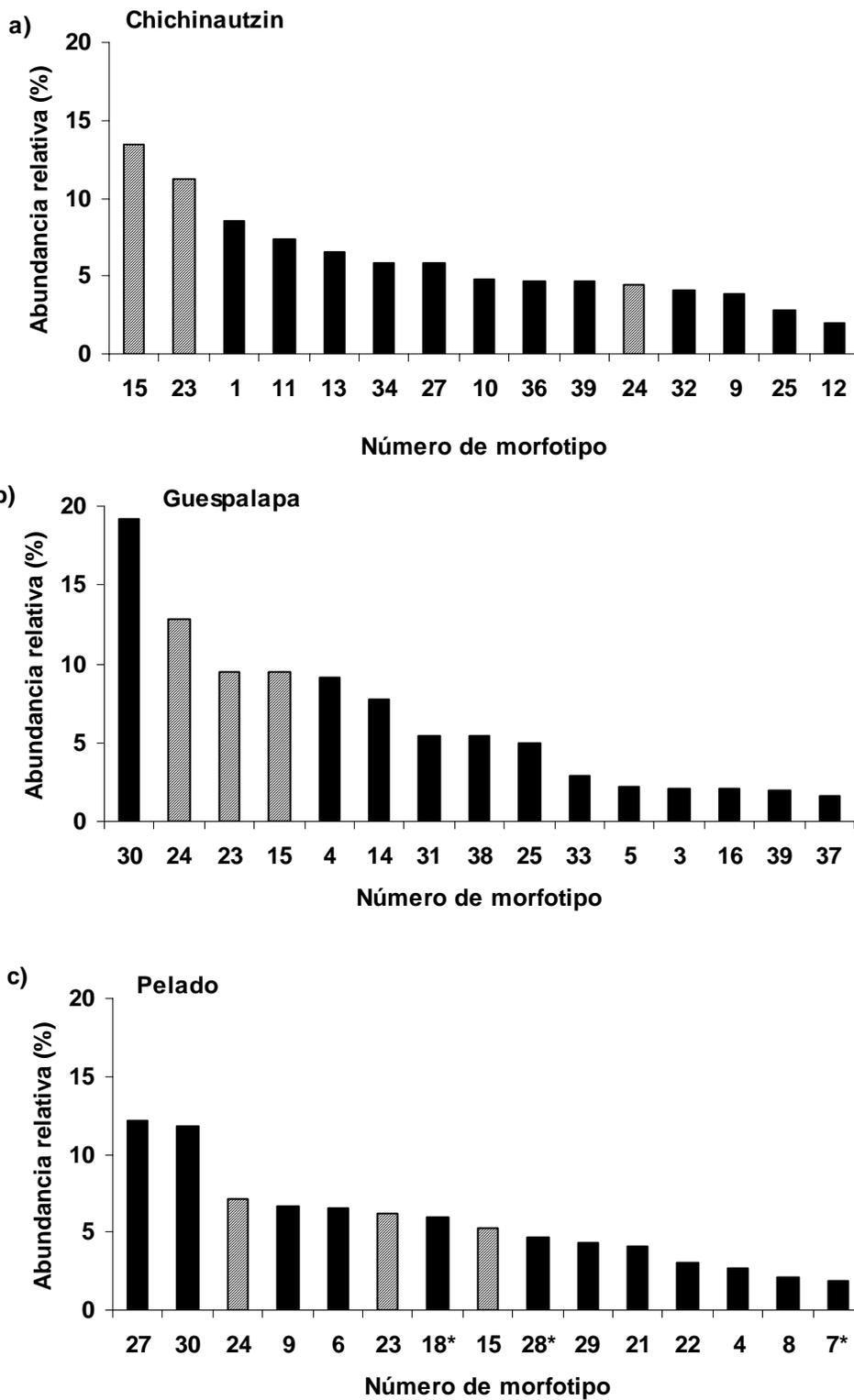


Figura 3. Abundancia relativa (%) de los morfotipos de hongos ECM asociados a las raíces de los árboles adultos de *P. montezumae* para los tres años de muestreo. a) sitio joven; b) sitio de edad intermedia; c) sitio antiguo. Las barras con patrón diagonal representan los morfotipos comunes a los tres sitios. *morfotipos exclusivos de un sitio.

Se observaron variaciones inter-anales en la composición de morfotipos de las comunidades ECM en los tres sitios de estudio (Fig. 4). Cinco morfotipos se encontraron en cada año de muestreo en el sitio joven, contra 4 en el sitio de edad intermedia y 2 en el sitio antiguo, que fue el sitio con más morfotipos (36 morfotipos encontrados a lo largo de 3 años, contra 30 en el sitio joven y 22 en el sitio intermedio). Las comunidades de hongos ECM asociados a las raíces de *P. montezumae* en los tres sitios de estudio fueron dominadas por morfotipos diferentes en cada año de muestreo.

Para llevar a cabo el análisis de CCA, se seleccionaron los 17 morfotipos más abundantes (abundancia relativa > 2%) de los tres sitios para estudiar su distribución (Cuadro 4). El diagrama de ordenación del CCA (Fig. 5) demostró que la abundancia de los morfotipos ECM difería en su respuesta a las variables ambientales seleccionadas. Los dos ejes del diagrama explicaron 29.9 y 26.5% de la distribución de los morfotipos ECM respectivamente. El contenido en N del suelo fue la variable con el valor más alto para el eje CCA1 (0.77), con morfotipos a la izquierda negativamente relacionados con el contenido total en N del horizonte orgánico del suelo y por lo tanto más abundantes en el sitio joven. La altura ponderada por la edad de los árboles hospederos obtuvo el valor más alto para el eje CCA2 (-0.66 para ambos), con morfotipos arriba del diagrama negativamente relacionados con el crecimiento de los hospederos. Los diferentes sitios no se agruparon en el diagrama de acuerdo a su composición de géneros ECM.

Los morfotipos que contribuyeron significativamente a la construcción del diagrama fueron los morfotipos no. 1, 6, 9, 11, 13, 14, 27, 30, 31 y 34. El diagrama sugiere que la abundancia del morfotipo 30 está influenciada positivamente por el N total del horizonte orgánico, dado que su vector está casi paralelo al eje "N". La distribución del morfotipo 6, al contrario, parece más relacionada con las tasas de crecimiento de los árboles (Fig. 6). Estas tendencias se comprobaron a través de un análisis de correlaciones de Spearman. Los resultados de las correlaciones se presentan en el Cuadro 4.

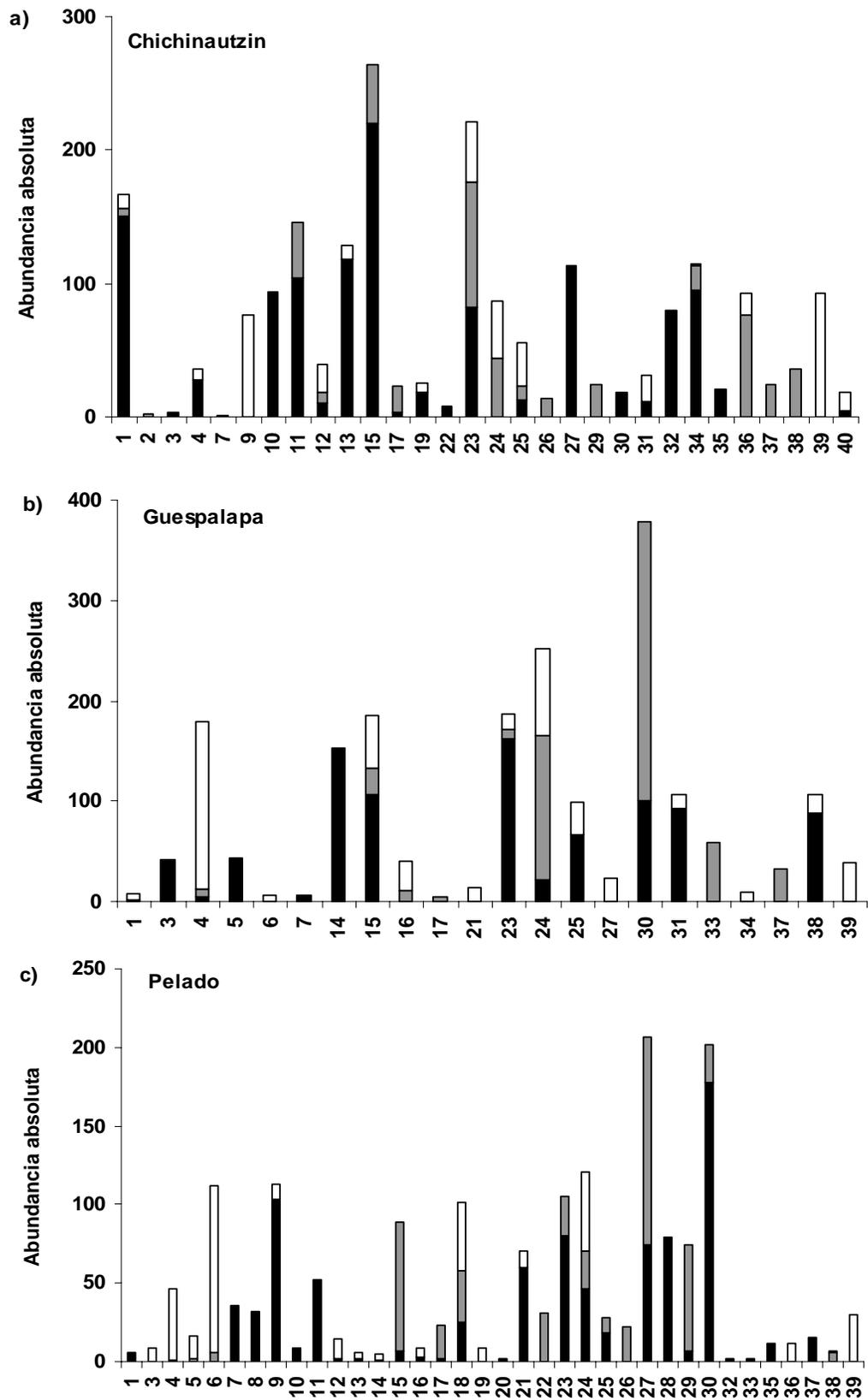


Figura 4. Abundancia absoluta de los morfotipos de hongos ECM asociados a *P. montezumae* para los tres años de muestreo. a) sitio joven; b) sitio de edad intermedia; c) sitio antiguo. Las barras negras representan el año 2005, las grises 2006 y las blancas 2007.

La riqueza total de los morfotipos ECM estuvo negativamente correlacionada con el contenido total de N en el suelo (ver Cuadro 2, capítulo I). A nivel de morfotipo, las correlaciones con las variables ambientales variaron de un morfotipo a otro. Las abundancias de algunos morfotipos correlacionaron positivamente con las variables de suelo (morfotipos 30 y 34) mientras que las abundancias de otros correlacionaron con las variables de crecimiento de los hospederos (morfotipos 4, 6, 11 y 24).

Cuadro 4. Correlaciones de Spearman entre las variables medidas y la abundancia de los morfotipos más comunes. *Correlaciones significativas a $p < 0.05$.

	C total	N total	C:N	P disponible	Diámetro del árbol ponderado	Área basal del árbol ponderada	Altura del árbol ponderada	Cobertura foliar del árbol ponderada
	(kg/m ²)			(g/m ²)	(cm/año)	(m ² /año)	(cm/año)	(m ² /año)
Abundancia total	-0.051	-0.046	-0.020	0.244	-0.169	-0.156	-0.235	-0.266
Riqueza total	-0.511	-0.580*	0.067	-0.388	0.011	-0.071	0.280	0.104
Morfotipo 1	-0.523	-0.529	0.124	-0.096	0.115	-0.115	-0.312	0.026
Morfotipo 4	-0.313	-0.216	-0.387	0.032	-0.705*	-0.588*	-0.691*	-0.627*
Morfotipo 6	0.377	0.307	0.292	-0.118	0.124	0.160	0.542*	0.297
Morfotipo 9	-0.292	-0.376	0.231	-0.025	-0.033	-0.297	0.358	0.085
Morfotipo 11	-0.401	-0.401	0.052	0.358	-0.456	-0.554*	-0.125	-0.211
Morfotipo 13	-0.382	-0.336	0.284	0.069	-0.397	-0.412	-0.218	-0.136
Morfotipo 14	0.356	0.351	0.003	0.172	0.120	0.289	0.033	0.197
Morfotipo 15	0.128	0.161	-0.207	0.313	-0.016	0.245	-0.176	0.185
Morfotipo 23	-0.124	-0.124	-0.061	-0.196	0.398	0.285	-0.128	-0.124
Morfotipo 24	0.117	0.192	-0.497	-0.055	-0.029	0.113	-0.241	-0.541*
Morfotipo 25	-0.122	-0.164	0.090	0.122	0.284	0.225	-0.108	0.421
Morfotipo 27	-0.431	-0.458	0.022	0.241	-0.002	-0.183	0.041	0.071
Morfotipo 30	0.729*	0.707*	-0.133	-0.064	0.320	0.429	0.360	0.042
Morfotipo 31	0.025	0.030	-0.259	-0.050	0.124	0.000	-0.289	-0.058
Morfotipo 34	-0.317	-0.364	0.633*	0.573*	0.077	-0.264	-0.066	0.410
Morfotipo 38	-0.059	-0.077	0.028	0.320	0.402	0.238	-0.059	-0.013
Morfotipo 39	-0.141	-0.170	0.093	-0.178	0.029	0.110	0.078	-0.239

4. Discusión

No se encontraron diferencias significativas entre sitios en la abundancia o riqueza de los ápices ECM aunque las propiedades edáficas a través de la cronosecuencia fueron contrastantes. Estos resultados difieren de aquellos obtenidos por Kranabetter et al. (2009)

quienes describieron cambios en la distribución y abundancia de las comunidades de hongos ECM a lo largo de un gradiente de productividad. Sin embargo, en el Chichinautzin, donde el horizonte orgánico fue el de menor humedad y el más pobre en C y N, el número de ápices ECM fue más alto, aunque no significativamente, y la riqueza en morfotipos ECM encontrada por árbol fue más alta.

La capacidad de retención de agua relativamente más baja y las altas tasas de evaporación en este sitio pueden ser factores limitantes para el crecimiento de los árboles. La presencia de hongos ECM asociados a las raíces de *P. montezumae* es por lo tanto crucial para la absorción de agua y la captación de nutrimentos del somero suelo. Gehring y Whitham (1994) describieron que la simbiosis ECM era más relevante para aquellas plantas creciendo en suelos áridos y menos fértiles y sugirieron, en un estudio posterior (Gehring et al. 1998), que las comunidades ECM podían soportar condiciones extremas gracias a la energía que recibían de sus hospederos.

La falta de diferencias en la abundancia y riqueza de las comunidades de hongos ECM en los tres sitios de estudio pudo ser en parte causada por la agregación de especies difíciles de distinguir con criterios morfológicos, especialmente porque no se caracterizaron patrones celulares y estructura del manto fúngico. Sin embargo, los métodos morfológicos constituyen una herramienta necesaria para una primera diferenciación de los morfotipos ECM y para establecer patrones de dominancia en la comunidad. Análisis a nivel molecular permitirían una mejor determinación de las especies asociadas a las raíces de *P. montezumae*, y es posible que el número de taxa aumente con la resolución más fina provista por las herramientas moleculares.

Varios estudios describieron cambios en la estructura de la comunidad ECM en respuesta al crecimiento del hospedero (Visser 1995; Jonsson et al. 1999; Twieg et al. 2007) y es posible que la similitud entre las comunidades ECM subterráneas asociadas a *P. montezumae* en bosques maduros en los tres sitios se debió a que los árboles seleccionados tuvieron aproximadamente la misma edad. La baja proporción de especies exclusivas de un sitio (15%) ilustra también la relativa semejanza de las comunidades ECM a lo largo de la cronosecuencia. Sin embargo, la existencia de micronichos debidos a la heterogeneidad espacial o la presencia aglomerada de los ápices ECM (Jonsson et al. 1999) podrían explicar las diferencias encontradas en la riqueza por árbol. Los ápices ECM se distribuyen

de forma agregada y la recolecta de dos muestras separadas con tan sólo 10 cm de distancia puede generar grandes diferencias en la abundancia y en la riqueza en especies registradas (Gardes y Bruns 1996; Taylor y Bruns 1999). Ha sido demostrado que distintas especies de hongos ECM tienen diferentes preferencias para el ambiente edáfico (Taylor y Bruns 1999; Lilleskov et al. 2002; Trudell y Edmonds 2004) y es por lo tanto más probable que la composición de morfotipos de la comunidad ECM esté más relacionada con la calidad de suelo que la abundancia o la riqueza. Varios trabajos han descrito esta falta de relación directa entre las condiciones edáficas y la abundancia o riqueza de la comunidad ECM (Kernaghan et al. 2003; Twieg et al. 2009). Sin embargo, la influencia del tipo de suelo en la composición de la comunidad fúngica ha sido comprobada (Gehring et al. 1998). Los cambios en la composición de especies pueden reflejar una especialización de la comunidad ECM para contribuir a la explotación exitosa de ambientes contrastantes dominados por una sola especie de hospedero (Kranabetter et al. 2009). Los suelos volcánicos jóvenes tienen una gran heterogeneidad espacial causada por la cobertura irregular de los flujos de lava por el suelo (Aplet et al. 1998), lo que acentúa las diferencias en los micronichos edáficos y por tanto, puede promover diferencias entre las comunidades ECM.

La alta densidad arbórea encontrada en el sitio antiguo (cf. descripción de los sitios de estudio, capítulo I sección 2.1) pudo también influir en el sesgo del muestreo de raíces de los individuos de *P. montezumae* seleccionados. La alta densidad de raíces en este sitio dificultó la recolecta de cilindros y pudo aumentar la probabilidad de estar en contacto con raíces de otros hospederos.

La comparación de los tres años de muestreo indicó que la composición de la comunidad ECM varió más de un año a otro, dentro del mismo sitio de estudio, que de un sitio a otro considerando todos los años de recolecta. Pocos morfotipos fueron detectados a lo largo de los tres años (17% de los morfotipos para el sitio joven, contra 18% para el sitio de edad intermedia y 6% para el sitio antiguo). Los morfotipos dominantes fueron diferentes en cada año, lo que Koide et al. (2007) interpretaron como una prueba de que las especies de hongos ECM no tienen coexistencia estable. Muestreos anuales de suelos hubieran permitido establecer correlaciones más precisas y es posible que pulsos en la disponibilidad de los nutrimentos del suelo también sean diferentes entre los años debidos a

factores ambientales. Es entonces posible que las diferencias entre los sitios estén dadas por especies “indicadoras” que responden a estos pulsos.

Los análisis de CCA y de correlaciones demostraron que al igual que los esporocarpos, no existió un factor único que explicara la mayor parte de la distribución de los morfotipos ECM y que la presencia de éstos dependió más bien de un conjunto de factores ambientales. La riqueza total de los morfotipos, como la riqueza de los esporocarpos de hongos ECM, correlacionó negativamente con el contenido total en N del horizonte orgánico del suelo, lo que corroboró los resultados encontrados en estudios previos (Lilleskov et al. 2002; Tarvainen et al. 2003; Parrent et al. 2006; Avis et al. 2008) aunque en sitios con deposición de antropogénica de N. Cada morfotipo respondió de forma distinta a las variables del análisis. La abundancia del morfotipo 34 por ejemplo correlacionó positivamente con el P disponible en el suelo. Algunos estudios describieron la importancia del P disponible para la estructura de las comunidades ECM (Morris et al. 2008; Twieg et al. 2009), particularmente para su diversidad. La abundancia de varios morfotipos estuvo correlacionada con las variables de crecimiento de los árboles hospederos, reforzando la teoría de que los ápices ECM parecen ser más dependientes del hospedero que del suelo (Twieg et al. 2009). Los factores que determinan la distribución y la estructura de las comunidades ECM no son todavía bien entendidos y es preciso incorporar más variables a estudios como éste para analizar el efecto del conjunto de factores que conforman la calidad del sitio (pH, micronutrientes, o humedad del suelo por ejemplo).

5. Conclusiones

No se encontraron diferencias significativas en la abundancia, riqueza y diversidad total de las comunidades ECM entre los tres sitios, a pesar de las propiedades contrastantes de sus suelos. Esta semejanza podría deberse a la edad de los hospederos que se mantuvo constante a lo largo de la cronosecuencia. Sin embargo, la riqueza en morfotipos por árbol fue más alta en el sitio joven, donde el suelo fue el menos fértil y el más seco. Este resultado demuestra la importancia de los hongos ECM para la captación de agua y nutrientes en sitios con condiciones ambientales estresantes, dado que el sitio joven, a

pesar de sus limitantes, es capaz de sostener un bosque maduro. La composición de morfotipos de la comunidad ECM varió de un año a otro, lo que resalta la variabilidad temporal de estos hongos. Adicionalmente, los morfotipos dominantes variaron en cada sitio, debido a que cada especie tiene estrategias distintas para explotar los recursos del ambiente y a la presencia de micronichos en los suelos volcánicos jóvenes. Los análisis multivariados y las correlaciones de Spearman indicaron que la riqueza total de la comunidad estuvo negativamente correlacionada con el contenido en N total del horizonte orgánico del suelo, corroborando los resultados de estudios previos. A nivel de morfotipo, existió una variabilidad en las respuestas a las variables ambientales medidas, lo que confirma que existe una especialización de la comunidad ECM para contribuir a la explotación exitosa de ambientes contrastantes dominados por una sola especie de hospedero.

Literatura citada

- Agerer, R. 1987-2002. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, Alemania.
- Aplet, G.H., Hughes, R.F., Vitousek, P.M. 1998. Ecosystem development on Hawaiian lava flows: biomass and species composition. *J. Veg. Sci.* **9**: 17-26.
- Avis, P.G., Mueller, G.M., Lussenhop, J. 2008. Ectomycorrhizal fungal communities in two North American oak forests respond to nitrogen addition. *New Phytol.* **179**: 472-483.
- Baier, R., Ingenhaag, J., Blaschke, H., Göttlein, A., Agerer, R. 2006. Vertical distribution of an ectomycorrhizal community in upper soil horizons of a young Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) stand of the Bavarian Limestone Alps. *Mycorrhiza*, **16**: 197-206.
- Bruns, T.D. 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil*, **170**: 63-73.
- Cavender-Bares, J., Izzo, A., Robinson, R., Lovelock, C.E. 2009. Changes in ectomycorrhizal community structure on two containerized oak hosts across an experimental hydrologic gradient. *Mycorrhiza*, **19**: 133-142.

- Conn, C., Dighton, J. 2000. Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biol. Bioch.* **32**: 489-496.
- Crews, T.E., Kitayama, K., Fownes, J.H., Riley, R.H., Herbert, D.A., Mueller-Dombois, D., Vitousek, P.M. 1995. Changes in soil phosphorus fractions and ecosystem dynamics across a long chronosequence in Hawaii. *Ecology*, **76**(5): 1407-1424.
- Courty, P.E., Pritsch, K., Schloter, M., Hartmann, A., Garbaye, J. 2005. Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. *New Phytol.* **167**: 309-319.
- Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T. 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytol.* **156**: 527-535.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Can. J. Bot.* **74**: 1572-1583.
- Gehring, C.A., Whitham, T.G. 1994. Comparisons of ectomycorrhizae on pinyon pine (*Pinus edulis*: Pinaceae) across extremes of soil type and herbivory. *Am. J. Bot.* **81**: 1509-1516.
- Gehring, C.A., Theimer, T.C., Whitham, T.G., Keim, P. 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology*, **79**(5): 1562-1572.
- Ihaka, R., Gentleman, R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* **5**: 299-314.
- Ishida, T.A., Nara, K., Hogetsu, T. 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytol.* **174**: 430-440.
- Jahn, R., Stahr, K. 1996. Development of soils and site qualities on basic volcanoclastics with special reference to the semiarid environment of Lanzarote, Canary Islands, Spain. *Rev. Mex. Ciencias Geológicas*, **13**(1): 104-112.
- Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Karén, O., Zackrisson, O. 1999. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytol.* **142**: 151-162.

- Jonsson, L.M., Nilsson, M.C., Wardle, D.A., Zackrisson, O. 2001. Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos*, **93**: 353-364.
- Kernaghan, G., Harper, K.A. 2001. Community structure of ectomycorrhizal fungi across an alpine/subalpine ecotone. *Ecography*, **24**: 181-188.
- Kernaghan, G., Widden, P., Bergeron, Y., Légaré, S., Paré, D. 2003. Biotic and abiotic factors affecting ectomycorrhizal diversity in boreal mixed-woods. *Oikos*, **102**: 497-504.
- Koide, R.T., Xu, B., Sharda, J., Lekberg, Y., Ostiguy, N. 2005. Evidence of species interactions within an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytol.* **165**: 305-316.
- Koide, R.T., Shumway, D.L., Xu, B., Sharda, J.N. 2007. On temporal partitioning of a community of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* **174**: 420-429.
- Kranabetter, J.M., Durall, D.M., MacKenzie, W.H. 2009. Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. *Mycorrhiza*, **19**: 99-111.
- Lilleskov, E.A., Fahey, T.J., Horton, T.R., Lovett, G.M. 2002. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology*, **83**: 104-115.
- Morris, M.H., Smith, M.E., Rizzo, D.M., Rejmanek, M., Bledsoe, C.S. 2008. Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. *New Phytol.* **178**: 167-176.
- Parrent, J.L., Morris, W.F., Vilgalys, R. 2006. CO₂-enrichment and nutrient availability alter ectomycorrhizal fungal communities. *Ecology*, **87**(9): 2278-2287.
- Peña-Ramírez, V.M., Vázquez-Selem, L., Siebe, C. 2009. Soil organic carbon stocks and forest productivity in volcanic ash soils of different age (1835 – 30,500 years B.P.) in Mexico. *Geoderma*, **149**: 224-234.
- Robertson, S.J., Tackaberry, L.E., Egger, K.N., Massicotte, H.B. 2006. Ectomycorrhizal fungal communities of black spruce differ between wetland and upland forests. *Can. J. For. Res.* **36**: 972-985.

- Rosling, A., Landeweert, R., Lindahl, B.D., Larsson, K.H., Kuyper, T.W., Taylor, A.F.S., Finlay, R.D. 2003. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytol.* **159**: 775-783.
- Shannon, C.E., Weaver, W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Smith, M.E., Douhan, G.W., Rizzo, D.M. 2007. 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, S.E., Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, third ed. Academic Press, Londres.
- Tarvainen, O., Markkola, A.M., Strömmer, R. 2003. Diversity of macrofungi and plants in Scots pine forests along an urban pollution gradient. *Basic Appl. Ecol.* **4**: 547-556.
- Taylor, D.L., Bruns, T.D. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molec. Ecol.* **8**: 1837-1850.
- Toljander, J.F., Eberhardt, U., Toljander, Y.K., Paul, L.R., Taylor, A.F.S. 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytol.* **170**: 873-884.
- Trudell, S.A., Edmonds, R.L. 2004. Macrofungus communities correlate with moisture and nitrogen abundance in two old-growth conifer forests, Olympic National Park, Washington, USA. *Can. J. Bot.* **82**: 781-800.
- Twieg, B.D., Durall, D.M., Simard, S.W. 2007. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytol.* **176**: 437-447.
- Twieg, B.D., Durall, D.M., Simard, S.W., Jones, M.D. 2009. Influence of soil nutrients on ectomycorrhizal communities in a chronosequence of mixed temperate forests. *Mycorrhiza*, **19**: 305-316.
- Visser, S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* **129**: 389-401.
- Wurzburger, N., Bidartondo, M.I., Bledsoe, C.S. 2001. Characterization of *Pinus* ectomycorrhizas from mixed conifer and pygmy forests using morphotyping and molecular methods. *Can. J. Bot.* **79**: 1211-1216.

CAPÍTULO IV

Comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados a plántulas de *Pinus montezumae* sembradas en bioensayos e *in situ* en suelos de la Sierra de Chichinautzin, Morelos

Resumen

Los hongos ectomicorrízicos mejoran el crecimiento de las plántulas y facilitan su adaptación a ambientes estresantes. El objetivo de este estudio fue caracterizar las comunidades de hongos ECM asociadas a las raíces de plántulas de *Pinus montezumae* y compararlas con aquellas asociadas a árboles adultos de la misma especie. Esta caracterización se efectuó a través de dos experimentos distintos: el primero consistió en sembrar semillas de *P. montezumae* *in situ* alrededor de individuos adultos para que se micorizaran a partir de las redes miceliales existentes y el segundo radicó en la implementación de bioensayos en condiciones de invernadero para identificar las especies de hongos ECM presentes en forma de propágulo en los suelos de la zona de estudio. En el caso de las plántulas *in situ*, los porcentajes de supervivencia fueron bajos debido a las condiciones adversas encontradas en el campo. Sin embargo las tasas de colonización fueron más altas que en el caso de los bioensayos, probablemente debido a que las plántulas *in situ* fueron más dependientes de los hongos ECM para obtener los nutrimentos necesarios a su establecimiento. Se encontraron 32 morfotipos asociados a las plántulas en ambos experimentos, aunque la composición de especies mostró ser diferentes en los dos

casos. Las especies encontradas también fueron diferentes de un sitio a otro, siendo *Inocybe* el único género que se encontró en los tres sitios de la cronosecuencia en el caso de las plántulas *in situ*. La proporción de especies exclusivas de un sitio fue menor y los patrones de dominancia mayores en el caso de los bioensayos. La comparación de las comunidades de hongos ECM asociadas a individuos adultos y a plántulas de *P. montezumae* mostró que las plántulas estuvieron asociadas a unas cuantas especies dominantes mientras que la comunidad ECM relacionada con los árboles adultos fue más diversa. Se encontraron 13 morfotipos comunes a los tres experimentos dentro de los cuales se pudieron identificar a nivel de especie *Cenococcum geophilum*, a nivel de género *Tomentella* sp. 1 y *Clavulina* sp. 1 y a nivel de familia Thelephoraceae 1 y 2, Sebacinaceae 1 y Atheliaceae 2. Los índices de similitud pudieron indicar que la micorrización de las plántulas proviene de las redes miceliales establecidas en el sitio antiguo, mientras que las condiciones más estresantes en los sitios jóvenes de la cronosecuencia favorecieron la micorrización de las plántulas a partir de las estructuras de resistencia en el suelo.

1. Introducción

La importancia de los hongos ECM para el crecimiento de los árboles y particularmente para la supervivencia de las plántulas, ha sido comprobada en varios estudios (Quoreshi et al. 2000; Teste et al. 2004; Nara 2006; Smith y Read 2008). Las ectomicorrizas mejoran el crecimiento de las plántulas incrementando su absorción de agua y nutrientes, extendiendo la longevidad de las raíces finas, protegiéndolas contra posibles patógenos y manteniendo la estructura del suelo (Yang et al. 1998). Adicionalmente, promueven la adaptación de las plantas a su ambiente y facilitan los procesos de reforestación en condiciones estresantes para las plántulas (Amaranthus y Perry 1994; Horton et al. 1999). Como se ha establecido en los capítulos anteriores de esta tesis, es importante caracterizar la diversidad de las comunidades de hongos ECM debido a que la composición de especies de los hongos ectomicorrízicos afectan el desarrollo del hospedero y el establecimiento de las plántulas (Menkis et al. 2007; Hynes et al. 2010).

Los hongos ECM asociados a plántulas pueden analizarse de diferentes formas. En varios estudios se recolectaron plántulas directamente de los sitios de muestreo, teniendo

cuidado de no lastimar las raíces en el proceso de extracción (Horton et al. 1998; Yang et al. 1998; Germino et al. 2006). Sin embargo, esta técnica es destructiva y por lo tanto no es recomendada en zonas donde se están llevando a cabo programas de reforestación. En otros trabajos se implementaron experimentos de bioensayos en condiciones de invernadero, sembrando plántulas en suelo de la zona de muestreo para que se asocien a la comunidad de propágulos resistentes presentes en el suelo (Quoreshi et al. 2000; Dickie et al. 2006; Izzo et al. 2006). Esta técnica permitió controlar las condiciones de crecimiento de las plántulas pero no fue representativa de las condiciones ambientales que existen en el campo y que pueden influir sobre el desarrollo de las plántulas. Adicionalmente, las plántulas creciendo *in situ* tienden a formar asociación con los hongos ECM ya presentes en la red micelial del suelo (Jonsson et al. 1999; Nara 2006). Izzo et al. (2006) describieron que los hongos presentes en los estudios de bioensayos eran generalmente menos diversos que los hongos encontrados como fuente de inóculo en campo. Por lo tanto, es preciso analizar ambas fases de la comunidad de hongos ECM para poder determinar si las especies presentes como propágulo resistente son las mismas que las especies micorrizando las plántulas estableciéndose *in situ*.

Las diferencias en las comunidades de hongos ECM asociadas a árboles adultos y a plántulas han sido estudiadas ampliamente a lo largo de cronosecuencias de edades de los hospederos. Dos patrones principales parecen dominar: i) las plántulas están generalmente colonizadas por los mismos hongos que los árboles adultos localizados a sus alrededores y este fenómeno ocurre a través de las redes miceliales existentes en el suelo (Simard et al. 1997; Jonsson et al. 1999; Kennedy et al. 2003; Nara 2006); ii) existen diferencias entre las comunidades de hongos ECM asociadas a las raíces de plántulas y las asociadas a árboles adultos, debidas a la preferencia de ciertas especies de hongos por un estadio dado del hospedero (hongos de etapa temprana vs. hongos de etapa tardía) (Visser 1995). Conocer los hongos asociados a las plántulas de *P. montezumae* en la Sierra del Chichinautzin, tanto los propágulos del suelo como los hongos micorrizando las plántulas creciendo *in situ*, podría promover el éxito de los programas de reforestación en la zona, utilizando como inóculos aquellas especies de etapa temprana naturalmente presentes en estos suelos. La competencia que existe a nivel subterráneo por los nutrientes es un factor importante para el crecimiento de las plántulas en condiciones naturales (Berntson y Wayne 2000) y por lo

tanto es preciso determinar las diferencias entre las comunidades ECM asociadas a árboles jóvenes y aquellas asociadas a árboles adultos, en diferentes tipos de suelo. Este capítulo tuvo por objetivo determinar cuáles son los hongos asociados a las plántulas de *P. montezumae* en la zona y compararlos con los hongos asociados con los árboles adultos. Se probaron nuevos experimentos y herramientas para la caracterización de las comunidades de hongos ECM a lo largo de la cronosecuencia de suelos volcánicos y se discutieron las implicaciones de esta comparación.

2. Métodos

La zona de estudio y los cuadrantes de muestreo fueron previamente descritos en la sección Métodos del capítulo I.

Para determinar cómo variaban las comunidades de hongos ECM asociadas a plántulas en función del suelo, se establecieron dos experimentos: i) el primero consistió en sembrar semillas de *P. montezumae in situ*, alrededor de los árboles adultos seleccionados al interior de los cuadrantes de muestreo; ii) el segundo consistió en un experimento de bioensayos en el invernadero, sembrando semillas de *P. montezumae* en suelo de los tres sitios de estudio para observar la colonización radical de las plántulas por propágulos nativos de la zona.

Las semillas de *P. montezumae* que se utilizaron para la siembra *in situ* y en bioensayos se consiguieron en el vivero San Luis Tlaxiátemalco, Xochimilco (México D.F.) encargado de los programas de reforestación del área metropolitana. Estas semillas provinieron de la localidad de Quepil Ajusco, en el Distrito Federal y fueron recolectadas a una altura de 2800 m. Pasaron por varios tratamientos en el vivero de control de calidad (enjuague con cloro para su desinfección, pruebas de viabilidad, de germinación y de pureza). Las semillas del lote proporcionado se volvieron a desinfectar en agua oxigenada al 30% durante 25 minutos antes de su siembra, según las recomendaciones del vivero para esta especie. Pruebas de germinación en cajas Petri, con 100 semillas sobre papel filtro, se dejaron dos semanas en un cuarto de cultivo a 25°C en oscuridad. Se determinó el porcentaje de germinación de estas semillas (90%), comenzando el proceso a partir de los cuatro días.

2.1. Semillas sembradas in situ

En octubre del año 2006, se sembraron *in situ*, a 3 cm de profundidad, 80 semillas por cuadrante en cada sitio de la cronosecuencia. Estas semillas se colocaron en 20 puntos (4 semillas por punto) alrededor de los individuos adultos previamente seleccionados, a 3 metros del tronco del árbol. Se escogió este número de semillas para asegurar la germinación de al menos una por punto, considerando las condiciones naturales adversas que pudieran reducir el porcentaje de germinación evaluado en el laboratorio. Se colocaron vasos de plástico transparente encima de las semillas para reconocer el punto exacto de siembra y conservar la humedad necesaria para la germinación de las semillas. El porcentaje de germinación se midió un mes después de la siembra (noviembre). Adicionalmente, en los meses de sequía (noviembre - mayo), se regaron las plántulas cada dos semanas para prevenir cualquier evento de desecación del suelo que impidiera su supervivencia. Las plántulas se recolectaron en febrero del 2008 y se midió el porcentaje de supervivencia en esta fecha.

2.2. Semillas sembradas en bioensayos

En octubre del 2006 se montó un experimento de crecimiento de *P. montezumae* desde semilla bajo condiciones de invernadero, llamado bioensayo. Los horizontes orgánicos de los suelos fueron recolectados en agosto del 2006 en cada cuadrante de muestreo, para cada sitio. Se tamizaron (2.0 mm) y se colocaron en contenedores especiales para pino, de 25 cm de largo \times 6.5 cm de diámetro, con aireación en la parte baja para permitir el drenaje del excedente de agua. Las semillas fueron colocadas a 3 cm de profundidad previa desinfección superficial con el mismo método descrito en el punto anterior. El porcentaje de germinación se midió un mes después de la siembra. Se regaron las plántulas cada semana y se mantuvieron a capacidad de campo durante todo el experimento. Las plántulas se recolectaron en abril del 2008 y se midió el porcentaje de supervivencia en esta fecha.

2.3. Caracterización morfológica de los ápices ECM

La totalidad de las raíces de las plántulas generadas, tanto del experimento *in situ* como del experimento de bioensayos, fue analizado bajo microscopio estereoscópico para determinar su porcentaje de colonización por hongos ECM. Este porcentaje se obtuvo evaluando cuantitativamente la proporción de raíces finas micorrizadas con relación al número total de raíces finas de las plántulas. Los ápices ECM se limpiaron con un pincel fino para quitar la materia orgánica adherida y se caracterizaron morfológicamente con los criterios descritos en el “Colour Atlas of Ectomycorrhizae” (Agerer 1987-2002), con base a su color, textura, forma, patrón de ramificación, presencia de rizomorfos, longitud y diámetro de los ápices terminales no ramificados. Posteriormente, se congelaron mediante nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C para su determinación molecular. Para cada experimento se midió la abundancia (total y relativa) y la riqueza de las comunidades de ápices ECM en los tres sitios de estudio. Adicionalmente, se compararon las comunidades de hongos ECM asociadas a plántulas y a árboles adultos (cf. Capítulo III) con el índice de similitud de Sørensen.

2.4. Determinación taxonómica mediante métodos moleculares

Los análisis moleculares se utilizaron para obtener una determinación más precisa de las especies de hongos ECM involucrados en la simbiosis y para verificar la consistencia de los caracteres morfológicos en los morfotipos identificados. Estos análisis se hicieron para los ápices aislados a partir de las raíces de las plántulas sembradas *in situ*. Para cada morfotipo descrito morfológicamente, se procesaron 3 - 4 ápices micorrizados.

Los protocolos para la extracción, amplificación y purificación del ADN fueron provistos por el Dr. Peter Kennedy y el Dr. Tom Bruns del Departamento *Plant and Microbial Biology* de la Universidad de Berkeley, California. Estos protocolos están detallados en los Apéndices D a F. Brevemente, la extracción de ADN se realizó con el kit SIGMA RedExtract-N-Amp Plant PCR a partir de los ápices ECM congelados en nitrógeno líquido. Cada ápice se colocó en un tubo de 0.2 mL con unas pinzas desinfectadas. Se agregaron 10 μL de la solución amortiguadora de extracción a cada tubo que se colocaron

en el termociclador a 65°C durante 10 minutos, seguidos de 10 minutos a 95°C. Posteriormente, se agregaron a la muestra 30 µL de la solución amortiguadora de dilución y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La amplificación de la región ITS del ADNr extraído (Fig. 1) se llevó a cabo mediante el PCR Mix del mismo kit de SIGMA, con los primers ITS1F (específico para hongos) e ITS4. Las secuencias de estos primers se describen en el Apéndice E. En cada microtubo, se agregaron 5 µL de la solución de ADN extraído, 10 µL de PCR Mix, 0.25 µL de cada primer y 9.5 µL de agua MilliQ para obtener un volumen total por tubo de 25 µL. Los tubos se colocaron en el termociclador con el programa de ciclos siguiente:

1. 94°C – 1 min
 2. 94°C – 1 min
 3. 51°C – 1 min
 4. 72°C – 1 min
 5. 72°C – 8 min
 6. 10°C – hasta sacar las muestras del termociclador.
- } 35 ciclos (puntos 2 a 4)

El ADN amplificado se purificó gracias al kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, con un sistema de columnas que permitió limpiar los productos de PCR. El ADN purificado se secuenció por ambos extremos (5´ y 3´) en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se editaron y se alinearon con el programa Sequencher 4.7 en el mismo Instituto. Los *contigs* (grupos de secuencias similares) se establecieron con el 97 % de similitud para definir las OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales) y se elaboró una secuencia “consenso” para cada *contig*. Las secuencias “consenso” se sometieron a la base de datos de nucleótidos de GenBank (algoritmo BLASTN) y UNITE (<http://unite.ut.ee/>) para determinar las secuencias más similares de esta base. Se consideraron las tres secuencias con el porcentaje de similitud más alto. Los árboles filogenéticos se elaboraron con el programa QuickTree y se editaron con MEGA 4.1. de acuerdo a la metodología propuesta en Nilsson et al. (2009) para automatizar el análisis de BLAST. El algoritmo utilizado para la construcción de los árboles filogenéticos fue *Neighbour Joining* y el número de *bootstrap* para validar el árbol a través de la estimación de las distribuciones por creación repetida fue de 1000.

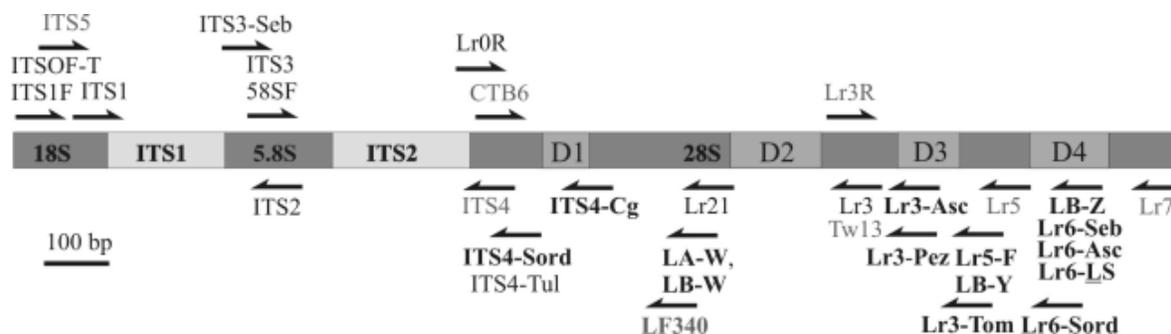


Figura 1. Esquema de los primers utilizados para la amplificación y la secuenciación de la región ITS del ADNr de los hongos. Tomada de la página de UNITE (<http://unite.ut.ee/>)

3. Resultados

3.1. Plántulas sembradas in situ

Los resultados de germinación, supervivencia y porcentaje de micorrización de las plántulas se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Número de semillas sembradas (Octubre 2006), de plántulas germinadas (Noviembre 2006) y supervivientes (Febrero 2008) y algunas variables de las plántulas por cuadrante (C). Diferentes letras significan diferencias significativas (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Sitio	Chichinautzin					Guespalapa					Pelado				
	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
No. semillas sembradas	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
No. plántulas germinadas	23	34	49	29	44	35	24	10	22	11	47	61	32	16	22
Promedio \pm error estándar		36 \pm 4.8 ^a					20 \pm 4.6 ^a					36 \pm 8.2 ^a			
No. plántulas supervivientes	2	6	1	1	10	6	3	0	0	1	1	19	11	3	10
Promedio \pm error estándar		4 \pm 1.8 ^a					2 \pm 1.1 ^a					9 \pm 3.2 ^a			
Longitud tallo (cm)	13.8 \pm 0.8	10.8 \pm 1.2	9	10.5	8 \pm 0.8	13 \pm 2.3	12.8 \pm 1.6	-	-	10.5	5	9.3 \pm 8.0	9.1 \pm 0.9	9.1 \pm 3.1	10.5 \pm 0.7
Promedio \pm error estándar		10.4 \pm 1.0					12.1 \pm 0.8					8.6 \pm 0.9			
Porcentaje de micorrización	50 \pm 0.0	23.3 \pm 15.6	50	100	54 \pm 9.7	80 \pm 16.3	100 \pm 0.0	-	-	100	100	71.1 \pm 8.4	85 \pm 7.8	86.7 \pm 7.3	76.5 \pm 10.5
Promedio \pm error estándar		55.5 \pm 12.4					93.3 \pm 6.7					83.9 \pm 4.9			

El porcentaje promedio de germinación de las semillas fue de 44.8% en el sitio joven, 25.5% en el sitio de edad intermedia y de 44.5% en el sitio antiguo. Los porcentajes promedios de supervivencia fueron de 5.0, 2.5 y 11.0% en el sitio joven, de edad intermedia y antiguo respectivamente (Fig. 1). El porcentaje total de colonización de las raíces por hongos ECM también fue más alto en el sitio antiguo, con 84% de las raíces micorrizadas, contra 57% y 56% para los sitios joven y intermedio respectivamente (Fig. 2). No se implementaron análisis de varianza para comparar las longitudes de tallo de las plántulas y los porcentajes de micorrización entre sitios dado que el número de plántulas supervivientes fue diferente en cada sitio.

Se contaron un total de 2130 ápices ECM de las plántulas sembradas *in situ*, y se pudieron diferenciar 32 morfotipos (ver Apéndice C y Figura 3 para la descripción de los morfotipos). Se procesaron 130 muestras provenientes de los morfotipos aislados asociados a las raíces de las plantas sembradas *in situ* con los análisis moleculares. De estas 130 muestras, sólo 61 (48%) lograron amplificar adecuadamente. De estas 61 muestras, 40 (65.5%) pudieron ser secuenciadas, mientras que 21 muestras salieron dobles o demasiado cortas para estar consideradas en este estudio.

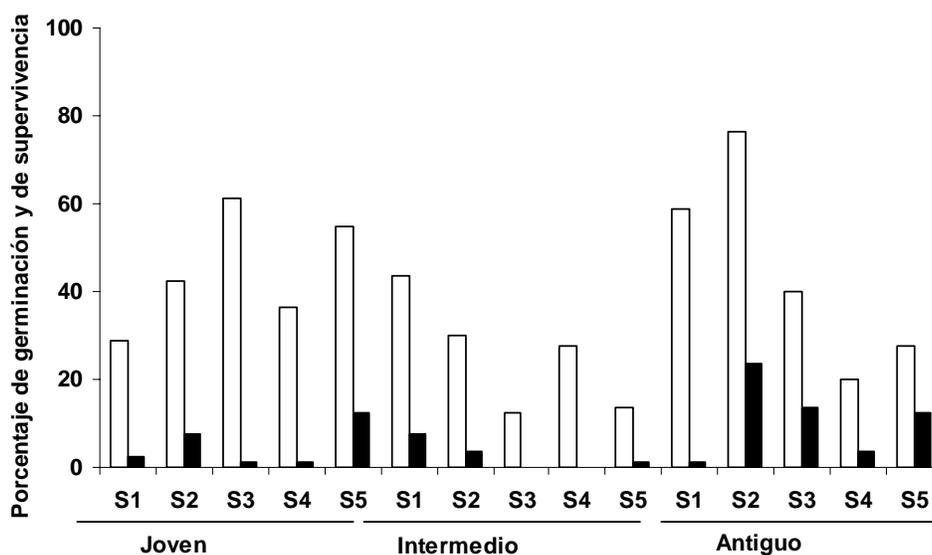


Figura 1. Porcentaje de germinación (barras blancas) y de supervivencia (barras negras) para cada sitio de los tres volcanes de estudio.

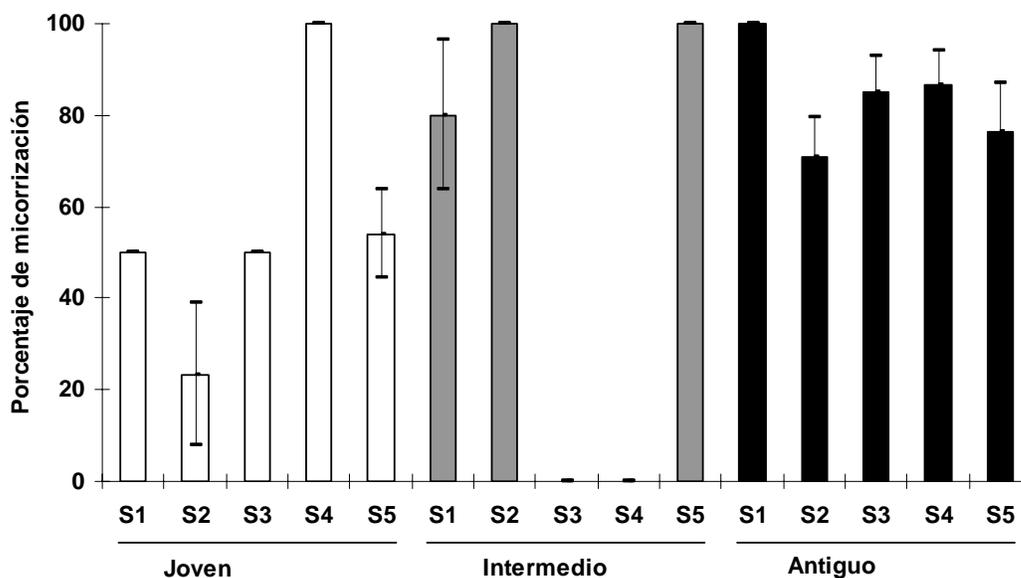


Figura 2. Porcentaje de micorrización de *P. montezumae* para cada sitio de los tres volcanes de estudio.

De los 32 morfotipos, 9 no pudieron ser identificados molecularmente. La descripción de las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs por sus siglas en inglés) y sus secuencias correspondientes en el *GenBank* se presentan en el Cuadro 2. El árbol filogenético ilustrando la clasificación de las secuencias encontradas se presenta en la Figura 4.

Las abundancias de los hongos ECM asociados a las raíces de las plántulas sembradas *in situ* se presentan en el Cuadro 3. Se encontraron 15 morfotipos diferentes en el sitio joven, 7 en el sitio de edad intermedia y 27 en el sitio antiguo. El promedio de morfotipos ECM por plántula fue el mismo en todos los sitios de la cronosecuencia (2 por plántula). La identificación taxonómica fue atribuida en función del Cuadro 2 y de la Figura 4.

La abundancia relativa para cada sitio de estudio de los 15 hongos ECM (y morfotipos no identificados) más comunes asociados a las plántulas sembradas *in situ* se presenta en la Figura 5. En el sitio joven, se observaron solamente 10 hongos ECM y 3 morfotipos no identificados, mientras que en el sitio de edad intermedia, se observaron 6 hongos diferentes y un morfotipo no identificado.

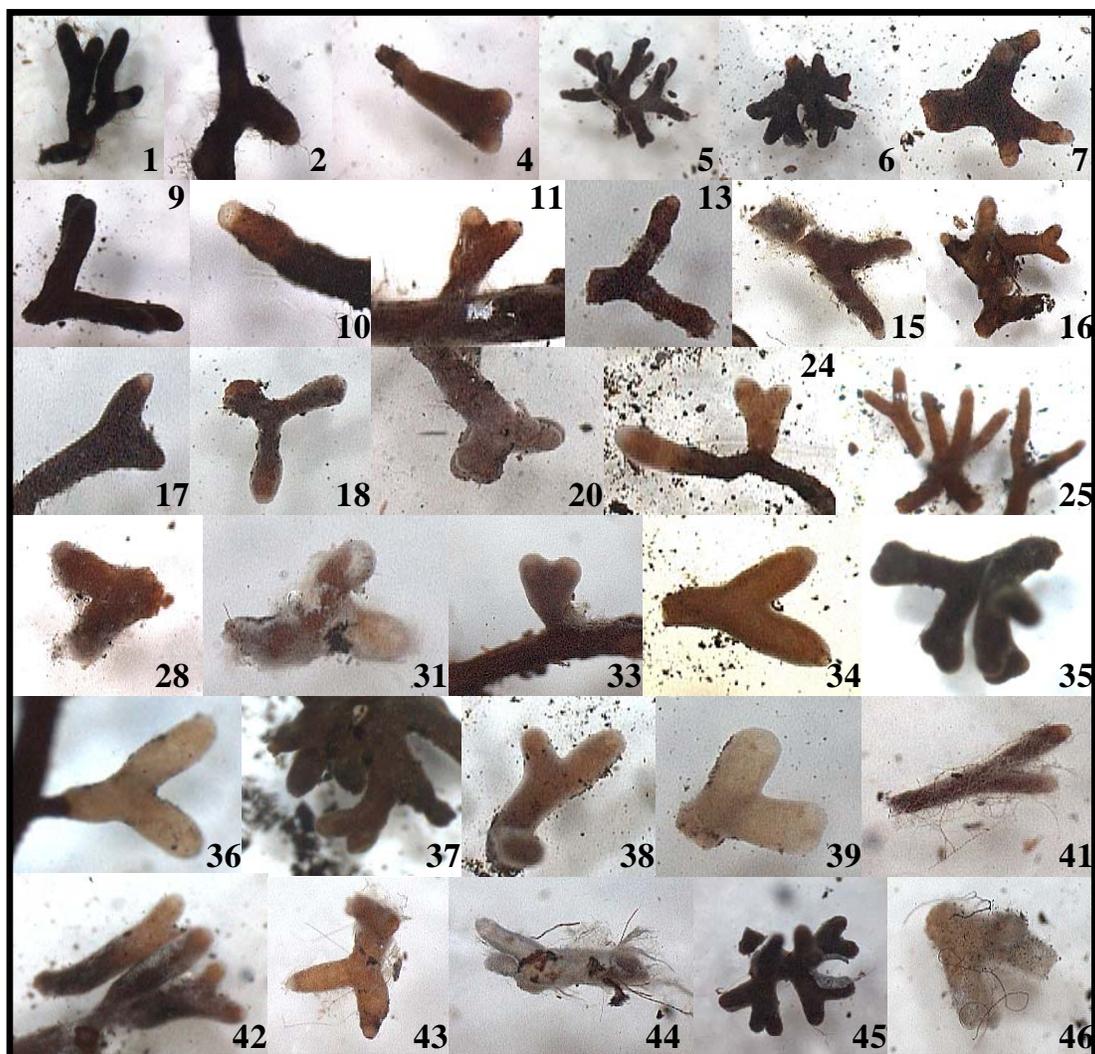


Figura 3. Microfotografías de los morfotipos ECM asociados a plántulas de *P. montezumae* sembradas *in situ* en los tres sitios de estudio de la Sierra del Chichinautzin, Morelos.

Morfotipo no. 1 *Cenococcum geophilum* ($\times 20$); no. 2 ($\times 40$); no. 4 ($\times 40$); no. 5 familia Thelephoraceae ($\times 25$); no. 6 ($\times 20$); no. 7 *Clavulina* sp. ($\times 32$); no. 9 familia Atheliaceae ($\times 20$); no. 10 ($\times 32$); no. 11 ($\times 32$); no. 13 *Oidiodendron* sp. ($\times 32$); no. 15 orden Sebaciales ($\times 32$); no. 16 familia Thelephoraceae ($\times 20$); no. 17 ($\times 32$); no. 18 ($\times 25$); no. 20 *Rhizopogon* sp. ($\times 25$); no. 24 *Inocybe* sp. ($\times 16$); no. 25 ($\times 16$); no. 28 *Cortinarius* sp. ($\times 25$); no. 31 ($\times 32$); no. 33 *Russula* sp. ($\times 32$); no. 34 orden Cantharellales ($\times 25$); no. 35 *Tomentella* sp. ($\times 25$); no. 36 familia Sebacinaceae ($\times 25$); no. 37 familia Atheliaceae ($\times 25$); no. 38 *Russula* sp. ($\times 25$); no. 39 familia Sebacinaceae ($\times 32$); no. 41 *Inocybe* sp. ($\times 32$); no. 42 familia Thelephoraceae ($\times 25$); no. 43 clase Agaricomycetes ($\times 40$); no. 44 Basidiomycetes ($\times 25$); no. 45 *Clavulina* sp. ($\times 32$); no. 46 familia Atheliaceae ($\times 25$).

Cuadro 2. Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) identificadas y sus tres mejores secuencias correspondientes en la base de datos *Genbank*, con porcentaje de similitud con la secuencia correspondiente y valor de e dados por las búsquedas de los ITS secuenciados por el algoritmo *BLASTN*.

Número de OTU	Secuencias formando la OTU	Longitud de la secuencia consenso (pb)	Porcentaje de similitud	Valor de e	Número de acceso y descripción de las mejores secuencias correspondientes (BLASTN)
7	7-8-264	631	99	0.0	Uncultured fungus (EU292431.1)
			97	0.0	Uncultured ECM fungus (<i>Inocybe</i>) (AY634142.1)
			96	0.0	<i>Inocybe nitidiuscula</i> (AM882913.2)
33	33-263	605	99	0.0	<i>Russula</i> sp. (DQ822825.1)
			99	0.0	<i>Russula abietina</i> (EU598179.1)
			99	0.0	<i>Russula aff. lilacea</i> (EU248589.1)
34	34-343	593	99	0.0	Uncultured <i>Tomentella</i> (EF619832.1)
			99	0.0	Uncultured ECM fungus (<i>Tomentella</i>) (AM161535.1)
			98	0.0	Uncultured ECM fungus (<i>Tomentella</i>) (DQ990851.1)
35	35	585	96	0.0	Uncultured ECM fungus (Thelephoraceae) (EU645635.1)
			96	0.0	Uncultured ECM fungus (Thelephoraceae) (AJ938002.1)
			96	0.0	Uncultured <i>Tomentella</i> (EF619831.1)
36	36-291-326	570	93	0.0	Uncultured ECM fungus (Clavulinaceae) (FJ196905.1)
			92	0.0	<i>Clavulina</i> sp. (EU569245.1)
			90	0.0	<i>Clavulina cinerea</i> (EU862209.1)
62	62-261	575	96	0.0	Uncultured ECM fungus (DQ493567.1)
			95	0.0	Uncultured ECM fungus (Cantharellales) (DQ481981.1)
			92	0.0	Uncultured Ceratobasidiaceae (DQ273373.1)
63	63	583	98	0.0	Uncultured <i>Cortinarius</i> (GU246988.1)
			98	0.0	Uncultured <i>Cortinarius</i> (EU668287.1)
			98	0.0	Uncultured ECM fungus (<i>Cortinarius</i>)(DQ481761.1)
76	76	585	99	0.0	Uncultured Thelephoraceae (EF619795.1)
			93	0.0	Uncultured ECM fungus (Thelephoraceae) (EF077520.1)
			91	0.0	Uncultured Thelephoraceae (EU046040.1)
136	136-137-265-272-325	606	99	0.0	Uncultured ECM fungus (Sebacinaceae) (AM161532.1)
			98	0.0	<i>Sebacina epigaea</i> (AJ966754.1)
			97	0.0	Uncultured ECM fungus (Sebacinaceae) (AJ893256.1)

Número de OTU	Secuencias formando la OTU	Longitud de la secuencia consenso (pb)	Porcentaje de similitud	Valor de e	Número de acceso y descripción de las mejores secuencias correspondientes (BLASTN)
139	139-146-287-295-341	542	98	0.0	Uncultured ECM fungus (Atheliaceae) (FJ807983.1)
			97	0.0	Uncultured Atheliaceae (EU726283.1)
			97	0.0	Uncultured ECM fungus (Amphinema) (EU649087.1)
140	140	492	96	0.0	Uncultured ECM fungus (Sebacinales) (FJ196961.1)
			92	0.0	Uncultured Sebacinales (EF417818.1)
			92	0.0	Uncultured <i>Sebacina</i> (EU668259.1)
147	147	542	100	0.0	<i>Inocybe mixtilis</i> (EU525969.1)
			99	0.0	<i>Inocybe mixtilis</i> (EU525968.1)
			98	0.0	<i>Inocybe mixtilis</i> (AM882840.1)
149	149	508	97	0.0	<i>Oidiodendron maius</i> (AF062799.1)
			97	0.0	<i>Oidiodendron</i> sp. (EU888633.1)
			97	0.0	<i>Oidiodendron citrinum</i> (AF062790.1)
262	262	591	93	0.0	<i>Inocybe</i> sp. (AJ534923.1)
			93	0.0	Uncultured ECM fungus (<i>Inocybe</i>) (EU816656.1)
			93	0.0	<i>Inocybe aff. fuscidula</i> (AM882935.1)
269	269	446	98	0.0	<i>Cenococcum geophilum</i> (EU427331.1)
			98	0.0	<i>Cenococcum geophilum</i> (AM084698.1)
			98	0.0	<i>Cenococcum geophilum</i> (DQ179119.1)
271	271	579	97	0.0	Uncultured Thelephoraceae
			92	0.0	<i>Tomentellopsis zygodesmoides</i> (AJ410761.1)
			92	0.0	<i>Tomentellopsis zygodesmoides</i> (AJ410760.1)
274	274	471	96	0.0	Uncultured fungus (EU292582.1)
			96	0.0	Uncultured ECM fungus (<i>Inocybe</i>) (FJ196929.1)
			95	0.0	Uncultured ECM fungus (<i>Inocybe</i>) (AY634142.1)
276	276	427	94	0.0	<i>Inocybe armeniaca</i> (DQ974803.1)
			94	0.0	<i>Inocybe geophylla</i> (FJ845414.1)
			94	0.0	<i>Inocybe armeniaca</i> (EU726291.1)
298	298	619	99	0.0	<i>Russula aff. sanguinea</i> (EU248591.1)
			98	0.0	Uncultured ECM fungus (Russulaceae) (DQ377398.1)
			98	0.0	Uncultured <i>Russula</i> (EF619752.1)

Número de OTU	Secuencias formando la OTU	Longitud de la secuencia consenso (pb)	Porcentaje de similitud	Valor de e	Número de acceso y descripción de las mejores secuencias correspondientes (BLASTN)
299	299-321	541	98	0.0	Uncultured <i>Piloderma</i> (GU452517.1)
			98	0.0	Uncultured Atheliaceae (DQ273354.1)
			98	0.0	Uncultured ECM fungus (<i>Piloderma</i>) (EF218793.1)
300	300	594	100	0.0	Uncultured fungus (EU292570.1)
			98	0.0	Uncultured <i>Pseudotomentella</i> (EU668254.1)
			97	0.0	Uncultured ECM fungus (<i>Pseudotomentella</i>) (EF644142.1)
301	301	506	98	0.0	Uncultured ECM fungus (Thelephoraceae) (FJ196979.1)
			98	0.0	Uncultured Thelephoraceae (GQ221626.1)
			98	0.0	Uncultured <i>Tomentella</i> (EF619820.1)
327	327	414	98	0.0	<i>Tomentella bryophila</i> (AF272908.1)
			98	0.0	Thelephoraceae sp. (AF272916.1)
			95	0.0	<i>Tomentella bryophila</i> (AJ889981.1)
345	345	486	99	0.0	<i>Rhizopogon fallax</i> (AF377144.1)
			99	0.0	<i>Rhizopogon</i> sp. (AF351875.1)
			99	0.0	<i>Rhizopogon subcaerulescens</i> (M91613.1)
351	351	563	98	0.0	Uncultured Sebacinales (EF417803.1)
			98	0.0	Uncultured ECM fungus (Sebacinales) (EU563483.1)
			97	0.0	Uncultured Sebacinales (EF027386.1)

Cuadro 3. Abundancias de los morfotipos ECM asociados a las raíces de plántulas sembradas *in situ* de *P. montezumae*, en los tres sitios de estudio.

Morfotipo ECM	OTU correspondiente	Identificación taxonómica	Chichinautzin	Guespalapa	Pelado
1	269	<i>Cenococcum geophilum</i>	14	-	74
2			2	-	-
4			-	-	2
5	301	Thelephoraceae 1	9	-	85
6			-	1	13
7	36	<i>Clavulina</i> sp. 1	-	-	15
9	139	Atheliaceae 1	6	-	33
10			-	-	5
11			-	-	15
13	149	<i>Oidiodendron</i> sp.	9	-	-
15	140	Sebacinales	-	69	33
16	76	Thelephoraceae 2	-	23	-
17			36	-	-
18			-	-	9
20	345	<i>Rhizopogon</i> sp.	2	-	12
24	7 - 274	<i>Inocybe</i> sp. 1	17	3	90
25			-	-	50
28	63	<i>Cortinarius</i> sp.	2	-	29
31			4	-	59
33	298	<i>Russula</i> sp. 1	-	-	2
34	62	Cantharellales	14	17	-
35	35	<i>Tomentella</i> sp. 1	-	-	24
36	136	Sebacinaceae 1	-	-	59
37	139	Atheliaceae 2	-	-	83
38	33	<i>Russula</i> sp. 2	-	-	205
39	136 - 351	Sebacinaceae 2	-	-	29
41	147 - 262 - 276	<i>Inocybe</i> 2	36	76	114
42	34 - 271	Thelephoraceae 3	-	30	231
43	136 - 327	Sebacinaceae / Thelephoraceae	21	-	252
44	299 - 300	Atheliaceae / Thelephoraceae	12	-	63
45	36	<i>Clavulina</i> sp. 2	19	-	6
46	139	Atheliaceae 3	-	-	116

Más de la mitad de los morfotipos (53%) fueron exclusivos de un sitio, siendo mayor esta proporción en el sitio antiguo: 48% de los morfotipos encontrados en el Pelado fueron exclusivos de este sitio, contra 20% de exclusividad en el Chichinautzin y 14% en el Guespalapa. El género *Clavulina* se encontró únicamente en el sitio antiguo, mientras que *Oidiodendron* fue exclusivo del sitio joven. Las dos especies de hongos comunes a los tres sitios pertenecieron al género *Inocybe*. Estas abundancias relativas se calcularon a partir de la abundancia de los morfotipos ECM presentadas en el Cuadro 3. Los morfotipos no. 43 y 44 se quitaron de la Figura 5 dado que estuvieron conformados por familias diferentes que no se lograron diferenciar por la simple caracterización morfológica. Los morfotipos conformados

por OTUs diferentes pero perteneciendo a la misma familia (morfortipos no. 39 y 42) o al mismo género (morfortipo no. 41) se incluyeron al análisis.

3.2. Bioensayos

Los resultados de germinación, supervivencia y porcentaje de micorrización de las plántulas crecidas en el experimento de bioensayos se presentan a continuación en el Cuadro 4. El porcentaje promedio de germinación de las semillas fue de 71.3% en el sitio joven, 80.0% en el sitio de edad intermedia y de 72.5% en el sitio antiguo; es decir, en promedio dos veces más que en el experimento de las plántulas sembradas *in situ*. Los porcentajes promedios de supervivencia fueron de 43.8, 38.8 y 41.3% en el sitio joven, de edad intermedia y antiguo respectivamente, ocho veces más que en el experimento de las plántulas sembradas *in situ* (Fig. 6). El porcentaje de colonización de las raíces por hongos ECM también fue más alto en el sitio antiguo, con 50.6% de las raíces micorrizadas, contra 41.4% y 39.7% para los sitios joven e intermedio respectivamente (Fig. 7). El porcentaje total de micorrización fue más alto en el experimento de las plántulas sembradas *in situ*.

Se contaron un total de 16,513 ápices ECM proviniendo de las plántulas sembradas en bioensayos y se pudieron diferenciar 32 morfortipos (ver Apéndice C y Figura 8 para la descripción de los morfortipos). Los morfortipos ECM de las plántulas crecidas en bioensayos no fueron determinados molecularmente y por lo tanto sólo se caracterizaron morfológicamente. El Cuadro 5 presenta las abundancias de los morfortipos ECM asociados a las raíces de las plántulas sembradas en bioensayos y su determinación taxonómica basada en los análisis moleculares implementados para las plántulas sembradas *in situ*. Se encontraron 21 morfortipos diferentes en el sitio joven, 22 en el sitio de edad intermedia y 25 en el sitio antiguo. El promedio de morfortipos ECM encontrados por plántula fue de 3 para el sitio joven y el sitio antiguo y de 2 para el sitio de edad intermedia. La abundancia relativa para cada sitio de estudio de los 15 morfortipos ECM más comunes asociados a las plántulas sembradas en bioensayos se presenta en la Figura 9. La proporción de morfortipos exclusivos de un sitio fue mayor en el sitio intermedio: 18%, contra 14% para el sitio joven y 8% solamente en el sitio antiguo. En total, 28% de los morfortipos fueron exclusivos de un sitio, mientras que 41% de los morfortipos fueron comunes a los tres sitios.

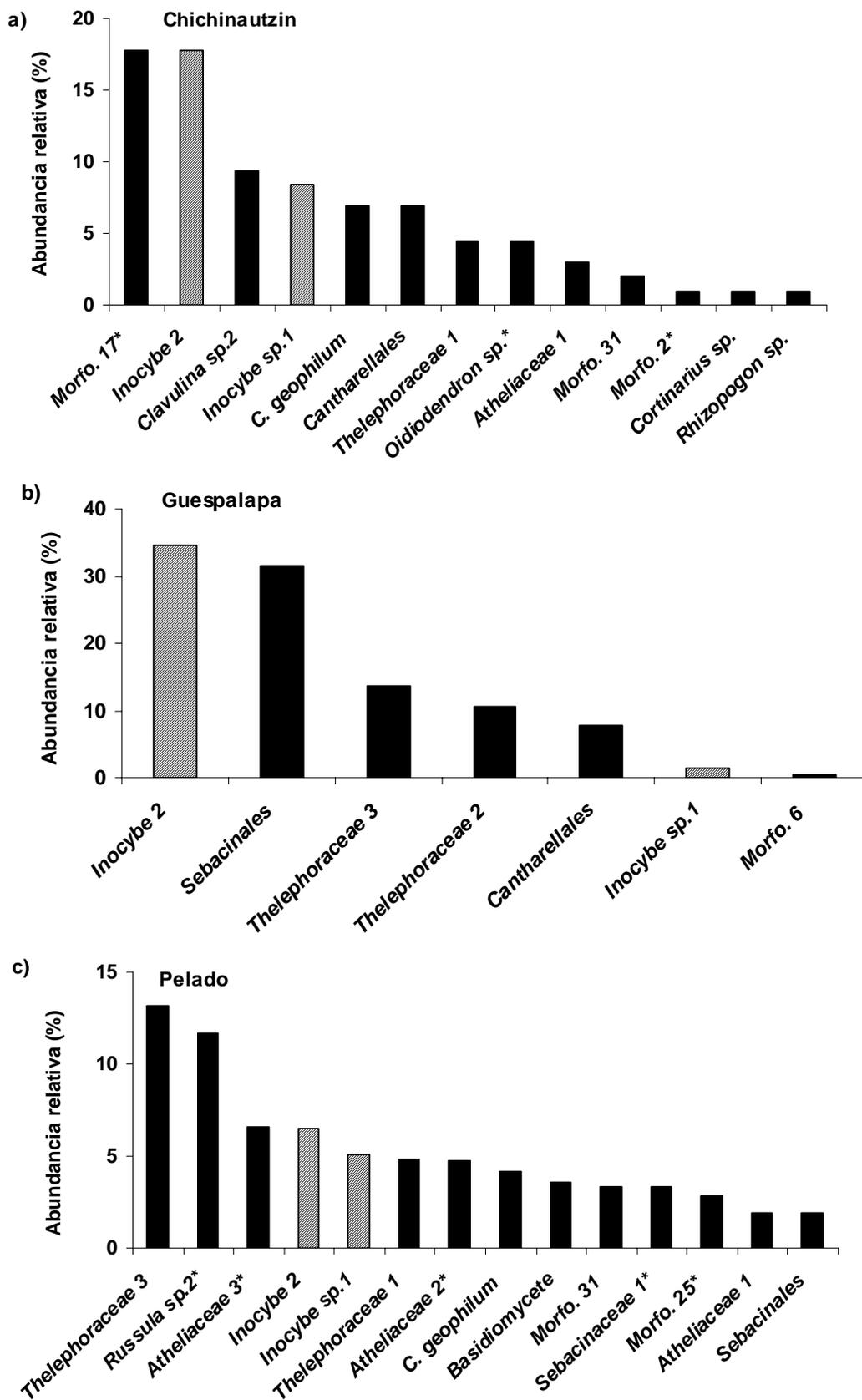


Figura 5. Abundancia relativa (%) de los hongos ECM asociados a las raíces de las plántulas sembradas *in situ* para los tres sitios de muestreo. a) sitio joven; b) sitio de edad intermedia; c) sitio antiguo. Las barras con patrón diagonal representan las especies comunes a los tres sitios de estudio. * Morfortipos exclusivos de un sitio.

Cuadro 4. Número de semillas sembradas (Octubre 2006), de plántulas germinadas (Noviembre 2006) y supervivientes (Abril 2008), y algunas variables de las plántulas en bioensayos por cuadrante (C). Diferentes letras significan diferencias significativas (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Sitio	Chichinautzin					Guespalapa					Pelado				
	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
N° semillas sembradas*	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
N° plántulas germinadas	8	12	13	15	9	12	11	11	14	16	16	8	13	12	9
Promedio \pm error estándar	11 ± 1.3^a					13 ± 1.0^a					12 ± 1.4^a				
N° plántulas sobrevivientes	8	5	8	7	7	8	5	7	7	8	8	5	5	9	6
Promedio \pm error estándar	7 ± 0.5^a					7 ± 0.5^a					7 ± 0.8^a				
Longitud tallo (cm)	10.4 \pm 1.7	12.8 \pm 2.6	6.9 \pm 0.5	12.1 \pm 3.6	7.6 \pm 1.5	12.1 \pm 3.2	5.8 \pm 1.0	6.1 \pm 1.0	11.1 \pm 3.3	7.9 \pm 2.9	8.5 \pm 2.0	8.3 \pm 3.4	5.3 \pm 0.7	8.8 \pm 2.4	5.3 \pm 0.4
Promedio \pm error estándar	10.0 ± 1.2					8.6 ± 1.3					7.2 ± 0.8				
Porcentaje de micorrización	48.8 \pm 9	30 \pm 12	52.5 \pm 12	50 \pm 11	25.7 \pm 7	67.1 \pm 7	46 \pm 9	21.4 \pm 4	23.6 \pm 8	40.3 \pm 11	55.6 \pm 8	65 \pm 5	39 \pm 11	41.5 \pm 6	51.8 \pm 8
Promedio \pm error estándar	41.4 ± 5.6					39.7 ± 8.3					50.6 ± 4.7				

* Se sembraron 2 semillas por contenedor, con 8 contenedores (repeticiones) por sitio.

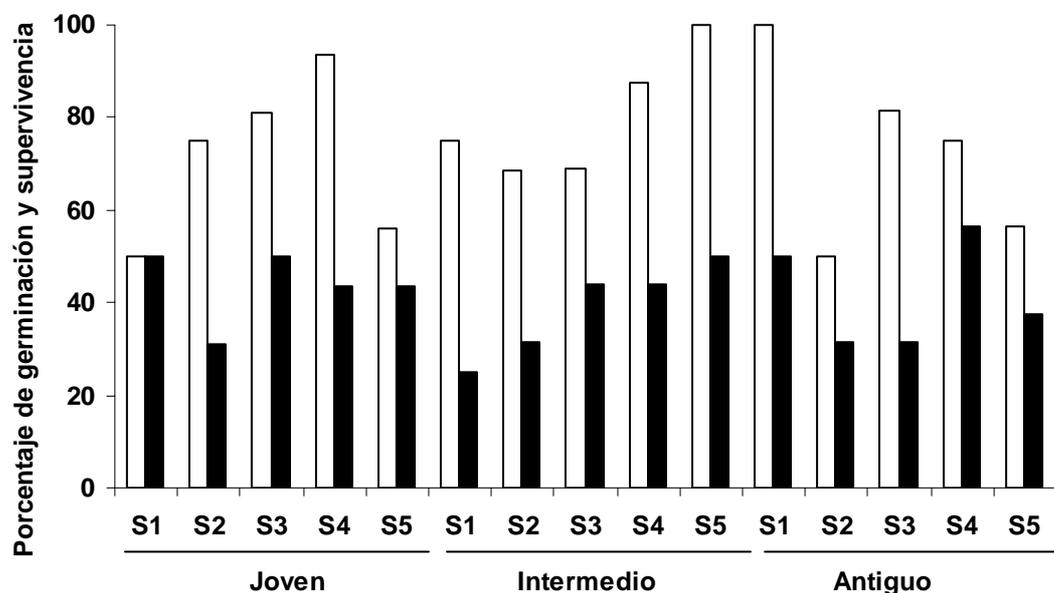


Figura 6. Porcentaje de germinación (barras blancas) y porcentaje de supervivencia (barras negras) para cada sitio de los tres volcanes de estudio.

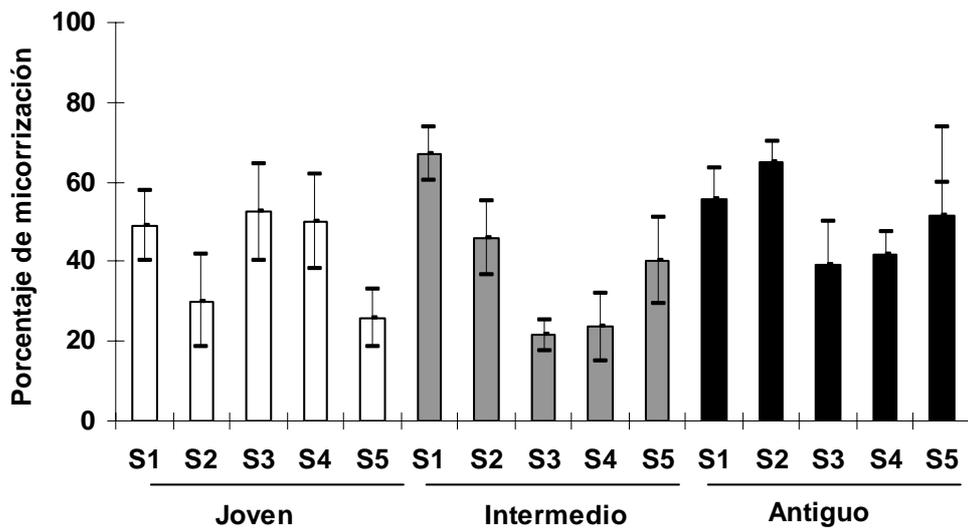


Figura 7. Porcentaje de micorrización para cada sitio de los tres volcanes de estudio.

Los morfotipos más abundantes fueron los morfotipos no. 47, 50 y 48 y representaron respectivamente 25.0%, 15.8% y 9.4% de la abundancia total. *Cenococcum geophilum* Fr. y el hongo ECM identificado como Atheliaceae 1 fueron comunes a los tres sitios. Dos de los tres hongos identificados como Thelephoraceae, dos fueron exclusivos del sitio antiguo. Como fue el caso para las plántulas sembradas *in situ*, las abundancias relativas se calcularon a partir de la abundancia de los morfotipos ECM presentadas en el Cuadro 5. Los morfotipos no. 43 y 44 se quitaron de la Figura 9 dado que estuvieron conformados por familias diferentes que no se lograron diferenciar por la simple caracterización morfológica. Los morfotipos conformados por OTUs diferentes pero perteneciendo a la misma familia (morfotipos no. 39 y 42) o al mismo género (morfotipo no. 41) se incluyeron al análisis.

3.3. Comparación de los tres enfoques para evaluar la diversidad ECM

La comparación cuantitativa de los tres enfoques para evaluar la diversidad de las comunidades ECM asociadas a *P. montezumae* (árboles adultos, plántulas sembradas *in situ* y en bioensayos) resulta difícil de llevar a cabo, por una parte debido a la falta de correspondencia entre los tres métodos de muestreo, y por otra parte debido a la disparidad entre el número de individuos analizados. Mientras comparar la abundancia y la riqueza totales de las tres comunidades ECM resultó irrelevante por la discrepancia en los números de árboles estudiados, se analizó y comparó la riqueza de morfotipos por individuo, tanto para los árboles adultos como para las plántulas de *P. montezumae*. Se presenta en el Cuadro 6 una síntesis de los patrones destacados por cada comunidad de hongos ECM.

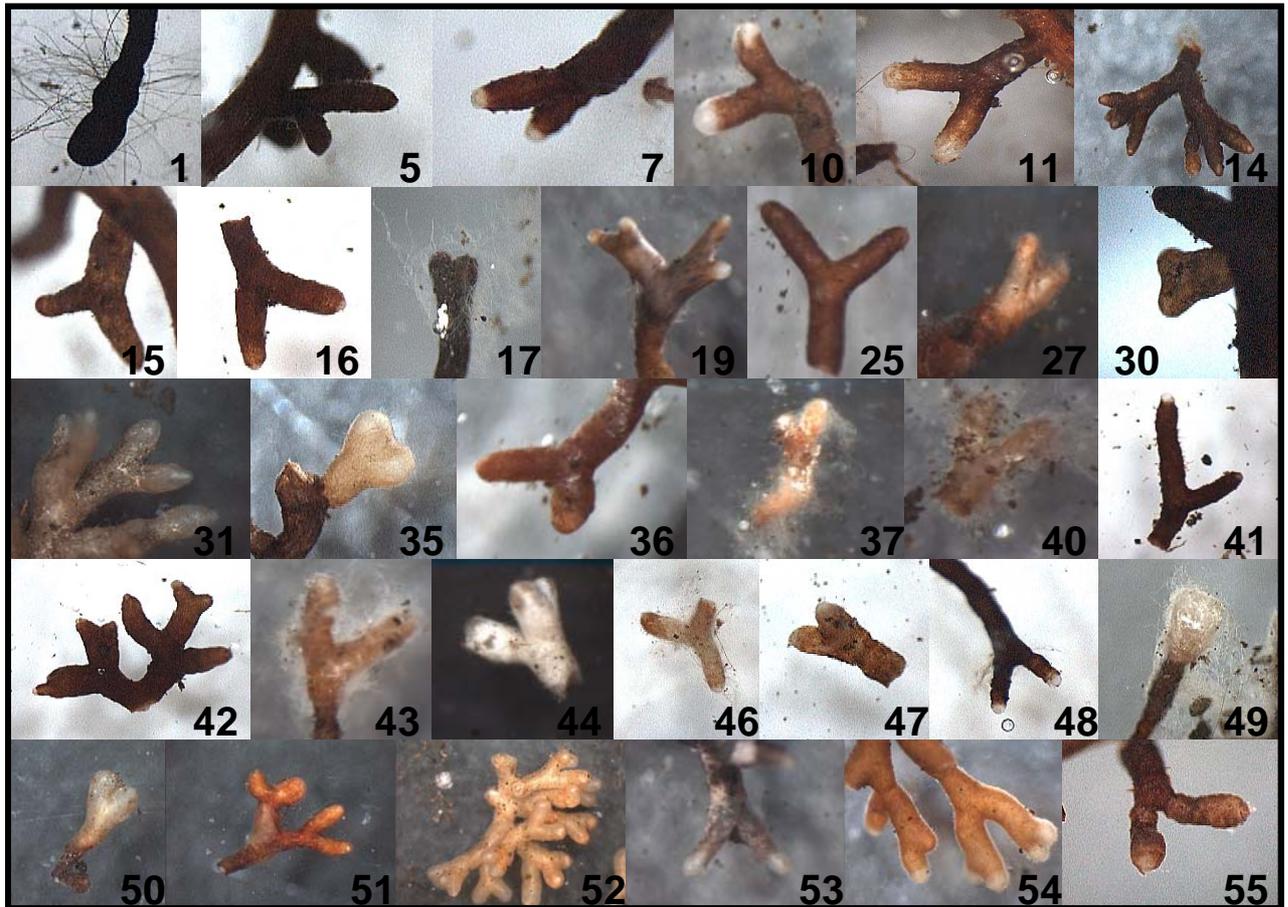


Figura 8. Microfotografías de los morfotipos ECM asociados a plántulas de *P. montezumae* sembradas en bioensayos en los tres sitios de estudio de la Sierra del Chichinautzin, Morelos. Morfotipo no. 1 *Cenococcum geophilum* ($\times 32$); no. 5 ($\times 32$); no. 7 ($\times 50$); no. 10 ($\times 40$); no. 11 ($\times 50$); no. 14 ($\times 25$); no. 15 ($\times 50$); no. 16 ($\times 32$); no. 17 ($\times 63$); no. 19 ($\times 40$); no. 25 ($\times 40$); no. 27 ($\times 40$); no. 30 ($\times 50$); no. 31 ($\times 40$); no. 35 ($\times 32$); no. 36 ($\times 40$); no. 37 ($\times 32$); no. 40 ($\times 40$); no. 41 ($\times 40$); no. 42 ($\times 32$); no. 43 ($\times 50$); no. 44 ($\times 40$); no. 46 ($\times 25$); no. 47 ($\times 32$); no. 48 ($\times 40$); no. 49 ($\times 32$); no. 50 ($\times 32$); no. 51 ($\times 40$); no. 52 ($\times 32$); no. 53 ($\times 40$); no. 54 ($\times 40$); no. 55 ($\times 40$).

El número de morfotipos por individuo de *P. montezumae* se calculó asumiendo que las raíces de los árboles adultos muestreadas a través de cilindros pertenecían al árbol de estudio (cf. Capítulo III). Este número fue más alto en el caso de los árboles adultos que para las plántulas. Al contrario, los patrones de dominancia fueron más fuertes en el caso de las plántulas, ya que el morfotipo no. 47 por ejemplo representó un cuarto de los morfotipos encontrados en el caso de la comunidad ECM asociada a los bioensayos. En el caso de los árboles adultos, el morfotipo más abundante representó solamente 10 % de la abundancia total.

Cuadro 5. Abundancias de los morfotipos ECM asociados a las raíces de plántulas de *P. montezumae* sembradas en bioensayos en suelos de los tres volcanes de estudio.

Morfotipo ECM	Identificación taxonómica	Chichinautzin	Guespalapa	Pelado
1	<i>Cenococcum geophilum</i>	341	4	122
5	Thelephoraceae 1	-	-	14
7	<i>Clavulina</i> sp. 1	-	435	108
10		15	59	109
11		176	81	209
14		27	-	250
15	Sebacinales	3	98	21
16	Thelephoraceae 2	-	202	321
17		9	-	59
19		13	-	-
25		-	284	32
27		-	30	21
30		-	13	-
31		217	-	-
35	<i>Tomentella</i> sp. 1	23	-	35
36	Sebacinaceae 1	48	-	15
37	Atheliaceae 1	100	68	88
40		-	78	-
41	<i>Inocybe</i> 2	3	-	18
42	Thelephoraceae 3	-	-	277
43	Sebacinaceae / Thelephoraceae	27	5	83
44	Atheliaceae / Thelephoraceae	-	53	-
46	Atheliaceae 3	-	121	214
47		801	1171	2156
48		586	357	613
49		313	154	466
50		787	1520	298
51		31	104	67
52		495	88	382
53		60	3	67
54		1419	-	-
55		-	46	-

Cuadro 6. Comparación del número de morfotipos por individuo (árbol adulto o plántula) de *Pinus montezumae* y de los morfotipos más abundantes en las comunidades de hongos ECM analizadas en los tres tipos de experimentos. * Promedio de los tres sitios de estudio.

	Número de morfotipos por planta*	Morfotipos más abundantes y su abundancia relativa
Árboles adultos	5 ± 0.31	No. 30 (10.0 %) No. 15 (9.4 %) No. 23 (8.9 %)
Plántulas <i>in situ</i>	2 ± 0.12	No. 41 (14.6 %) No. 43 (12.2 %) No. 42 (11.7 %)
Bioensayos	3 ± 0.10	No. 47 (25.0 %) No. 50 (15.8 %) No. 48 (9.4 %)

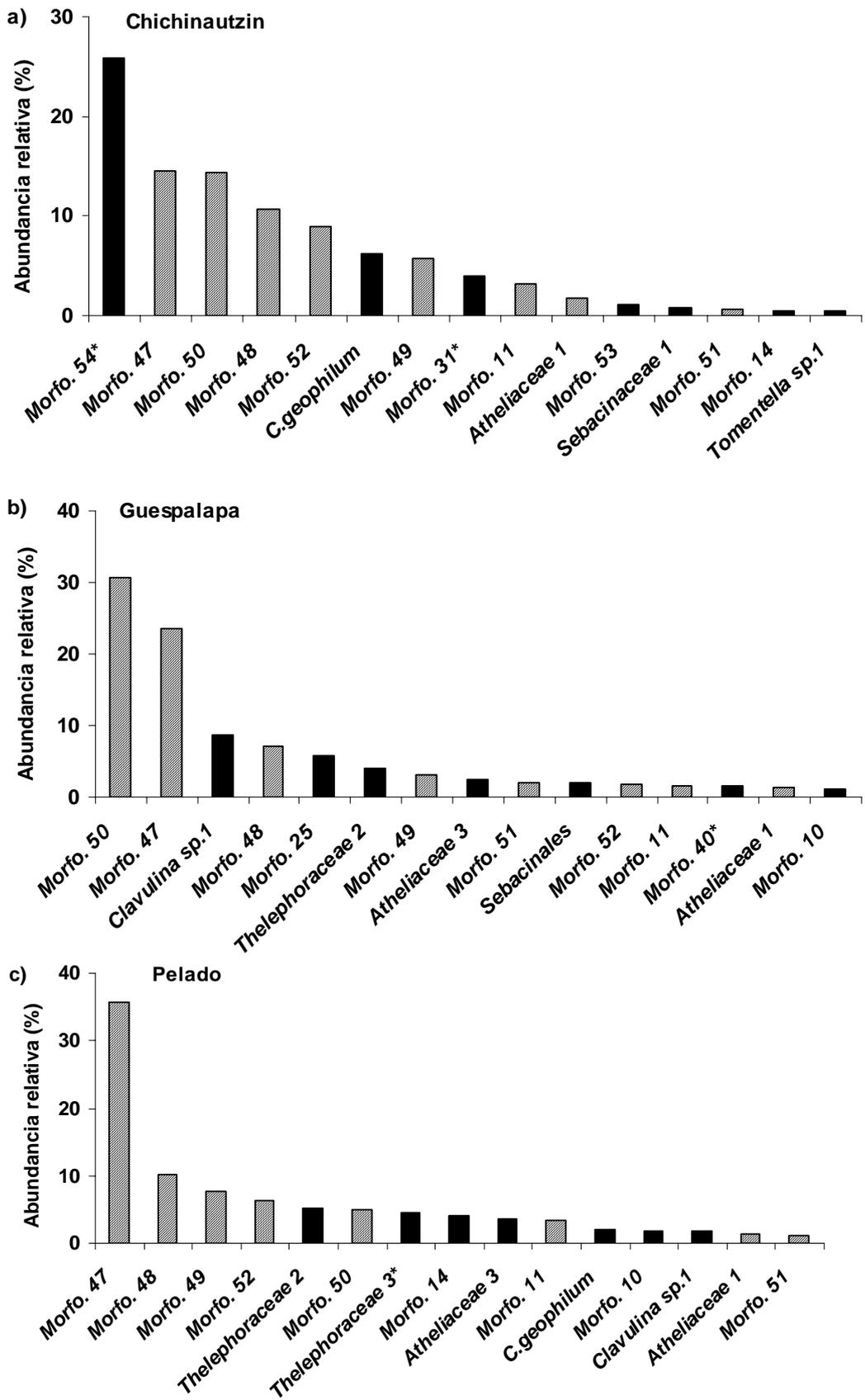


Figura 9. Abundancia relativa (%) de los hongos ECM asociados a las raíces de las plántulas sembradas en bioensayos para los tres sitios de muestreo: a) sitio joven; b) sitio de edad intermedia; c) sitio antiguo. Las barras con patrón diagonal representan las especies comunes a los tres sitios de estudio.

* Morfotipos exclusivos de un sitio.

Comparando el número de morfotipos compartidos por cada uno de los experimentos, encontramos que los patrones dependen del sitio considerado (Fig. 10). Sin embargo, los árboles adultos comparten más morfotipos con las plántulas (bioensayos o plántulas sembradas *in situ*) que los dos experimentos con plántulas entre sí. En los sitios más jóvenes, el número de morfotipos compartidos fue mayor en el caso de los árboles adultos y de los bioensayos. En el caso del volcán antiguo, fue mayor el número de morfotipos compartidos entre los árboles adultos y las plántulas sembradas *in situ*.

Los morfotipos comunes a los tres experimentos fueron los morfotipos no. 1 (*Cenococcum geophilum*), 5 (Thelephoraceae 1), 7 (*Clavulina* sp. 1), 10, 11, 15 (Sebacinales), 16 (Thelephoraceae 2), 17, 25, 31, 35 (*Tomentella* sp. 1), 36 (Sebacinaceae 1) y 37 (Atheliaceae 2). La repartición de los morfotipos por experimento y por sitio se presenta en el Cuadro 7 y en la Figura 11.

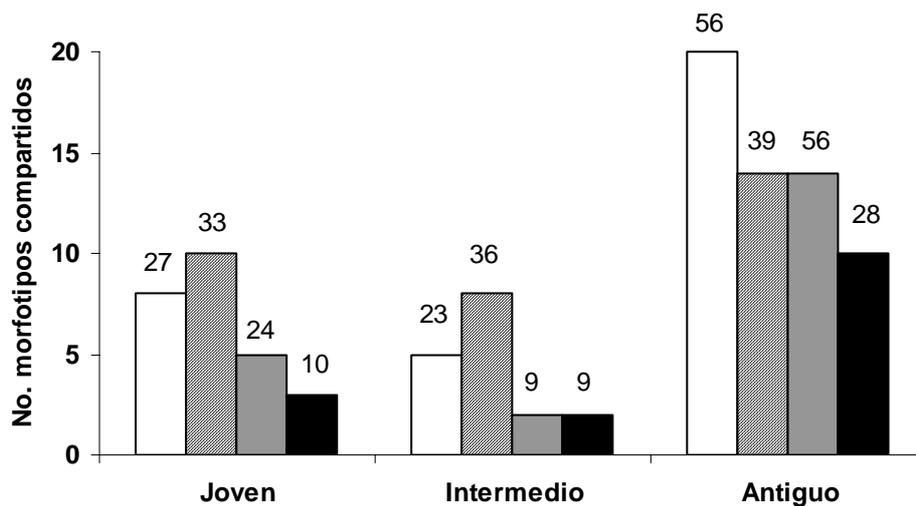


Figura 10. Número de morfotipos compartidos entre los distintos experimentos para los tres sitios de estudio. Las barras blancas representan los morfotipos compartidos entre los árboles adultos y las plántulas sembradas *in situ*; las barras con patrón diagonal entre los árboles adultos y las plántulas en bioensayos; las barras grises entre las plántulas sembradas *in situ* y los bioensayos; las barras negras entre los tres experimentos. Los números representan el porcentaje del número total de morfotipos del experimento con mayor riqueza (árboles adultos para las barras blancas, achuradas y negras, y bioensayos para la comparación plántulas sembradas *in situ* / bioensayos).

Cuadro 7. Presencia / ausencia de los morfotipos encontrados por experimento y por sitio de estudio.

Morfotipo ECM	Árboles adultos			Plántulas <i>in situ</i>			Bioensayos		
	Joven	Intermedio	Antiguo	Joven	Intermedio	Antiguo	Joven	Intermedio	Antiguo
1 (<i>Cenococcum geophilum</i>)	x	x	x	x		x	x	x	x
2	x			x					
3	x	x	x						
4	x	x	x			x			
5 (Thelephoraceae 1)		x	x	x		x			x
6		x	x		x	x			
7 (<i>Clavulina</i> sp. 1)	x	x	x			x		x	x
8			x						
9 (Atheliaceae 1)	x		x	x		x			
10	x		x			x	x	x	x
11	x		x			x	x	x	x
12	x		x						
13 (<i>Oidiodendron</i> sp.)	x		x	x					
14		x	x				x		x
15 (Sebacinales)	x	x	x		x	x	x	x	x
16 (Thelephoraceae 2)		x	x		x			x	x
17	x	x	x	x			x		x
18			x			x			
19	x		x				x		
20 (<i>Rhizopogon</i> sp.)			x	x		x			
21		x	x						
22	x		x						
23	x	x	x						
24 (<i>Inocybe</i> sp. 1)	x	x	x	x	x	x			
25	x	x	x			x		x	x
26	x		x						
27	x		x					x	x
28 (<i>Cortinarius</i> sp.)			x	x		x			
29	x		x						
30	x	x	x					x	
31	x	x		x		x	x		
32	x		x						
33 (<i>Russula</i> sp. 1)		x	x			x			
34 (Cantharellales)	x	x		x	x				
35 (<i>Tomentella</i> sp. 1)	x		x			x	x		x
36 (Sebacinaceae 1)	x		x			x	x		x
37 (Atheliaceae 2)	x	x	x			x	x	x	x
38 (<i>Russula</i> sp. 2)	x	x	x			x			
39 (Sebacinaceae 2)	x	x	x			x			
40	x							x	
41 (<i>Inocybe</i> sp. 2)				x	x	x	x		x
42 (Thelephoraceae 3)					x	x			x
43 (Agaricomycete)				x		x	x	x	x
44 (Basidiomycete)				x		x		x	
45 (<i>Clavulina</i> sp. 2)				x		x			
46 (Atheliaceae 3)						x		x	x
47							x	x	x

Morfotipo ECM	Árboles adultos			Plántulas <i>in situ</i>			Bioensayos		
	Joven	Intermedio	Antiguo	Joven	Intermedio	Antiguo	Joven	Intermedio	Antiguo
48							x	x	x
49							x	x	x
50							x	x	x
51							x	x	x
52							x	x	x
53							x	x	x
54							x		
55								x	

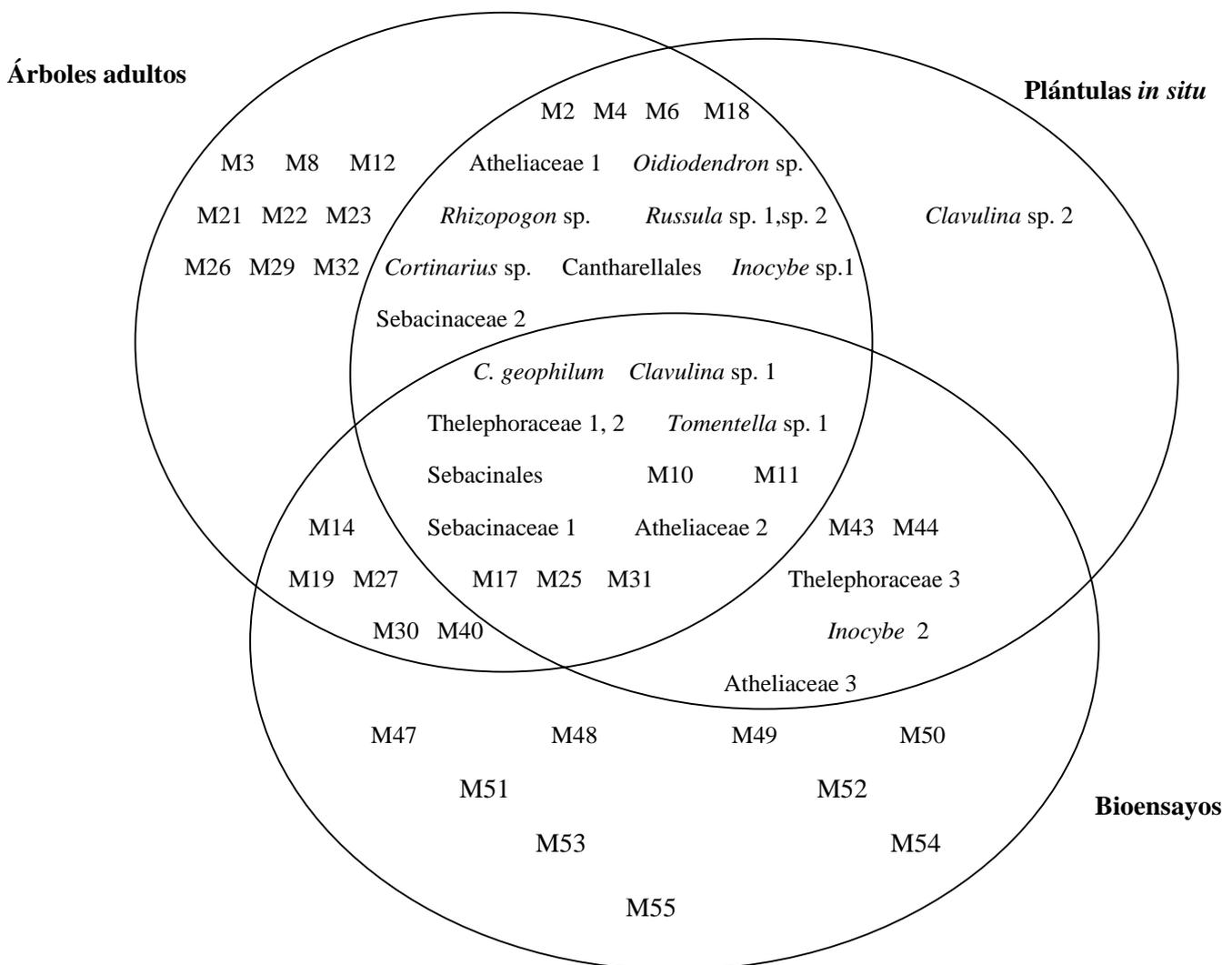


Figura 11. Repartición de los diferentes morfotipos encontrados en función de los tres experimentos: recolección de ápices ECM a partir de raíces de árboles adultos de *P. montezumae*, caracterización de los ápices ECM de las raíces de plántulas de *P. montezumae* sembradas *in situ* y caracterización de los ápices ECM de las raíces de plántulas de *P. montezumae* sembradas en bioensayos en condiciones de invernadero.

Se calculó el índice de Sørensen para evaluar la similitud entre las comunidades ECM hipogreas de los tres experimentos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valores de los índices de Sørensen para evaluar la similitud de las comunidades ECM asociadas a las raíces de *P. montezumae* en los tres experimentos (árboles adultos, plántulas sembradas in situ, plántulas sembradas en bioensayos), en los tres sitios de estudio.

	Chichinautzin	Guespalapa	Pelado
Adultos / plántulas <i>in situ</i>	0.36	0.35	0.63
Adultos / bioensayos	0.39	0.36	0.46
Plántulas <i>in situ</i> / bioensayos	0.28	0.14	0.53

Las tendencias indicadas en la Figura 10 se confirmaron con los índices de Sørensen. Los índices de similitud entre las comunidades ECM asociadas a los árboles adultos y aquellas asociadas a las plántulas, tanto sembradas *in situ* como en bioensayos, fueron los más altos para los sitios jóvenes de la cronosecuencia. En el caso del sitio antiguo, la similitud más baja se encontró entre las comunidades ECM asociadas a los árboles adultos y aquellas asociadas a los bioensayos. Las similitudes entre las comunidades de hongos ECM asociadas a individuos adultos y a plántulas de *P. montezumae* fueron más altas en el Pelado.

4. Discusión

4.1. Plántulas sembradas in situ

A pesar de haber sembrado un gran número de semillas en cada cuadrante y aunque este número fue el mismo para cada sitio, las condiciones exteriores ocasionaron una supervivencia irregular y por lo tanto impidieron la comparación de los tres sitios de estudio. En el caso del Chichinautzin, la baja supervivencia de las plántulas (5%) se debió probablemente a la alta tasa de evaporación en este sitio que limitó la humedad relativa necesaria para el buen desarrollo de las plántulas. Los porcentajes de micorrización de las plántulas que crecieron en los sitios más jóvenes de la cronosecuencia fueron menores al porcentaje de micorrización para el sitio antiguo, lo que combinado a la calidad de sitio más favorable en este lugar, pudo explicar la mayor supervivencia de las plántulas en el Pelado (Nara 2006). Debido a las discrepancias entre las tasas de supervivencia a lo largo de la cronosecuencia, no fue posible comparar los patrones de abundancia y riqueza de morfotipos

ECM entre sitios. Sin embargo, se analizó la riqueza en morfotipos ECM por plántula y no se encontraron diferencias significativas. La mortalidad de la totalidad de las plántulas para dos cuadrantes del sitio de edad intermedia se debió a la invasión del sitio por tusas y a pesar de haber tomado algunas medidas como el riego bimensual de las plántulas, es preciso reconocer las dificultades que existen en el control de los experimentos *in situ*.

Se encontraron solamente 7 morfotipos asociados a las raíces de las plántulas sembradas *in situ* en el sitio de edad intermedia. Esta baja riqueza fue descrita previamente para *Pinus* (Visser 1995; Jonsson et al. 1999), ya que la típica estructura de la comunidad ECM asociada a plántulas es la dominancia de unas pocas especies y un conjunto de otras especies con frecuencia baja. Los tres morfotipos más abundantes, identificados como *Inocybe* sp. 2, Agaromycete y Thelephoraceae 3, representaron respectivamente 14.6%, 12.2% y 11.7% de la abundancia total, siendo ligeramente mayor la dominancia en el caso de las plántulas que para los árboles adultos. Sin embargo, las condiciones exteriores y la alta mortalidad de las plántulas probablemente llevaron a la subestimación de la riqueza existente, ya que en el caso de las plántulas sembradas en bioensayos se encontraron 22 morfotipos en el Guespalapa.

La mayoría de los morfotipos encontrados (53%) fueron exclusivos de un sitio y esta exclusividad fue más importante en el sitio antiguo. Estos morfotipos exclusivos pueden estar adaptados a condiciones edáficas específicas y contribuir a una mejor utilización de los recursos (Kranabetter et al. 2009). Un solo morfotipo (el no. 45, correspondiendo a *Clavulina* sp. 2) se encontró exclusivamente asociado a las raíces de las plántulas sembradas *in situ*. Sin embargo, el bajo número de morfotipos encontrados por plántula (2 en promedio) pudo también haber llevado a la subestimación de los morfotipos comunes a los tres sitios, ya que solamente se encontraron dos morfotipos (no. 24 y no. 41, los dos perteneciendo al género *Inocybe*) compartidos por los tres sitios de la cronosecuencia. *Inocybe* se distribuye ampliamente desde el Ártico hacia los trópicos y puede ser dominante en ambientes extremos (Cullings y Makhija 2001). Identificar precisamente las especies de *Inocybe* funcionando como generalistas en este estudio (presentes en los tres sitios de la cronosecuencia) y comprobar la factibilidad de su aislamiento a partir de esporocarpos y su cultivo *in vitro* podría permitir su utilización como inóculo en los programas de reforestación, como lo sugiere Nara (2006).

A pesar de las limitaciones inherentes al estudio *in situ* de plántulas y de sus hongos asociados, los datos generados son valiosos dado que muy poca información existe acerca de las taxa ECM presentes en bosques del Neotrópico. El método más comúnmente empleado para el estudio de los hongos ECM presentes en el suelo son los bioensayos ya que estos

experimentos se montan en el invernadero en condiciones controladas (Taylor y Bruns 1999; Quoreshi et al. 2000; Kjølner y Bruns 2003; Göransson et al. 2006). Sin embargo, los bioensayos consisten en analizar los hongos presentes en forma de propágulos y pueden no detectar las redes miceliales ya existentes como fuente de inóculo (Izzo et al. 2006). Por lo tanto, es preciso estudiar en condiciones naturales los mecanismos de micorrización de las plántulas a partir del micelio asociado a árboles ya establecidos, y se requieren nuevas estrategias metodológicas para poder garantizar la supervivencia de las plántulas en situaciones de estrés.

Un 34% de las muestras no se pudo identificar molecularmente, saliendo dobles los productos de PCR. Este fenómeno había sido descrito previamente por Morris et al. (2008), quienes describieron la ocurrencia frecuente de varias especies fúngicas en ápices individuales de encino. Koide et al. (2005) también describieron la ocurrencia de especies múltiples en 10% de los ápices ECM de *Pinus resinosa*. La presencia de varias especies en un ápice individual cuestiona la precisión de la determinación morfológica que tradicionalmente ha sido utilizada, sobre todo en el siglo anterior cuando se describieron géneros asociados a los morfotipos (Agerer 1987-2002). Sin embargo, aunque no todos los morfotipos segregados pudieron ser identificados molecularmente, los morfotipos morfológicamente parecidos pertenecieron generalmente al mismo taxón fúngico de acuerdo con las secuencias de ADN. Como se describió, dos excepciones fueron los morfotipos no. 43 (*Thelephora* y *Sebacina*) y 44 (*Pseudotomentella* y *Atheliaceae*).

4.2. Bioensayos

Las altas tasas de germinación y supervivencia en las plántulas crecidas en bioensayos comparado con las plántulas sembradas *in situ* se pudieron explicar por las condiciones controladas que provee el invernadero. Sin embargo, el porcentaje de micorrización de estas plántulas fue menor que el de las plántulas sembradas *in situ*, probablemente debido a las condiciones más favorables para el crecimiento de los árboles, haciendo menos necesaria la simbiosis con hongos ECM (Gehring y Whitham 1994).

Solamente 28% de los morfotipos fueron exclusivos de un sitio, lo que constituye casi la mitad de la proporción encontrada para las plántulas *in situ*. Los patrones de dominancia fueron mayores que en el caso de las plántulas *in situ*. Los morfotipos más frecuentes en los experimentos de bioensayos fueron generalmente descritos como poco eficientes en ambientes con alta competitividad pero muy persistentes en ámbitos perturbados (Horton et

al. 1998; Taylor y Bruns 1999; Izzo et al. 2006), lo que explica que la comunidad de propágulos resistentes en este estudio mostrara más dominancia. El morfotipo más común en este estudio fue el no. 47 que representó 25% de la abundancia encontrada. Las comunidades de propágulos resistentes fueron generalmente más homogéneas espacialmente que las comunidades asociadas a los ápices radicales, muy diversas y cuya distribución fue heterogénea (Izzo et al. 2006). Esto podría explicar la relativamente baja proporción de los morfotipos exclusivos de un sitio. Nueve morfotipos se encontraron asociados exclusivamente a las raíces de las plántulas sembradas en bioensayos (morfotipos no. 47 a 55). Se reconoce que las especies de hongos ECM difieren en su capacidad a establecerse a partir de esporas (Jonsson et al. 1999) y el establecimiento de los bioensayos permitió revelar morfotipos que no se habían observado en las plántulas sembradas *in situ*, que más probablemente se micorrizaron a partir del micelio extraradical de la red existente en el suelo (Nara 2006).

4.3. Comparación de los tres experimentos

La proporción de morfotipos comunes fue más alta en el caso de los árboles adultos y de los bioensayos para los dos sitios más jóvenes de la cronosecuencia, y para los árboles adultos y las plántulas sembradas *in situ* en el sitio más antiguo. Este resultado es sorprendente dado que se esperaba que los dos experimentos involucrando plántulas tuvieran más morfotipos compartidos debido a la propensión de las plántulas de *Pinus* a asociarse a una comunidad de hongos ECM en esta fase de su desarrollo. Yang et al. (1998) describieron que la composición de especies de hongos ECM varió en general más entre sitios que entre árboles de diferente edad. Estas discrepancias entre sitios se debieron a los cambios en la disponibilidad de nutrimentos que influyeron sobre el establecimiento de las plántulas y la diversidad ectomicorrízica. En este caso, la micorrización de las plántulas pareció provenir de las redes miceliales establecidas en el sitio antiguo, mientras que las condiciones más estresantes existiendo en los sitios jóvenes de la cronosecuencia podría favorecer la micorrización de las plántulas a partir de las estructuras de resistencia en el suelo.

Las especies de hongos ECM típicamente asociadas a raíces de plántulas son comúnmente denominadas “de etapa temprana”, mientras que los hongos ECM más frecuentemente asociados a individuos maduros se denominan “de etapa tardía” (Taylor y Bruns 1999). Aunque esta terminología fue cuestionada debido a patrones de colonización más bien continuos (Visser 1995), se sigue empleando refiriéndose a los hongos de etapa temprana como aquellos que tienen poca habilidad para la competencia pero adaptados a condiciones

extremas o perturbadas, y a los de etapa tardía como aquellos que ocurren cuando la comunidad es más diversa y estable (Last et al. 1987; Baar et al. 1999). Varios trabajos enfatizaron la falta de similitud entre las comunidades de hongos ECM que colonizan árboles maduros y aquellas que colonizan las plántulas de la misma especie (Visser 1995; Taylor y Bruns 1999; Izzo et al. 2006). Sin embargo, otros estudios resaltaron la continuidad en la colonización, lo que significa que las mismas especies se encontraban asociadas al hospedero, independiente de su edad (Jonsson et al. 1999; Kennedy et al. 2003; Teste et al. 2009). En este trabajo, los índices de Sørensen calculados indicaron una similitud relativamente alta entre las comunidades de hongos ECM asociadas a árboles adultos y a plántulas, al menos en el sitio antiguo. Parte de esta continuidad en árboles maduros se ha explicado debido a que los hongos ECM que se asociaron a las raíces de los árboles provinieron generalmente de la red micelial presente en el suelo forestal: el micelio de las micorrizas ya existentes tuvo más probabilidad de colonizar nuevos ápices gracias a los carbohidratos que recibe de parte de sus hospederos (Simard et al. 1997). La importancia de las redes miceliales para la ecología de los hongos ECM y de sus hospederos se ha resaltado en varios estudios recientes (Kennedy et al. 2003; Taylor 2006). Sin embargo, existen evidencias de que las esporas transportadas por el viento o presentes como inóculo en el suelo pueden jugar un papel importante en la colonización de las plántulas (Teste et al. 2009), aún cuando éstas están establecidas cerca de un individuo adulto. En este estudio, solamente 33% de los morfotipos asociados a las plántulas *in situ* se encontraron en los bioensayos del sitio joven, 29% en el sitio de edad intermedia y 52% en el sitio antiguo, aún cuando el suelo procedía de las mismos puntos. Estas proporciones fueron más altas en el caso de los morfotipos comunes a las plántulas y a los árboles adultos, lo que sugirió que las redes miceliales tuvieron un papel importante en la micorrización de las plántulas sembradas alrededor de los individuos maduros.

Comparando los morfotipos asociados a las raíces de los árboles adultos y los morfotipos asociados a las plántulas sembradas *in situ*, se encontraron ocho morfotipos en común para el sitio joven (53.3% de los morfotipos de las plántulas), 5 para el sitio de edad intermedia (71.4%) y 20 para el sitio antiguo (74%). El morfotipo no. 2, que no se logró identificar molecularmente, fue exclusivo del Chichinautzin tanto para los árboles adultos como para las plántulas sembradas *in situ*, y el morfotipo no. 18 fue exclusivo del Pelado para los dos experimentos. En el caso del Guespalapa, la exclusividad no se conservó. En los tres sitios, la mayoría de los morfotipos asociados a las plántulas se encontraron también asociados a los individuos adultos, lo que confirma lo que se había descrito previamente sobre la continuidad entre adultos y plántulas (Jonsson et al. 1999; Teste et al. 2009).

Las comunidades de los tres experimentos fueron dominadas por distintas especies, con tasas de dominancia diferentes. *Cenococcum geophilum* (morfortipo no. 1) fue una de las especies dominantes en el Chichinautzin tanto asociada a los árboles adultos como a las plántulas *in situ* y en bioensayos. *C. geophilum* es conocido por ser resistente a condiciones de sequía gracias a sus paredes celulares gruesas y melanizadas (di Pietro et al. 2007; Rineau y Garbaye 2009) y es generalmente abundante en bosques sometidos a condiciones de estrés, lo que es consistente con la baja capacidad de retención de agua indicada en el sitio joven.

Una limitación a la interpretación de resultados fue la diferencia en el método de muestreo, dado que el muestreo de las raíces de los árboles adultos fue más limitado (solamente cuatro cilindros por árbol) que el muestreo exhaustivo de las plántulas. Sin embargo, la producción de raíces por las plántulas es menor a la de los árboles adultos, por lo que puede haber causado un sesgo en la comparación de la riqueza por planta. Adicionalmente, inferimos que las raíces muestreadas a través de los cilindros pertenecían a los árboles de estudio (ver sección Métodos del capítulo III) pero existe una posibilidad de que pertenecieran a otros individuos de *Pinus* relativamente cercanos. Otra limitación fue el hecho de no haber utilizado técnicas moleculares para la identificación de todos los morfortipos encontrados en este estudio. Es muy probable que el número de taxa ECM aumente con la resolución más alta que proveen las herramientas moleculares. Sin embargo, este estudio establece una aproximación original de la caracterización de las especies de hongos ECM asociados a plántulas de *P. montezumae in situ* y constituye uno de los primeros trabajos de identificación molecular de los hongos simbiotes de *Pinus* en México. Dado que México es centro de diversidad para este género y considerando las altas tasas de deforestación en el país, es necesario conocer la diversidad de las comunidades de hongos ECM asociadas a estos árboles para poder establecer estrategias de manejo y restauración exitosas.

Literatura citada

- Agerer, R. 1987-2002. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, Alemania.
- Amaranthus, M.P., Perry, D.A. 1994. The functioning of ectomycorrhizal fungi in the field: linkages in space and time. *Plant Soil*, **159**: 133-140.

- Baar, J., Horton, T.R., Kretzer, A.M., Bruns, T.D. 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytol.* **143**: 409-418.
- Berntson, G.M., Wayne, P.M. 2000. Characterizing the size dependence of resource acquisition within crowded plant populations. *Ecology*, **81**:1072-1085.
- Cullings, K., Makhija, S. 2001. Ectomycorrhizal fungal associates of *Pinus contorta* in soils associated with a hot spring in Norris Geyser basin, Yellowstone National Park, Wyoming. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5538-5543.
- Dickie, I.A., Oleksyn, J., Reich, P.B., Karolewski, P., Zytkowski, R., Jagodzinski, A.M., Turzanska, E. 2006. Soil modification by different tree species influences the extent of seedling mycorrhizal infection. *Mycorrhiza*, **16**: 73-79.
- di Pietro, M., Churin, J.L., Garbaye, J. 2007. Differential ability of ectomycorrhizas to survive drying. *Mycorrhiza*, **17**: 547-550.
- Gehring, C.A., Whitham, T.G. 1994. Comparisons of ectomycorrhizae on pinyon pines, *Pinus edulis* (Pinaceae), across extremes of soil type and herbivory. *Am. J. Bot.* **81**:1509-1516.
- Germino, M.J., Hasselquist, N.J., McGonigle, T., Smith, W.K., Sheridan, P.P. 2006. Landscape- and age-based factors affecting fungal colonization of conifer seedling roots at the alpine tree line. *Can. J. For. Res.* **36**: 901-909.
- Göransson, H., Wallander, H., Ingerslev, M., Rosengren, U. 2006. Estimating the relative nutrient uptake from different soil depths in *Quercus robur*, *Fagus sylvatica* and *Picea abies*. *Plant Soil*, **286**: 87-97.
- Horton, T.R., Cazares, E., Bruns, T.D. 1998. Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months of growth after wildfire. *Mycorrhiza*, **8**: 11-18.
- Horton, T.R., Bruns, T.D., Parker, V.T. 1999. Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. *Can. J. Bot.* **77**(1): 93-102.
- Hynes, M.M., Smith, M.E., Zasoski, R.J., Bledsoe, C.S. 2010. A molecular survey of ectomycorrhizal hyphae in a California *Quercus - Pinus* woodland. *Mycorrhiza*, **20**: 265-274.
- Izzo, A., Nguyen, D.T., Bruns, T.D. 2006. Spatial structure and richness of ectomycorrhizal fungi colonizing bioassay seedlings from resistant propagules in a Sierra Nevada forest: comparisons using two hosts that exhibit different seedling establishment patterns. *Mycologia*, **98**(3): 374-383.

- Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Karén, O., Zackrisson, O. 1999. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytol.* **142**: 151-162.
- Kennedy, P.G., Izzo A.D., Bruns T.D. 2003. There is high potential for the formation of common mycorrhizal networks between understorey and canopy trees in a mixed evergreen forest. *J. of Ecol.* **91**: 1071-1080.
- Kjoller, R., Bruns, T.D. 2003. *Rhizopogon* spore bank communities within and among California pine forests. *Mycologia*, **15**(4): 603-613.
- Koide, R.T., Xu, B., Sharda, J., Lekberg, Y., Ostiguy, N. 2005. Evidence of species interactions within an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytol.* **165**: 305-316.
- Kranabetter, J.M., Durall, D.M., MacKenzie, W.H. 2009. Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. *Mycorrhiza*, **19**: 99-111.
- Last, F.T., Dighton, J., Mason, P.A. 1987. Successions of sheathing mycorrhizal fungi. *Trends Ecol. Evol.* **2**: 157-161.
- Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A.F.S., Stenlid, J., Finlay, R. 2007. Afforestation of abandoned farmland with conifer seedlings inoculated with three ectomycorrhizal fungi - impact on plant performance and ectomycorrhizal community. *Mycorrhiza*, **17**: 337-348.
- Morris, M.H., Pérez-Pérez, M.A., Smith, M.E., Bledsoe, C.S. 2008. Multiple species of ectomycorrhizal fungi are frequently detected on individual oak root tips in a tropical cloud forest. *Mycorrhiza*, **18**: 375-383.
- Nara, K. 2006. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytol.* **169**: 169-178.
- Nilsson, R.H., Bok, G., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hallenberg, N. 2009. A software pipeline for processing and identification of fungal ITS sequences. *Source Code Biol. Medic.* **4**:1.
- Quoreshi, A.M., Timmer, V.R. 2000. Early outplanting performance of nutrient-loaded containerized black spruce seedlings inoculated with *Laccaria bicolor*: a bioassay study. *Can. J. For. Res.* **30**: 744-752.
- Rineau, F., Garbaye, J. 2009. Effects of liming on ectomycorrhizal community structure in relation to soil horizons and tree hosts. *Fungal Ecol.* **2**: 103-109.
- Simard, S.W., Perry, A.P., Smith, J.E., Molina, R. 1997. Effects of soil trenching on occurrence of ectomycorrhizas on *Pseudotsuga menziesii* seedlings grown in mature forests of *Betula papyrifera* and *Pseudotsuga menziesii*. *New Phytol.* **136**: 327-340.

- Smith, S.E., Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, third ed. Academic Press, Londres.
- Taylor, A.F.S. 2006. Common mycelial networks: life-lines and radical addictions. *New Phytol.* **169**: 6-8.
- Taylor, D.L., Bruns, T.D. 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.
- Teste, F.P., Schmidt, M.G., Berch, S.M., Bulmer, C., Egger, K.N. 2004. Effects of ectomycorrhizal inoculants on survival and growth of interior Douglas-fir seedlings on reforestation sites and partially rehabilitated landings. *Can. J. Bot.* **34**: 2074-2088.
- Teste, F.P., Simard, S.W., Durall, D.M. 2009. Role of mycorrhizal networks and tree proximity in ectomycorrhizal colonization of planted seedlings. *Fungal Ecol.* **2**: 21-30.
- Visser, S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* **129**: 389-401.
- Yang, G., Cha, J.Y., Shibuya, M., Yajima, T., Takahashi, K. 1998. The occurrence and diversity of ectomycorrhizas of *Larix kaempferi* seedlings on a volcanic mountain in Japan. *Mycol. Res.* **102**(12): 1503-1508.

Discusión general

Cambios en las comunidades ECM a lo largo de la cronosecuencia edáfica

El objetivo principal de esta investigación fue analizar los cambios en las comunidades de hongos ECM asociadas a *Pinus montezumae* Lamb. var. *montezumae* a lo largo de una cronosecuencia de suelos volcánicos. Esta cronosecuencia constituyó el marco ideal para analizar los factores edáficos relacionados con la evolución del suelo que podrían determinar la estructura de estas comunidades. Según el grado de desarrollo de los suelos, se dieron distintas calidades de sitio y a pesar de los contrastes existentes entre ellas a lo largo de la cronosecuencia, se determinó que la comunidad de los árboles en los tres sitios fuera relativamente similar, formando en los tres casos un bosque maduro dominado por *P. montezumae* con tasas de regeneración de aproximadamente 150 años.

Las comunidades de hongos ECM resultaron ser diferentes a lo largo de la cronosecuencia estudiada. Contrariamente a lo esperado, el sitio con menor calidad de suelo (poca profundidad, poca capacidad de retención de agua) fue el que presentó mayor abundancia y riqueza de especies, tanto para esporocarpos como para ápices ECM. Aún cuando las diferencias inter-sitios en los estimadores de estructura de comunidad utilizados en este trabajo (abundancia, riqueza, diversidad) no siempre fueron significativas, la composición de especies mostró ser muy distinta a través de la cronosecuencia. El sitio joven y el sitio de edad intermedia fueron dominados por especies perteneciendo a los géneros *Inocybe* y *Laccaria* en su fase esporocárpica, mientras que el sitio antiguo se caracterizó por la abundancia de *Amanita flavoconia*, *Cantharellus cibarius* y *Tricholoma imbricatum*. A nivel de raíces de los árboles adultos, la composición de morfotipos también fue diferente en cada sitio, aunque la falta de identificación molecular no permitió determinar con precisión las especies de hongos ECM involucradas en la simbiosis.

Respecto a las plántulas, sembradas *in situ* o en invernadero, el sitio joven fue dominado por *Cenococcum geophilum*, *Clavulina* sp. 2 y la familia Atheliaceae, mientras que el Guespalapa y el Pelado se caracterizaron por la presencia de la familia Thelephoraceae. Esta familia se encuentra de forma muy abundante en los sistemas templados y boreales (Peter et al. 2001; Buée et al. 2007). La composición de especies estuvo influenciada por las variables edáficas y cada especie respondió de manera distinta a éstas. Respuestas específicas habían sido descritas previamente en varios estudios: respuestas a un incremento en las concentraciones de N (Lilleskov et al. 2002; Taniguchi et al. 2007), a la composición y a la calidad de la hojarasca (Conn y Dighton 2000) y a la profundidad del suelo (Rosling et al. 2003). Especies diferentes desempeñan papeles diferentes y tienen preferencias distintas para las condiciones ambientales (Courty et al. 2006). Esta diversidad funcional optimiza la nutrición de los hospederos y favorece la resiliencia de los bosques (Buée et al. 2005).

El porcentaje de especies exclusivas de un sitio fue mayor en el Chichinautzin, el sitio más joven de la cronosecuencia, tanto para esporocarpos como para ápices ECM. Es posible que efectos aleatorios influyeran también en el muestreo y que por lo tanto algunas de estas especies no fueron encontradas en otros sitios. Sin embargo, algunas de ellas, como *Amanita muscaria*, *Cantharellus cibarius* o *Tricholoma imbricatum*, fueron encontradas abundante y exclusivamente en estos sitios por lo que se infirió que fueron especies adecuadas a las condiciones edáficas particulares del sitio. El sitio joven fue el de mayor heterogeneidad espacial, debido a la gran cantidad de rocas volcánicas desprovistas de formación de suelo. En este ambiente heterogéneo, descrito como típico de los suelos volcánicos jóvenes (Aplet et al. 1997), la mayor diversidad probablemente fue promovida por el número de micronichos donde más especies serían capaces de encontrar recursos y condiciones abióticas adecuadas (Sulkava y Huhta 1998; Taylor y Bruns 1999). Condiciones ambientales adversas tienden a favorecer las especies más aptas y resistentes a estos ambientes, aumentando la dominancia de especies ECM exclusivas del sitio y generando una mayor disimilaridad entre los sitios de estudio (Parrent et al. 2006). Dada la diversidad en las habilidades de diferentes taxones ECM para adquirir nutrientes, mantener asociaciones con muchas especies ECM diferentes en ambientes con pocos nutrientes permite a las plantas acceder a cantidades más grandes de recursos. Es

entonces altamente probable que el bosque maduro que se desarrolla en el Chichinautzin esté propiciado por las ectomicorrizas.

Comparación de los patrones de diversidad de los esporocarpos de especies ECM y de las comunidades de hongos ECM asociadas a las raíces de *P. montezumae*

Como Gardes y Bruns (1996) lo habían descrito previamente, se encontró una baja correspondencia entre las comunidades ECM representadas por esporocarpos y las comunidades asociadas a las raíces del hospedero. Aún cuando no fue posible identificar a nivel taxonómico ni molecular todos los morfotipos encontrados, se observó que las familias más abundantemente representadas fueron Thelephoraceae, Atheliaceae, Sebacinaceae y el género *Inocybe* (Cortinariaceae), con base en la composición de la comunidad ECM asociada a las plántulas sembradas *in situ*. De éstas, solamente el género *Inocybe* fue recolectado en campo en su fase esporocárpica y fue el género más abundante a nivel de fructificaciones en los tres sitios de estudio. Este género se reconoce como de amplia distribución (Nara 2006; Ryberg et al. 2008) y es especialmente relevante en sitios perturbados o de baja calidad (Cullings y Makhija 2001). *Laccaria* fue el otro género muy abundante en forma de fructificación y no se identificó a nivel de raíces. Esta discrepancia entre esporocarpos y ápices ECM se puede explicar por el hecho de que muchas especies fúngicas asociadas a las raíces del hospedero, y formando micorrizas, no fructifican o llegan a formar esporocarpos poco conspicuos, como es el caso de los géneros *Tomentella* o *Sebacina*.

Comparar la estructura de las dos vistas de la comunidad resulta todavía más difícil por las diferencias en el esfuerzo de muestreo. En este trabajo, los esporocarpos se recolectaron semanalmente durante tres años mientras que los ápices ECM se muestrearon solamente una vez al año en el mismo tiempo. Esto es un hecho común a la mayoría de los estudios sobre comunidades ECM debido al trabajo que implica el procesamiento de muestras hipogeas (Visser 1995; Gardes y Bruns 1996; Jonsson et al. 1999; Saari et al. 2005; Urban et al. 2008). La intensidad del muestreo fue también distinta, dado que los esporocarpos se recolectaron en cuadrantes de 100 m² mientras que los ápices se recolectaron a partir de cilindros de 98.175 cm³. El volumen de suelo puede haber sido demasiado pequeño como

para evaluar precisamente la variabilidad espacial de las comunidades ECM asociadas a las raíces del hospedero y para considerar morfotipos raros. Esta disparidad en el esfuerzo de muestreo contribuyó a tener mejor representada la diversidad de especies de esporocarpos comparado con la diversidad hipogea. La riqueza más alta obtenida para los esporocarpos también puede ser causada por el nivel de identificación: los esporocarpos pueden ser identificados precisamente con un conocimiento taxonómico adecuado, mientras que la simple caracterización morfológica utilizada para diferenciar las especies asociadas a las raíces de los árboles adultos puede haber generado una subestimación de la riqueza de la comunidad.

Considerando las anteriores precauciones, con los datos obtenidos se encontró que la producción de esporocarpos pareció estar más influenciada por las condiciones edáficas que los ápices ECM, como fue confirmado por los índices de similitud de Sørensen. Ambas apreciaciones de la comunidad ECM estuvieron compuestas por especies diferentes de acuerdo al sitio, lo que confirma la importancia de los parámetros edáficos para la estructura de la comunidad (Toljander et al. 2006; Kranabetter et al. 2009), dado que la especie y la edad del hospedero se mantuvieron constantes. Las proporciones de especies exclusivas de un sitio fueron altas, tanto a nivel de esporocarpos que de ápices. Aún cuando se puede atribuir esta exclusividad a efectos del muestreo, es probable que la distribución de especies de hongos ECM responda a las propiedades edáficas diferentes en los tres sitios de la cronosecuencia. Algunas especies exclusivamente encontradas en los sitios jóvenes de la cronosecuencia en forma de esporocarpo fueron *Amanita muscaria* para el Chichinautzin y *Astraeus hygrometricus* para el Guespalapa. Sawyer et al. (2003) describieron que *A. muscaria* contribuía significativamente a la utilización y al reciclaje de P en el suelo. Las mayores cantidades de fósforo disponible en los suelos volcánicos jóvenes (cf. Cuadro 1, capítulo I) podrían determinar la distribución de esta especie en el Chichinautzin. Por otra parte, *A. hygrometricus* está generalmente asociado a suelos más secos como lo es el Guespalapa (Phosri et al. 2004). Las especies adaptadas a condiciones de sequía también se encontraron a nivel de raíces, como *Cenococcum geophilum* que fue identificado abundantemente en el Chichinautzin. Dado que la distribución de las especies de hongos ECM asociadas a *P. montezumae* está influenciada por la calidad de suelo, es preciso

conocer cuáles son las especies presentes en cada sitio para poder comprender el papel que desempeñan en el crecimiento de su hospedero.

Implicaciones y recomendaciones para el estudio de los hongos ECM en bosques neotropicales y para el manejo forestal

Entender cuáles son los factores involucrados en la determinación de la estructura y diversidad de la comunidad ECM resulta muy útil para el inventario y la conservación de estos hongos, así como para poder diseñar estrategias de manejo forestales más eficientes. Es especialmente relevante en bosques templados del Neotrópico, donde poca información ha sido publicada sobre la diversidad y la estructura de las comunidades de hongos ECM. El uso de análisis multivariados ayudó a entender cuáles pudieron ser los factores edáficos asociados a la distribución de estos hongos. Es claro que en la naturaleza y más en circunstancias de poco disturbio, no es posible de manera simplista encontrar a un solo factor causal de la distribución de especies ECM. Varios factores ambientales influyen de manera diferencial a ciertas especies y modifican en su conjunto las comunidades de hongos ECM, incluyendo la disponibilidad de N y P, la humedad del suelo o su pH (Kranabetter et al. 2009). Otras variables edáficas no consideradas (humedad, pH, mineralización del N) deben ser posteriormente exploradas para tener un mayor número de factores que expliquen en función de qué variables las distintas especies ECM se distribuyen en estos ecosistemas. Cómo los hongos ECM responden a la calidad de sitio en su conjunto ha sido poco estudiado, siendo este trabajo uno de los primeros en analizar estas comunidades en un bosque neotropical. Otras variables influenciadas por el hombre también podrían estar ocasionando cambios en la estructura de la comunidad ECM, como la recolecta de esporocarpos comestibles por la gente de los alrededores o las eventuales perturbaciones debidas a la recolecta de productos maderables y no maderables en la zona y a la introducción de cultivos y de ganado en los bosques cercanos. Esta influencia se registró casualmente cerca de los sitios de estudio, principalmente en el sitio intermedio. Aún así, el listado de especies, la abundancia de las mismas y su distribución sirve como antecedente para realizar estudios de manejo y conservación para este sitio particular, como uno de los más amenazados por el cambio de uso de suelo.

A pesar de que la importancia ecológica de los hongos ECM en ecosistemas tropicales y neotropicales ha sido reconocida en los últimos años (Bruns y Kennedy 2009), no se ha reconocido todavía las variaciones entre las especies presentes en estas regiones y las registradas en sistemas templados. Esto fue otro de los factores limitantes para este estudio y muchas de las imprecisiones logradas aún con el apoyo de las herramientas moleculares se debe en gran medida a esta razón. Se tienen pocas secuencias en las bases de datos generales (GenBank) o especializadas (UNITE) que presenten una elevada afinidad a lo encontrado en sistemas tropicales o neotropicales (Morris et al. 2008). La recolección intensiva de esporocarpos a lo largo de este trabajo, tanto ECM como saprobios, permitió generar más información acerca de los macrohongos de la zona de estudio. Los estudios moleculares llevados a cabo determinaron que taxa como Thelephoraceae, Sebacinaceae o el género *Rhizopogon* estuvieron asociadas en fase temprana a *P. montezumae*. Sin embargo, sus fructificaciones son poco conspicuas y será necesario implementar muestreos más enfocados a la recolección de los esporocarpos de estas familias y completar el conocimiento taxonómico para la identificación precisa de las secuencias de los ápices ECM.

Los tres experimentos implementados para caracterizar la diversidad existente a nivel hipogeo demostraron que existe una continuidad en la colonización de las raíces de *P. montezumae* por los hongos ECM, dado que las plántulas y los árboles adultos comparten una gran parte de sus morfotipos. Esta continuidad resalta la importancia de las redes miceliales para la nutrición de los hospederos, ya que éstas facilitan el intercambio de nutrimentos entre plantas, reduciendo la competencia entre las plántulas y los hospederos ya establecidos (Nara et al. 2006). Adicionalmente, estas redes miceliales funcionan como un reservorio de inóculos para las plántulas (Selosse et al. 2006). Por lo tanto, juegan un papel primordial en el establecimiento de éstas y en la sucesión de los bosques. Se requieren más estudios sobre estas redes miceliales para determinar con precisión su relevancia ecológica y sus efectos sobre el funcionamiento del ecosistema.

Como consideraciones finales, se sugiere probar la eficiencia como inóculos de aquellas especies generalistas encontradas a lo largo de la cronosecuencia y por lo tanto adaptadas a las condiciones edáficas contrastantes de los tres sitios. Utilizar como fuente de inóculo especies nativas de la zona podría ayudar a mejorar sustantivamente las estrategias

de reforestación. Estas especies, como *Inocybe cookei*, *Inocybe fastigiata*, *Laccaria laccata* o *Laccaria bicolor* a nivel epigeo, podrían actuar como amortiguadores contra condiciones extremas o perturbaciones eventuales y asegurar la resiliencia y la productividad en ambientes forestales dinámicos (Kranabetter et al. 2009). Este estudio se llevó a cabo dentro del Corredor Biológico del Chichinautzin, sin embargo estos bosques se encuentran en la cercanía de la Ciudad de México, donde la explotación forestal y el cambio de usos del suelo son intensivos. La reforestación con plántulas inoculadas con especies de hongos nativas, adaptadas a las condiciones edáficas locales, podría incrementar la supervivencia de éstas en aquellos suelos poco desarrollados, particularmente donde las altas tasas de evaporación limitan la regeneración natural del bosque.

Literatura citada

- Aplet, G.H., Hughes, R.F., Vitousek, P.M. 1997. Ecosystem development on Hawaiian lava flows: biomass and species composition. *J. Veg. Sci.* **9**: 17-26.
- Bruns, T.D., Kennedy, P.G. 2009. Individuals, populations, communities and function: the growing field of ectomycorrhizal ecology. *New Phytol.* **182**: 12-14.
- Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J. 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech *Fagus sylvatica* forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza*, **15**: 235–245.
- Buée, M., Courty, P.E., Mignot, D., Garbaye, J. 2007. Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. *Soil Biol. Biochem.* **39**: 1947-1955.
- Conn, C., Dighton, J. 2000. Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 489-496.
- Courty, P.E., Pouysegur, R., Buée, M., Garbaye, J. 2006. Laccase and phosphatase activities of the dominant ectomycorrhizal types in a lowland oak forest. *Soil Biol. Biochem.* **38**: 1219–1222.

- Cullings, K., Makhija, S. 2001. Ectomycorrhizal fungal associates of *Pinus contorta* in soils associated with a hot spring in Norris Geysir basin, Yellowstone National Park, Wyoming. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5538-5543.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Can. J. Bot.* **74**: 1572-1583.
- Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Karén, O., Zackrisson, O. 1999. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytol.* **142**: 151-62.
- Kranabetter, J.L., Durall, D.M., MacKenzie, W.H. 2009. Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. *Mycorrhiza*, **19**: 99-111.
- Lilleskov, E.A., Fahey, T.J., Horton, T.R., Lovett, G.M. 2002. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology*, **83**(1): 104-115.
- Morris, M.H., Pérez-Pérez, M.A., Smith, M.E., Bledsoe, C.S. 2008. Multiple species of ectomycorrhizal fungi are frequently detected on individual oak root tips in a tropical cloud forest. *Mycorrhiza*, **18**: 375-383.
- Nara, K. 2006. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytol.* **169**: 169-178.
- Parrent, J.L., Morris, W.F., Vilgalys, R. 2006. CO₂-enrichment and nutrient availability alter ectomycorrhizal fungal communities. *Ecology*, **87**(9): 2278-2287.
- Peter, M., Ayer, F., Egli, S. 2001. Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition. *New Phytol.* **149**: 311-325.
- Phosri, C., Watling, R., Martín, M.P., Whalley, A.J.S. 2004. The genus *Astraeus* in Thailand. *Mycotaxon*, **89**(2): 453-463.
- Rosling, A., Landeweert, R., Lindahl, B.D., Larsson, K.H., Kuyper, T.W., Taylor, A.F.S., Finlay, R.D. 2003. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytol.* **159**: 775-783.

- Ryberg, M., Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Töpel, M., Jacobsson, S., Larsson, E. 2008. Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: A case study in *Inocybe* (Basidiomycota). *BMC Evol. Biol.* **8**: 50-63.
- Saari, S.K., Campbell, C.D., Russell, J., Alexander, I.J., Anderson, I.C. 2005. Pine microsatellite markers allow roots and ectomycorrhizas to be linked to individual trees. *New Phytol.* **165**: 295-304.
- Sawyer, N.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G. 2003. Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. *Austral. J. Bot.* **51**: 151-158.
- Selosse, M.A., Richard, F., He, X., Simard, S.W. 2006. Mycorrhizal networks: des *liaisons dangereuses*? *Trends Ecol. Evol.* **21**(11): 621-628.
- Sulkava, P., Huhta, V. 1998. Habitat patchiness affects decomposition and faunal diversity: a microcosm experiment on forest floor. *Oecologia*, **116**: 390-396.
- Taniguchi, T., Kanzaki, N., Tamai, S., Yamanaka, N., Futai, K. 2007. Does ectomycorrhizal fungal community structure vary along a Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) to black locust (*Robinia pseudoacacia*) gradient? *New Phytol.* **173**: 322-334.
- Taylor, D.L., Bruns, T.D. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molec. Ecol.* **8**: 1837-1850.
- Toljander, J.F., Eberhardt, U., Toljander, I.K., Paul L.R., Taylor, A.F.S. 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytol.* **170**: 873-884.
- Urban, A., Puschenreiter, M., Strauss, J., Gorfer, M. 2008. Diversity and structure of ectomycorrhizal and co-associated fungal communities in a serpentine soil. *Mycorrhiza*, **18**: 339-354.
- Visser, S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* **129**: 389-401.

Apéndice A. Número de esporocarpos de especies ECM recolectados durante tres temporadas de lluvias consecutivas (2005-2007) en los tres sitios de muestreo.

	Chichinautzin			Guespalapa			Pelado		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007
<i>Amanita flavoconia</i> G.F. Atk	8	15	14	-	-	-	17	13	20
<i>Amanita franchetii</i> (Boud.) Fayod	3	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Amanita fulva</i> (Schaeff.) Fr.	1	2	3	-	-	3	2	13	3
<i>Amanita muscaria</i> (L.) Lam.*	22	11	6	-	-	-	-	-	-
<i>Amanita aff. phalloides</i> (Vaill. ex Fr.) Link*	-	-	-	3	-	1	-	-	-
<i>Amanita rubescens</i> Pers.	5	11	5	1	1	2	6	9	6
<i>Amanita aff. solitaria</i> (Bull.) Fr.	1	-	1	1	-	2	-	-	-
<i>Amanita aff. vittadinii</i> (Moretti) Sacc.	1	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Amanita</i> sp. 1*	-	-	-	5	1	7	-	-	-
<i>Amanita</i> sp. 2	-	4	-	3	-	-	-	-	-
<i>Amanita</i> sp. 3	-	-	2	3	4	2	-	1	-
<i>Amanita</i> sp. 4*	-	-	-	3	-	-	-	-	-
<i>Amanita</i> sp. 5	1	1	-	-	-	2	-	-	1
<i>Amanita</i> sp. 6*	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Astraeus hygrometricus</i> (Pers.) Morgan*	-	-	-	6	3	2	-	-	-
<i>Boletus aff. badius</i> (Fr.) Fr.*	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Boletus aff. bicolor</i> Peck*	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Boletus aff. calopus</i> Pers.*	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Boletus chrysenteron</i> Bull.	2	1	-	10	-	-	-	-	-
<i>Boletus edulis</i> Bull.*	2	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>Boletus aff. pinicola</i> Rea*	-	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>Boletus aff. pinophilus</i> Pilát & Dermek*	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Boletus subtomentosus</i> (L.) Fr.*	-	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Boletus</i> sp.*	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.*	-	-	-	-	-	-	10	14	24
<i>Clavariadelphus americanus</i> (Corner) Methven*	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Clavariadelphus aff. ligula</i> (Schaeff.) Donk	-	1	-	-	-	-	-	1	-
<i>Clavulina cinerea</i> (Bull.) J. Schröt.*	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Clavulina coralloides</i> (L.) J. Schröt.	-	17	3	-	-	1	7	11	-
<i>Clavulina</i> sp. 1*	-	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clavulina</i> sp. 2*	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Cortinarius anthracinus</i> (Fr.) Fr.	8	-	1	-	-	-	-	4	20
<i>Cortinarius aff. cinnabarinus</i> Fr.	-	2	-	-	-	-	-	2	-
<i>Cortinarius aff. cinnamomeoluteus</i> P.D. Orton*	2	-	3	-	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius croceus</i> (Schaeff.) Gray	10	-	25	-	-	3	-	3	2
<i>Cortinarius purpurascens</i> (Fr.) Fr.*	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius saniosus</i> (Fr.) Fr.*	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius semisanguineus</i> (Fr.) Gillet*	-	2	3	-	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius aff. sphagnogenus</i> (M.M. Moser) Nezdójm.*	-	3	12	-	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius violaceus</i> (L.) Gray*	-	-	-	-	-	-	2	-	-
<i>Cortinarius</i> sp. 1	2	3	3	3	-	-	1	-	2

	Chichinautzin			Guespalapa			Pelado		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007
<i>Cortinarius</i> sp. 2*	-	-	-	-	-	-	5	-	1
<i>Cortinarius</i> sp. 3	3	-	51	-	-	-	1	-	8
<i>Cortinarius</i> sp. 4	-	-	6	-	1	1	-	-	3
<i>Cortinarius</i> sp. 5	-	-	5	-	-	-	-	-	2
<i>Cortinarius</i> sp. 6*	-	-	-	-	-	2	-	-	-
<i>Cortinarius</i> sp. 7*	-	-	6	-	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius</i> sp. 8*	-	-	10	-	-	-	-	-	-
<i>Entoloma clypeatum</i> f. <i>clypeatum</i> (L.) P. Kumm.	-	3	1	-	-	-	-	3	2
<i>Entoloma lividoalbum</i> (Kühner & Romagn.) Kubička	-	9	-	-	-	2	5	2	3
<i>Entoloma rhodopolium</i> (Fr.) P. Kumm.	-	8	2	-	-	-	3	3	10
<i>Entoloma</i> sp. 1*	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Entoloma</i> sp. 2	-	-	6	-	-	-	-	4	-
<i>Entoloma</i> sp. 3	-	-	1	-	-	-	-	-	2
<i>Entoloma</i> sp. 4	-	-	-	-	-	4	-	-	1
<i>Entoloma</i> sp. 5*	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Entoloma</i> sp. 6*	-	-	3	-	-	-	-	-	-
<i>Gomphus floccosus</i> (Schwein.) Singer*	12	17	13	-	-	-	-	-	-
<i>Gyrodon lividus</i> (Bull.) Fr.*	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gyromitra infula</i> (Schaeff.) Quél.*	1	2	4	-	-	-	-	-	-
<i>Gyroporus cyanescens</i> (Bull.) Quél.*	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Hebeloma aff. alpinum</i> (J. Favre) Buchet	-	-	1	-	-	-	-	1	4
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (Bull.) Quél.*	-	-	-	-	-	-	1	4	5
<i>Hebeloma aff. fastibile</i> (Pers.) P. Kumm.	2	4	7	-	-	-	-	1	-
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Pers.) Quél.	-	1	1	-	-	-	1	1	3
<i>Helvella acetabulum</i> (L.) Quél.*	-	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>Helvella crispa</i> (Scop.) Fr.	1	1	-	-	-	-	20	6	1
<i>Helvella lacunosa</i> Afzel.	-	-	1	2	5	-	6	7	-
<i>Helvella macropus</i> (Pers.) P. Karst.	10	13	35	12	21	5	-	1	1
<i>Hygrophorus agathosmus</i> (Fr.) Fr.*	-	-	-	-	-	-	2	-	-
<i>Hygrophorus hypothejus</i> (Fr.) Fr.*	-	-	-	5	-	-	-	-	-
<i>Hygrophorus</i> sp.	-	-	2	-	-	-	3	-	-
<i>Inocybe agardhii</i> (N. Lund) P.D. Orton*	-	14	-	-	-	-	-	-	-
<i>Inocybe calamistrata</i> (Fr.) Gillet	21	-	-	-	-	-	4	-	-
<i>Inocybe cookei</i> Bres.	22	38	94	1	20	14	1	10	9
<i>Inocybe fastigiata</i> (Schaeff.) Quél.	2	1	4	3	-	22	11	15	17
<i>Inocybe aff. geophylla</i> (Pers.) P. Kumm.	1	5	4	-	8	12	10	6	4
<i>Inocybe aff. nitidiuscula</i> (Britzelm.) Lapl.*	-	-	-	-	-	2	-	-	-
<i>Inocybe</i> sp. 1	7	12	6	-	1	-	-	-	-
<i>Inocybe</i> sp. 2	-	12	5	13	18	5	3	1	6
<i>Inocybe</i> sp. 3	5	13	-	5	1	-	-	1	2
<i>Inocybe</i> sp. 4	34	14	65	-	-	1	3	6	-
<i>Inocybe</i> sp. 5	1	2	10	-	1	2	-	-	-
<i>Inocybe</i> sp. 6	8	4	21	-	1	17	1	7	10

	Chichinautzin			Guespalapa			Pelado		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007
<i>Inocybe</i> sp. 7	-	2	14	-	12	36	-	-	2
<i>Inocybe</i> sp. 8	2	6	14	-	2	12	-	-	-
<i>Inocybe</i> sp. 9	-	2	1	-	2	1	-	-	4
<i>Laccaria amethystina</i> Cooke	1	5	13	-	6	-	2	11	22
<i>Laccaria bicolor</i> (Maire) P.D. Orton	33	57	25	3	34	59	1	12	4
<i>Laccaria laccata</i> (Scop.) Cooke	31	43	55	3	13	18	3	2	-
<i>Laccaria aff. ochropurpurea</i> (Berk.) Peck	3	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Laccaria aff. tortilis</i> (Bolton) Cooke*	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Laccaria</i> sp. 1	-	1	-	4	-	2	-	-	-
<i>Laccaria</i> sp. 2*	-	-	-	-	-	-	-	12	-
<i>Laccaria</i> sp. 3*	-	-	-	-	1	1	-	-	-
<i>Lactarius aff. aurantiacus</i> (Pers.) Gray*	-	-	-	-	-	-	-	2	-
<i>Lactarius aff. deliciosus</i> (L.) Gray	1	-	-	-	1	-	3	4	3
<i>Lactarius aff. salmonicolor</i> R. Heim & Leclair	-	1	4	1	2	14	-	-	-
<i>Lactarius scrobiculatus</i> (Scop.) Fr.*	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Lactarius</i> sp. 1	-	1	1	3	-	4	-	-	-
<i>Lactarius</i> sp. 2	-	-	2	2	-	-	-	-	-
<i>Lactarius</i> sp. 3*	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Lactarius</i> sp. 4*	-	-	-	-	-	-	-	-	8
<i>Lactarius</i> sp. 5*	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Leccinum aff. pseudoscabrum</i> (Kallenb.) Šutara*	-	-	3	-	-	-	-	-	-
<i>Leotia lubrica</i> (Scop.) Pers.*	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lyophyllum decastes</i> (Fr.) Singer	20	75	-	-	-	-	6	25	2
<i>Porphyrellus porphyrosporus</i> (Fr. & Hök) E.-J. Gilbert	-	-	-	6	-	2	-	1	-
<i>Ramaria aff. flava</i> (Schaeff.) Quél.	1	1	-	-	-	-	-	3	1
<i>Ramaria pallida</i> (Schaeff.) Ricken*	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Ramaria rubrievanescens</i> Marr & D.E. Stuntz*	-	3	6	-	-	-	-	-	-
<i>Ramaria</i> sp.*	2	-	2	-	-	-	-	-	-
<i>Russula aff. arnoldae</i> Murrill	-	-	-	-	1	-	2	2	4
<i>Russula brevipes</i> Peck	1	-	1	-	-	1	2	-	5
<i>Russula delica</i> Fr.	4	-	-	1	-	-	1	3	1
<i>Russula aff. mexicana</i> Burl.*	-	2	5	-	-	-	-	-	-
<i>Russula aff. pulverulenta</i> Peck	1	2	2	4	3	16	-	-	1
<i>Russula aff. viscida</i> Kudřna*	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Russula</i> sp. 1*	-	-	-	-	-	-	1	-	2
<i>Russula</i> sp. 2	3	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Russula</i> sp. 3	1	1	3	-	-	-	3	1	6
<i>Russula</i> sp. 4	5	1	-	2	-	2	2	-	-
<i>Russula</i> sp. 5	1	1	5	-	-	-	-	1	3
<i>Russula</i> sp. 6	-	-	-	-	1	-	2	2	5
<i>Russula</i> sp. 7*	-	-	-	-	-	-	-	8	2
<i>Russula</i> sp. 8	-	-	-	-	-	1	-	3	3
<i>Russula</i> sp. 9*	-	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Russula</i> sp. 10	-	-	-	-	1	4	-	1	1
<i>Russula</i> sp. 11*	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Sarcodon imbricatus</i> (L.) P. Karst.*	-	-	-	1	-	-	-	-	-

	Chichinautzin			Guespalapa			Pelado		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007
<i>Suillus bovinus</i> (Pers.) Roussel*	6	5	4	-	-	-	-	-	-
<i>Suillus aff. granulatus</i> (L.) Roussel*	5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Suillus aff. luteus</i> (L.) Roussel	1	3	2	-	-	2	-	-	-
<i>Suillus</i> sp. 1*	3	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Suillus</i> sp. 2*	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Suillus</i> sp. 3*	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Suillus</i> sp. 4	1	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Suillus</i> sp. 5*	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Tricholoma acerbum</i> (Bull.) Vent.*	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Tricholoma aff. aestuans</i> (Fr.) Gillet*	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tricholoma aff. album</i> (Schaeff.) P. Kumm.	-	-	-	1	-	-	2	-	-
<i>Tricholoma aff. columbetta</i> (Fr.) P. Kumm.*	-	-	-	-	-	-	2	-	-
<i>Tricholoma equestre</i> (L.) P. Kumm.	-	11	1	-	-	-	-	1	7
<i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.) P. Kumm.*	-	-	-	-	-	-	22	22	16
<i>Tricholoma inamoenum</i> (Fr.) Gillet*	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Tricholoma aff. pseudonictitans</i> Bon*	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tricholoma sejunctum</i> (Sowerby) Quél.	3	-	8	1	-	-	1	-	6
<i>Tricholoma aff. sulphureum</i> (Bull.) P. Kumm.*	-	-	-	4	-	-	-	-	-
<i>Tricholoma ustale</i> (Fr.) P. Kumm.	4	-	-	-	-	-	-	8	7
<i>Tricholoma</i> sp. 1*	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Tricholoma</i> sp. 2*	-	2	1	-	-	-	-	-	-
<i>Tricholoma</i> sp. 3*	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Tricholoma</i> sp. 4*	-	-	1	-	-	-	-	-	-

* Especies exclusivas de un sitio.

Apéndice B. Variables ecológicas en la producción de esporocarpos de especies ECM recolectados durante tres temporadas de lluvias consecutivas (2005-2007) en los tres sitios de muestreo.

Especie	AA	AR	FE	FER	FT	FTR	PhX	EBt	EBR	VIE
<i>Amanita flavoconia</i>	12	0.014	0.333	0.014	0.303	0.034	17.1	244.1	0.022	0.084
<i>Amanita fulva</i>	5	0.006	0.500	0.022	0.152	0.017	11.4	57.1	0.005	0.049
<i>Amanita muscaria</i>	2	0.002	0.167	0.007	0.061	0.007	100.0	200.0	0.018	0.034
<i>Amanita</i> sp. 1	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	17.3	17.3	0.002	0.013
<i>Amanita</i> sp. 3	4	0.005	0.333	0.014	0.091	0.010	18.2	113.8	0.010	0.040
<i>Amanita</i> sp. 4	2	0.002	0.167	0.007	0.030	0.003	20.8	41.5	0.004	0.017
<i>Amanita</i> sp. 5	2	0.002	0.333	0.014	0.061	0.007	4.9	9.8	0.001	0.024
<i>Boletus pinicola</i>	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	34.1	34.1	0.003	0.015
<i>Clavariadelphus aff. ligula</i>	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	2.4	2.4	0.000	0.012
<i>Clavulina aff. cinerea</i>	2	0.002	0.167	0.007	0.030	0.003	1.5	6.1	0.001	0.013
<i>Cortinarius aff. cinnabarinus</i>	2	0.002	0.167	0.007	0.030	0.003	1.4	5.6	0.001	0.013
<i>Cortinarius aff. croceus</i>	6	0.007	0.500	0.022	0.091	0.010	2.5	30.0	0.003	0.041
<i>Cortinarius anthracinus</i>	15	0.018	0.333	0.014	0.121	0.013	2.1	141.7	0.013	0.058
<i>Cortinarius semisanguineus</i>	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	8.0	8.0	0.001	0.012
<i>Cortinarius</i> sp. 1	3	0.004	0.167	0.007	0.061	0.007	6.2	28.4	0.003	0.020

Especie	AA	AR	FE	FER	FT	FTR	PhX	EBt	EBR	VIE
<i>Cortinarius</i> sp. 2	5	0.006	0.167	0.007	0.030	0.003	0.5	13.5	0.001	0.018
<i>Cortinarius</i> sp. 3	51	0.060	0.333	0.014	0.061	0.007	1.9	3346.6	0.305	0.386
<i>Cortinarius</i> sp. 4	5	0.006	0.500	0.022	0.091	0.010	3.8	37.2	0.003	0.041
<i>Cortinarius</i> sp. 5	2	0.002	0.167	0.007	0.030	0.003	1.0	4.0	0.000	0.013
<i>Cortinarius</i> sp. 7	6	0.007	0.167	0.007	0.091	0.010	3.9	48.0	0.004	0.029
<i>Entoloma clypeatum</i>	3	0.004	0.167	0.007	0.030	0.003	0.8	7.5	0.001	0.015
<i>Entoloma lividoalbum</i>	5	0.006	0.333	0.014	0.091	0.010	9.8	94.1	0.009	0.039
<i>Entoloma rhodopolium</i>	10	0.012	0.167	0.007	0.152	0.017	15.1	227.6	0.021	0.056
<i>Entoloma</i> sp. 2	7	0.008	0.333	0.014	0.061	0.007	3.0	71.5	0.007	0.036
<i>Entoloma</i> sp. 3	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	1.0	1.0	0.000	0.012
<i>Entoloma</i> sp. 4	5	0.006	0.333	0.014	0.061	0.007	8.0	65.0	0.006	0.033
<i>Entoloma</i> sp. 6	3	0.004	0.167	0.007	0.030	0.003	0.7	6.0	0.001	0.015
<i>Gyromitra infula</i>	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	9.2	9.2	0.001	0.013
<i>Hebeloma aff. alpinum</i>	2	0.002	0.333	0.014	0.061	0.007	3.9	7.8	0.001	0.024
<i>Hebeloma fastibile</i>	3	0.004	0.167	0.007	0.030	0.003	15.3	138.0	0.013	0.027
<i>Helvella crispa</i>	19	0.022	0.167	0.007	0.273	0.030	2.4	77.8	0.007	0.067
<i>Helvella lacunosa</i>	10	0.012	0.333	0.014	0.242	0.027	10.4	136.3	0.012	0.065
<i>Helvella macropus</i>	44	0.052	0.667	0.029	0.424	0.047	0.6	103.3	0.009	0.137

Especie	AA	AR	FE	FER	FT	FTR	PhX	EBt	EBR	VIE
<i>Hygrophorus hypothejus</i>	5	0.006	0.167	0.007	0.030	0.003	0.3	6.9	0.001	0.017
<i>Hygrophorus</i> sp.	2	0.002	0.167	0.007	0.030	0.003	15.0	60.0	0.005	0.018
<i>Inocybe cookei</i>	132	0.155	1.000	0.043	1.182	0.131	1.6	750.0	0.068	0.398
<i>Inocybe fastigiata</i>	34	0.040	0.833	0.036	0.394	0.044	3.7	317.6	0.029	0.149
<i>Inocybe geophylla</i>	4	0.005	0.333	0.014	0.121	0.013	1.3	5.2	0.000	0.033
<i>Inocybe aff. nitidiuscula</i>	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	0.5	0.5	0.000	0.012
<i>Inocybe</i> sp. 1	10	0.012	0.167	0.007	0.091	0.010	0.2	7.2	0.001	0.030
<i>Inocybe</i> sp. 2	47	0.055	0.500	0.022	0.424	0.047	1.1	163.2	0.015	0.139
<i>Inocybe</i> sp. 3	13	0.015	0.333	0.014	0.061	0.007	0.9	111.0	0.010	0.047
<i>Inocybe</i> sp. 4	94	0.111	0.667	0.029	0.515	0.057	0.9	302.0	0.028	0.224
<i>Inocybe</i> sp. 5	14	0.016	0.667	0.029	0.152	0.017	1.7	55.7	0.005	0.067
<i>Inocybe</i> sp. 6	50	0.059	0.833	0.036	0.364	0.040	1.4	303.3	0.028	0.163
<i>Inocybe</i> sp. 7	29	0.034	0.667	0.029	0.212	0.023	1.3	144.2	0.013	0.100
<i>Inocybe</i> sp. 8	19	0.022	0.333	0.014	0.182	0.020	0.6	27.4	0.002	0.059
<i>Inocybe</i> sp. 9	5	0.006	0.333	0.014	0.091	0.010	0.9	7.2	0.001	0.031
<i>Laccaria amethystina</i>	2	0.002	0.333	0.014	0.061	0.007	0.5	1.0	0.000	0.024
<i>Laccaria bicolor</i>	47	0.055	0.833	0.036	0.515	0.057	1.7	251.6	0.023	0.171
<i>Laccaria laccata</i>	34	0.040	0.833	0.036	0.303	0.034	0.9	85.1	0.008	0.117

Espece	AA	AR	FE	FER	FT	FTR	PhX	EBt	EBR	VIE
<i>Laccaria aff. tortilis</i>	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	1.0	1.0	0.000	0.012
<i>Laccaria</i> sp. 1	7	0.008	0.500	0.022	0.121	0.013	1.3	13.4	0.001	0.044
<i>Laccaria</i> sp. 2	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	1.0	1.0	0.000	0.012
<i>Laccaria</i> sp. 3	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	2.7	2.7	0.000	0.012
<i>Lactarius deliciosus</i>	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	8.0	8.0	0.001	0.012
<i>Lactarius aff. salmonicolor</i>	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	16.0	16.0	0.001	0.013
<i>Lactarius</i> sp. 2	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	12.0	12.0	0.001	0.013
<i>Lyophyllum decastes</i>	6	0.007	0.167	0.007	0.030	0.003	37.1	1336.4	0.122	0.139
<i>Russula aff. arnoldae</i>	2	0.002	0.167	0.007	0.061	0.007	6.0	11.9	0.001	0.017
<i>Russula brevipes</i>	2	0.002	0.167	0.007	0.061	0.007	41.0	82.0	0.007	0.024
<i>Russula delica</i>	3	0.004	0.500	0.022	0.091	0.010	75.4	226.3	0.021	0.056
<i>Russula pulverulenta</i>	9	0.011	0.167	0.007	0.212	0.023	2.0	126.1	0.011	0.053
<i>Russula</i> sp. 2	4	0.005	0.333	0.014	0.061	0.007	22.6	172.3	0.016	0.042
<i>Russula</i> sp. 3	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	10.0	10.0	0.001	0.013
<i>Russula</i> sp. 5	2	0.002	0.333	0.014	0.061	0.007	22.0	44.0	0.004	0.027
<i>Russula</i> sp. 6	3	0.004	0.333	0.014	0.091	0.010	16.0	48.0	0.004	0.032
<i>Russula</i> sp. 8	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	1.0	1.0	0.000	0.012
<i>Russula</i> sp. 9	2	0.002	0.167	0.007	0.030	0.003	23.6	94.2	0.009	0.021

Especie	AA	AR	FE	FER	FT	FTR	PhX	EBt	EBR	VIE
<i>Russula</i> sp. 10	2	0.002	0.167	0.007	0.030	0.003	39.0	156.0	0.014	0.027
<i>Suillus</i> aff. <i>luteus</i>	2	0.002	0.167	0.007	0.030	0.003	48.0	192.0	0.018	0.030
<i>Tricholoma</i> aff. <i>album</i>	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	0.2	0.2	0.000	0.012
<i>Tricholoma</i> <i>equestre</i>	4	0.005	0.167	0.007	0.061	0.007	10.7	88.0	0.008	0.027
<i>Tricholoma</i> aff. <i>sejunctum</i>	5	0.006	0.167	0.007	0.030	0.003	14.8	370.0	0.034	0.050
<i>Tricholoma</i> aff. <i>sulphureum</i>	4	0.005	0.167	0.007	0.030	0.003	1.4	21.6	0.002	0.017
<i>Tricholoma</i> sp. 4	1	0.001	0.167	0.007	0.030	0.003	2.6	2.6	0.000	0.012

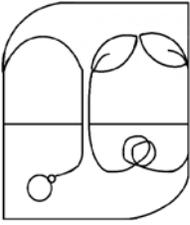
AA: Abundancia Absoluta total de esporocarpos; AR: Abundancia relativa; FE: Frecuencia Espacial; FER: Frecuencia Espacial Relativa; FT: Frecuencia Temporal; FTR: Frecuencia Temporal Relativa; PhX: Peso húmedo promedio; EBt: Estimación de la producción de Biomasa total; EBR: Estimación de la producción de Biomasa Relativa; VIE: Valor de Importancia Ecológica.

Apéndice C. Descripción de los morfotipos ECM asociados a *Pinus montezumae* en los tres sitios de estudio. * Dimensiones (\pm error estándar) de los ápices terminales no ramificados. (a) Color de la extremidad del ápice.

Número de morfotipo	Color	Patrón de ramificación	Forma	Textura	Largo* (mm)	Ancho* (mm)
1	negro	dicotómico	recta	granulosa / rizomorfos	0.84 ± 0.07	0.40 ± 0.03
2	café	coraloide	inflada	granulosa / lanosa	0.64 ± 0.00	0.33 ± 0.00
3	café / naranja(a)	coraloide	recta	lisa	0.81 ± 0.16	0.53 ± 0.09
4	café	dicotómico / coraloide	inflada	lisa	0.65 ± 0.12	0.34 ± 0.02
5	café / naranja(a)	dicotómico	con constricciones	lisa	0.94 ± 0.22	0.38 ± 0.04
6	café	dicotómico	inflada	algodonosa	0.50 ± 0.00	0.34 ± 0.00
7	café / naranja(a)	dicotómico	inflada	lisa / brillante	0.84 ± 0.05	0.39 ± 0.04
8	café / amarillo(a)	dicotómico	recta	algodonosa	1.33 ± 0.19	0.54 ± 0.05
9	café / negro(a)	dicotómico	recta	lisa	1.39 ± 0.18	0.55 ± 0.10
10	café / blanco(a)	dicotómico	recta	lisa	0.79 ± 0.08	0.44 ± 0.03
11	café anaranjado / amarillo(a)	dicotómico	con constricciones	fieltrosa /brillante / hifas emanentes	0.90 ± 0.15	0.38 ± 0.03
12	café anaranjado / transparente(a)	dicotómico	con constricciones	lisa / brillante	0.84 ± 0.36	0.38 ± 0.02
13	café anaranjado / naranja(a)	dicotómico	con constricciones	algodonosa / brillante	0.72 ± 0.12	0.43 ± 0.04
14	café anaranjado / transparente(a)	dicotómico	inflada	algodonosa / brillante	0.78 ± 0.14	0.57 ± 0.06
15	café anaranjado / naranja(a)	dicotómico	recta	algodonosa / brillante	0.97 ± 0.09	0.47 ± 0.03
16	café anaranjado / naranja(a)	dicotómico	recta	lisa	0.67 ± 0.36	0.36 ± 0.00
17	café oscuro / negro(a)	dicotómico	recta	fieltrosa / rizomorfos	0.97 ± 0.21	0.37 ± 0.03
18	café oscuro / naranja(a)	dicotómico	recta	lisa / rizomorfos	0.92 ± 0.01	0.43 ± 0.07
19	café gris / transparente(a)	dicotómico	inflada	granulosa / plateada	0.76 ± 0.12	0.43 ± 0.06

Número de morfotipo	Color	Patrón de ramificación	Forma	Textura	Largo* (mm)	Ancho* (mm)
20	lila / transparente(a)	dicotómico	inflada	aterciopelada	1.35 ± 0.00	0.40 ± 0.00
21	ocre	coraloide	recta	fieltrosa	1.63 ± 0.19	0.71 ± 0.02
22	ocre	dicotómico	recta	algodonosa	1.56 ± 0.39	0.67 ± 0.24
23	ocre / transparente(a)	dicotómico	recta	lisa	1.27 ± 0.15	0.53 ± 0.03
24	naranja / manchas blancas	coraloide	inflada	lisa	0.85 ± 0.09	0.50 ± 0.04
25	naranja / manchas blancas	dicotómico /coraloide	inflada	algodonosa	0.73 ± 0.06	0.40 ± 0.03
26	naranja	dicotómico	con constricciones	lisa	0.99 ± 0.08	0.41 ± 0.01
27	naranja / amarillo(a)	dicotómico	inflada	algodonosa / plateada	1.07 ± 0.13	0.52 ± 0.06
28	naranja / amarillo(a)	dicotómico	inflada	algodonosa /fieltrosa	1.01 ± 0.12	0.62 ± 0.04
29	naranja	dicotómico	recta	algodonosa / hifas emanentes	0.97 ± 0.15	0.39 ± 0.05
30	naranja	dicotómico	recta	lisa	0.96 ± 0.11	0.46 ± 0.03
31	naranja / manchas brillantes / transparente(a)	dicotómico	recta	aterciopelada	0.94 ± 0.10	0.46 ± 0.04
32	naranja	dicotómico	recta	lanosa	0.76 ± 0.18	0.40 ± 0.06
33	rosado	dicotómico	recta	aterciopelada	1.20 ± 0.05	0.70 ± 0.18
34	amarillo / manchas blancas / blanco(a)	dicotómico	recta	algodonosa	0.94 ± 0.20	0.45 ± 0.05
35	amarillento	coraloide	inflada	aterciopelada	1.55 ± 0.20	0.47 ± 0.10
36	amarillo anaranjado / transparente(a)	dicotómico /coraloide	recta	algodonosa	0.67 ± 0.08	0.32 ± 0.04
37	amarillo anaranjado / manchas doradas	dicotómico	inflada	algodonosa	0.80 ± 0.03	0.31 ± 0.02
38	amarillo anaranjado / transparente(a)	dicotómico	inflada	lisa	1.00 ± 0.04	0.57 ± 0.04
39	amarillo anaranjado	dicotómico	recta	lisa / hifas emanentes	1.31 ± 0.00	0.38 ± 0.00
40	amarillo anaranjado / amarillo(a)	dicotómico	recta	lanosa	1.00 ± 0.25	0.39 ± 0.10
41	naranja / transparente(a)	dicotómico	recta	lisa	0.39 ± 0.00	0.2 ± 0.00

Número de morfotipo	Color	Patrón de ramificación	Forma	Textura	Largo* (mm)	Ancho* (mm)
42	amarillo anaranjado	dicotómico	inflada	lisa / plateada	1.02 ± 0.00	0.33 ± 0.00
43	amarillo anaranjado / transparente(a) / manchas blancas	dicotómico	recta	lanosa / rizomorfos	0.76 ± 0.09	0.27 ± 0.03
44	blanquecino	dicotómico	recta	lanosa	0.97 ± 0.00	0.53 ± 0.00
45	café	dicotómico	inflada	lisa / plateada	0.98 ± 0.00	0.40 ± 0.00
46	amarillento / blanco(a)	dicotómico	inflada	lanosa	0.81 ± 0.11	0.36 ± 0.02
47	naranja / blanquecino(a)	dicotómico	inflada	lisa	0.76 ± 0.05	0.34 ± 0.02
48	café / blanco(a)	dicotómico	con constricciones	fieltrosa	0.88 ± 0.08	0.29 ± 0.04
49	amarillo	dicotómico / no ram.	inflada	algodonosa / hifas emanentes	1.01 ± 0.12	0.33 ± 0.01
50	blanquecino	dicotómico	inflada	fieltrosa	0.70 ± 0.05	0.36 ± 0.02
51	naranja muy vivo	dicotómico	inflada	lisa	0.55 ± 0.10	0.35 ± 0.04
52	amarillo / blanquecino(a)	dicotómico / cor.	inflada	lisa	0.98 ± 0.15	0.37 ± 0.02
53	rosado / blanquecino(a)	dicotómico / cor.	recta	lisa / hifas emanentes	0.92 ± 0.26	0.57 ± 0.20
54	naranja / blanco(a)	dicotómico	inflada	lisa	0.73 ± 0.08	0.43 ± 0.05
55	naranja / blanco(a)	dicotómico	con constricciones	fieltrosa	0.67	0.26

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe002
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Extracción de ADN a partir de ápices ectomicorrízicos con el kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

Propósito

Obtención de ADN total para llevar a cabo su posterior amplificación a partir de alguna muestra de tejido, en este caso particular, muestras de ápices ectomicorrízicos (ECM) o de segmentos de cuerpos fructíferos.

Principio

El kit REDEExtract-N-Amp Plant PCR contiene una solución extractora para la lisis de células (E7526) que mediante la aplicación de un ciclo de calor en el termociclador permite extraer rápidamente ADN de muestras vegetales o fúngicas. La agregación posterior de una solución dilutora (D5688) permite neutralizar las sustancias inhibitoras como los ácidos húmicos antes de la amplificación. Se necesita de una cantidad muy pequeña de muestra (aprox. 0.5 cm).

Técnicas relacionadas

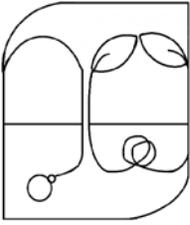
- Utilización del termociclador (presop no. MCCTU003).
- Extracción de ápices ECM a partir de suelo recolectado en campo (presop no. MCCPe001).
- Amplificación de ADN por PCR a partir de ápices ectomicorrízicos (ECM) con el kit REDEExtract-N-Amp Plant PCR (presop no. MCCPe003).
- Electroforesis en geles de agarosa para comprobar la presencia de ADN (presop no. MCCPe004).

Equipo y material

- Termociclador.
- Autoclave.
- 1 microtubo de tapa plana (Eppendorf) por muestra, de 0.2 mL estéril.
- 1 micropipeta de rango 0.2 – 10 µL con 1 punta estéril.
- 1 micropipeta de rango 2 – 200 µL con 1 punta estéril .

1:

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe002
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Extracción de ADN a partir de ápices ectomicorrízicos con el kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

- 1 gradilla para puntas de 0.2 – 10 µL estéril.
- 1 gradilla para puntas de 2– 200 µL estéril.
- 1 pinza de relojero n° 5.
- Cinta adhesiva.
- 1 frasco Gerber para contener el alcohol
- 1 par de guantes de latex.
- 1 marcador indeleble.
- Trapo o servilletas de limpieza.

Reactivos

Clave del reactivo	Nombre del reactivo	Cantidad requerida para 1 muestra
MCCR0168	Kit REExtract-N-Amp Plant PCR de Sigma (XNAP2) que contiene: - solución de extracción E7525 - solución de dilución D5688	10 µL 30 µL
MCCR0196	Hipoclorito de sodio comercial diluido 10%	10 mL
MCCR0103	Alcohol etílico a 90%	50 mL

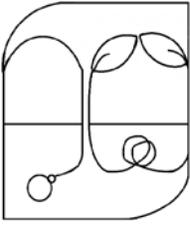
Muestra

Se puede extraer el ADN a partir de un ápice fresco recientemente aislado y limpio (ver presop no. MCCPe001) o conservado congelado a -70°C . En caso de que el ápice sea congelado en el ultracongelador REVCO, se debe de procesar inmediatamente después de sacarlo.

Esta técnica está calibrada para realizar la extracción de un solo ápice ectomicorrízico o de 1 a 2 mm de un cuerpo fructífero.

1:

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe002
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Extracción de ADN a partir de ápices ectomicorrízicos con el kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

Procedimiento

Todo el procedimiento se realiza en un área previamente limpiada en las superficies con un trapo con cloro diluido para evitar contaminar el ADN, y con guantes estériles.

La muestra se saca del REVCO y se transporta y mantiene en una charola con hielo picado. Se descongela al liberarla del hielo e instantáneamente se coloca en un tubo Eppendorf de 0.2 mL con una una pinza desinfectada con alcohol. Se agregan con la micropipeta 10 μ L del buffer de extracción (E7526). El microtubo se coloca en el termociclador y se calienta a 65°C por 10 minutos y a 95°C por otros 10 minutos (se puede combinar las dos etapas en un solo programa).

Una vez finalizado el calentamiento se agrega a la muestra 30 μ L del buffer de dilución (D5688), si se trata de un ápice, o 10 μ L si la muestra proviene de un carpóforo ectomicorrízico. La muestra se deja incubar una hora a temperatura ambiente, ya que el buffer funciona mejor a esta temperatura. La muestra debe de permanecer luego en el refrigerador (4°C es la temperatura ideal para la conservación del ADN si se utilizará en menos de dos días) o en el congelador a -20°C.

Cálculos

No aplica.

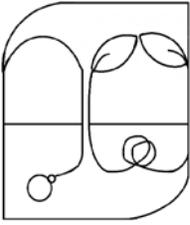
Referencias

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/productdetail/sigma/xnapr> (fecha de última actualización: 30 de marzo del 2010)

Thomas Bruns y Peter Kennedy, Berkeley University. Comunicación personal.

1:

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe002
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Extracción de ADN a partir de ápices ectomicorrízicos con el kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

Observaciones

El kit se almacena a -20°C en el congelador.

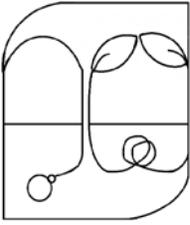
Se recomienda realizar alícuotas (de 500 µL en tubos Eppendorf estériles) de cada una de las soluciones del kit para evitar una eventual contaminación por estar manipulando constantemente el material dado que viene en dosis muy grandes para el manejo de pequeños volúmenes.

Las soluciones se descongelan a temperatura ambiente en hielo, proceso que lleva casi una mañana por lo que hay que tener precaución si se planea hacer una extracción y no se cuenta con alícuotas.

Anexo

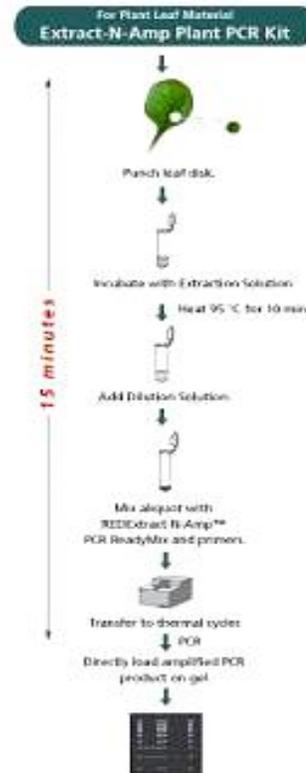
1:

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe002
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Extracción de ADN a partir de ápices ectomicorrízicos con el kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

Description: The Extract-N-Amp Plant PCR Kits contain all the reagents necessary to rapidly extract genomic DNA from plant leaves (**Figure 1**) and amplify targets of interest by PCR. A novel Extraction Solution eliminates the need for conventional freezing of plant tissues with liquid nitrogen, mechanical disruption, organic extraction, column purification, or precipitation of DNA. The kit also includes a PCR reaction mix, especially formulated for amplification directly from the extract. This formulation uses an antibody based Hot Start for specific amplification. The PCR master mix comes in two formulations: Extract-N-Amp PCR Reaction Mix and REExtract-N-Amp Plant PCR Kit. The REExtract-N-Amp™ PCR mix is formulated with **REDTaq** which acts as a tracking dye and allows for convenient direct loading of PCR reactions onto agarose gels for analysis.

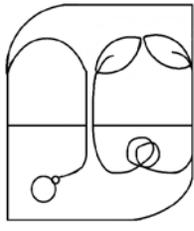
Genomic DNA is extracted from 0.5 to 0.7 cm plant leaf disks that have been cut with a standard paper punch and simply incubated in Extraction Solution at 95 °C for 10 minutes. An equal volume of Dilution Solution is added to the extract to neutralize inhibitory substances prior to PCR. A portion of the DNA extract is then added to a PCR reaction containing primers and either the REExtract-N-Amp or Extract-N-Amp PCR.



Protocol for Extract-N-Amp Plant PCR Kit
Kit Contents

1:

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe003
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Amplificación de ADN por PCR a partir de ápices ectomicorrízicos con el PCR mix del kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

Propósito

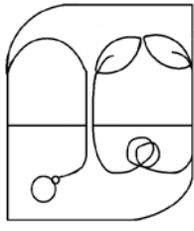
Realizar la multiplicación de fracciones específicas de ADN a través de un iniciador (PRIMER) mediante su amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés). La finalidad de esta amplificación es tener suficientes copias de una región genómica de una especie o grupo biológico de interés (en este caso hongos ectomicorrízicos) a partir de una muestra pura o compleja de ADN.

Principio

La técnica de PCR, desarrollada desde 1983 por Mullis (Bartlett y Stirling, 2003), tiene como objetivo replicar en grandes cantidades uno o varios fragmentos específicos de ADN. Para llevar a cabo la amplificación por PCR se requieren iniciadores específicos (PRIMERS), fragmentos sintéticos de ADN que se adhieren específicamente a una de las regiones de la cadena cuando ha sido desnaturalizada por calor. Van a servir de punto de partida para la replicación de esta región a través de una proteína llamada Taq polimerasa (enzima que va a catalizar la replicación del ADN), así como desoxinucleótidos (dNTPs) que van a constituir el sustrato para sintetizar las multicopias de nuevo ADN al cabo de varios ciclos. Estos ciclos consisten en la inicialización, la desnaturalización, la unión del primer a la cadena, y la elongación de la cadena.

Este protocolo se basa en la utilización de un kit PCR Ready Mix de REDEExtract-N-Amp Plant PCR de Sigma. En este kit existe una solución que contiene el buffer (solución amortiguadora que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa), las sales que actúan como cofactores de la polimerasa, los dNTPs que forman el sustrato para polimerizar el nuevo ADN y la Taq polimerasa. Los primers que se usan son los ITS1F, específico para hongos, y el ITS4.

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe003
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Amplificación de ADN por PCR a partir de ápices ectomicorrízicos con el PCR mix del kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

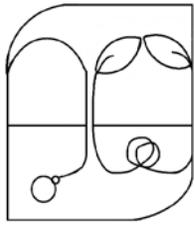
Técnicas relacionadas

- Extracción de ADN a partir de ápices ectomicorrízicos (ECM) con el kit REDEExtract-N-Amp Plant PCR (presop no. MCCPe002).
- Electroforesis en geles de agarosa para comprobar la presencia de ADN (presop no. MCCPe004).
- Resuspensión de primers para la amplificación de ADN por PCR (presop no. MCCPe007).
- Utilización del termociclador (presop no. MCCTU003).
- Utilización de la microcentrífuga (presop no. MCCTU007).
- Utilización del aparato cuantificador de ADN AmpliQuant (presop no. MCCTU037).

Equipo y material

- Termociclador.
- Microcentrífuga.
- Autoclave.
- 1 microtubo de Eppendorf de tapa plana por muestra, de 0.2 mL estéril.
- 1 micropipeta de rango 0.2 – 10 µL, 1 Punta estéril por muestra.
- 1 micropipeta de rango 2 – 200 µL, 1 Punta estéril por muestra.
- 1 gradilla para puntas de 0.2 – 10 µL, estéril.
- 1 gradilla para puntas de 2– 200 µL, estéril.
- 1 par de guantes de latex.
- 1 marcador indeleble.
- Trapo o servilletas de limpieza.

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe003
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Amplificación de ADN por PCR a partir de ápices ectomicorrízicos con el PCR mix del kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

Reactivos

Clave del reactivo	Nombre del reactivo	Peso molecular del reactivo	Cantidad requerida para 1 muestra
MCCR0168	Kit REDEExtract-N-Amp Plant PCR de Sigma (XNAP2) que contiene la solución PCR Ready Mix R4775	-	10 µL
MCCR0183	Primer ITS1-F*	50 µM	0.25 µL
MCCR0182	Primer ITS4*	50 µM	0.25 µL
	Agua milliQ		-
MCCR0196	Hipoclorito de sodio comercial diluido 10%		10 mL
	Alcohol		-

* Ver secuencias en anexo.

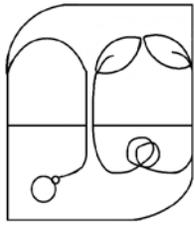
Muestra

ADN previamente extraído (procedimiento descrito en la presop no. MCCPe001) que se encuentra en tubos Eppendorf de 0.2 mL en refrigeración o congelación.

Procedimiento

Todo el procedimiento se realiza en un área previamente limpiada en las superficies con un trapo con cloro diluido para evitar contaminar el ADN, y con guantes estériles. Se recomienda realizar alícuotas de las soluciones del kit para evitar una eventual contaminación.

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe003
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Amplificación de ADN por PCR a partir de ápices ectomicorrízicos con el PCR mix del kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

El volumen total para cada reacción es de 25 μL .

Se puede usar el ADN directamente de las extracciones realizadas, o se puede diluir con agua milliQ estéril a 1:10, 1:50 o 1:100*. Por tanto, la cantidad de ADN que se va a colocar en el tubo para PCR depende de la muestra pero generalmente se parte de un volumen inicial de 5 μL del ADN extraído para ápices ectomicorrízicos. Estos 5 μL se colocan en un microtubo estéril Eppendorf de 0.2 mL o 0.5 mL en el orden descrito en el siguiente cuadro:

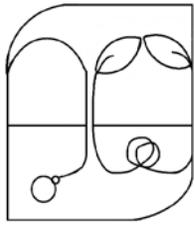
Mezcla de reactivos	1 reacción (μL)
ADN extraído de la muestra	5.00
PCR mix	10.00
50 μM ITS4	0.25
50 μM ITS1-F	0.25
Agua milliQ	9.50

En el caso de amplificar más de una muestra, se recomienda preparar una mezcla para el número de muestras que se van a procesar, para minimizar un error de pipeteo. Una tabla de proporciones en excel permite calcular la cantidad de reactivos que se tiene que colocar en el tubo. Para cada tubo de PCR se pipetea 20 μL de la mezcla y se agregan estos 20 μL al tubo conteniendo los 5 μL de ADN fúngico.

Reactivo	1 reacción	5 reacciones	10 reacciones
PCR mix (R4775)	10 μL	50 μL	100 μL
Agua milliQ estéril	9.5 μL	47.5 μL	95 μL
ITS 1F	0.25 μL	1.25 μL	2.5 μL
ITS 4	0.25 μL	1.25 μL	2.5 μL

Una vez añadidos los reactivos, se colocan los tubos en la microcentrifuga manual por 30 segundos para bajar y homogeneizar los reactivos. Se disponen los tubos marcados** en el termociclador respetando los ciclos descritos a continuación:

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe003
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Amplificación de ADN por PCR a partir de ápices ectomicorrízicos con el PCR mix del kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

1. 94 °C – 1 min (Inicialización)
2. 94 °C – 1 min (Desnaturalización)
3. 51 °C – 1 min (Unión del primer)
4. 72 °C – 1 min (Elongación de la cadena)
5. Repetir a partir del paso 2 (34 veces)
6. 72 °C – 8 min (Elongación final)
7. 10 °C – hasta sacar las muestras del termociclador.

Cuando la PCR termina, se verifica que la amplificación fue exitosa corriendo una electroforesis en gel de agarosa (presop no. MCCPe004). Se almacenan los productos de PCR en el congelador a -20°C en caso de purificarlos en menos de tres días, o en el ultracongelador a -70°C.

Cálculos

No aplica.

Referencias

Bartlett, J.M.S., Stirling, S. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods of molecular biology* 226: 3-6.

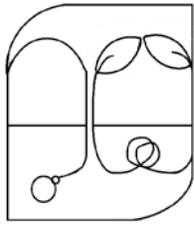
Thomas Bruns y Peter Kennedy, Berkeley University. Comunicación personal.

Observaciones

* La amplificación puede funcionar más eficientemente a cierta concentración de ADN de partida. Por lo tanto, es recomendable tener unas muestras de calibración para probar cuál es la dilución más adecuada a su tipo de muestra.

** Se recomienda etiquetar cada microtubo con números consecutivos y anotar en una libreta a qué muestra corresponde. Adicionalmente, es preciso conocer el orden en lo cual se están colocando en la placa del termociclador ya que las inscripciones pueden llegar a borrarse.

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe003
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Amplificación de ADN por PCR a partir de ápices ectomicorrízicos con el PCR mix del kit RedExtract-N-Amp Plant PCR	Versión: 2

Es muy importante correr un blanco para cada reacción de PCR que se va a llevar a cabo. Un blanco contiene las mismas cantidades de PCR mix e ITS que las otras muestras, pero se reemplazan los 5 µL de ADN por 5 µL de agua milliQ estéril. Este blanco permite determinar la presencia de una eventual contaminación que puede provenir de alguno de los reactivos, de los tubos o micropuntas o de eventuales malas manipulaciones como estornudos sobre las muestras o un ambiente de trabajo sucio o con mucha corriente de aire.

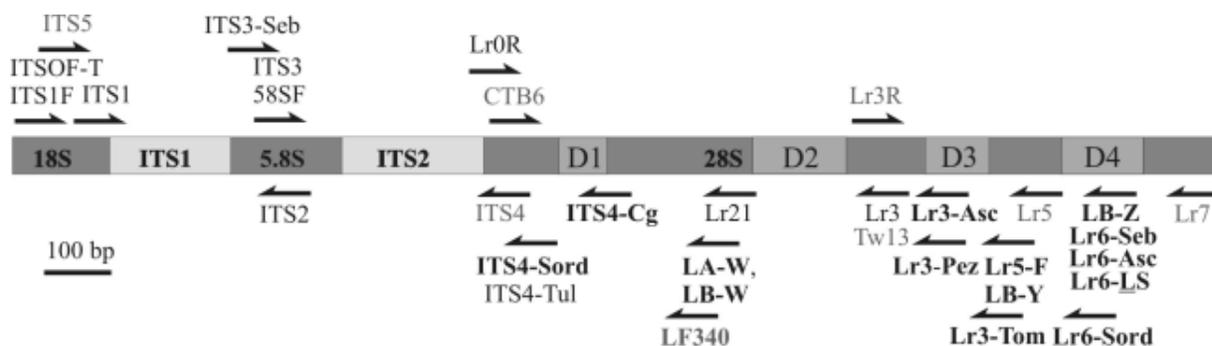
El primer PCR que se realiza con una concentración de ADN original puede permitir saber si ésta es correcta para realizar la amplificación o si se necesitara diluir. En caso de que el ADN no amplifique sin dilución, se debe recurrir a correr un PCR de calibración para probar cuál es la dilución más adecuada a su tipo de muestra.

Los primers utilizados en esta presop amplifican la región ITS altamente variable del ADN ribosomal de los hongos. Se pueden usar otros primers en combinación con el ITS1-F como el ITS4-B (específico para Basidiomicetes) o ITS4-A (para Ascomicetes). Estos primers usan el mismo programa del termociclador que el ITS4 que es un primer universal. Los primers se conservan en refrigeración a 4°C.

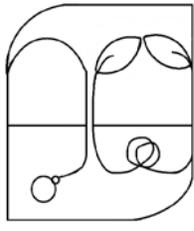
La secuencia de los primers que se requieren en este procedimiento es:

ITS1-F 5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3'
ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Anexo



<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe005
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Limpieza de los productos de PCR con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de Promega	Versión: 2

Propósito

Realizar la purificación de la solución de ADN amplificado por PCR y que contiene dNTPs, primers y sales remanentes.

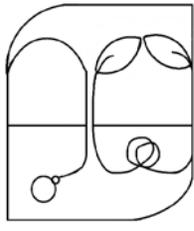
Principio

Los productos de la reacción de amplificación de segmentos específicos de ADN a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se purifican para remover el exceso de nucleótidos y de primers remanentes de la matriz de reacción. El kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System funciona mediante un sistema de membrana de sílica que puede adsorber hasta 40 µg de ADN y permite recuperar el ADN limpiándolo en menos de 20 minutos. El ADN purificado se puede usar posteriormente para secuenciación, clonación, o digestiones enzimáticas. La limpieza del ADN consiste en 3 fases: primero, la adsorción del ADN a la membrana a través de sales caotrópicos; la segunda la limpieza del ADN con una solución de etanol y la tercera, la elución o recuperación del ADN en agua.

Técnicas relacionadas

- Extracción de ADN a partir de ápices ectomicorrízicos (ECM) con el kit REDExtract-N-Amp Plant PCR (presop no. MCCPe002).
- Amplificación de ADN por PCR a partir de ápices ectomicorrízicos (ECM) con el kit REDExtract-N-Amp Plant PCR (presop no. MCCPe003).
- Electroforesis en geles de agarosa para comprobar la presencia de ADN (presop no. MCCPe004).
- Uso de la microcentrifuga (presop no. MCCTU006).

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe005
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Limpieza de los productos de PCR con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de Promega	Versión: 2

Equipo y material

- Microcentrifuga.
- 1 micropipeta de rango 100 – 1000 μ L, 2 puntas estériles.
- 1 micropipeta de rango 20 – 200 μ L, 1 punta estéril.
- 1 gradilla para puntas de 20 – 200 μ L estériles.
- 1 gradilla para puntas de 100 – 1000 μ L estériles.
- 1 minicolumna (viene en el kit).
- 1 tubo de recolección (viene en el kit).
- 1 microtubo Eppendorf de 1.5 mL.
- 1 par de guantes de latex
- 1 marcador indeleble.

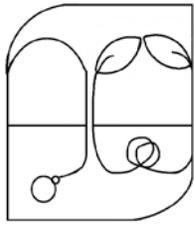
Reactivos

Clave del reactivo	Nombre del reactivo	Cantidad requerida para 1 muestra
MCCR0123	Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega que contiene: - Membrane Binding Solution - Membrane Wash Solution - Nuclease-free water	25.0 μ L 1.2 mL 50.0 μ L

Muestra

La muestra es el producto de PCR que se encuentra en un tubo de 0.2 mL en refrigeración a 4°C o a -20°C si el PCR se corrió hace unas semanas.

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe005
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Limpieza de los productos de PCR con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de Promega	Versión: 2

Procedimiento

Todo el procedimiento se realiza en un área previamente limpiada en las superficies con un trapo con cloro diluido para evitar contaminar el ADN, y con guantes estériles.

El kit se almacena en a temperatura ambiente. Se recomienda realizar alícuotas de las soluciones del kit para evitar una eventual contaminación.

Se agrega al tubo del producto de PCR 25 μ L de la solución Membrane Binding (solución para adsorber el ADN a la membrana). A continuación se inserta la minicolumna que provee el kit en un tubo de recolección (incluido en el kit). Se vierte el contenido del tubo de 0.2 mL (50 μ L) en la minicolumna y se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifuga el tubo de recolección y la columna a $16\ 000 \times g$ durante 1 minuto. Se desecha el líquido filtrado y se vuelve a colocar la minicolumna en el tubo de recolección.

Se agregan a la minicolumna 700 μ L de la solución Membrane Wash (solución conteniendo etanol para limpiar la membrana). Se centrifuga a $16\ 000 \times g$ durante 1 minuto. Se desecha el líquido filtrado y se vuelve a colocar la minicolumna en el tubo de recolección. Se agrega nuevamente 500 μ L de la solución Membrane Wash, se centrifuga a $16\ 000 \times g$ durante 5 minutos. Se vacía el tubo de recolección, se coloca otra vez la minicolumna y se centrifuga nuevamente a $16\ 000 \times g$ durante 1 minuto, con la tapa abierta para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol. Se coloca luego la minicolumna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se agrega 50 μ L de agua libre de nucleasas (free nuclease water) y se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifuga a $16\ 000 \times g$ durante 1 minuto. Se desecha la minicolumna y se almacena el ADN a -20°C en caso de un almacenamiento prolongado.

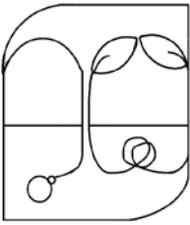
Referencias

<http://www.promega.com/tbs/tb308/tb308.html> (fecha de última actualización: 19 de abril del 2010)

Anexo

140

<u>Autor:</u> Frédérique Reverchon.	<u>Fuente:</u>
<u>Vo. Bo. encargado de aseguramiento de calidad:</u> Mónica Rangel Villafranco y Ma. del Pilar Ortega Larrocea.	<u>Firma:</u>

	MICROCOSMOS BIOEDÁFICO	MCCPe005
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM	págs.: 1-4
	Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP)	11-05-2010
	Limpieza de los productos de PCR con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de Promega	Versión: 2

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A9280, A9281, AND A9282.



DNA Purification by Centrifugation

Gel Slice and PCR Product Preparation

A. Dissolving the Gel Slice

1. Following electrophoresis, excise DNA band from gel and place gel slice in a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 10µl Membrane Binding Solution per 10mg of gel slice. Vortex and incubate at 50–65°C until gel slice is completely dissolved.

B. Processing PCR Reactions

1. Add an equal volume of Membrane Binding Solution to the PCR reaction.

Binding of DNA

1. Insert SV Minicolumn into Collection Tube.
2. Transfer dissolved gel mixture or prepared PCR product to the Minicolumn assembly. Incubate at room temperature for 1 minute.
3. Centrifuge at 16,000 × g for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.

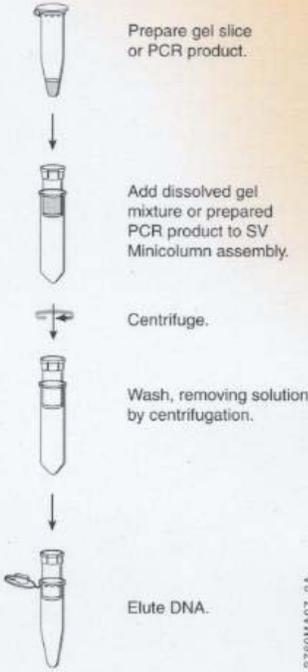
Washing

4. Add 700µl Membrane Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at 16,000 × g for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.
5. Repeat Step 4 with 500µl Membrane Wash Solution. Centrifuge at 16,000 × g for 5 minutes.
6. Empty the Collection Tube and recentrifuge the column assembly for 1 minute with the microcentrifuge lid open (or off) to allow evaporation of any residual ethanol.

Elution

7. Carefully transfer Minicolumn to a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
8. Add 50µl of Nuclease-Free Water to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 16,000 × g for 1 minute.
9. Discard Minicolumn and store DNA at 4°C or –20°C.

Additional protocol information is available in Technical Bulletin #TB308, available upon request from Promega or online at www.promega.com



3750MA07_2A

ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:
www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

© 2002–2005 Promega Corporation. All Rights Reserved.



Printed in USA. Revised 1/05
Part #9FB072