



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

INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
Ecología

**Efecto del suelo del bosque de *Abies religiosa* en la comunidad de hongos  
ectomicorrízicos en el Zarco, San Pedro Atlapulco, Estado de México**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANDRÉS ARGÜELLES MOYAO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: (Dr. ROBERTO GARIBAY ORIJEL)  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: (DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA)  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA  
(DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ SÁNCHEZ)  
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





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

INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
Ecología

**Efecto del suelo del bosque de *Abies religiosa* en la comunidad de hongos  
ectomicorrízicos en el Zarco, San Pedro Atlapulco, Estado de México**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANDRÉS ARGÜELLES MOYAO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: (DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL)  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: (DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA)  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA  
(DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ SÁNCHEZ)  
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013



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

*Presente*

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de mayo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ARGÜELLES MOYAO ANDRES** con número de cuenta **511021273** con la tesis titulada: **"Efecto del suelo del bosque de *Abies religiosa* en la comunidad de hongos ectomicorrízicos en el Zarco, San Pedro Atlapulco, Estado de México"**, realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL**:

Presidente: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS  
Vocal: DRA. SILKE CRAM HEYDRICH  
Secretario: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA  
Suplente: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO  
Suplente: DR. SIGFRIDO SIERRA GALVÁN

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

**Atentamente**

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de julio de 2013.

*M del Coro Arizmendi*  
**Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga**  
Coordinadora del Programa

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

## **Agradecimientos**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por aceptarme en su programa de posgrado.

También agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por aceptarme en el Programa de Becas Nacionales, con registro de becario 255120 y número de CVU 385015.

Al proyecto "Caracterización morfológica, microscópica y genética de las fases vegetativa (micorriza) y reproductiva (esporoma) de los hongos ectomicorrízicos de mayor relevancia forestal del Neotrópico Mexicano" PAPIIT IN218210, por el financiamiento.

Al Dr. Roberto Garibay Orijel, por poseer el ojo crítico en todo momento, sus invaluable comentarios, la ayuda prestada, y por no cerrar su puerta a mis preguntas.

A la Dra. Ma. del Pilar Ortega Larrocea, por la ayuda que me brindó, sus pláticas y comentarios a mi trabajo.

Al Dr. Javier Álvarez Sánchez, por su comprensión y acertados comentarios en los tutoriales que me permitieron ver el trabajo desde otro punto de vista.

## Agradecimientos a título personal

A la comunidad de San Pedro Atlapulco por las facilidades proporcionadas para elaborar la tesis, cuiden sus bosques porque sin ellos no hay agua.

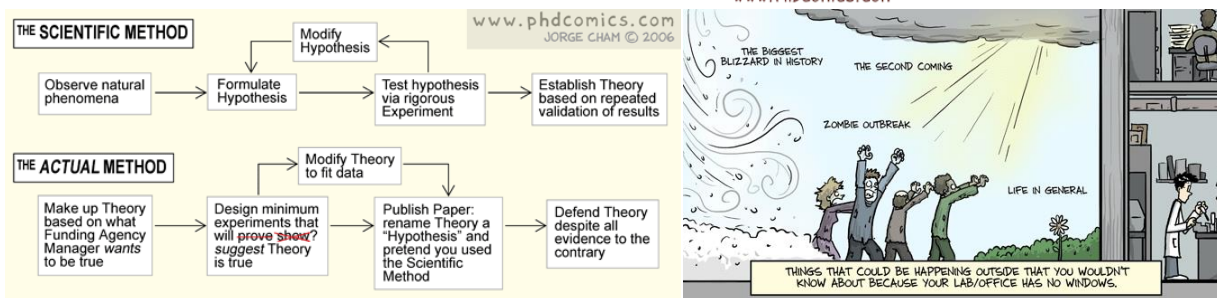
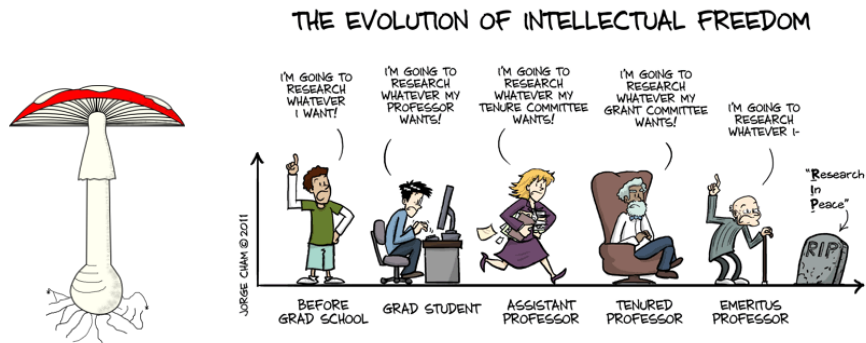
A la M. en C. Kumiko Shimada Miyasaka por su invaluable ayuda al momento de realizar los análisis de suelo.

A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar por llevar a cabo las reacciones de secuenciación, y las facilidades otorgadas en su laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio C-103, sin su valiosa ayuda y apoyo nunca habría acabado esta tesis ni el trabajo en campo. Me encantó covariar mi vida junto con ustedes, tengo varias anécdotas que recordar cuando llegue a viejo. Los quiero mucho :-).

A la familia que nunca estuvo los 220 Km lejos de mí.

A la gran tortuga, a Dios y a Tláloc por la lluvia...



## Índice

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
• <i>Geomorfología de la Sierra de las Cruces</i>	5
• <i>Los bosques de Abies en México</i>	6
▪ <i>Abies religiosa</i>	7
• <i>Descripción del área de estudio</i>	7
• <i>Generalidades de las ectomicorrizas</i>	8
○ <i>Ecología de ectomicorrizas</i>	9
▪ <i>Hospederos estudiados recientemente en el mundo</i>	10
• <i>El suelo como hábitat y modelador de comunidades</i>	11
○ <i>El espacio poroso</i>	12
○ <i>Nitrógeno</i>	13
○ <i>Carbono</i>	14
○ <i>Fósforo</i>	14
○ <i>pH</i>	14
Antecedentes	16
• <i>Comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados con Abies en el mundo</i>	16
• <i>Comunidades de hongos ectomicorrízicos en México</i>	17
• <i>Comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados con Abies en México</i>	18
Justificación	20
Objetivos	20
• <i>General</i>	20
• <i>Específicos</i>	20
Hipótesis	21
Metodología	21
• <i>Selección de parcelas de muestreo</i>	21
• <i>Caracterización de las parcelas</i>	22
• <i>Muestreo de ectomicorrizas y densidad de suelo</i>	24
• <i>Disección de las ectomicorrizas</i>	26
• <i>Determinación de las especies con herramientas de biología molecular</i>	26



• <i>Protocolo de extracción de ADN</i>	26
• <i>Reacción de PCR</i>	26
• <i>Electroforesis</i>	27
• <i>Limpiezas de productos de PCR</i>	27
• <i>Edición de secuencias</i>	28
• <i>Procedimientos de bioinformática (BLAST)</i>	28
• <i>Estudios de diversidad</i>	28
• <i>Análisis del efecto del suelo sobre la diversidad</i>	29
Resultados	29
• <i>Selección de sitios de estudio y variables arbóreas</i>	30
• <i>Disección de raíces, densidad del suelo, y extracción de las micorrizas</i>	36
• <i>Biomasa de raíces en época de lluvias (octubre) y densidad aparente</i>	39
• <i>Resultados determinación de las especies con herramientas de biología molecular</i>	42
• <i>Efecto del suelo sobre la diversidad</i>	58
Discusión	63
Conclusiones	71
Referencias	72
Anexos	90

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Número de especies reportadas en los 21 trabajos de hongos ectomicorrízicos para los bosques del género <i>Abies</i> .	16
Cuadro 2. Estudios de hongos ectomicorrízicos en México donde se muestra el número de especies reportadas y el tipo de metodología en 12 estudios en México con enfoque hacia los hongos ectomicorrízicos.	17
Cuadro 3. Número de especies de hongos ectomicorrízicos reportados para <i>Abies religiosa</i> en México.	19
Cuadro 4. Características de vegetación arbórea y suelo de las parcelas.	30
Cuadro 5. Correlaciones múltiples de Spearman $_{\alpha=0.05}$ entre las variables arbóreas y edáficas. Los valores significativos están subrayados.	31
Cuadro 6. MANOVA $_{\alpha=0.05}$ de las parcelas, para la distancia, Log <sub>10</sub> Biomasa en peso seco de raíces, y Log <sub>10</sub> DAP. Los valores significativos están subrayados.	32
Cuadro 7. Abundancia de los morfotipos por parcela.	38
Cuadro 8. ANOVA $_{\alpha=0.05}$ de parcelas y los transectos de Log <sub>10</sub> de biomasa en peso seco de raíces (octubre). Los valores significativos están subrayados.	39
Cuadro 9. Comparación (t-student $_{\alpha=0.05}$ ) entre la producción de raíces (Log <sub>10</sub> de la biomasa en peso seco (g) de las raíces) durante dos meses, mayo y octubre.	40
Cuadro 10. ANOVA $_{\alpha=0.05}$ de parcelas y las líneas de los transectos de densidad del suelo (g/cm <sup>3</sup> ). Las diferencias significativas están resaltadas.	41
Cuadro 11. Porcentaje de eficiencia de todo el proceso desde la toma de muestras en el campo hasta obtener la identidad por medio de la secuenciación de la región ITS.	43
Cuadro 12. Listado de taxones de ectomicorrizas de <i>Abies religiosa</i> encontrados.	44
Cuadro 13. Dominancia de especies e Índice de diversidad de Simpson.	50
Cuadro 14. Estimador basado en Abundancia (CHAO 1).	50
Cuadro 15. Estimador basado en Abundancia (Jack-Knife 1).	50
Cuadro 16. Características de vegetación arbórea y suelo de las parcelas a estudiar.	59
Cuadro 17. Correlación no paramétrica de Spearman $_{\alpha=0.05}$ , entre las variables y la diversidad.	60
Cuadro 18. Carga de factores con extracción de componentes principales.	61
Cuadro 19. Eigenvalues de la extracción de los dos factores.	62

## Índice de Figuras

Figura 1. Localización de los 21 parcelas de muestreo en la localidad del “Zarco”, Municipio de San Pedro Atlapulco, Estado de México. Los círculos y los triángulos señalan la localización de las parcelas. Sólo se analizaron para las ectomicorrizas los sitios señalados con triángulos.	22
Figura 2. Sitios de toma de datos de árboles y muestreo de suelo para seleccionar las parcelas de muestreo de ectomicorrizas. Los triángulos representan los árboles, los círculos los puntos de muestreo de raíces y suelo, y los cuadrados los puntos a partir de los cuales se seleccionaron los cinco árboles más cercanos.	24
Figura 3. Diseño de toma de datos de densidad de suelo y raíces de <i>A. religiosa</i> . Los círculos son los sitios donde se tomaron los datos dentro de la parcela. Los triángulos representan los árboles.	25
Figura 4. Análisis de clúster por UPGMA de los sitios. Se encuentran tres grupos: el grupo A, B y C. Los triángulos indican parcelas diferentes en el MANOVA $\alpha=0.05$ <i>Post hoc</i> Tukey	33
Figura 5. Análisis de Correspondencia Canónica entre las variables de diámetro a la altura del pecho (DAP) y distancia. El círculo indica las parcelas más homogéneas.	34
Figura 6. Análisis de Correspondencia Canónica entre las variables de suelo. El círculo indica las parcelas más homogéneas.	35
Figura 7. Abundancia de los morfotipos de ectomicorrizas de <i>A. religiosa</i> .	36
Figura 8. Número de micorrizas recolectadas por parcela.	37
Figura 9. Número de morfotipos por parcela.	37
Figura 10. ANOVA $\alpha=0.05$ para $\text{Log}_{10}$ de biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre).	40
Figura 11. Comparación (t- student $\alpha=0.05$ ) entre la producción de raíces en mayo y octubre.	41
Figura 12. ANOVA $\alpha=0.05$ para densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ).	42
Figura 13. Composición de la comunidad de hongos ectomicorrízicos por número de secuencias.	47
Figura 14. Número de taxa (OTU's) por género.	48
Figura 15. Número de secuencias de los OTU's por familia.	49
Figura 16. Curva de rarefacción de especies.	51
Figura 17. Abundancia relativa de las especies.	52
Figura 18. Frecuencia absoluta de las especies.	52
Figura 19. Frecuencia relativa de las especies.	53
Figura 20. Valor de importancia ecológica de las especies.	53
Figura 21. Valor de importancia ecológica en la parcela 1.	54

Figura 22. Valor de importancia ecológica en la parcela 4.	54
Figura 23. Valor de importancia ecológica en la parcela 5.	55
Figura 24. Valor de importancia ecológica en la parcela 7.	55
Figura 25. Valor de importancia ecológica en la parcela 8.	56
Figura 26. Valor de importancia ecológica en la parcela 9.	56
Figura 27. Valor de importancia ecológica en la parcela 10.	57
Figura 28. Análisis de factores con extracción de componentes principales.	62

## Índice de Fórmulas

Fórmula 1. Índice de equitatividad de Simpson (1-D).

28

## Resumen

El suelo es el hábitat de los hongos ectomicorrízicos, y complementa al tipo de hospedero al momento de explicar la estructura de la comunidad. Además, es un factor determinante para la diversidad. En México, los bosques de *Abies religiosa* los encontramos asociados con este tipo de hongos, y es posible encontrar a éstos de manera monodominante y monoespecífica, por lo que es viable aislar la variable arbórea para estudiar los parámetros del suelo. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de algunas propiedades del suelo sobre la estructura de la comunidad de hongos ectomicorrízicos. Establecimos 21 parcelas al azar (tres transectos por parcela (N=3)) y las describimos en función de dos variables: 1) la arbórea (distancia promedio entre árboles, diámetro a la altura del pecho y biomasa de raíces durante secas (mayo)), y 2) la edáfica (pH en agua, y en KCl, fósforo fácilmente extraíble, porcentaje de nitrógeno, porcentaje de carbono y conductividad eléctrica). Hicimos correlaciones no paramétricas de Spearman $_{\alpha=0.05}$ , análisis de varianza multivariado (MANOVA $_{\alpha=0.05}$ ), clúster por UPGMA y análisis de correspondencia canónica con las variables arbórea y edáfica, para seleccionar las parcelas de estudio. En estas parcelas fue donde extrajimos las micorrizas, además, nosotros tomamos medida de la densidad aparente, y la biomasa de raíces en la época de lluvias (octubre). También nosotros caracterizamos la comunidad de hongos al amplificar y secuenciar la región ITS de las micorrizas, y comparar las secuencias con la base de datos del GENBANK. Con las secuencias identificadas, determinamos la diversidad en las parcelas con el Índice de Simpson, y los estimadores de diversidad no paramétricos Chao 1 y Jack-Knife 1. También, calculamos la abundancia relativa, y la frecuencia absoluta y relativa. Comparamos la densidad aparente con un ANOVA $_{\alpha=0.05}$  con un *Post Hoc* de Tukey y la biomasa de raíces en octubre con la prueba de t de student $_{\alpha=0.05}$ . Para determinar el efecto del suelo utilizamos la correlación no paramétrica de Spearman $_{\alpha=0.05}$  y análisis de factores $_{\alpha=0.1}$ .

Para la selección de sitios en el análisis de Spearman $_{\alpha=0.05}$ , existieron correlaciones significativas ( $p<0.05$ ) y superiores al 90% en el carbono y el nitrógeno, también en el pH en agua y KCl. En el MANOVA $_{\alpha=0.05}$  entre los sitios, sólo la parcela tuvo un efecto significativo ( $p<0.05$ ). Con ayuda del análisis de agrupamiento por UPGMA y de correspondencia canónica, seleccionamos las parcelas homogéneas en sus características arbóreas y en un gradiente de pH, y de C y N. nosotros extrajimos 1198 micorrizas de las 10 parcelas, pero sólo analizamos 7 parcelas con 856 micorrizas. Nosotros enviamos a secuenciar 757 productos de PCR y recuperamos 591 secuencias útiles. Encontramos 91 unidades taxonómicas operativas (OTU's) de las cuales 87 pertenecen a hongos formadores de ectomicorrizas. De éstas 15 pertenecen al phylum Ascomycota y 72 a

Basidiomycota. *Clavulina cf. cinerea* tiene 76 secuencias, *Membranomyces spurius* 51, y Thelephoraceae sp. 1 tiene 39 secuencias, siendo estas tres las especies más abundantes. El género *Inocybe* presentó más especies (OTU's) (21), después *Tomentella* (10), y *Russula* (8). La parcela 9 presenta el mayor índice de diversidad de Simpson (1-D= 0.955) seguida por la parcela 10 (1-D= 0.942). La que presenta el menor índice es la parcela 1 (1-D=0.775). Para el estimador CHAO 1 encontramos que es posible obtener 147.07 especies y para el Jack-Knife 1, 129.86 especies. En la abundancia y frecuencia relativa se encontró que *Clavulina cf. cinerea* es la más abundante seguida por *Membranomyces spurius*. Para la frecuencia absoluta, *Clavulina cf. cinerea* fue la más frecuente, seguida por *Membranomyces spurius*. Estos dos valores (abundancia y frecuencia relativa) se ven resumidos en el valor de importancia de la comunidad, en donde *Clavulina cf. cinerea* fue la más importante, seguida por *Membranomyces spurius*. Thelephoraceae sp. 1 está en tercer lugar de importancia. Hubo una diferente producción de micorrizas entre las parcelas, y existió diferencia en la densidad aparente ( $p < 0.05$ ) en una parcela de los sitios, y no hubo un aumento significativo ( $p > 0.05$ ) en la producción de raíces entre los dos meses comparados (mayo y octubre), pero si hubo parcelas con diferente producción de biomasa de raíces.

Para la correlación no paramétrica de Spearman $_{\alpha=0.05}$ , el porcentaje de carbono y nitrógeno fueron significativos ( $r = 0.857, 0.821$   $p < 0.05$ ) con la diversidad (1-D). En el análisis de factores encontramos que el porcentaje de carbono y, el pH en agua y en KCl, son componentes del factor 1, además la biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre) es el factor 2. Con estos dos factores es explicamos el 73.05 % de la varianza de los datos. La salud del suelo (factor 1), está dado por el porcentaje de C y de N, y pH. Por lo que la diversidad está en función de la salud del suelo y de la biomasa de raíces. Así las propiedades del suelo tuvieron un efecto en la estructura de la comunidad al existir correlación entre variables que determinan la dominancia de un grupo en la comunidad.

## Abstract

Soil is the ectomycorrhizal fungi habitat, and is a complement to host type when explain community structure. Also, soil is an important factor for promoting diversity. *Abies religiosa* forests in Mexico, are associated with this type of fungi, and were possible to find forests in a monodominant and monospecific manner, so isolate arboreal variable for soil parameters study is worthwhile. Determination of soil effect on ectomycorrhizal fungal community was the objective of this work. We randomly established 21 plots (three lines per plots (N=3)) and we described in function of two variables, arboreal variable (tree distance average, breast height diameter, and dry root biomass on May), and edaphic variable (H<sub>2</sub>O and KCl pH, readily extractable phosphorous, nitrogen percent, carbon percent, and electrical conductivity). A Spearman<sub>α=0.05</sub> no parametrical correlation, multivariate analysis of variance (MANOVA<sub>α=0.05</sub>), UPGMA cluster and canonical correspondence analysis was made to variables for plot study selection.

On these plots, we extracted root tips, in addition, bulk density and root biomass on rainy season was recorded. We characterized fungal community by amplifying and sequencing the ITS region from root tips, and compared sequences with GENE BANK database. With identified sequences we characterized plot diversity using Simpson index, no parametric estimator Chao 1 and Jack-Knife. Also, we calculated relative abundance and absolute, and relative sequence. We compared bulk density with an ANOVA<sub>α=0.05</sub> with a Tukey *Post hoc*, and root biomass with a student *t* test. For soil effect determination, we used Spearman<sub>α=0.05</sub> no parametrical correlation, and factor analysis<sub>α=0.1</sub>. For select plots, we used Spearman<sub>α=0.05</sub> correlation (p<0.05), and superior to 90% on carbon and nitrogen, also H<sub>2</sub>O and KCl pH. For plot's MANOVA<sub>α=0.05</sub>, only plot was significative (p<0.05). Assisted by UPGMA cluster analysis and canonical correspondence, we selected homogenous plot in arboreal traits on plots, and in a pH, C and N gradient. We extracted 1198 root tips from 10 plots, but only 7 were analyzed, with 856 tips. 757 PCR products were sequenced and 591 useful sequences were recovered. We found 91 Operative Taxonomic Units (OTU), which 87 develop ectomycorrhizal association. Fifteen sequences were classified as Ascomycota, and 72 to Basidiomycota. *Clavulina cf. cinerea* had 76 sequences, *Membranomyces spurius* 51, and *Thelephoraceae sp. 1* had 39 sequences, being the three most abundant species. Genus *Inocybe* had more species (OTU's) (21), followed by *Tomentella* (10), and *Russula* (8). Plot 9 has higher Simpson diversity index (1-D= 0.955), succeed by plot 10 (1-D=0.942). Plot 1 has lowest index (1-D=0.775). Our Chao 1 estimated 147.07 and Jack-Knife 1, 129.86 species. *Clavulina cf. cinerea* was the most abundant in relative abundance, succeed by *Membranomyces spurius*. In absolute



frequency *Clavulina cf. cinerea* was the most frequent, followed by *Membranomyces spurius*. In relative frequency *Clavulina cf. cinerea* was the most frequent, followed by *Membranomyces spurius*. These two values (relative abundance and frequency) are resumed in ecological importance value, we find *Clavulina cf. cinerea* is the most important, succeeded by *Membranomyces spurius*, and Thelephoraceae sp. 1 is on third importance place. There are a different root tip production between the plots, and exist a plot different in bulk density ( $p < 0.05$ ), and there were not a significative increase ( $p > 0.05$ ) on root production between both months (May and October), but there were plots with different root biomass in May or in October. In Spearman $_{\alpha=0.05}$  no parametrical correlation, carbon and nitrogenous percent are significative ( $r = 0.857, 0.821$   $p < 0.05$ ) with diversity (1-D). In factor analysis we found carbon percent, H<sub>2</sub>O and KCl pH, were part of factor 1, and root dry weight (g) biomass (October) is factor 2. With 2 factors we can explain 73.05% of data variance. Soil site health (factor 1), is composed by carbon and nitrogen percent, and pH. So diversity is in function to soil site health and root biomass. Thus, soil had an effect on community structure because correlations there were between variables that determine dominance of a group in the community.

## Introducción

Las comunidades de hongos ectomicorrízicos para poder establecerse deben superar el filtro abiótico del suelo, y también deben ser compatibles con el hospedero (Koide *et al.* 2011). La capacidad de un hospedero para establecerse depende de su biología y del ambiente en donde espera establecerse. Esta interacción del hospedero-ambiente afecta a las comunidades de hongos en lo general, y en lo particular las propiedades del suelo tienen relación directa con la diversidad (Tedersoo *et al.* 2012). Así, ciertas propiedades de la Sierra de las Cruces permiten el establecimiento del hospedero de hongos ectomicorrízicos (*Abies religiosa*) en el Zarco Estado de México y son:

- *Geomorfología de la Sierra de las Cruces*

La secuencia de la Sierra de las Cruces separa la cuenca de México de la Cuenca del Lerma. Tiene una orientación de NNO-SSE y está formada por varios estratovolcanes andesíticos como el San Miguel, La Corona, Picacho, Zempoala, y el Ajusco, además de otras estructuras volcánicas, en su mayoría domos, calderas, y conos de escoria (García-Palomo *et al.* 2008). Cada volcán está hecho de flujos piroclásticos, caída de depósitos y flujos de lava, además de una gruesa secuencia de lajar y depósitos en avalancha asociados en ocasiones con el colapso de las estructuras. Esta secuencia se va adelgazando hacia los depósitos lacustrinos, fluviales, y aluviales de la cuenca del Lerma; en el caso de la secuencia de las Cruces presenta además, una capa de rocas más jóvenes del campo volcánico del Chichinautzin, y yace discordantemente en la punta de la Formación Tepoztlán. La edad de esta formación geológica es considerablemente variable, y tiene un intervalo de 13 a 6 millones de años (Ma) en la parte más norteña (Aguirre-Díaz y Carrasco-Hernández 1999), y de 8 a 5 Ma en la caldera Catedral (Aguirre-Díaz *et al.*, 1999). En el sur se estima de 2.87 a 0.39 Ma (Mora-Álvarez *et al.*, 1991) y de 3.4 a 0.6 Ma en el Volcán del Ajusco (Romero-Terán 1999, García-Palomo *et al.* 2002).

Los suelos derivados de depósitos o cenizas volcánicas son denominados andosoles en la FAO (2006) se presentan en asociación con las mayores zonas tectónicas del globo. Los andosoles son el grupo edáfico más representativo de la Faja Volcánica Transmexicana (FVT), debido a que se trata de suelos minerales derivados cenizas (García-Calderón *et al.* 2007). Los andosoles se clasifican como suelos minerales que tienen un horizonte vítrico o un horizonte ándico. Las propiedades ándicas, es decir de color oscuro, resultan del intemperismo moderado de los depósitos principalmente piroclásticos que pueden encontrarse de forma superficial como subsuperficialmente. Los horizontes ándicos generalmente contienen elevadas cantidades de

materia orgánica (más del 5%), y de ahí su color oscuro o pardo. También tienen una estructura macroesponjosa que resulta en una baja densidad aparente y con frecuencia una consistencia untuosa, esto debido a los alófanos presentes (García-Calderón *et al.* 2007, Brady y Weil 2008).

Los fosfatos son los aniones retenidos en mayor proporción por los andosoles, ya que algunos suelos adsorben más de 200  $\mu\text{g}$  (Gebhardt y Coleman 1974, Rajan y Fox 1975, Parfitt *et al.* 1977). Valera y colaboradores (1994), y Valera y Aguilera (1995), mostraron que existió una clara tendencia al aumento de la retención de fosfatos en andosoles, que junto con la característica de baja densidad aparente son características de éstos. Aguilera (1969, 1989) reportó valores de densidad aparente para andosoles mexicanos de 0.74 a 0.86  $\text{g}/\text{cm}^3$ , Álvarez (1982) reporta valores entre 0.68 y 0.90  $\text{g}/\text{cm}^3$  para Michoacán, Hidalgo (1986, 1988) en la Sierra Nevada de 0.72  $\text{g}/\text{cm}^3$  a 1.22  $\text{g}/\text{cm}^3$ , y Saucedo (1989, 1990) en de Puebla 0.82  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Es en este tipo de andosoles donde se establece y desarrolla preferentemente *A. religiosa* debido a que la densidad aparente baja es una característica determinante de los andosoles. Como se ha mencionado estos árboles establecen simbiosis mutualística con los hongos ectomicorrízicos y su desarrollo está influenciado por las dinámicas de los hongos y su interacción con el suelo. Así, las características geomorfológicas, edáficas y de humedad de la sierra de las cruces permiten el establecimiento de bosques de afinidad boreal, en este caso *Abies*, en la región del Neotrópico mexicano.

- *Los bosques de Abies en México*

Los bosques de coníferas, son frecuentes en las zonas de clima templado y frío del hemisferio boreal. En latitudes boreales están prácticamente desde el nivel del mar hasta el límite de la vegetación arbórea, prosperan en regiones de clima semiárido, semihúmedos, y húmedos además de que varios existen sólo en condiciones edáficas especiales de humedad y profundidad (Rzedowski 2006). En México estos bosques son un remanente de los bosques boreales y por lo tanto su afinidad biogeográfica es Neártica en cualquier lugar en donde estén (Rzedowski 2006), además de localizarse sólo en zonas montañosas.

México cuenta con 1 959 248  $\text{Km}^2$  o 195 924 800 ha de superficie total. La superficie de distribución potencial de bosques de Oyamel (*Abies*) es de 402 462 ha, y la superficie total comprendida hasta 2008 es de 142 269 ha (SEMARNAT 2008). Estos bosques de *Abies* comprenden un área de vegetación primaria con 127 960.61 ha, y de vegetación secundaria con 15 618.67 ha de superficie. Esto representa en porcentaje respecto a la cobertura de la superficie del país el 0.07% de superficie cubierta por bosques de *Abies*, de un total de 0.2% de superficie

potencial para bosques de *Abies*. Flores y colaboradores (1971) *sensu* Rzedowski (2006), cita que la extensión para 1971 de estos bosques era del 0.16% del área total del país, es decir 313 479.68 ha, lo que ha representado una disminución actual de la superficie que reportó SEMARNAT (2008) de 171 210 ha, siendo reducida en un 54.61 % de la distribución de 1971 a 2008.

- *Abies religiosa*

*Abies religiosa* (Kunth) Schlechtendal et Chamisso, está distribuida en la FVT. Los bosques se establecen en suelos derivados de rocas andesíticas desarrollándose típicamente entre los 2500 y 3500 m de altitud y presentan, casi siempre, un estrato arbóreo en donde son el elemento dominante, pero puede ser común que se mezcle con especies de los géneros *Pinus* o *Quercus* dependiendo de su posición en la montaña. También pueden existir en el estrato arbóreo inferior especies de *Alnus*, *Arbutus*, *Salix*, *Prunus*, *Garrya*, *Buddleja*, además de herbáceas como *Senecio*, *Eupatorium*, *Stevia* y *Archibaccaris* (Rzedowski 2006). En algunos casos en el estrato arbustivo *A. religiosa* se ve acompañada por *Roldana angulifolia*, *Syphoricarpos microphyllus*, *Cestrum anagyris*, *Solanum cervantesii* y *Physalis coztomatl* (Rivera-Hernández y Espinosa-Henze 2007). Los bosques de *A. religiosa* en condiciones de disturbio están perturbados con *Salix paradoxa*, *Garrya laurifolia*, *Sambucus nigra* y *Buddleja cordata*, además de encontrar *Berberis moranensis*, *Baccharis conferta*, *Roldana barba-johannis*, *Fuchsia microphylla* y *Rubus liebmannii* (Rivera-Hernández y Espinosa-Henze 2007).

- *Descripción del área de estudio*

El bosque de *A. religiosa* en El "Zarco", Estado de México, es monodominante, y está localizado en la Sierra de las Cruces dentro de la FVT. En el caso del bosque en el Zarco, los únicos árboles que presentarían simbiosis ectomicorrízica además de *A. religiosa* son: *Alnus jorullensis* y *Salix paradoxa*. De acuerdo con el INEGI (2011) estos bosques se desarrollan en el sitio en un suelo tipo Andosol úmbrico de textura media y una litología de roca ígnea extrusiva, con clima C(E)(w) (semifrío, subhúmedo con lluvias en verano). Además, Rodríguez-Palacios (2009) reportó que presenta una combinación de suelos de tipo Andosol húmico asociados con Andosol ocrico, ambos de textura media. También, en este mismo trabajo se reporta que la litología es de toba en la parte basal y de brecha volcánica en la parte superior de esta localidad.

Los estudios en campo de ecología de comunidades de ectomicorrizas presentan dificultades, no obstante trabajar con bosques monoespecíficos como los de *Abies religiosa* en el “Zarco” permite mantener cierta homogeneidad en las características arbóreas (una sola especie de planta hospedera de hongos ectomicorrízicos, amplia distribución en un continuo geomorfológico) lo que permite atribuirle la diversidad de la comunidad no a la diversidad de los hospederos, sino a las propiedades físico químicas del suelo. Por lo tanto es necesario describir la simbiosis ectomicorrízica y su interacción con las propiedades del suelo que pueden afectar a la comunidad de hongos ectomicorrízicos.

- *Generalidades de las ectomicorrizas*

Las ectomicorrizas son la asociación entre algunos grupos de hongos y las raíces de ciertas plantas, en donde las hifas de los hongos se distribuyen en los espacios intercelulares sin penetrar las células de las raíces (Molina *et al.* 1992, Smith y Read 2008). En los ecosistemas forestales la simbiosis micorrízica tiene mucha importancia porque los árboles dentro del bosque en las zonas templadas y boreales forman esta asociación (Horton y Bruns 2001). Las ectomicorrizas tienen un papel importante en el aporte de nutrientes a la planta hospedera y participan en el reciclaje de los nutrientes del suelo. La ectomicorriza se establece con el contacto de los hongos que envuelven a los pelos absorbentes de la raíz y promueven su reabsorción. El micelio del hongo empieza a envolver a la raíz y forma un arreglo especial conocido como manto. El micelio del hongo atraviesa la epidermis intercelularmente y rodea de forma extracelular a las células del córtex en donde se da el intercambio de nutrientes. A este arreglo de micelio que rodea a las células vegetales se le conoce como red de Hartig. El manto puede continuar desarrollándose y formar una capa de varias células de espesor (Peterson *et al.* 2001).

La simbiosis ectomicorrízica produce regularmente cambios morfológicos evidentes en la raíz, al contrario de lo que ocurre en las micorrizas arbusculares, estos cambios morfológicos en las raíces de los árboles ectomicorrízicos permiten caracterizar las propiedades cualitativas externas y con esto agrupar en morfoespecies y en algunos casos identificar el organismo causante de la asociación. No obstante este tipo de procedimientos son laboriosos y no permiten la diferenciación a nivel de especie por lo que se han ido sustituyendo paulatinamente con métodos que involucran herramientas de biología molecular (patrones de RFLP, secuenciación de regiones de ADN o secuenciación de nueva generación) que permiten en la mayoría de los casos una mejor determinación.

Los hongos ectomicorrízicos influyen en la productividad, el restablecimiento de la vegetación, la dinámica y sucesión de las comunidades de plantas además en la estabilidad del hábitat. Las ectomicorrizas pueden aumentar el crecimiento de los árboles, y benefician diferencialmente el crecimiento de las plántulas (Amaranthus 1998, Smith y Read 2008, Bonfante y Genre 2010). Los sistemas radiculares de las plantas se conectan por el micelio de los hongos ectomicorrízicos formando lo que se conoce como Red Micorrízica Común (RMC). Estas redes permiten el intercambio de azúcares simples y nutrientes entre distintas especies vegetales a través del micelio de los hongos. La red facilita el establecimiento de plántulas nuevas dentro de los bosques permitiendo su crecimiento además de mantener el hábitat, sin embargo la red se ve afectada por la distancia que pueda existir entre las plantas hospederas, evitando el desarrollo normal del bosque y el reclutamiento de plántulas (Selosse *et al.* 2006). Una parte importante de las redes micorrízicas es la diversidad de especies. La red es fundamental para el establecimiento de bosques. El primer paso en su estudio es analizar la estructura de la comunidad, y después los factores edafo-ecológicos que afectan la comunidad.

○ *Ecología de ectomicorrizas*

El número de especies de hongos ectomicorrízicos estaba estimado entre 5000 a 6000 especies (Molina *et al.* 1992, Baxter y Dighton 2005), pero Comandini y colaboradores (2012) reportaron un estimado de 20 000 a 25 000 especies con 7950 especies descritas, y representa un avance en los últimos 7 años. Además esta riqueza de hongos es alta en comparación de las 228 especies de hongos arbusculares (Schüßler y Walker 2010). Las especies de hongos no existen como entidades aisladas en el espacio, por lo que están sujetas a condiciones de interacción con otras especies y con su ambiente. Para el caso de los hongos ectomicorrízicos, estos tienen una estrecha relación con las raíces de su árbol hospedero y con el suelo en el cual viven y se desarrollan, por lo que su distribución y abundancia se ve afectada principalmente por ambos factores. Además, las especies de hongos tienen que interactuar a corto plazo con otras especies de forma mutualística, neutra o antagonista (Tuininga 2005). Así, las especies son entidades semi-independientes, por lo que otras especies pueden influenciar la presencia y la estructura de las comunidades de los hongos. En ecología de comunidades de hongos, una propiedad emergente y propia de ésta, es la diversidad, compuesta por la riqueza y la abundancia de especies conocida como diversidad alfa o local. El ensamblaje de la comunidad son las especies componentes y su arreglo de riqueza y abundancia, por lo que el ensamblaje de las comunidades puede ser diferente en sitios que presentan la misma

diversidad o una diversidad alta (Ricklef y Miller 1999). La abundancia relativa de cada especie identificará aquellas especies que por su escasa representatividad en la comunidad pueden ser más sensibles a las perturbaciones ambientales. Además, identificar un cambio en la diversidad, ya sea en el número de especies, en la distribución de su abundancia o en la dominancia, nos alerta acerca de procesos empobrecedores o extinciones locales (Moreno 2001). Sin embargo, como se destacó, la diversidad de las especies ectomicorrízicas es difícil de diagnosticar con técnicas morfológicas por lo que con técnicas de biología molecular es posible reconocer más entidades taxonómicas distintas y poder determinar la diversidad y su distribución espacial en el suelo. En el trabajo de Tedersoo y colaboradores (2003), encontraron la distribución espacial de las especies a una escala fina, y encontraron que la abundancia relativa de las especies cambia de forma horizontal y, de manera vertical en espacios de 5 cm verticales y de 50 cm horizontales. La composición de especies varía en distancias muy cortas de suelo, por ejemplo Izzo y colaboradores (2005a), encontraron cambios en la composición espacial en las ectomicorrizas entre muestras tomadas a una distancia de 5 cm. En el meta análisis de comunidades a nivel global de Tedersoo y colaboradores (2012), analizan que el 70% de la distribución de la riqueza está influenciado por factores edáficos, mientras que el 30% se lo atribuyen al hospedero.

- *Hospederos estudiados recientemente en el mundo*

Las comunidades de hongos ectomicorrízicos en el mundo han sido estudiadas numerosas veces, Tedersoo y colaboradores (2012) citaron 56 trabajos. Algunos de los hospederos que se han estudiado recientemente, y que son relevantes porque representa una mejoría en la cantidad y calidad de información de las bases de datos para la identificación de los miembros de la comunidad en los últimos años son: *Fagus sylvatica* (Kjøller 2006); bosques mixtos de *Abies homeolepis*, *Tsuga sieboldii*, *Betula maximowicziana*, *B. grossa*, *Fagus crenata*, *F. japonica*, *Quercus crispula* (Ishida et al. 2007); bosques mixtos de *Pseudotsuga menziesii*, *Betula papyrifera*, *Pinus contorta* var. *latifolia*, *Thuja plicata*, *Tsuga heterophylla* (Twieg et al. 2007); bosque mixto de *Quercus petraea*, *Q. rubra* y *Carpinus betulus* (Courty et al. 2008); bosques mixtos de *Nothofagus truncata*, *N. fusca*, y *N. truncata* (Dickie et al. 2009); comunidades de *Dryas acroptala* y *Salix reticulata* (Ryberg et al. 2009); selvas de *Anthonotha fragrans*, *Anthonotha macrophylla*, *Cryptosepalum tetraphyllum*, *Paramacrolobium coeruleum* y *Uapaca esculenta* (Diédhiou et al. 2010); *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus camaldulensis* (Jairus et al. 2011); comunidades mixtas de *Shorea obtusa*, *S. siamensis*, *Dipterocarpus obtusifolius*, *D. tuberculatus* (Phosri et al. 2012).

- *El suelo como hábitat y modelador de comunidades*

El suelo es un cuerpo natural complejo y dinámico. Además, es un sistema estructurado, heterogéneo y discontinuo, con microorganismos viviendo en microhábitats discretos (Nannipieri *et al.* 2003). Los suelos son el resultado de la interacción de varios factores: clima, organismos, material parental y el relieve (Coleman y Crossley 1996) moldeados por el tiempo (Brady y Weil 2008). De los suelos depende la productividad de las plantas, de los ecosistemas, y los ciclos biogeoquímicos, porque los microorganismos en el suelo degradan los compuestos orgánicos persistentes, liberando el carbono y el nitrógeno retornándolo de vuelta a la atmósfera. El 80 - 90% de los procesos que ocurren en el suelo están mediados por microorganismos (Coleman y Crossley 1996, Brady y Weil 2008). Los hongos y las bacterias son muy versátiles, ya que pueden efectuar casi todas las reacciones biológicas conocidas. Por lo tanto existe una relación casi directa entre la diversidad de microorganismos y la función de los suelos.

El suelo presenta diversas funciones ecológicas: es un regulador del ciclo hidrológico, un hábitat de organismos, interviene en la producción de biomasa, es un almacén, filtro y transformador de nutrientes, sustancias y agua, además de ser un reservorio de biodiversidad, una fuente de materiales diversos y un almacén de carbono. La capacidad de llevar a cabo alguna de estas funciones se llama calidad del suelo (Brady y Weil 2008). Cuando los suelos funcionan como parte del ecosistema el concepto se denomina salud del suelo (Brady y Weil 2008) en el cual la resiliencia, resistencia, y la carencia de síntomas de estrés en el suelo (como baja diversidad) reflejan la salud del suelo. De todas estas funciones, la diversidad biológica de microorganismos, presenta una relación con dichas funciones del suelo (como la regulación de los ciclos biogeoquímicos, descomposición de la materia orgánica, el ciclaje de los nutrientes, la bioturbación (formación de canales, poros, y agregados) y la supresión de enfermedades y plagas (Coleman y Crossley 1996, Brady y Weil 2008). Nannipieri y colaboradores (2003), argumentaron que la permanencia de funciones no está necesariamente relacionada con la estabilidad de las comunidades de microorganismos ya que suelos que conservan sus funciones ecológicas presentan una alta diversidad de organismos, pero con una estructura dinámica de la comunidad. La alta diversidad de microorganismos no es crítica para mantener los procesos de los ecosistemas bajo condiciones ambientales constantes o benignas, pero esta puede ser importante para mantener éstos procesos en condiciones cambiantes (Loreau *et al.* 2001). Esto se debe a que diferentes especies responden diferencialmente a las fluctuaciones ambientales (Yachi y Loreau 1999). Existe evidencia de que los organismos son funcionalmente redundantes y que las



características funcionales de las especies que la componen, son al menos, igual de importantes como el número de especies *per se* para mantener los procesos esenciales (Andren y Balandreau 1999, Bardgett y Shine 1999, Nannipieri *et al.* 2003). Un alto contenido de C orgánico, la estabilidad de los agregados, la capacidad de intercambio catiónico y la biomasa microbiana permiten que la equitatividad de microorganismos en el suelo sea resistente a las perturbaciones, ya que en suelos con una menor equitatividad catabólica (una medida indirecta de diversidad metabólica) presentan mayores perturbaciones en su función (Degens *et al.* 2001, Nannipieri *et al.* 2003). No obstante existen también otras propiedades que pueden explicar la diversidad en el suelo. Éstas propiedades afectan la estructura de las comunidades en el suelo, ya que ciertos organismos ocuparan diferentes hábitats, además de que estos interactuaran entre sí, lo que afectará también la estructura de la comunidad.

Las características abióticas y propiedades particulares de los suelos, son otros factores que influyen la riqueza y estructura de la comunidad de los organismos. Por ejemplo, la textura influye en el tamaño y cantidad de poros, que regulan la calidad y la dinámica del agua y aire, lo que determina la presencia de organismos aerobios o anaerobios en el suelo (Brady y Weil 2008).

La humedad del suelo es necesaria tanto para organismos terrestres como acuáticos. El oxígeno y el H<sub>2</sub>O determinan la presencia organismos aerobios, aerobios facultativos o anaerobios. La temperatura influye en la presencia de organismos ya que a más de 80 °C ocurre la muerte de la mayoría de ellos, y a temperaturas menores de 0 °C se detienen su actividad biológica. La luz/UV, interfiere con organismos con o sin pigmento, estos dos factores, la temperatura del suelo y la luz UV, aumentan cuando el suelo se encuentra expuesto a una mayor iluminación. El pH afecta la actividad microbiana y es óptima para la mayoría a pH cercano al neutro (Coleman y Crossley 1996, Brady y Weil 2008). Un cambio en la calidad de la materia orgánica (relación de C en proporción con el N) tendrá efecto la disponibilidad de nutrimentos lo que cambia la diversidad. También la materia orgánica (M.O.) afecta a las características estructurales, ya que los suelos son más porosos con mayores contenidos de M.O. El espacio poroso, el nitrógeno, el carbono, el fósforo, y el pH, afectan de manera diferente a las comunidades de hongos en el suelo por lo que se explican a continuación:

- *El espacio poroso*

En el suelo existe una interacción con la atmosfera, que está determinada por su cantidad de poros (Brady y Weil 2008). Los limos y las arcillas tienen menos cantidad de espacio poroso que las

arenas. No obstante, las arcillas tienden a organizarse en agregados lo que por lo que pueden funcionar como partículas de mayor tamaño. La cantidad de poros le permite al suelo actuar como un regulador en el ciclo hidrológico, ya que si la percolación excede a la evapotranspiración, entonces ocurre la recarga del acuífero, lixiviación (lavado) de nutrientes o contaminantes; si la percolación es menor a la evapotranspiración, se genera una acumulación de solutos (salinización, precipitación de carbonatos secundarios); si el escurrimiento superficial es mayor a la infiltración, entonces ocurre la erosión hídrica del suelo, pérdida radicular y el azolve (Brady y Weil 2008).

El sistema poroso actúa como un sistema de capilares con diferente conectividad entre poros, lo que le confiere propiedades muy importantes, tanto para regular al ciclo hidrológico como para determinar los microorganismos presentes en el edafón. El espacio poroso, cuya medida indirecta es la densidad aparente del suelo, determina la atmósfera oxidante o reductora. En una atmósfera oxidante, se facilitará la alta diversidad de bacterias que mineraliza rápidamente la M.O del suelo. En condiciones reductoras, es decir con ausencia de oxígeno, se favorece a los microorganismos fermentadores y bacterias reductoras del nitrógeno, lo que cambia las condiciones del hábitat, y esto produce un cambio en la estructura de la comunidad (Standing y Killham 2007).

#### ○ *Nitrógeno*

El nitrógeno es requerido en mayor cantidad por los microorganismos en el suelo, y a menudo es el factor limitante en el hábitat. Todos los hongos pueden usar aminoácidos como fuente de nitrógeno. Además, el papel de los hongos ectomicorrízicos es el de mejorar la adquisición de nitrógeno para el árbol hospedero, y la interacción es predominante en ecosistemas con nitrógeno limitante (Read y Pérez-Moreno 2003, Corrêa y Martins-Loução 2011). Los hongos ectomicorrízicos también pueden aumentar la cantidad de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) traslocado. La mayoría de especies de hongos que dominan en ecosistemas ectomicorrízicos prefieren el  $\text{NH}_4^+$  al nitrato ( $\text{NO}_3$ ) como fuente de N (Eltrop y Marschner 1996, Anderson *et al.* 1999, Plassard *et al.* 2000; Corrêa y Martins-Loução 2011). Por lo que la capacidad de los hongos de colonizar las raíces y de producir micelio extramatricial, aumenta cuando disminuye la disponibilidad del N indicando que la traslocación de C al hongo es mayor a niveles bajos de N (Wallander y Nylund 1991, Högberg *et al.* 2003, Nilsson y Wallander 2003, Treseder *et al.* 2004, Hobbie 2006, Correã *et al.* 2008, 2010, Corrêa y Martins-Loução 2011). También a lo largo de un depósito de N habrá mayor diversidad (Lilleskov *et al.* 2002, Kranabetter *et al.* 2009, Cox *et al.* 2010).

- *Carbono*

Las asociaciones micorrízicas tienen un efecto profundo en el metabolismo del carbono, generalmente la planta incrementa el transporte de éste hacia las raíces (Jones *et al.* 1991, Rygielwicz y Andersen 1994, Wu *et al.* 2002; Corrêa y Martins-Loução 2011). Un importante porcentaje de este carbono es transportado hacia las micorrizas y hacia el micelio del hongo, indicando que el simbionte fúngico es un importante sumidero de los carbohidratos de la planta hospedante (Wu *et al.* 2002, Corrêa y Martins-Loução 2011). El control en el flujo de carbohidratos de la planta hospedante en la simbiosis, es esencial para evitar el parasitismo por hongos (Nehls 2008). Varios estudios indicaron que las plantas micorrizadas traslocan más carbono al hongo conforme la disponibilidad de nutrientes disminuye, incluso si la cantidad de nutrientes provista por el hongo también desciende (Ingestad *et al.* 1986, Treseder y Allen 2002, Högberg *et al.* 2003, Hobbie 2006, Corrêa *et al.* 2008, 2010, Corrêa y Martins-Loução 2011).

- *Fósforo*

El fósforo tiene un impacto en la productividad de los ecosistemas terrestres ya que su disponibilidad en los mismos es baja (Brady y Weil 2008). Además, el fósforo en el suelo es muy insoluble y se encuentra formando compuestos de difícil asimilación. Las ectomicorrizas mejoran la absorción de P, ya que lo traslocan desde zonas en donde existe y pueden romper los enlaces de las formas menos disponibles de este elemento, evitando así la zona de escasez de éste en las raíces. Los hongos ectomicorrízicos preferencialmente traslocan carbono a las hifas que tienen acceso a minerales que contienen fósforo (Plassard y Dell 2010). Se ha demostrado que estos hongos liberan fosfomonoesterasas alcalinas que tienen como objetivo la mineralización del fosfato secuestrado en compuestos orgánicos (Plassard y Dell 2010) y también excretan menos ácido oxálico cuando hay más amonio en el medio (Plassard y Dell 2010), siendo mayor la liberación de P a la solución del suelo en pH ácidos.

- *pH*

Los hongos son tolerantes a los ambientes ácidos. Pueden modificar el pH alrededor de ellos y así crear su propio microambiente. Los cambios en la estructura de la comunidad han sido atribuidos a cambios en el pH (Dighton y Skeffington 1987, Agerer *et al.* 1998). Los cambios en el pH se deben a que la forma en la cual el nitrógeno se hace disponible para los hongos es a través de iones de  $\text{NH}_4^+$ , en este proceso utilizan el intercambio de iones  $\text{H}^+$  por iones de  $\text{NH}_4^+$  por lo que se excretan

activamente protones (Deacon 2006). En general la acidificación no reduce el grado de micorrización de las raíces finas, pero sí el número de puntas de raíces micorrizadas por volumen de suelo además del número de morfotipos (Cudlin *et al.* 2007). Un aumento del pH no afecta drásticamente a distintas especies de ectomicorrizas ya que la mayoría de las comunidades están adaptadas a condiciones de suelo ácidas (Read 1991), pero puede desencadenar un cambio en la estructura de la comunidad (Erland y Taylor 2002; Kraigher y Al Sayegh Petkovšček 2011).

Analizado lo anterior, el espacio poroso, el nitrógeno, el carbono, el fósforo, y el pH, notamos que las condiciones edáficas tienen una influencia en la riqueza y estructura de la comunidad de hongos ectomicorrízicos. Existe evidencia de la importancia de las condiciones del suelo en la configuración de las comunidades de estos hongos (Bruns 1995, Erland y Taylor 2002; Khernaghan 2005). Por lo que la cantidad, cualidad y heterogeneidad de la materia orgánica en el suelo tendrá una influencia significativa en la estructura de la comunidad (Khernaghan 2005). Así, la heterogeneidad del hábitat (Bruns 1995) y la repartición entre las especies es un factor adicional al tipo de hospedero (Tedersoo *et al.* 2012) al momento de explicar la diversidad de éstos hongos en el suelo. Usualmente una baja diversidad indica ambientes estresados. Una reducción en el número de especies en una comunidad de hongos micorrízicos puede estar negativamente influenciada por la capacidad de las poblaciones de micorrizas y plántulas para formar una simbiosis funcional. Existe la idea de que los athelioides y thelephoroides (*Thelephora terrestris*, *Tylospora fibrillosa*, y *Thelephora asterophora*) además de *Cenococcum geophilum*, pueden jugar un papel crucial en ecosistemas forestales estresados (Kraigher y Al Sayegh Petkovšček 2011).

Avis y colaboradores (2012), corroboraron que la perturbación artificial con N reduce la diversidad y cambia la composición, observando que aumenta la dominancia de ciertos grupos como *Russula* y *Lactarius*. La alta diversidad es importante para mantener los procesos de los ecosistemas bajo condiciones cambiantes (Loreau *et al.* 2001). Esto se debe a que diferentes especies responden diferencialmente a las fluctuaciones (Yachi y Loreau 1999) y por lo cual la diversidad le confiere propiedades de resistencia y resiliencia a éstos ecosistemas. Por lo tanto, las propiedades físicas y químicas del suelo van a alterar la composición de la comunidad y por lo tanto su diversidad.

## Antecedentes

- *Comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados con Abies en el mundo*

Para los árboles del género *Abies*, han sido elaborados 21 trabajos sobre ectomicorrizas, y se muestran en el Cuadro 1, existen tres varios de métodos de colecta y análisis: colecta de esporomas, colecta de morfotipos, análisis de patrones de RFLP, y análisis por técnicas de extracción, amplificación y secuenciación de ADN de los morfotipos o esporomas.

**Cuadro 1. Número de especies de hongos ectomicorrízicos reportadas en los 21 trabajos para los bosques del género *Abies*.**

Autor y año	Número de especies	Morfotipos caracterizados	Número de micorrizas extraídas	Método de muestreo y tipo de análisis
Vogt <i>et al.</i> (1982)	1	-	-	Esporomas
Berndt <i>et al.</i> (1990)	4	-	-	Morfotipos
Pillukat (1996)	1	1	-	Morfotipos
Kernaghan <i>et al.</i> (1997)	15	-	-	Morfotipos, patrones de RFLP y secuenciación
Agerer y Ammirati (1998)	1	1	-	Morfotipos
Commandini <i>et al.</i> (1998)	25	25	-	Morfotipos
Matsuda e Hijii (1998)	39	-	-	Esporomas
Kranabetter <i>et al.</i> (1999)	14	74	19200	Morfotipos
Massicotte <i>et al.</i> (1999)	10	10	-	Morfotipos
Matsuda e Hijii (1999a)	2	16	6156	RFLP y Esporomas
Matsuda e Hijii (1999b)	16	37	-	Morfotipos
Eberhardt <i>et al.</i> (2000)	3	-	-	Morfotipos, patrones de RFLP y secuenciación
Laganà <i>et al.</i> (2002)	45	-	-	Esporomas
Kernaghan <i>et al.</i> (2003)	3	33	100	Morfotipos
Matsuda e Hijii (2004)	18	37 en plántulas + 26 en árboles maduros	1652 raíces en 129 plántulas + 1841 de árboles maduros	Morfotipos
Izzo <i>et al.</i> (2005a)*	100	-	1300	Morfotipos y secuenciación
Izzo <i>et al.</i> (2005b)*	69	-	-	Secuenciación directa, esporomas y esporas

Izzo <i>et al.</i> (2006)*	6	-	1005	Morfotipos y patrones de RFLP
Ishida <i>et al.</i> (2007)*	46	-	1396	Morfotipos, patrones de RFLP y secuenciación
Nuytinck <i>et al.</i> (2007)	2	-	-	Secuenciación
Kranabetter <i>et al.</i> (2009)*	74	63	-	Morfotipos y secuenciación

\* Bosques no monoespecíficos.

- *Comunidades de hongos ectomicorrízicos en México*

Los estudios de diversidad para hongos ectomicorrízicos en México se han conducido principalmente utilizando esporomas, pero en los últimos años se han elaborado 12 estudios con un enfoque hacia las ectomicorrizas en bosques de *Pinus*, *Quercus* y *Alnus* (Cuadro 2), en los que existen tres metodologías distintas para determinar la diversidad, colecta de esporomas, morfotipos, y por técnicas de extracción, amplificación y secuenciación de ADN de los morfotipos.

**Cuadro 2. Estudios de hongos ectomicorrízicos en México donde se muestra el número de especies reportadas y el tipo de metodología en 12 estudios en México con enfoque hacia los hongos ectomicorrízicos.**

Autor y Año	Número de especies	Método
Garibay-Orijel (2008)	231 en <i>Pinus</i> spp.	Secuenciación de ADN de los morfotipos
Morris <i>et al.</i> (2008a)	154 en <i>Quercus</i> spp.	Secuenciación de ADN de los morfotipos
Morris <i>et al.</i> (2008b)	44 en <i>Quercus</i> spp.	Secuenciación de ADN de los morfotipos
Smith y Pfister (2009)	6 en <i>Quercus</i> spp.	Secuenciación de ADN de los morfotipos
Montoya <i>et al.</i> (2010)	2 en <i>Fagus grandifolia</i>	Secuenciación de ADN de los morfotipos

---

<b>Reverchon et al. (2010)</b>	7 en <i>Pinus montezumae</i>	Secuenciación de ADN de los morfotipos
<b>Aguilar-Aguilar et al. (2011)</b>	6 en <i>Pinus jeffreyi</i>	Morfotipos
<b>Hasselquist et al. (2011)</b>	4 especies en <i>Guapira</i> , <i>Neea</i> , <i>Pisonia</i> , y <i>Coccoloba</i>	Esporomas
<b>Kennedy et al. (2011)</b>	23 en <i>Alnus jorullensis</i> y <i>A. acuminata</i>	Secuenciación de ADN de los morfotipos
<b>Reverchon et al. (2011)</b>	21 en <i>Pinus montezumae</i>	Esporomas
<b>Reverchon et al. (2012)</b>	26 y 29 OTUS en plántulas y adultos de <i>Pinus montezumae</i> respectivamente	Secuenciación de ADN de los morfotipos
<b>Garibay-Orijel et al. (2013)</b>	27 en <i>Pinus</i> spp.	Secuenciación de ADN de los morfotipos

---

- *Comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados con Abies en México*

En México para los bosques de *A. religiosa*, Estrada-Torres (2003) enlistó 550 especies de hongos potencialmente ectomicorrizógenas. Además, refiere que los trabajos de León y Guzmán (1980), Quintos y colaboradores (1984) y Garza y colaboradores (1985), donde se hicieron listados sobre la micobiota ectomicorrizógena del sur de Veracruz, Durango y la parte central de Nuevo León respectivamente. También en los trabajos de Gispert *et al.* (1984), Garza-Ocañas (1986), Kong-Luz (1998), y Varela *et al.* (2000), se proporcionan listados de hongos ectomicorrízicos. No obstante todos estos listados únicamente están basados en muestreos de esporomas en donde adjudican su asociación micorrizica a través de la literatura. Para México en bosques de *Abies* no existen trabajos que se enfoquen de manera puntual en el estudio de las ectomicorrizas, los trabajos que existen (Cuadro 3) utilizan esporomas, y reportan algunas especies como ectomicorrízicas mediante la literatura.

**Cuadro 3. Número de especies de hongos ectomicorrízicos reportados para *Abies religiosa* en México.**

<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>Especies</b>
<b>Guzmán</b>	1972	30
<b>Guzmán y Villareal</b>	1984	36
<b>Valenzuela <i>et al.</i></b>	2004	2
<b>Montoya <i>et al.</i></b>	2005	24
<b>Arteaga y Moreno</b>	2006	18
<b>Landeros <i>et al.</i></b>	2006	25
<b>Montoya <i>et al.</i></b>	2007	4
<b>Villaruel y Cifuentes</b>	2007	7
<b>Guzmán <i>et al.</i></b>	2009	39
<b>Pérez-Moreno <i>et al.</i></b>	2010	20
<b>Franco-Mass y Burrola</b>	2010	25
<b>Medel <i>et al.</i></b>	2012	2

Peña-Cabriales y Valdés (1973) reportaron que las ectomicorrizas aisladas de *Abies religiosa*, presentan un antagonismo hacia cepas de hongos patógenos de raíces, incluso teniendo potencial de inocular otras especies como *Pinus* y aún pueden mantener la capacidad antagónica contra estos parásitos.



## Justificación

Los bosques de *Abies religiosa* presentan una extensión muy limitada en México, distribuyéndose en condiciones de elevada humedad y bajas temperaturas. También, en contraste con otros países donde se han efectuado estudios de ecología de ectomicorrizas en bosques de *Abies* pero no moespecíficos, en México los bosques se encuentran de forma monodominante y monoespecífica. Se ha demostrado que la diversidad de ectomicorrizas depende del tipo de hospedero y del suelo, pero para el caso de *Abies religiosa*, no existen trabajos donde se estudie de forma exclusiva el suelo en bosques monodominantes y monoespecíficos. Además, su distribución en el país ha sido reducida en más del 50%, por lo que es importante generar datos sobre las ectomicorrizas de esta especie. Por lo que nuestro estudio explora por primera vez, el efecto de algunas propiedades del suelo sobre la comunidad de hongos ectomicorrízicos en sitios con características arbóreas similares.

## Objetivos

- *General*

Evaluar el efecto de la heterogeneidad de las características físicas químicas del suelo sobre la diversidad especies en la estructura de la comunidad de los hongos ectomicorrízicos asociados al bosque de *Abies religiosa* en la comunidad de hongos ectomicorrízicos en el “Zarco”, San Pedro Atlapulco, Estado de México.

- *Específicos*

Utilizar análisis estadísticos multivariados (UPGMA y correspondencia canónica) para seleccionar las parcelas con la variable arbórea similar y en un gradiente de suelo.

Conocer el número de especies de hongos ECM en las micorrizas asociadas a *A. religiosa*, al amplificar la región ITS y compararla con la base de datos del Genbank para caracterizar la comunidad de micorrizas.

Calcular la abundancia y frecuencia de especies en las micorrizas asociadas a los bosques de *A. religiosa* para determinar la diversidad al obtener el Índice de Simpson.

Relacionar la variable del suelo con la diversidad al utilizar la correlación de Spearman y el análisis de factores.

**Hipótesis:**

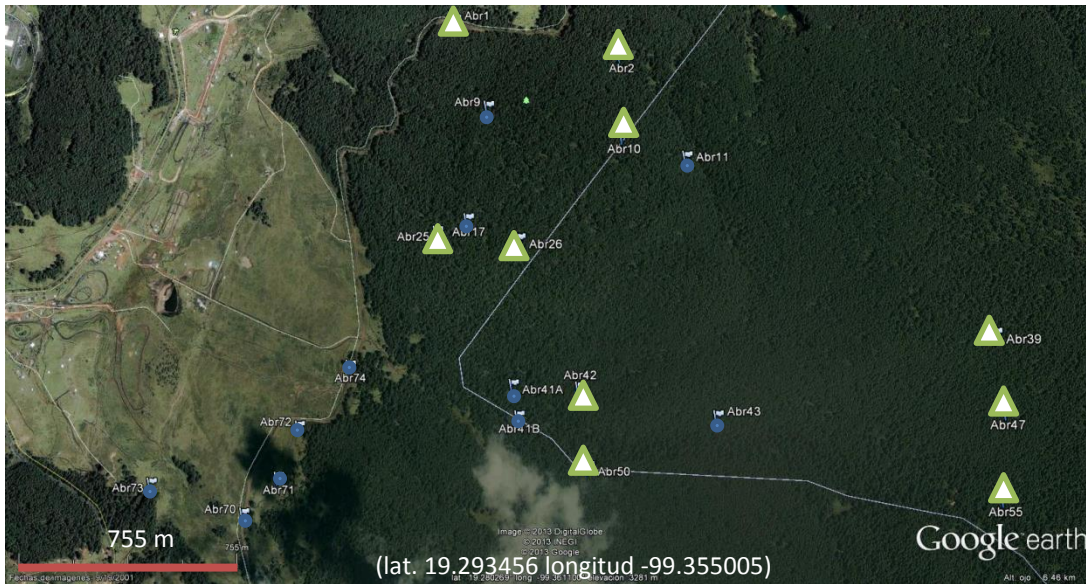
Debido a la alta especificidad de los hongos ectomicorrízicos con su planta hospedera y la capacidad de *A. religiosa* de formar bosques monoespecíficos y monodominantes, el tener homogeneidad en las variables arbóreas permitirá que no exista diferencia entre la diversidad (riqueza y abundancia), al variar las propiedades físico químicas del suelo. De existir esta diferencia en la diversidad, será posible atribuirla a las características del suelo.

**Metodología**

- *Selección de parcelas de muestreo*

El estudio se llevo a cabo en las tierras comunales del “Zarco” (lat. 19.293456 longitud -99.355005) pertenecientes a la comunidad de San Pedro Atlapulco en el Estado de México, por tener bosques modominantes y monoespecíficos, con un tipo específico de suelo (Andosol) además de presentar facilidad para su acceso por tener senderos y estar en cercanía de la Ciudad de México. Para seleccionar las parcelas de muestreo en el “Zarco” nosotros utilizamos un diseño experimental con un muestreo completamente al azar (Figura 1). Se caracterizaron todas las parcelas en cuanto a sus variables arbóreas y de suelo.

La zona, se dividió en 64 cuadrantes de 250 m<sup>2</sup> sobreponiendo una cuadrícula en la imagen satelital del Google Earth®. Con estos cuadrantes se utilizó la página [www.random.org](http://www.random.org), para seleccionar números al azar (porque presenta verdadera aleatoriedad, ya que está basado en ruido espacial, y no en algún algoritmo) para seleccionaron al azar 21 de los 64 cuadrantes. En estos cuadrantes seleccionados se estableció una parcela de 60 m x 60 m en la esquina superior izquierda (en total 21 parcelas). Las coordenadas se grabaron en un GPS (Garmin eTrex®) para localizarlas en el campo.



**Figura 1. Localización de los 21 parcelas de muestreo en la localidad del “Zarco”, Municipio de San Pedro Atlapulco, Estado de México. Los círculos y los triángulos señalan la localización de las parcelas. Sólo se analizaron para las ectomicorizas los sitios señalados con triángulos (imagen Google earth ®).**

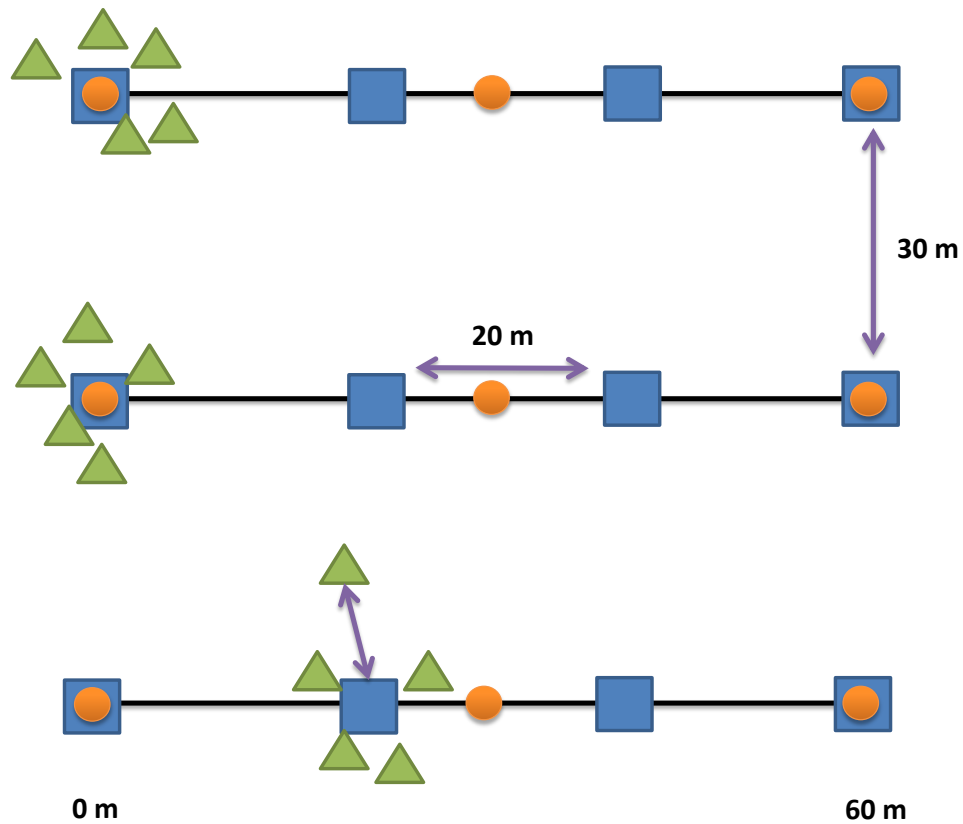
- *Caracterización de las parcelas*

Durante mayo de 2011 en cada una de estas parcelas se establecieron tres transectos de 60 metros de largo separados entre sí por 20 m. Para caracterizar la variable arbórea los transectos se dividieron en cuatro puntos (metro 0, 20, 40 y 60) y en estos puntos, en total 12 por parcela, se localizaron los cinco árboles más cercanos al punto y se les midió su distancia al punto (metro 0, 20, 40, 60) y el perímetro a la altura del pecho de cada árbol para obtener el diámetro a la altura del pecho (DAP).

Para caracterizar la variable del suelo, en el metro 0, 30 y 60 de cada transecto se tomaron dos núcleos de suelo con ayuda de un tubo de PVC de 30 cm de largo por 2.5 cm de diámetro, ya que es similar a la utilizada en otros estudios (Rerverchon *et al.* 2010, Kennendy *et al.* 2011), en total se tomaron 18 submuestras por parcela (Figura 2), nueve submuestras para los análisis de suelo (en una muestra compuesta por parcela) y nueve submuestras para cuantificar la biomasa de raíces. El suelo contenido en todos los núcleos se almacenó en bolsas de plástico en campo y se colocó en el refrigerador para ser procesado posteriormente. El suelo en las bolsas destinadas para los análisis, se secó colocándolo en una bolsa de papel estraza etiquetada en una secadora a

65 °C por cinco días. El suelo seco se dividió en dos partes iguales, dejando la mitad en almacén y mezclando el suelo restante por cada submuestra por cuadrante para formar una muestra compuesta. Este suelo total, se tamizó para quitar las rocas de mayor tamaño y trituró para los análisis de suelo en el Instituto de Geología de la UNAM. Los análisis fueron los siguientes: porcentaje de nitrógeno (% N), y porcentaje de carbono (% C) analizados por el analizador elemental Perkin-Elmer® 2400 utilizando acetanilida para calibración y con temperaturas de combustión de 980 °C y de reducción de 640 °C; Conductividad eléctrica (C.E.), pH en agua (pH H<sub>2</sub>O), pH en cloruro de potasio (pH KCl) en relación 1:2.5 con agitación de 18 horas, con conductímetro y potenciómetro respectivamente; fósforo fácilmente extraíble (P) por el método de Bray, usando ácido ascórbico como agente reductor en espectofotómetro Genesys® 20. Las nueve submuestras de suelo destinadas para la biomasa de raíces se lavó en un tamiz de 2 mm de abertura de malla, para obtener las raíces de *Abies religiosa*. Estas raíces se diferencian de otras por presentar una apariencia leñosa, tener un característico color rojo y presentar micorrizas. Las otras raíces se descartaron ya que no estaban lignificadas, y la presencia de otros posibles hospederos arbóreos fue verificada en campo para no tomar raíces de árboles distintos de *A. religiosa*. Las raíces se pesaron, después se almacenaron en bolsas de papel y se secaron en la estufa a 65 °C y posteriormente se tomó su peso seco. De cada transecto se obtuvo el valor promedio de los datos de distancia, DAP y biomasa de raíces, en cada parcela (N=21 con tres observaciones (transectos) por parcela). Con estos datos se hizo una correlación múltiple de Spearman<sub>α=0.05</sub>. Para seleccionar las parcelas a estudiar, se efectuaron pruebas de normalidad en los datos de Distancia (m), DAP (m) y Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo). Los datos que no cumplieron la normalidad fueron Log<sub>10</sub> transformados. A los datos normales o normalizados, se le efectuó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) con *Post hoc* de Tukey para encontrar si había diferencias entre alguna parcela en función de sus variables arbóreas.

Los datos de suelo y arbóreos se analizaron con técnicas exploratorias multivariadas (UPGMA y Correspondencia Canónica) y se seleccionaron sitios de estudio basados en la similitud de su componente arbóreo, para así tener controlada la variable de estructura arbórea y comprobar la hipótesis nula. La normalidad, correlación no paramétrica de Spearman, MANOVA y clúster por UPGMA se hicieron con el programa STATISTICA 10 (Statsoft®) mientras que el Análisis de correspondencia canónica con el Software R (R-Project) usando la librería Vegan.



**Figura 2. Sitios de toma de datos de árboles y muestreo de suelo para seleccionar las parcelas de muestreo de ectomicorrizas. Los triángulos representan los árboles, los círculos los puntos de muestreo de raíces y suelo, y los cuadrados los puntos a partir de los cuales se seleccionaron los cinco árboles más cercanos.**

- *Muestreo de ectomicorrizas y densidad de suelo*

El muestreo de ectomicorrizas se llevó a cabo en 10 parcelas que resultaron similares en la variable arbórea y presentaron un gradiente en las características de suelo durante el mes de mayo de 2011 a partir de los análisis exploratorios multivariados. La presencia de ectomicorrizas se monitorizó durante los meses de agosto y septiembre para iniciar el muestreo cuándo comenzó la producción de micorrizas. La producción empezó en octubre de 2011, por lo que fue cuando realizamos el muestreo de raíces para extraer las ectomicorrizas. El criterio para determinar que empezó la producción de micorrizas, fue cuando en las raíces aparecieron estructuras engrosadas, no leñosas, con colores brillantes y presentaban turgencia. En cada parcela se colocó una línea de 60 m (Figura 3). Cada 20 m se colocó una línea paralela a la pendiente y otra perpendicular a ésta, sobre la cual se tomaron muestras de suelo cada 20 m (3 submuestras por línea) para micorrizas

con un tubo de PVC de 2.5 cm por 30 cm. Al extraer el núcleo el contenido se colocó en una bolsa de plástico y se etiquetó. Además, antes de tomar la muestra con el tubo de PVC, se tomaron muestras para densidad aparente del suelo utilizando cilindros Eijkelkamp® (07.53.SA Sample ring kit, model A). Estos cilindros se ensamblaron a una pieza más grande y después de retirar el mantillo del suelo, se tomó la muestra procurando que el suelo en el cilindro saliera completo. Después se rotuló y se guardó con la tapa. En el laboratorio se tomó el peso del cilindro con suelo, para después secarlos a 65 °C por 2 días. Posteriormente se volvió a pesar y se continuó secando hasta que el peso no varió. El peso de cada cilindro se tomó previamente y se restó al peso del suelo seco. El peso del suelo seco se multiplicó por el volumen del cilindro (100 cm<sup>3</sup>), para calcular la densidad aparente. Se comparó las densidades aparentes entre parcelas con un ANOVA<sub>α=0.05</sub> con el programa STATISTICA 10 (Statsoft®).

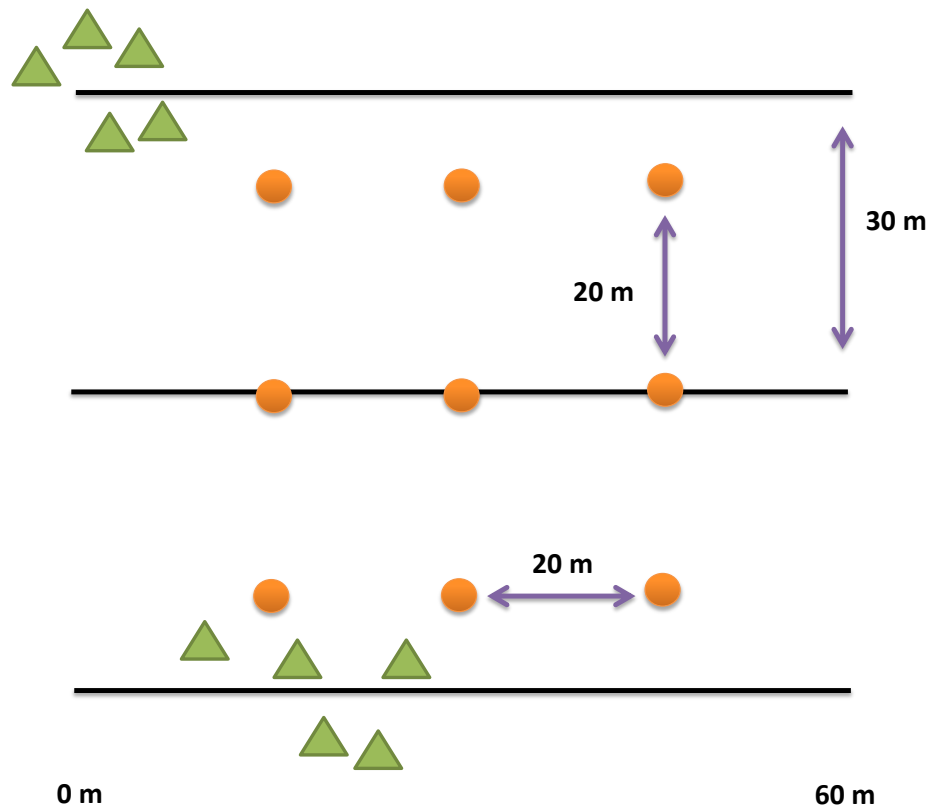


Figura 3. Diseño de toma de datos de densidad de suelo y raíces de *A. religiosa*. Los círculos son los sitios donde se tomaron los datos dentro de la parcela. Los triángulos representan los árboles.

- *Disección de las ectomicorrizas*

Para obtener las ectomicorrizas se tamizó el suelo a través de dos tamices, uno de 850 micras y el otro de 2 mm de abertura, sobre el cual se colocó el suelo. Con agua se enjuagó con suavidad el suelo y se colocó el contenido de raíces que quedó sobre los tamices en una tina de color blanco (para facilitar la observación de raíces) llena de agua, en donde se extrajeron las raíces con las ectomicorrizas con ayuda de pinzas de punta fina y se colocaron en frascos de plástico con agua destilada fría. Al extraer todas las raíces, los frascos se refrigeraron. Las raíces se extajeron la misma semana de recolecta. Las micorrizas se disectaron en una caja de Petri bajo un microscopio estereoscópico. Las que fueron seleccionadas, estuvieron turgentes y presentaron colores distintos a los de la raíz, además de patrones de ramificación distintivos (Agerer 2002). Se extrajeron las micorrizas mayores a 1 mm para colocarlas en una caja Petri con agua destilada fría. Las raíces restantes, se colocaron en papel absorbente y en bolsas de papel estraza y se secaron a 65 °C. Al tener todas las micorrizas, la caja Petri se colocó sobre una hoja cuadriculada y numerada y se seleccionaron 15 micorrizas al azar. De éstas, se registró el color y el tipo de ramificación que presentaron, y se colocaron en tubos Eppendorff® con agua destilada fría. Las ectomicorrizas se mantuvieron en frío durante la disección y posteriormente se refrigeraron. La biomasa de las raíces producidas en mayo y en octubre de 2011 se comparó utilizando una prueba de t de student <sub>$\alpha=0.05$</sub>  con el programa STATISTICA 10 (Statsoft®).

- *Determinación de las especies con herramientas de biología molecular*

- *Protocolo de extracción de ADN*

El ADN se extrajo utilizando placas para PCR (GENEMate®, ISC BioEXpress) de 96 pozos, en cada pozo se colocaron 10  $\mu$ L de solución de extracción (ES) del kit Xnap REDEX xtract-N-Amp (Sigma-Aldrich®), y se colocó en cada uno un fragmento de 1 mm de ectomicorriza. Después se calentó en un termociclador (Applied biosystem®) a 65 °C por 10 minutos y 95 °C por 10 minutos para permanecer a 4 °C. Al terminar el programa a cada pozo se le añadieron 30  $\mu$ L de solución de disolución (DS) del mismo kit. Cada placa se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente y después se guardó en el refrigerador a -20° C.

- *Reacción de PCR*

Una vez que se extrajo el ADN se procedió amplificar la región de los ITS (ITS1, 5.8 S e ITS2) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los primers ITS1F

(CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Gardes y Bruns 1993) y el ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Se hizo una solución maestra (7.6  $\mu$ L de agua didestilada, 10  $\mu$ L de solución REDEX (Sigma- Aldrich®), 0.2  $\mu$ L de Primer ITS1F y 0.2  $\mu$ L de ITS4) para colocar 18  $\mu$ L de ésta en cada pozo y se les agregaron 2  $\mu$ L de ADN. Posteriormente, cada placa se colocó en un termociclador (Applied biosystem®) con el siguiente programa: 94 °C 3 min (temperatura de desinhibición de Taq polimerasa); 34 ciclos de: 94 °C 1 min (desnaturalización), 51 °C 1 min (alineamiento), 72 °C 1 min (elongación); al terminar los 34 ciclos, 8 min en 72 °C para terminar en 4 °C. Para verificar la existencia de la amplificación de la región ITS se procedió a hacer un gel de electroforesis para cada placa.

- *Electroforesis*

Para preparar TBE 10x se pesaron 54 g de Tris, se disolvieron en 400 mL de agua desionizada. Al matraz con la solución se le añadieron 27.5 g de ácido bórico, luego se agregaron 20 mL de EDTA 0.5 M. El matraz se aforó hasta 500 mL. En otro matraz de 500 mL, se disolvieron 2 g de agarosa en 200 mL de buffer TBE 0.5x, y se calentó suavemente en un horno de microondas, al estar a 60 °C se le añadió 1  $\mu$ L de tinte REDGEL (Biotium®). Posteriormente se vertió en un molde, y se colocó el peine, que formaron los pozos donde se colocaron las muestras. En cada uno de los pozos se depositaron 4  $\mu$ L de producto de PCR, luego el gel se cubrió con buffer TBE al 1x y se colocó en una cámara de electroforesis a 100 V por 45 m. Una vez terminado, se colocó el gel en la cámara de UV (Kodak-Eastman ®) para revelar las bandas. Una vez que se verificó que las muestras amplificaron se procedió a realizar un protocolo de limpieza en los productos de PCR para enviarlos a secuenciar.

- *Limpieza de productos de PCR*

En un tubo Eppendorff se añadió 1  $\mu$ L de Exo-SAP-IT (Affymetrix®) y se agregó 1  $\mu$ L de agua didestilada, esto se repitió para el número total de muestras. Se añadieron 2  $\mu$ L de la solución de Exo-SAP-IT a cada pozo, y se le agregaron 3.5  $\mu$ L de producto de PCR. Al terminar, se homogeneizó suavemente con el vórtex y posteriormente se centrifugó por 30 s a 2990 RPM. A continuación se colocaron las muestras en el termociclador con un programa de 37 °C por 45 minutos, 80 °C por 15 minutos y 4 °C para terminar. El producto limpio se envió a la unidad de secuenciación del Instituto de Biología (UNAM), la cual se encargó de la secuenciación.



- *Edición de secuencias*

Los electroferogramas se editaron con el programa GENEious 5.5 (Biomatters®), las secuencias útiles se agruparon en contigs al 90, y 80 % de similitud, la edición consistió en verificar la longitud de las secuencias (600-800 bp), eliminar la región de los primers (extremos terminales), y detectar o corregir errores en las identidades de los nucleótidos.

- *Procedimientos de bioinformática (BLAST)*

Las secuencias editadas, se ensamblaron en secuencias consenso al 97% de similitud ya que esta es la media de asociación utilizada por consenso para hongos (Peay *et al.* 2008), y se compararon por medio del algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1990) con la base de datos del GENBANK (NCBI®) únicamente con ejemplares voucher de esporomas, para así asignarle una identidad a cada unidad taxonómica operativa (OTU), a las secuencias que superaban el 97% de similitud.

- *Estudios de diversidad*

Al tener la identidad de cada OTU se elaboró una lista de taxones, además de gráficas del número de secuencias por OTU, el número de especies por género, y el número de secuencias por familia. Se analizó la comunidad utilizando la diversidad local (alfa) en función del Índice de equitatividad de Simpson (1-D) con la dominancia de especies (Krebs 1999):

$$D = \sum \left( \frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \right) \quad (1)$$

$n_i$  = número de secuencias de la especie *i-ésima*

$N$  = número total de secuencias

$D$  = Dominancia de especies de Simpson

Se utilizaron los estimadores de riqueza no paramétricos CHAO 1 y Jack-Knife 1, y se constituyó la curva de rarefacción de especies por parcela. Los análisis de diversidad se hicieron con el software Biodiversity PRO (SAMS®). Para la descripción de la comunidad utilizamos la abundancia relativa, la frecuencia absoluta y la frecuencia relativa de las secuencias (Horton y Bruns 2001) para la abundancia relativa se utilizó la cantidad de secuencias por OTU dividida sobre la cantidad de secuencias. Para la frecuencia absoluta se dividieron las ocasiones de aparición de la secuencia por parcela (máximo 9) sobre el total de parcelas utilizadas, y para la frecuencia relativa se dividió la

sumatoria de la frecuencia absoluta sobre el total de parcelas analizadas. Además, se resumieron los valores en el Valor de Importancia Ecológica (VIE) (Horton y Bruns 2001, Garibay-Orijel *et al.* 2009).

- *Análisis del efecto del suelo sobre la diversidad*

En las parcelas utilizadas se verificó la normalidad de las variables del suelo y de diversidad y en caso de no cumplir este supuesto se transformaron  $\text{Log}_{10}$ . A las variables se les hizo una correlación no paramétrica de Spearman $_{\alpha=0.05}$ , además de un análisis multivariado de factores con extracción de componentes principales con el programa STATISTICA 10 (Statsoft®) y así inferimos el efecto de las variables del suelo en la diversidad.

## Resultados

- *Selección de sitios de estudio y variables arbóreas*

En el Cuadro 4, se muestran los resultados obtenidos de los muestreos por parcela, todos los valores son promedios de las submuestras. Observamos que existen gradientes entre las variables (distancia de: 3.462 a 7.334 m; DAP de: 0.062 a 0.577 m; Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo) de: 0.1 a 0.511 g; pH H<sub>2</sub>O de : 5.48 a 6.225 ; pH KCl de :4.825 a 5.65; fósforo de: 0.07 a 1.69 mg/Kg; porcentaje de carbono de: 5.202 a 13.118; porcentaje de nitrógeno de :0.34 a 0.804; conductividad eléctrica de: 0.087 a 0.158 dS/m) y que hay unas parcelas más parecidas a otros.

**Cuadro 4. Características de vegetación arbórea y suelo de las parcelas.**

Parcela	Distancia (m)	DAP (m)	Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo)	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl	P mg/Kg	% C	% N	CE dS/m
1	6.272	0.564	0.160	6.040	5.420	0.420	6.160	0.415	0.144
2	5.781	0.544	0.100	5.835	5.190	0.490	8.872	0.515	0.141
9	7.095	0.548	0.177	5.835	5.220	0.740	7.578	0.435	0.142
10	6.397	0.496	0.101	5.855	5.265	0.600	6.374	0.371	0.138
11	4.928	0.523	0.108	6.055	5.510	0.885	5.682	0.340	0.138
17	7.334	0.509	0.511	6.040	5.460	0.455	8.126	0.463	0.135
25	5.613	0.577	0.187	6.225	5.650	0.525	8.030	0.482	0.158
26	6.227	0.521	0.188	6.000	5.385	0.990	6.923	0.423	0.154
39	6.637	0.524	0.201	5.535	4.855	1.690	10.439	0.637	0.120
42	5.821	0.542	0.120	5.870	5.260	0.385	8.762	0.520	0.122
43	6.053	0.440	0.287	5.870	5.260	0.810	9.118	0.486	0.119
47	6.314	0.505	0.167	5.815	5.220	0.670	7.966	0.412	0.113
50	5.453	0.515	0.172	5.740	5.125	0.315	8.939	0.515	0.105
55	5.834	0.470	0.173	5.485	4.825	0.385	9.300	0.553	0.112
70	5.990	0.301	0.111	5.870	5.265	1.340	9.306	0.663	0.099
71	5.742	0.280	0.242	5.910	5.240	0.070	11.702	0.804	0.131
72	4.717	0.295	0.227	5.805	5.080	0.670	10.800	0.697	0.099
73	6.424	0.457	0.149	6.090	5.440	0.175	9.267	0.548	0.134
74	3.462	0.062	0.105	5.990	5.250	0.070	5.202	0.392	0.087
41 a	5.360	0.390	0.178	5.715	5.025	0.600	9.579	0.582	0.093
41 b	5.356	0.364	0.151	5.700	5.030	0.175	13.118	0.762	0.132

**Distancia:** distancia entre árboles, **DAP:** diámetro a la altura del pecho, **P:** fósforo fácilmente extraíble, **% C:** porcentaje de carbono, **% N:** porcentaje de nitrógeno, **CE:** Conductividad eléctrica.

En la análisis de Spearman $_{\alpha=0.05}$  se encontraron correlaciones significativas entre algunas variables (Cuadro 5). El diámetro a la altura del pecho está negativamente relacionado con el porcentaje de carbono y positivamente relacionado con la conductividad eléctrica. La distancia no se correlaciona con ninguna variable. El porcentaje de nitrógeno se relaciona positivamente con el porcentaje de C y negativamente con el pH en agua y el pH en KCl. El fósforo no se correlaciona con ninguna variable. La C.E se relaciona positivamente con el DAP y el pH en agua, pH en KCl y negativamente con el porcentaje de C. El pH en agua se correlaciona negativamente con el porcentaje de nitrógeno y el porcentaje de carbono y positivamente con la conductividad eléctrica. La biomasa en peso seco de raíces (mayo) no se relaciona con ninguna variable.

**Cuadro 5. Correlaciones múltiples de Spearman $_{\alpha=0.05}$  entre las variables arbóreas y edáficas. Los valores significativos están subrayados.**

	Distancia (m)	DAP (m)	Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo)	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl	P (mg/Kg)	% C	% N	CE (dS/m)
Distancia (m)	1	0.382	0.206	0.098	0.207	0.304	-0.151	-0.196	0.391
DAP (m)		1	-0.071	0.211	0.286	0.263	<u>-0.461</u>	-0.417	<u>0.719</u>
Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo)			1	-0.062	-0.107	0.174	0.386	0.317	-0.025
pH H <sub>2</sub> O				1	<u>0.952</u>	-0.078	<u>-0.537</u>	<u>-0.452</u>	<u>0.514</u>
pH KCl					1	0.080	<u>-0.577</u>	<u>-0.524</u>	<u>0.553</u>
P (mg/Kg)						1	-0.107	-0.176	0.120
% C							1	<u>0.965</u>	-0.423
% N								1	-0.383
CE (dS/m)									1

**Distancia: distancia entre árboles, DAP: diámetro a la altura del pecho, P: fósforo fácilmente extraíble, % C: porcentaje de carbono, % N: porcentaje de nitrógeno, CE: Conductividad eléctrica.**

Para la prueba de normalidad de los datos arbóreos de Shapiro-Wilk $_{\alpha=0.05}$  se encontró que: La variable Distancia:  $W_{\alpha=0.05} = 0.984$ ,  $p=0.599$ , por lo tanto es normal; la variable  $\text{Log}_{10}$  Biomasa en peso seco de raíces (mayo):  $W_{\alpha=0.05} = 0.976$ ,  $p=0.270$ , por lo tanto es normal. El DAP no cumplió con los supuestos de normalidad aun cuando se transformó a logaritmo de base 10,  $\text{Log}_{10}$  DAP:  $W_{\alpha=0.05} = 0.740$ ,  $p = 3.943E^{-09}$ , por lo tanto no es normal. En consecuencia se usó la función empírica

de distribución acumulativa (Empírica CDF en inglés) para determinar el tipo de distribución. La distribución obtenida de  $\text{Log}_{10}$  DAP es una distribución multivariada del tipo Gaussiana mixta (Prueba de Kolmogorov–Smirnov  $\alpha=0.05$   $d=0.085$ ,  $p=0.716$ ) con tendencia a la derecha. Por este motivo se procedió a dividir los datos en dos conjuntos y determinar de forma independiente la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks. Para la variable  $\text{Log}_{10}$  DAP de 14 parcelas (1, 2, 9, 10, 11, 17, 25, 26, 39, 42, 43, 47, 50, 55):  $W_{\alpha=0.05}=0.963$   $p=0.195$ , por lo tanto es normal; Variable  $\text{Log}_{10}$  DAP sitios perturbados (70, 71, 72, 73, 74, 41a, 41b):  $W_{\alpha=0.05}=0.914$   $p=0.777$ , por lo tanto es normal. Al determinar que existen dentro de la variable DAP normalidad de los datos por separado y verificar que los residuales se comportan de manera normal en la variable DAP se continuó con el MANOVA  $\alpha=0.05$  (Datos para el MANOVA en el Anexo C).

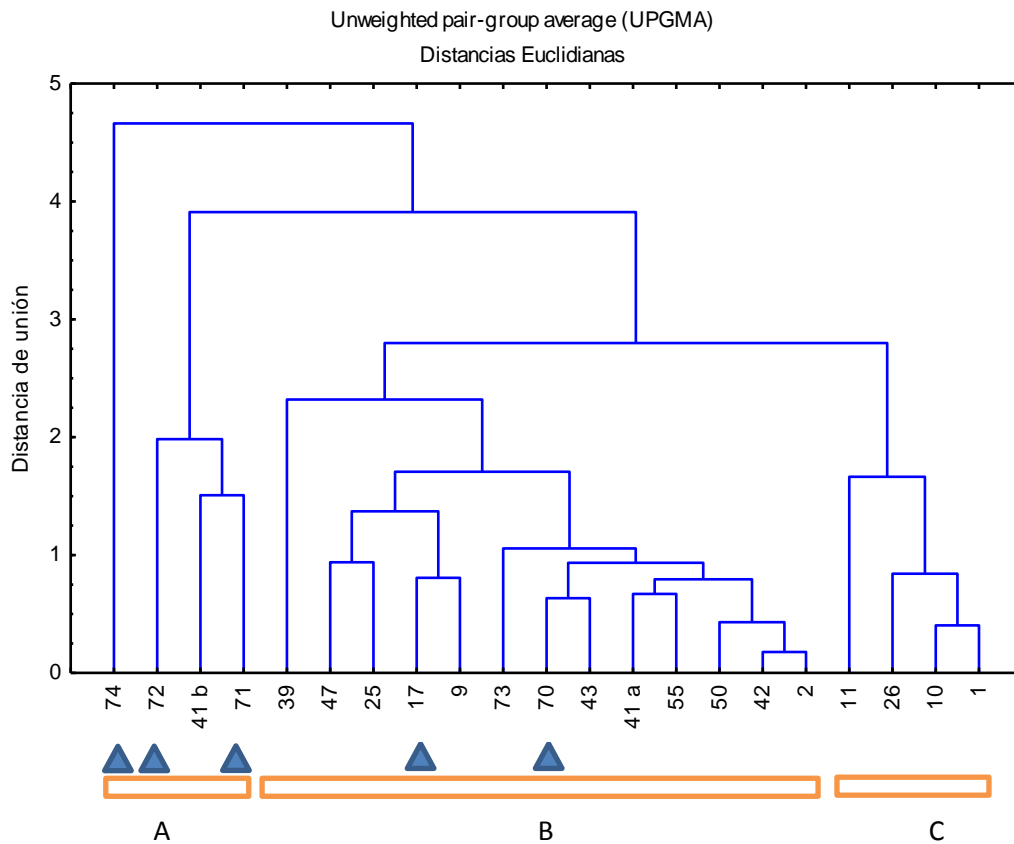
Al realizar el MANOVA  $\alpha=0.05$  se encontró que existe un efecto de la parcela por lo menos para una variable ( $\lambda$  Wilks  $\alpha=0.05=0.047$   $p<0.05$ ) (Cuadro 6).

**Cuadro 6. MANOVA  $\alpha=0.05$  de las parcelas, para la distancia,  $\text{Log}_{10}$  Biomasa en peso seco de raíces, y  $\text{Log}_{10}$  DAP. Los valores significativos están subrayados.**

	Prueba	Valor	F	Efecto	Error	p
<b>Parcela</b>	<u>Wilks</u>	<u>0.048</u>	<u>3.286</u>	<u>60.000</u>	<u>111.222</u>	<u><math>p&lt;&lt;0.01</math></u>
<b>Transecto</b>	Wilks	0.860	0.967	6.000	74.000	0.454

Al realizar las pruebas *Post Hoc* de Tukey, se encontró que la parcela tiene un efecto; para la variable Distancia:  $MS_{\alpha=0.05}=1.186$   $p>0.05$ , no hay grupos diferentes. Para la variable  $\text{Log}_{10}$  Biomasa en peso seco de raíces (mayo):  $MS_{\alpha=0.05}=0.0495$   $p<0.05$ , la parcela 17 es diferente. Para la variable  $\text{Log}_{10}$  DAP:  $MS_{\alpha=0.05}=0.006$   $p<0.05$ , las parcelas 70, 71, 72, 74 son diferentes. Los valores de p por parcela se presentan en el Anexo F.

En el análisis de clúster por UPGMA se encontraron tres grupos, el grupo A, el B y el C (Figura 4). Los grupos A y B tienen cuadrantes que presentan diferencias significativas en  $\text{Log}_{10}$  DAP ( $MS_{\alpha=0.05}=0.006$   $p<0.05$ ) o en la  $\text{Log}_{10}$  Biomasa en peso seco de raíces (mayo) ( $MS_{\alpha=0.05}=0.049$   $p<0.05$ ) por lo que se excluyeron del análisis.



**Figura 4. Análisis de clúster por UPGMA de los sitios. Se encuentran tres grupos: el grupo A, B y C. Los triángulos indican parcelas diferentes en el MANOVA  $\alpha=0.05$  *Post hoc* Tukey.**

En el análisis exploratorio de correspondencia canónica (CCA) se encontró que los ejes son significativos (Pillai's trace: 0.897  $p=0.022$ ) y se observan las tendencias generales de los sitios según nuestra variable de interés. En la Figura 5 se observa que las variables de distancia y DAP separan a los sitios 41a, 41b, 70, 71, 72, 73 y 74 con respecto a los demás. El sitio 43 se aleja de las variables y se agrupa más con el sitio 73. El sitio 9 y 17 se encuentran alejados de los demás. En la Figura 6 observamos que los mismos sitios 41a, 41b, 70, 71, 72, 73 y 74 están siendo discriminados por las variables de suelo.

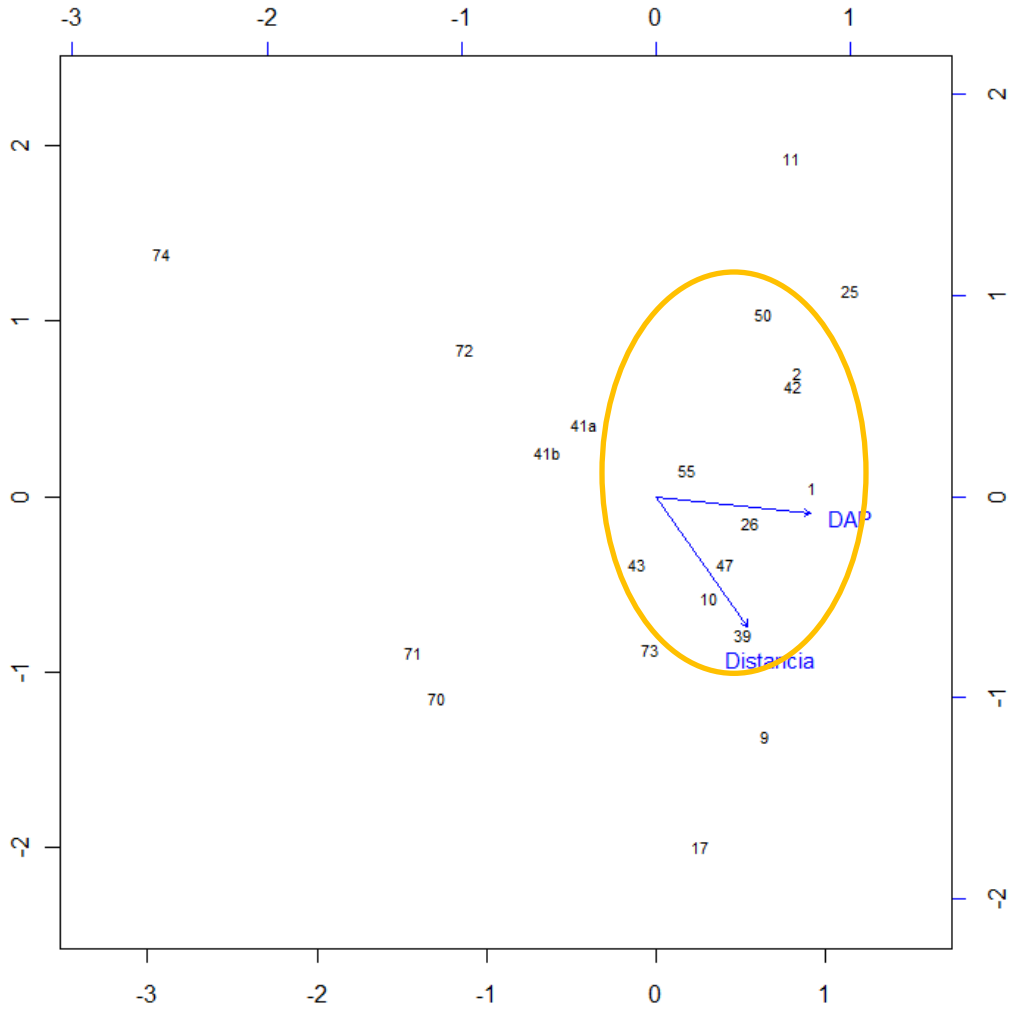
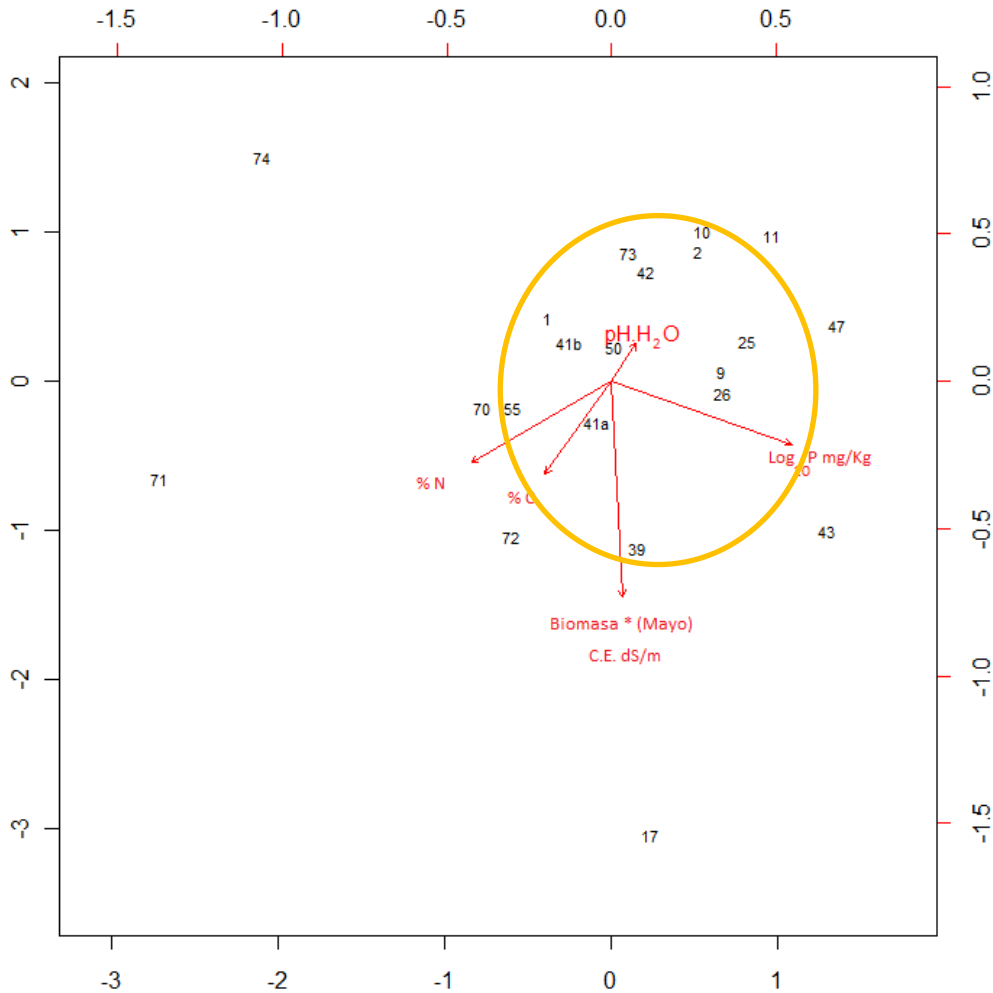


Figura 5. Análisis de Correspondencia Canónica entre las variables de diámetro a la altura del pecho (DAP) y distancia. El círculo indica las parcelas más homogéneas.



**Figura 6. Análisis de Correspondencia Canónica entre las variables de suelo. (Porcentaje de nitrógeno (% N), porcentaje de carbono (% C), fósforo fácilmente extraíble (P mg/Kg), conductividad eléctrica (C.E. dS/m), pH en agua (pH H<sub>2</sub>O) y Biomasa \* (mayo) (Biomasa en peso seco de raíces (mayo))). El círculo indica las parcelas más homogéneas.**

El grupo B (Figura 4) presentó una parcela con predominancia de árboles jóvenes (43), otra con el bosque muy cerrado (11) y dos abiertos o dispersos (9 y 17) por lo que también se excluyeron del análisis. Las parcelas 41a, 41b, 71, 73 presentaron un DAP pequeño (Cuadro 4) por lo que los consideramos cuadrantes jóvenes aunque no presenten diferencias en su distancia con los demás (Cuadro 5). La parcela 43 (Figura 5) presentó con respecto a la variable de DAP un alejamiento de los demás cuadrantes en el análisis exploratorio de CCA, aunque no presenta una diferencia estadísticamente significativa. Así las parcelas que se seleccionaron para los sitios de estudio



fueron: 1, 2, 10, 25, 26, 39, 42, 47, 50, 55. Para facilitar la lectura se renombraron las parcelas como sigue: 1 (1), 2(2), 3(10), 4(25), 5(26), 6(39), 7(42), 8(47), 9(50), 10(55).

- *Disección de raíces, densidad del suelo, y extracción de las micorrizas*

En total se disectaron 1198 ectomicorrizas y a estas se les extrajo el ADN. Durante la disección se anotaron características como color, tipo de ramificación, presencia de micelio emanente, para agruparlos por morfotipos, conceptos de los morfotipos se presentan en el Anexo A. El morfotipo naranja recta fue el más abundante con 608 micorrizas (Figura 7) siendo el 50.75 % del total. En las figuras 8, 9 y en el Cuadro 7 se presentan el número de ectomicorrizas por parcela, el número de morfotipos por parcela y el tipo con su proporción de morfotipos por parcela. Existieron parcelas que presentaron diferente producción de raíces y de micorrizas (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9), tampoco hubo la misma cantidad de morfotipos en todas las parcelas, siendo la parcela 10 la que presenta la mayor cantidad (23).

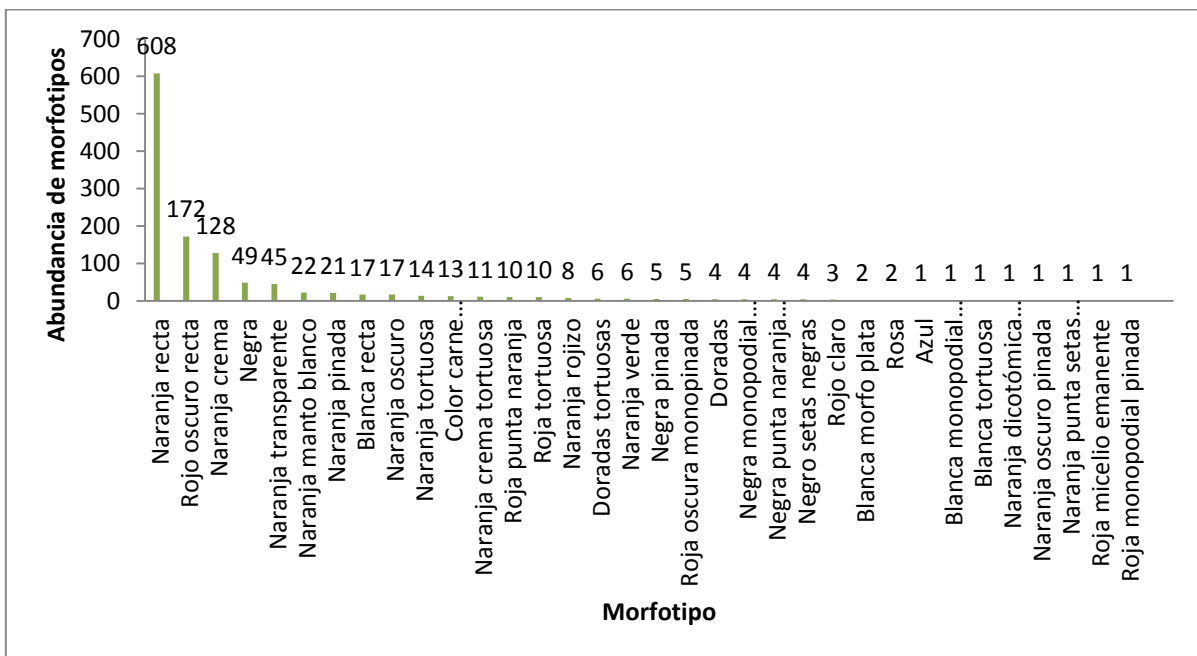
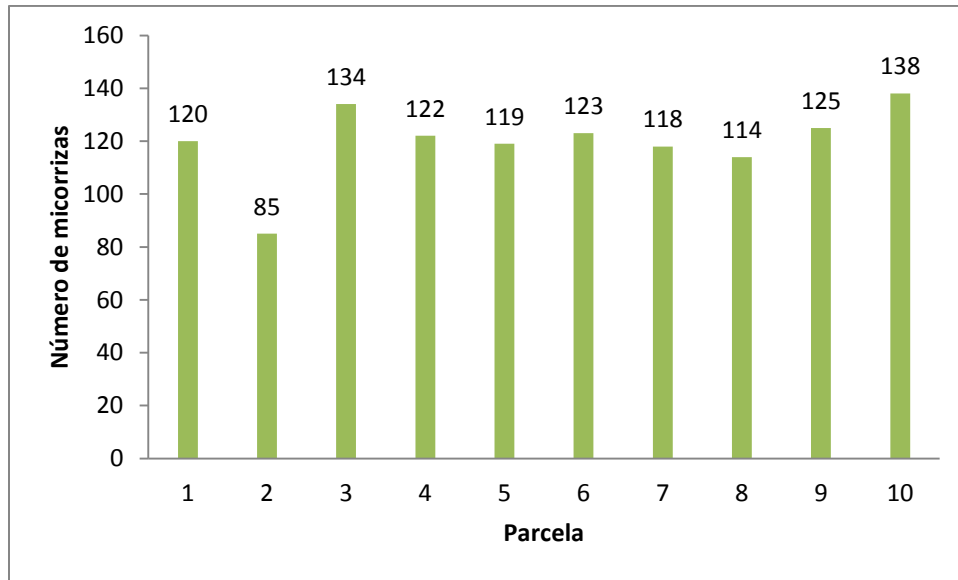
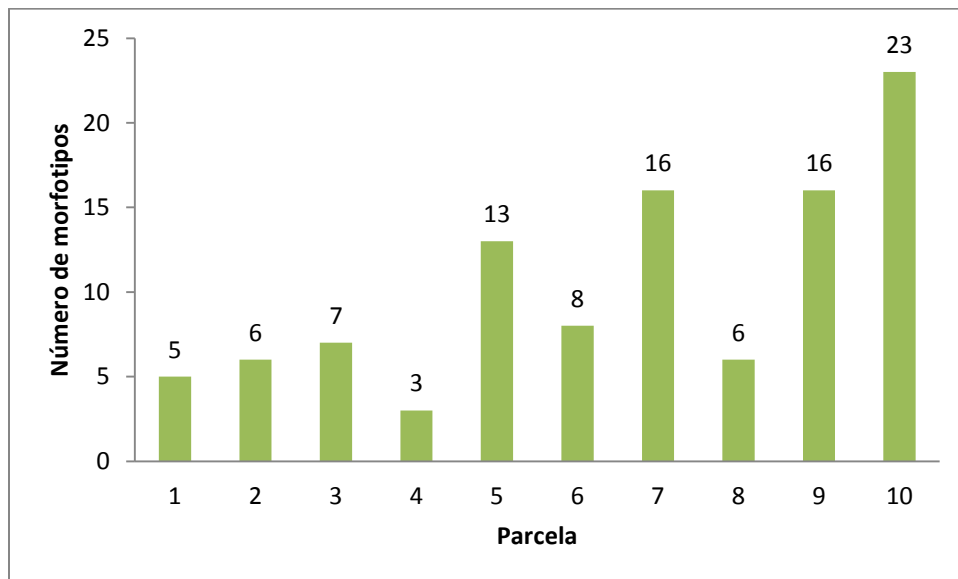


Figura 7. Abundancia de morfotipos de ectomicorrizas de *A. religiosa*.



**Figura 8. Número de micorrizas recolectadas por parcela.**



**Figura 9. Número de morfotipos por parcela.**

Morfotipo /Parcela	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Naranja recta	76	39	102	107	42	64	57	72	23	26
Rojo oscuro recta	31	10	4	10	15	38	10	14	27	13
Naranja crema	11	20	13		15	12	3	7	24	23
Negra	1	4	8		13	1	1	16	1	4
Naranja transparente					11		1		6	27
Naranja manto blanco				5	5	4	4		1	3
Naranja pinada					1		17		1	2
Blanca recta	1				4			2	3	7
Naranja oscuro			2		5		2		5	3
Naranja tortuosa					1		1		4	8
Color carne monopodial piramidal									13	
Naranja crema tortuosa		11								
Roja punta naranja							9		1	
Roja tortuosa									7	3
Naranja rojizo							1		7	
Doradas tortuosas							6			
Naranja verde			4			2				
Negra pinada					4					1
Roja oscura monopinada					1		1			3
Doradas			1				3			
Negra monopodial pinada										4
Negra punta naranja clara					2					2
Negro setas negras		1				1			1	1
Rojo claro								3		
Blanca morfo plata										2
Rosa							1			1
Azul						1				
Blanca monopodial pinada										1
Blanca tortuosa										1
Naranja dicotómica punta naranja							1			
Naranja oscuro pinada										1
Naranja punta setas negras										1
Roja micelio emanente									1	
Roja monopodial pinada										1

**Cuadro 7. Abundancia de los morfotipos por parcela.**

- *Biomasa de raíces en época de lluvias (octubre) y densidad aparente*

Para las diez parcelas con los tres transectos como réplicas, se obtuvo el valor de biomasa de raíces que osciló entre 0.05 y 0.305 g en mayo y, 0.045 y 0.527 g en octubre, de biomasa de raíces secas de *Abies religiosa*. La biomasa en peso seco de raíces (mayo) presenta una distribución normal ( $W_{\alpha=0.05}=0.975$   $p=0.575$ ), la biomasa en peso seco de raíces (octubre) no es normal ( $W_{\alpha=0.05}=0.859$   $p<0.05$ ), y la densidad si es normal ( $W_{\alpha=0.05}=0.97$   $p=0.652$ ). Por lo tanto se decidió transformar los datos de biomasa en peso seco de raíces (octubre) y si cumplió el supuesto de normalidad ( $W_{\alpha=0.05}=0.992$   $p=0.998$ ). También transformamos los valores de Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo) para comparar entre los meses.

Existió una diferencia en por lo menos una parcela en cuanto a  $\text{Log}_{10}$  de biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre) ( $F= 2.578$   $p=0.042$ , Cuadro 8) para el ANOVA $_{\alpha=0.05}$ . La parcela diferente en el  $\text{Log}_{10}$  de biomasa en peso seco de raíces (octubre) fue la 8, que presenta diferencias con la parcela 2 (Tukey MS= 0.036  $p=0.015$ , Figura 10). La biomasa no aumentó significativamente entre los dos muestreos ( $F= 1.544$   $p=2.48$ , Cuadro 9) pero se notó un ligero incremento (Figura 11). En la densidad aparente del suelo (densidad  $\text{g/cm}^3$ ) también por lo menos un grupo fue diferente ( $F= 5.026$   $p=0.002$ , Cuadro 10) y en las comparaciones de Tukey se encontró que fueron las parcelas 9 y 10 las que presentan diferencias con la parcela 2, 3, 6 y 8 (Tukey MS= 0.003  $p<0.05$ , Figura 12). Los valores de p se presentan en el Anexo H.

**Cuadro 8. ANOVA $_{\alpha=0.05}$  de parcelas y los transectos de  $\text{Log}_{10}$  de biomasa en peso seco de raíces (octubre). Los valores significativos están subrayados.**

	SC	Grados de libertad (df)	CM	F	p
<b>Parcela</b>	<u>0.843</u>	<u>9</u>	<u>0.094</u>	<u>2.579</u>	<u>0.042</u>
<b>Transecto</b>	0.033	2	0.017	0.456	0.641
<b>Error</b>	0.654	18	0.036		

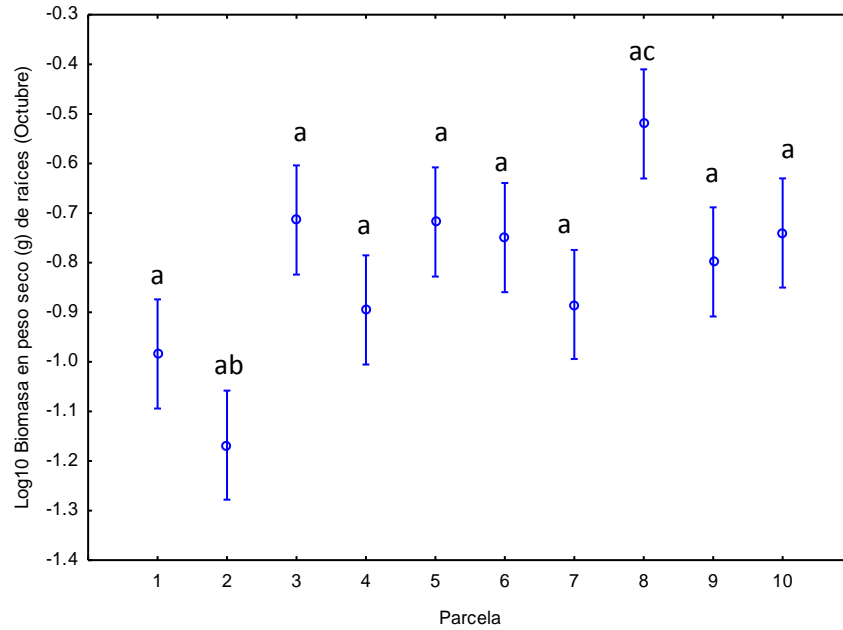


Figura 10. ANOVA $_{\alpha=0.05}$  para Log $_{10}$  de biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre). En la prueba de Tukey las letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 9. Comparación (t-student $_{\alpha=0.05}$ ) entre la producción de raíces (Log $_{10}$  de la biomasa en peso seco (g) de las raíces) durante dos meses, mayo y octubre.

	Media (mayo)	Media (octubre)	df	t	p	DS (mayo)	DS (octubre)	F Var	p
<b>Bio-masa</b>	-0.840	-0.817	58	-0.415	0.679	0.185	0.230	1.544	0.248

Biomasa = Log $_{10}$  Biomasa en peso seco (g) de raíces, df= grados de libertad, DS= desviación estándar, Var= varianza.

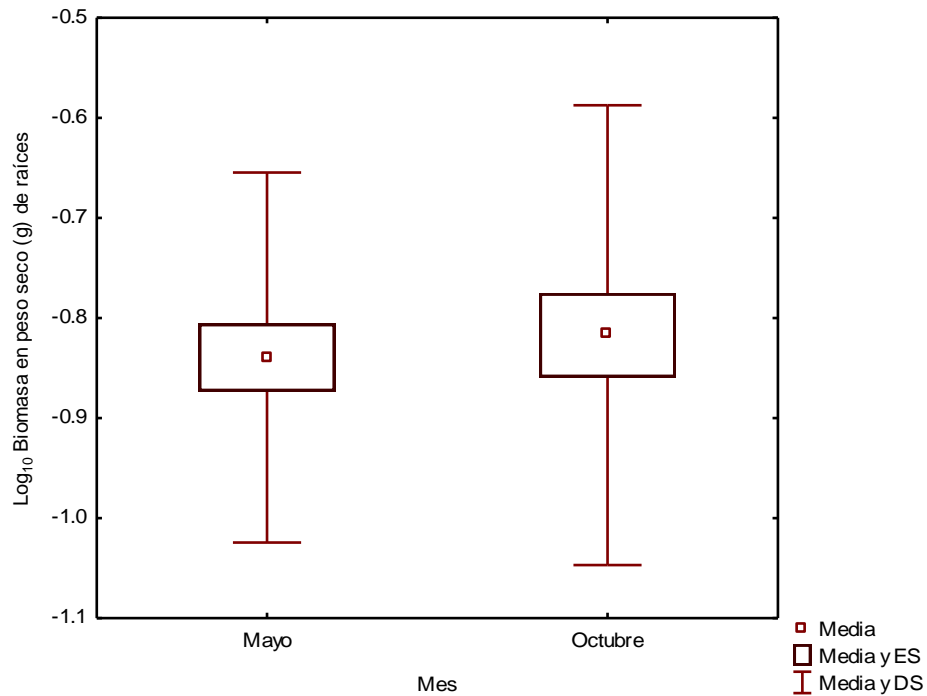
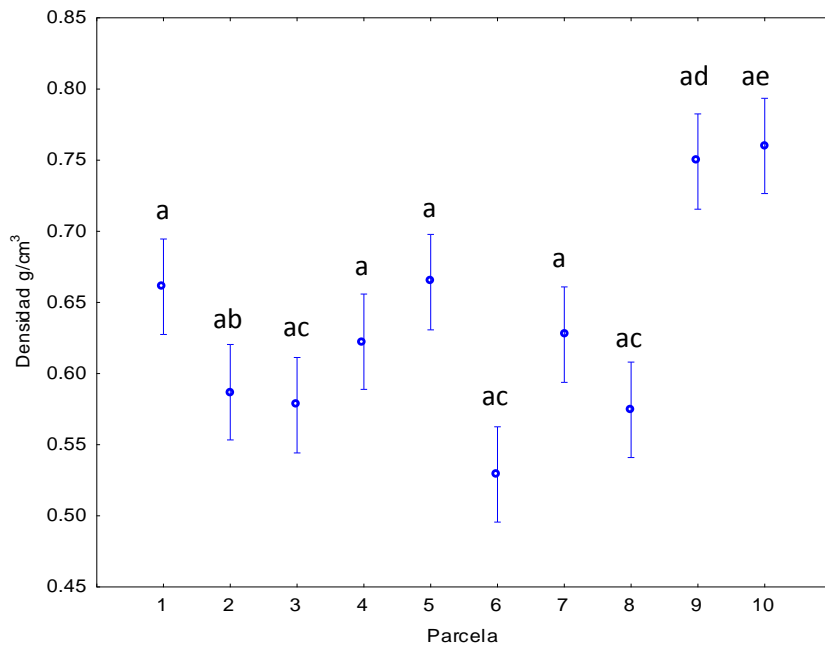


Figura 11. Comparación (t- student<sub>α=0.05</sub>) entre la producción de raíces en mayo y octubre. ES: error estándar. DS: Desviación estándar.

Cuadro 10. ANOVA<sub>α=0.05</sub> de parcelas y las líneas de los transectos de densidad del suelo g/cm<sup>3</sup>.

Las diferencias significativas están resaltadas.

	SC	Grados de libertad (df)	CM	F	p
<b>Parcela</b>	<u>0.152</u>	<u>9</u>	<u>0.017</u>	<u>5.026</u>	<u>0.002</u>
<b>Transecto</b>	0.001	2	0.001	0.193	0.826
<b>Error</b>	0.061	18	0.003		



**Figura 12. ANOVA $_{\alpha=0.05}$  para densidad (g/cm<sup>3</sup>). En la prueba de Tukey las letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05).**

- *Resultados determinación de las especies con herramientas de biología molecular*

Un total 757 productos de PCR fueron enviados a secuenciar en el laboratorio de Biología Molecular de la UNAM. De estos se obtuvieron 621 secuencias de calidad y 175 no cumplieron los estándares. Para el análisis molecular se usaron sólo los datos de las parcelas 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10. Se tienen 591 secuencias útiles de las cuales 570 pertenecen hongos formadores de ectomicorrizas. En el Cuadro 11 se presentan el número de OTU's obtenidos, la cantidad de secuencias por parcela, el número de micorrizas recolectadas y el porcentaje de eficiencia del proceso. Se enlistan 91 especies (Cuadro 12) cuya identidad obtuvimos al comparar las secuencias de la región ITS de las ectomicorrizas contra la base de datos del GENBANK. De estas, 87 son de hongos ectomicorrízicos mientras que cuatro especies no son formadoras de ectomicorrizas. De estos 87 hongos, 15 pertenecen al phylum Ascomycota mientras que 72 a Basidiomycota. En la Figura 13 se presenta la composición de la comunidad de hongos ectomicorrízicos asociados con *Abies religiosa* durante el mes de octubre, la lista completa se presenta en el Anexo B, *Clavulina cf. cinerea* es la que presenta el mayor número de secuencias (76) en la comunidad. En la Figura 14, se presenta el número de OTUs por género, *Inocybe* y *Tomentella* son los que presentan la mayor cantidad de especies. Para *Inocybe*, tres OTU's se parecen a la secuencia de ITS en 97% o más a alguna especie de *Inocybe* de GENBANK, mientras que 12 sólo se identificaron hasta la secuencia más parecida y 6 sólo se determinaron hasta género. En *Tomentella*, una secuencia se parece en 97% o más a otra

secuencia de voucher, mientras que dos secuencias, se parecen en menos del 97% y otras se parecen a ejemplares no determinados. En la Figura 15 se muestra que la familia Clavulinaceae agrupa más de un cuarto de todas las secuencias (127).

En el Cuadro 13 se presentan los datos de dominancia de Simpson. La parcela 1 es en la que existe mayor dominancia de alguna especie (*Clavulina*) mientras que en la parcela 9 es más probable que al tomar otra muestra ésta sea de distinta especie ( $p=0.955$ ), ésta probabilidad es el recíproco del índice de dominancia de Simpson (1-D). En los estimadores de diversidad Chao 1 y Jack-Knife 1 (Cuadro 14 y 15), se encontró que es posible obtener más de las 87 especies que encontramos, siendo 147.07 y 129.86 especies posibles respectivamente para cada estimador. En la Figura 16 se muestra la curva de rarefacción de especies, donde se encontró que en algunas parcelas el muestreo de 15 ectomicorrizas no captura toda la riqueza (parcela 9 y 10), mientras que en algunos hubo sobre muestreo (parcelas 5 y 7).

**Cuadro 11. Porcentaje de eficiencia de todo el proceso desde la toma de muestras en el campo hasta obtener la identidad por medio de la secuenciación de la región ITS.**

Parcela	Micorrizas recolectadas	ADN amplificado	Porcentaje de amplificación	Secuencias útiles obtenidas	Número de OTU's	% de eficiencia del proceso de micorrizas a secuencias
<b>1</b>	120	112	93.33%	98	20	81.67%
<b>4</b>	122	114	93.44%	87	17	71.31%
<b>5</b>	119	104	87.39%	70	22	58.82%
<b>7</b>	118	112	94.92%	75	21	63.56%
<b>8</b>	114	104	91.23%	85	22	74.56%
<b>9</b>	125	119	95.20%	92	32	73.60%
<b>10</b>	138	132	95.65%	84	34	60.87%



**Cuadro 12. Listado de taxones de ectomicorrizas de *Abies religiosa* encontrados.**

Especie	Phylum
Atheliaceae sp. 1	B
<i>Clavulina</i> cf. <i>cinerea</i>	B
<i>Clavulina</i> sp. 1	B
<i>Clavulina</i> sp. 2	B
<i>Clavulina</i> sp. 3 (aff. <i>cinerea</i> )	B
<i>Clavulina</i> sp. 4 (aff. <i>cinerea</i> )	B
<i>Cortinarius</i> cf. <i>ignipes</i>	B
<i>Cortinarius obtusus</i>	B
<i>Cortinarius vernus</i>	B
<i>Fischerula</i> sp. 1 (aff. <i>macrospora</i> )	A
<i>Genabea</i> sp. 1 (aff. <i>sphaerospora</i> )	A
<i>Genea</i> sp. 1	A
<i>Genea</i> sp. 2 (aff. <i>harknessii</i> )	A
<i>Hebeloma albocolossum</i>	B
<i>Helvella</i> sp. 1	A
<i>Humaria</i> sp. 1 (aff. <i>hemisphaerica</i> )	A
<i>Humaria</i> sp. 2 (aff. <i>hemisphaerica</i> )	A
<i>Hydnobolites</i> sp. 1 (aff. <i>cerebriformis</i> )	A
<i>Hydnobolites</i> sp. 2 (aff. <i>cerebriformis</i> )	A
<i>Hydnotrya cerebriformis</i>	A
<i>Hydnum</i> sp. 1	B
<i>Inocybe geophylla</i> var. <i>lilacina</i>	B
<i>Inocybe lanatodisca</i>	B
<i>Inocybe</i> sp. 1	B
<i>Inocybe</i> sp. 2	B
<i>Inocybe</i> sp. 3	B
<i>Inocybe</i> sp. 4	B
<i>Inocybe</i> sp. 5 (aff. <i>amblyspora</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 7 (aff. <i>geophylla</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 8 (aff. <i>glabrodisca</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 9 (aff. <i>mixtilis</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 10 (aff. <i>vulpinella</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 11 (aff. <i>salicis-herbaceae</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 12 (aff. <i>pseudoreducta</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 13 (aff. <i>reisneri</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 14 (aff. <i>rimosa</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 15 (aff. <i>serotina</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 16	B
<i>Inocybe</i> sp. 17 (aff. <i>inodora</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 18 (aff. <i>neobrunnescens</i> )	B
<i>Inocybe</i> sp. 19	B
<i>Inocybe suaveolens</i>	B
<i>Lactarius fennoscandicus</i>	B

<i>Membranomyces</i> sp. 1 (aff. <i>spurius</i> )	B
<i>Membranomyces spurius</i>	B
<i>Peziza</i> sp. 1 (aff. <i>ostracoderma</i> )	A
<i>Phaeocollybia</i> sp. 1 (aff. <i>sipei</i> )	B
<i>Phaeocollybia</i> sp. 2 (aff. <i>pseudofestiva</i> )	B
<i>Phaeocollybia</i> sp. 3 (aff. <i>spadicea</i> )	B
<i>Piloderma</i> sp. 1 (aff. <i>fallax</i> )	B
<i>Pseudotomentella</i> sp. 1 (aff. <i>tristis</i> )	B
<i>Pseudotomentella</i> sp. 2 (aff. <i>tristis</i> )	B
<i>Russula abietina</i>	B
<i>Russula acrifolia</i>	B
<i>Russula americana</i>	B
<i>Russula</i> cf. <i>chloroides</i>	B
<i>Russula firmula</i>	B
<i>Russula olivacea</i>	B
<i>Russula roseipes</i>	B
<i>Russula</i> sp. 1 (aff. <i>olivobrunnea</i> )	B
<i>Sebacina incrustans</i>	B
<i>Sebacina</i> sp. 1 (aff. <i>epigaea</i> )	B
<i>Sebacina</i> sp. 2 (aff. <i>epigaea</i> )	B
<i>Sebacina</i> sp. 3	B
<i>Sebacina</i> sp. 4	B
<i>Sebacina</i> sp. 5	B
Sebacinaceae sp. 1	B
Sebacinaceae sp. 2	B
<i>Tarzetta</i> sp. 1	A
<i>Tarzetta</i> sp. 2	A
Thelephoraceae sp. 1	B
Thelephoraceae sp. 2	B
Thelephorales sp. 1	B
<i>Tomentella pilosa</i>	B
<i>Tomentella</i> sp. 1	B
<i>Tomentella</i> sp. 2	B
<i>Tomentella</i> sp. 3	B
<i>Tomentella</i> sp. 4	B
<i>Tomentella</i> sp. 5	B
<i>Tomentella</i> sp. 6	B
<i>Tomentella</i> sp. 7	B
<i>Tomentella</i> sp. 8 (aff. <i>fusco-cinerea</i> )	B
<i>Tomentella</i> sp. 9 (aff. <i>lateritia</i> )	B
<i>Tremelloscypha</i> sp. 1 (aff. <i>gelatinosa</i> )	B
<i>Trichophaea</i> sp. 1 (aff. <i>hybrida</i> )	A
<i>Tuber separans</i>	A
<i>Xerocomellus</i> sp. 1 (aff. <i>chrysenderon</i> )	B
<i>Chalara microchona</i>	A

<u>Hyaloscyphaceae sp. 1</u>	A
<u>Ilyonectria rufa</u>	A
<u>Verticillium leptobactrum</u>	A

A: Ascomycota. B: Basidiomycota. Las especies subrayadas no forman ectomicorrizas.

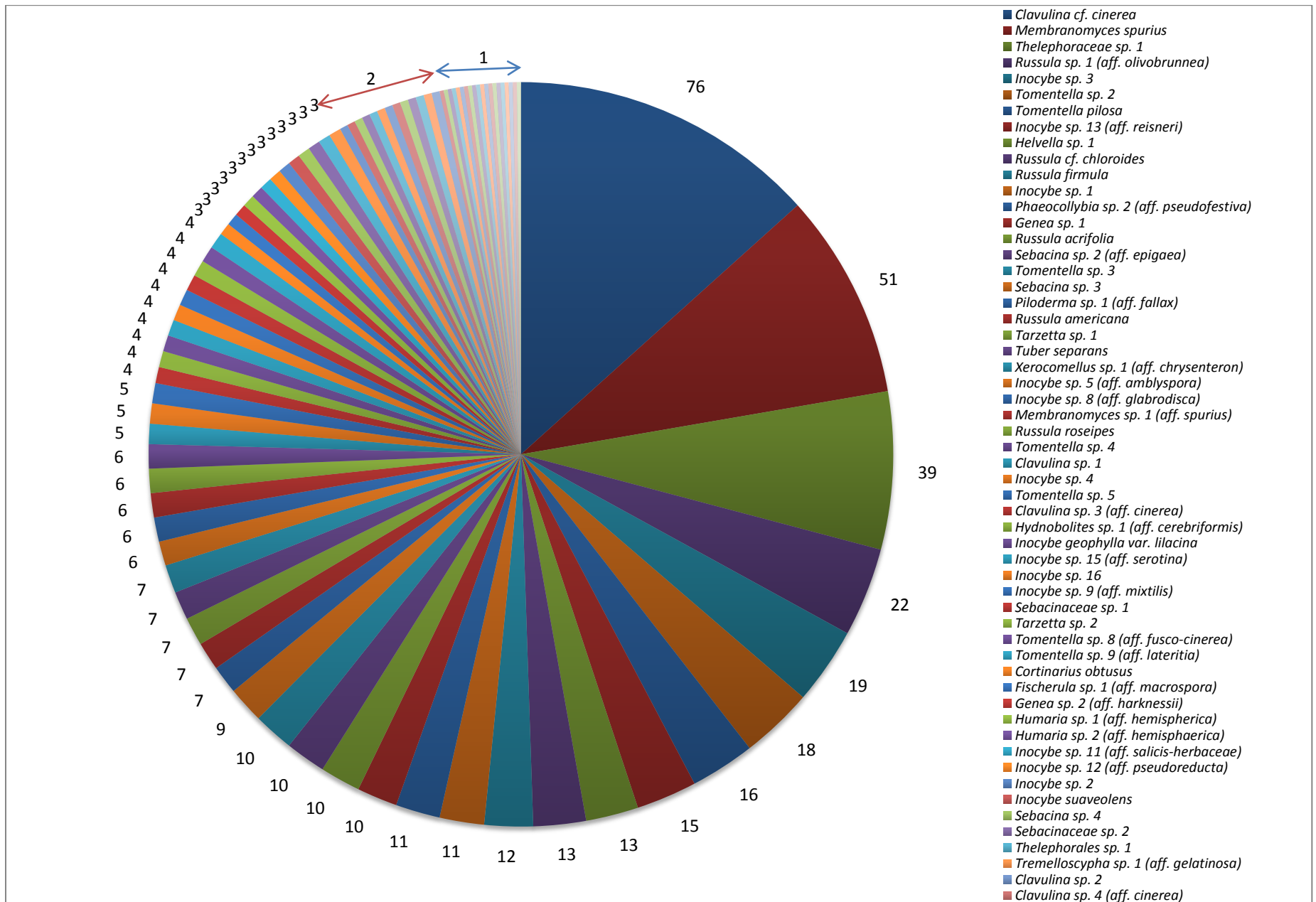


Figura 13. Composición de la comunidad de hongos ectomicorrízicos por número de secuencias.

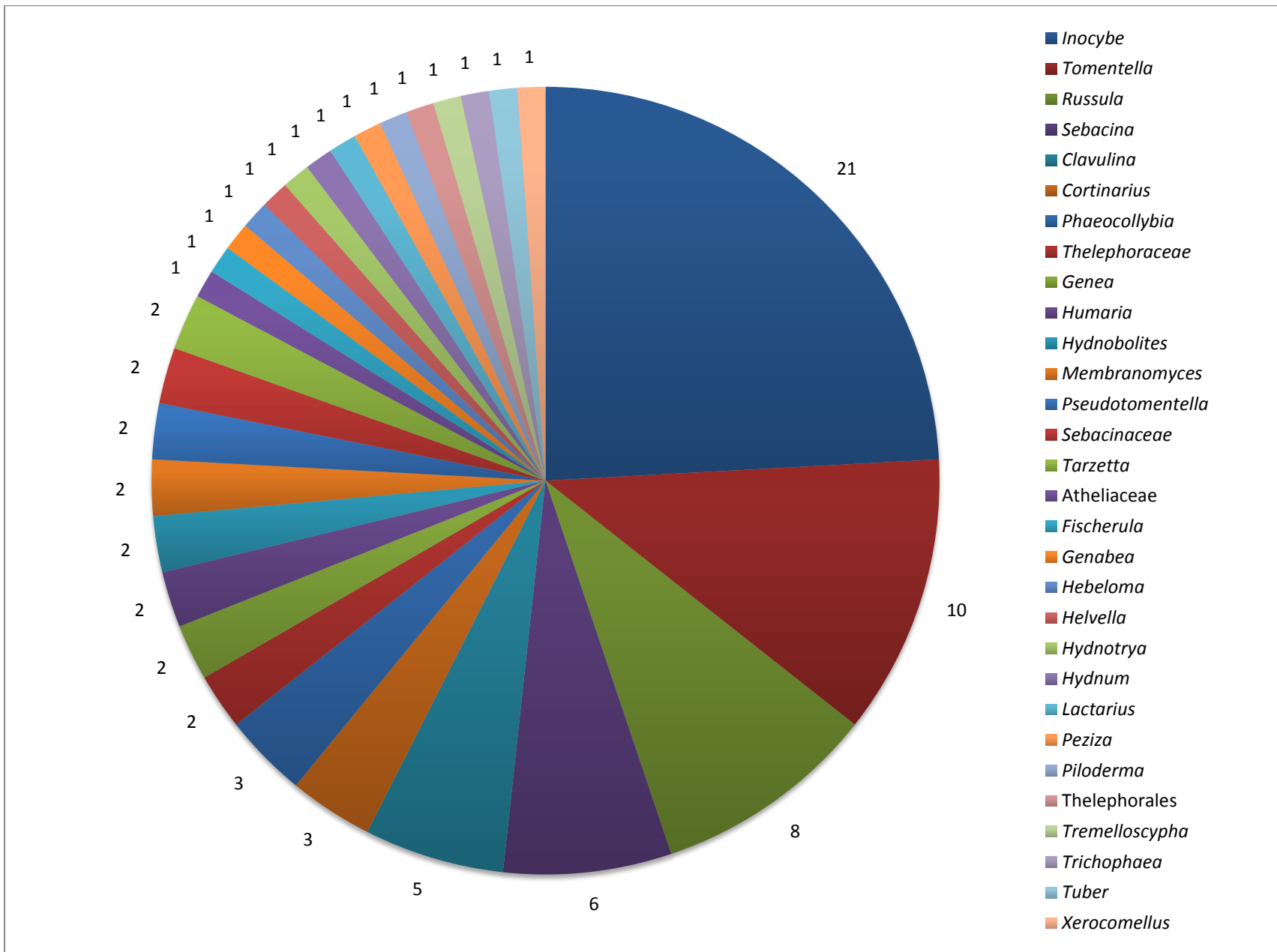


Figura 14. Número de taxa (OTU's) por género.

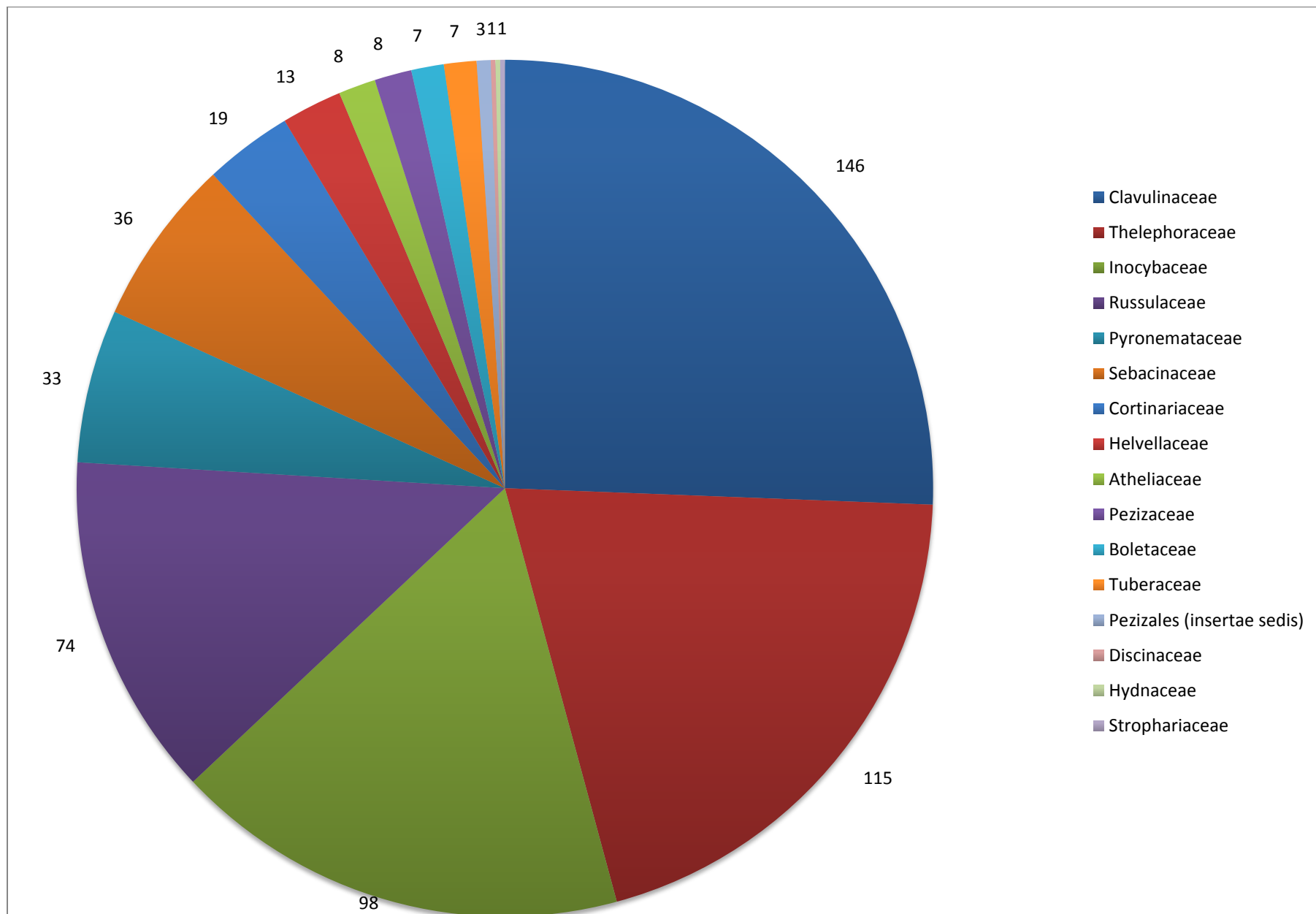


Figura 15. Número de secuencias de los OTU por familia.

**Cuadro 13. Dominancia de especies e Índice de diversidad de Simpson.**

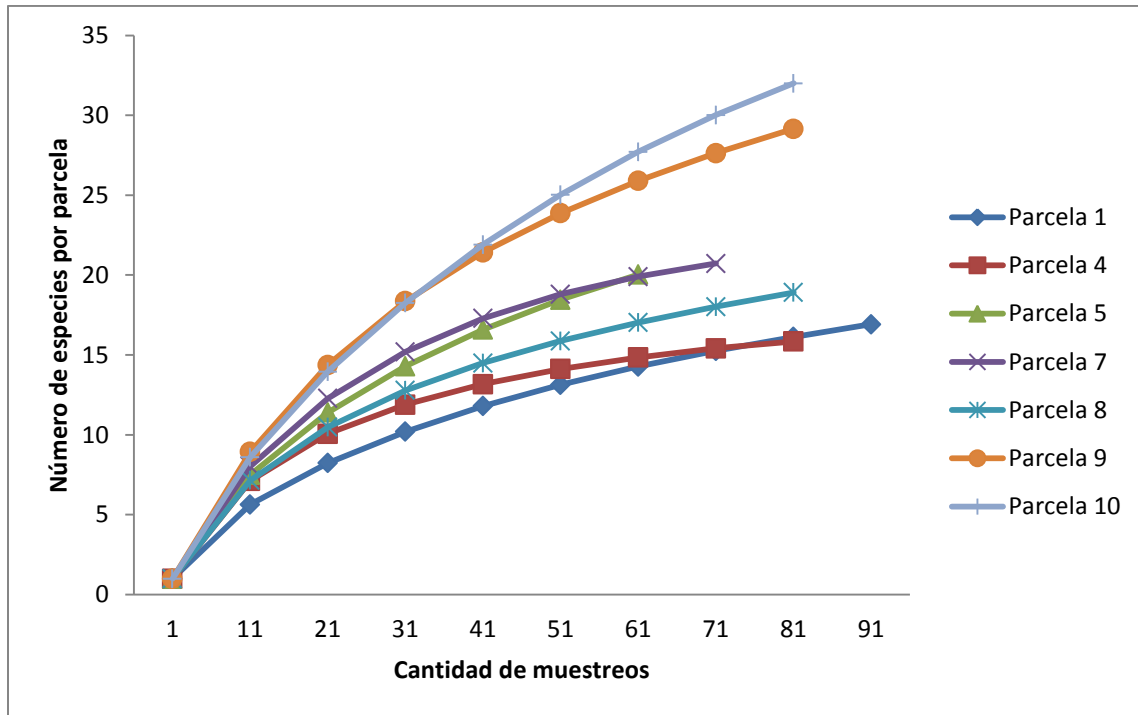
Parcela	Dominancia (D)	Índice de diversidad de Simpson (1-D)
1	0.225	0.775
4	0.101	0.899
5	0.097	0.903
7	0.073	0.927
8	0.109	0.891
9	0.045	0.955
10	0.058	0.942

**Cuadro 14. Estimador basado en Abundancia (CHAO 1).**

Parcela	CHAO 1
1	29.25
2	41
3	67.06
4	77.15
5	97.03
6	122.66
7	147.07

**Cuadro 15. Estimador basado en Abundancia (Jack-Knife 1).**

Parcela	Jack-Knife 1
1	17
2	45.5
3	74.33
4	84.25
5	101
6	111.5
7	129.86



**Figura 16. Curva de rarefacción de especies.**

En la abundancia relativa y frecuencia absoluta se encontró que *Clavulina cf. cinerea* es la más abundante y fecuente seguida por *Membranomyces spurius* (Figuras 17 y 18). En la frecuencia relativa también *Clavulina cf. cinerea* fue la más frecuente, seguida por *Membranomyces spurius* (Figura 19). Estos dos valores (abundancia y frecuencia relativa) se ven resumidos en el valor de importancia de la comunidad, en donde *Clavulina cf. cinerea* fue la más importante, seguida por *Membranomyces spurius*. *Thelephoraceae sp. 1* está en tercer lugar de importancia (Figura 20). Los datos de abundancia relativa, frecuencia absoluta y frecuencia relativa por parcela no se muestran, pero se muestran los VIE en cada parcela (Figuras 21-27) y observamos que hay diferente estructura de las especies en cada parcela.



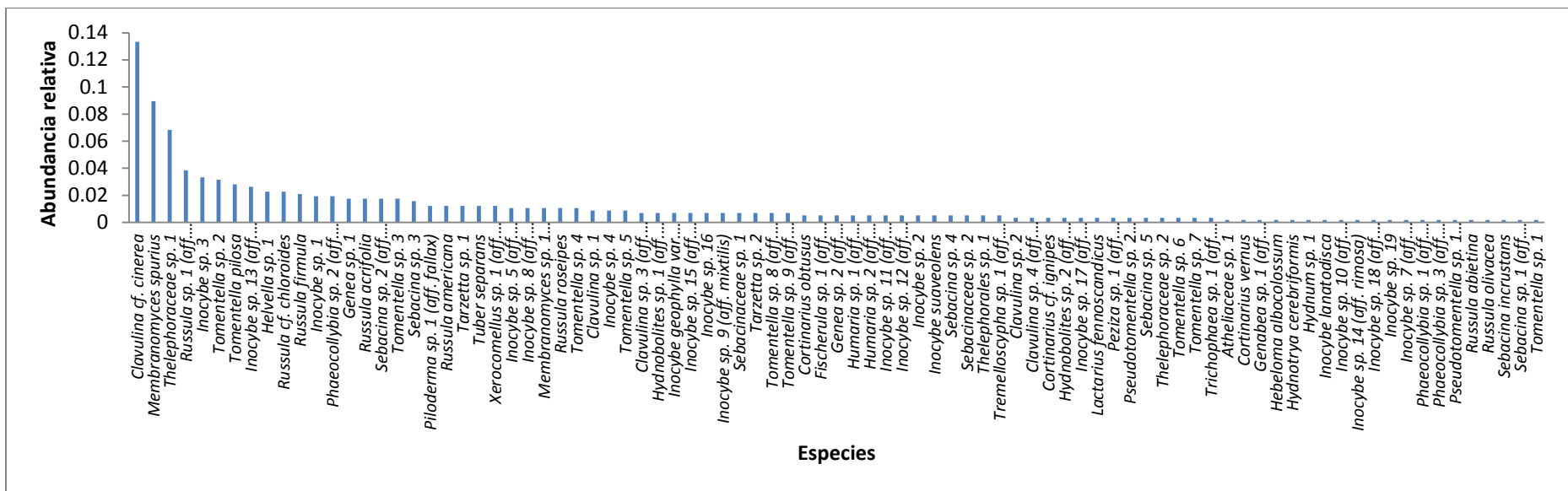


Figura 17. Abundancia relativa de las especies.

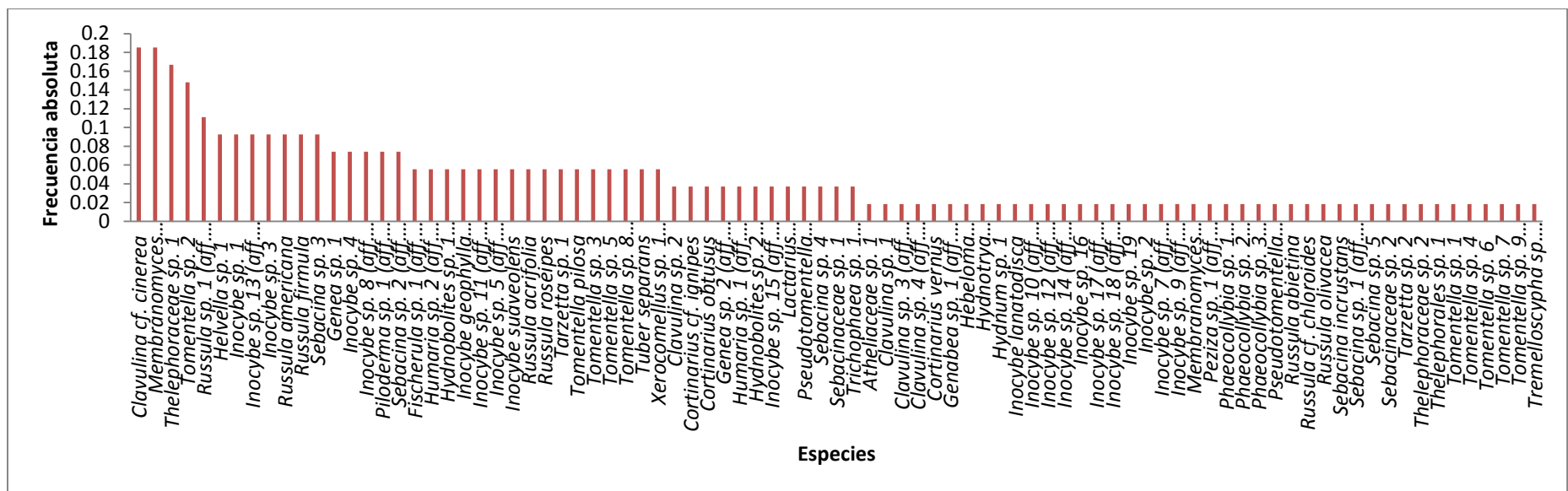


Figura 18. Frecuencia absoluta de las especies.

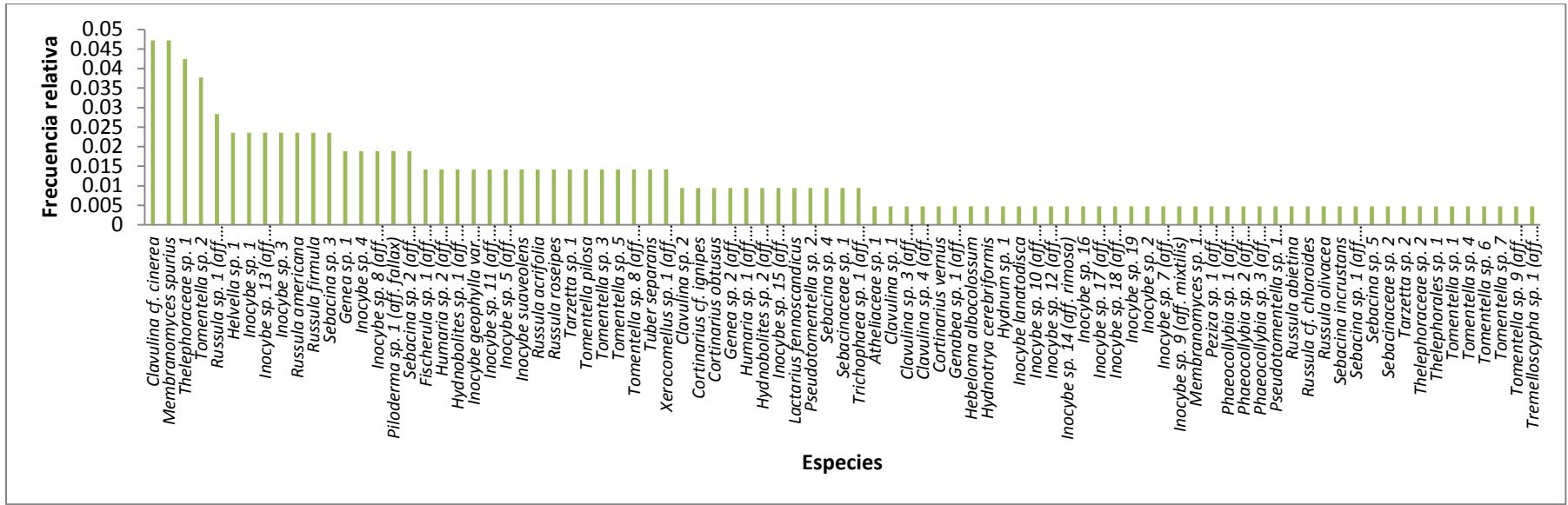


Figura 19. Frecuencia relativa de las especies.

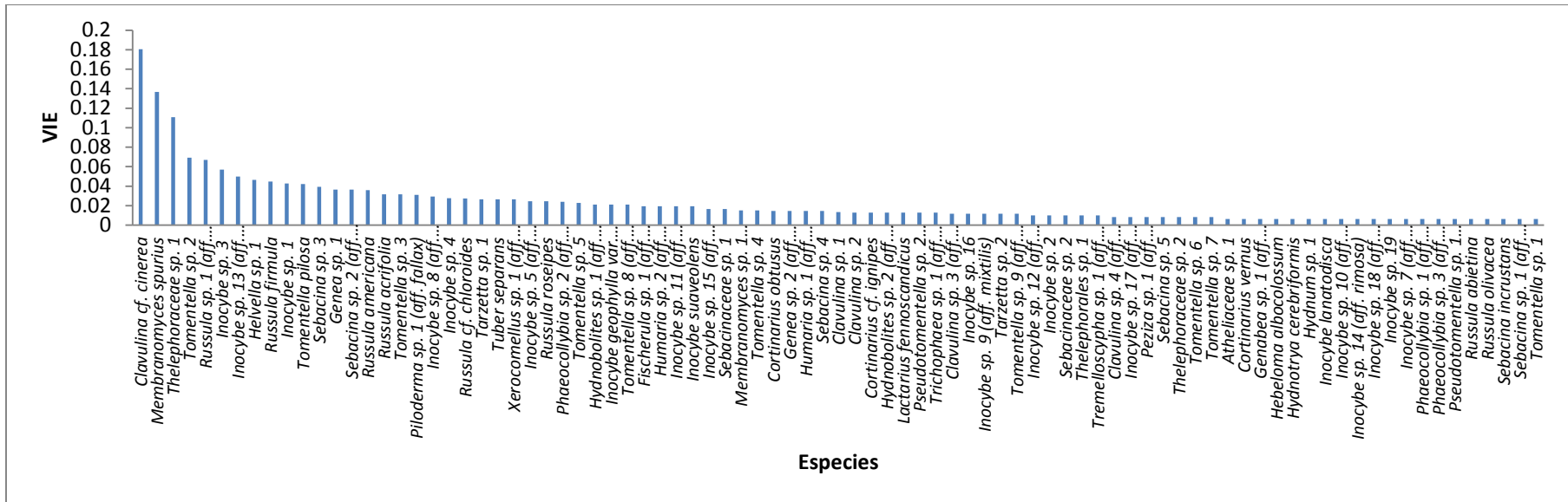


Figura 20. Valor de importancia ecológica de las especies.

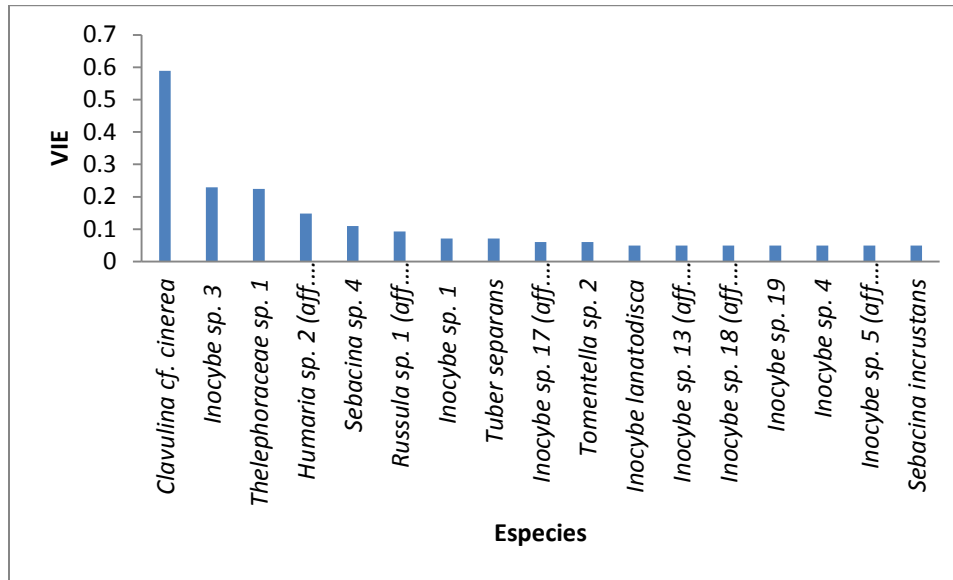


Figura 21. Valor de importancia ecológica de las especies en la parcela 1.

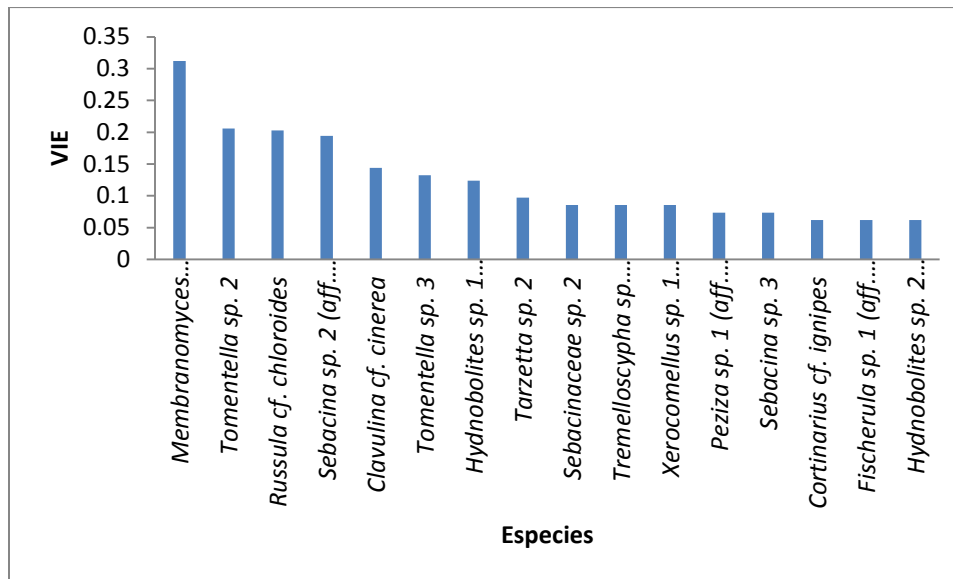


Figura 22. Valor de importancia ecológica de las especies en la parcela 4.

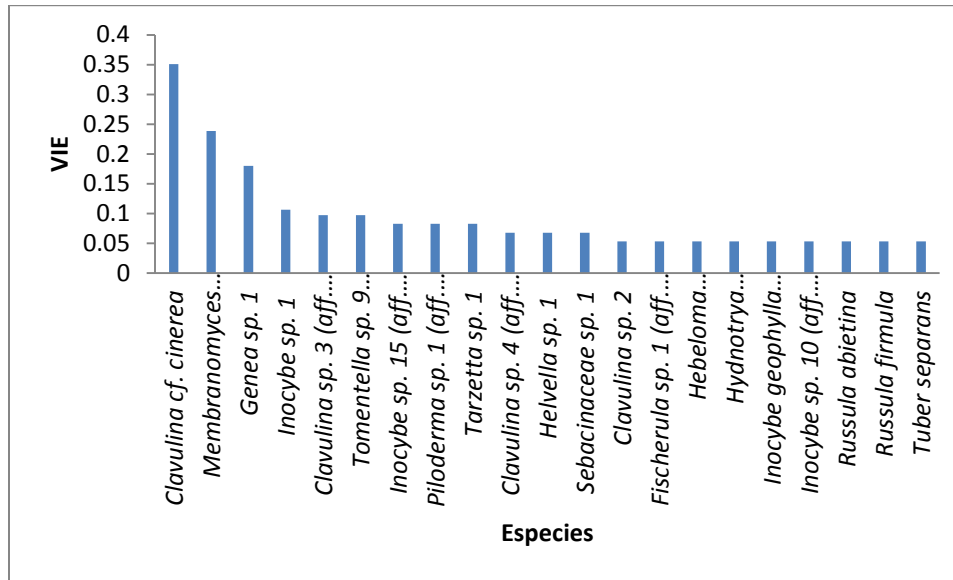


Figura 23. Valor de importancia ecológica de las especies en la parcela 5.

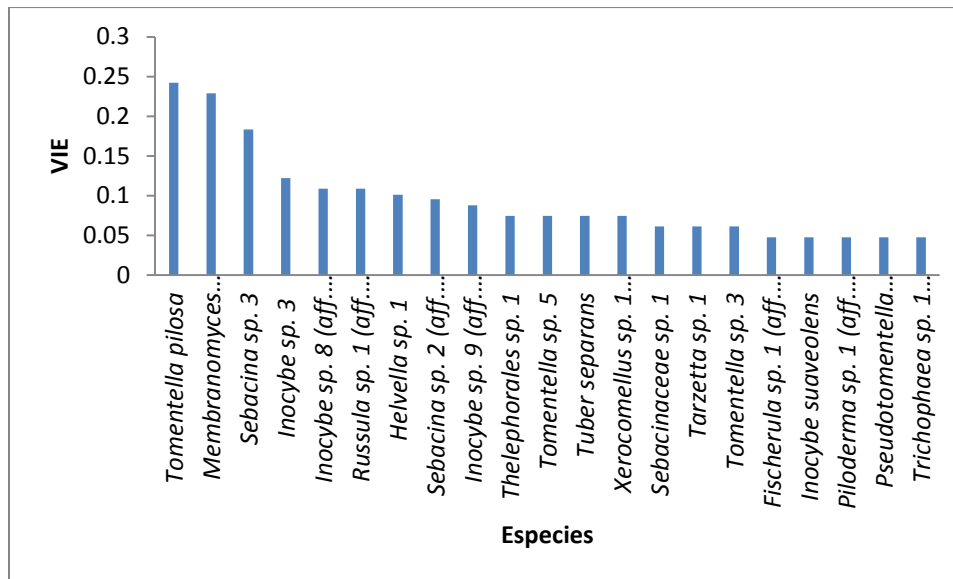


Figura 24. Valor de importancia ecológica de las especies en la parcela 7.

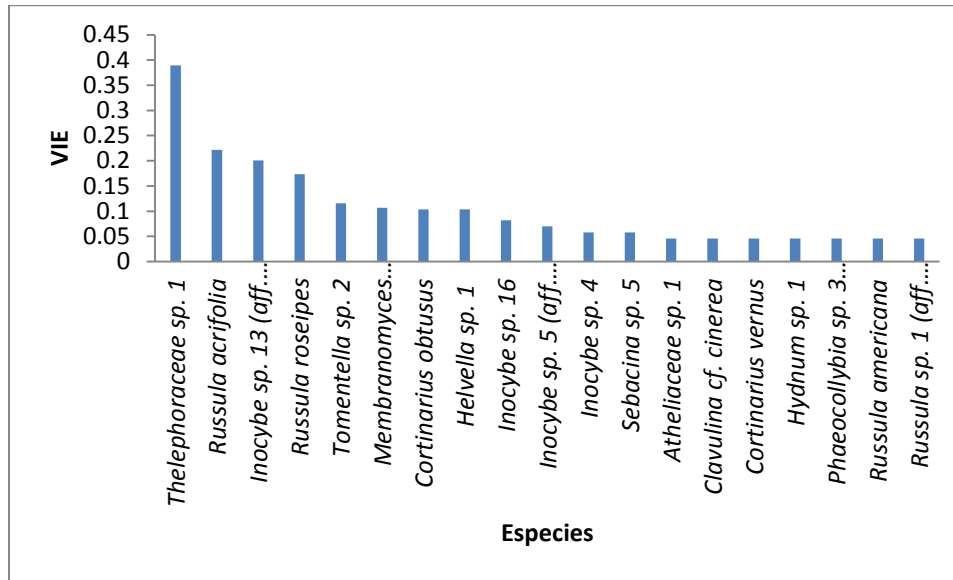


Figura 25. Valor de importancia ecológica de las especies en la parcela 8.

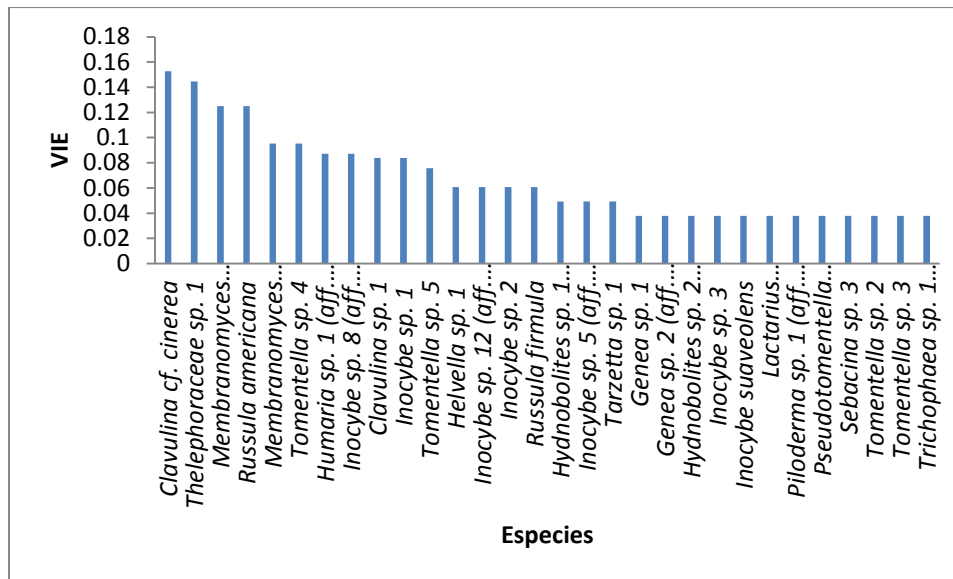


Figura 26. Valor de importancia ecológica de las especies en la parcela 9.

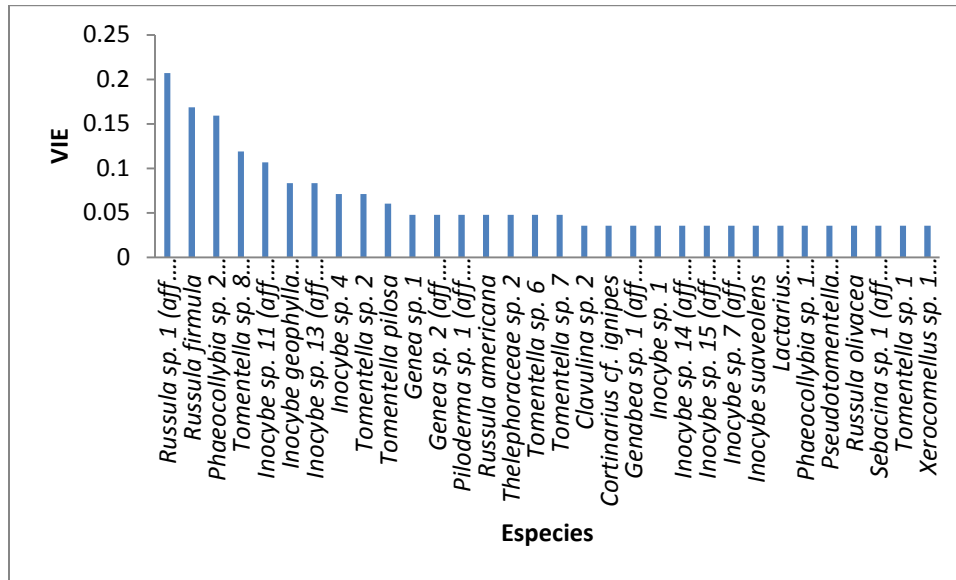


Figura 27. Valor de importancia ecológica de las especies en la parcela 10.

- *Efecto del suelo sobre la diversidad*

Las variables físico químicas del suelo que usamos para los análisis se presentan en el Cuadro 16, donde puede observarse que únicamente siete parcelas cuentan con el índice de diversidad de Simpson. Para la diversidad de ectomicorrizas (1-D), donde existió un gradiente de diversidad de 0.775 a 0.955, sólo el porcentaje de carbono (% C) y de nitrógeno (% N) son significativos ( $p < 0.05$ ) en la correlación de Spearman (Cuadro 17). También, a mayor distancia promedio entre los árboles existe una mayor cantidad de fósforo disponible, y el porcentaje de carbono y nitrógeno disminuye cuando el pH se hace más neutro (es decir aumenta el pH), y a su vez el diámetro a la altura del pecho disminuye. En el mismo Cuadro observamos que cuando aumenta la densidad aparente del suelo, disminuye la cantidad de fósforo fácilmente extraíble ( $\text{Log}_{10} P$ ). Con el análisis exploratorio multivariado con extracción de componentes principales ( $p < 0.1$ ) no encontramos que el % C y el % N tengan una correlación significativa con la diversidad de ectomicorrizas (Cuadro 18), no obstante los valores son muy cercanos al 0.9 para el pH en agua, el % C y la biomasa de raíces durante el mes de octubre. Al graficar los valores observamos que existió una separación entre los dos factores, el 1 (mayor porcentaje de carbono y nitrógeno, además de un pH más ácido o menor) y el factor 2 (Biomasa de raíces en el mes de octubre) (Figura 28), además se explicó el 73.02 % de la varianza con los dos primeros factores (Cuadro 19).

**Cuadro 16. Características de vegetación arbórea y suelo de las parcelas a estudiar.**

Parcela	Distancia (m)	DAP (m)	Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre)	pH H <sub>2</sub> O	C.E. (dS/m)	pH KCl	Log <sub>10</sub> P (mg/Kg)	% C	% N	(1-D) micorrizas	P (mg/Kg)
<b>1</b>	6.272	0.564	0.16	0.661	0.107	6.04	0.144	5.42	-0.377	6.16	0.415	0.775	0.42
<b>2</b>	5.781	0.544	0.1	0.587	0.071	5.835	0.141	5.19	-0.31	8.875	0.515	-	0.49
<b>3</b>	6.397	0.496	0.101	0.578	0.255	5.855	0.138	5.265	-0.222	6.375	0.375	-	0.6
<b>4</b>	5.613	0.577	0.187	0.622	0.131	6.225	0.157	5.65	-0.279	8.03	0.482	0.899	0.525
<b>5</b>	6.227	0.521	0.188	0.664	0.192	6	0.154	5.385	-0.004	6.925	0.425	0.903	0.99
<b>6</b>	6.637	0.524	0.201	0.529	0.184	5.535	0.12	4.855	0.228	10.44	0.64	-	1.69
<b>7</b>	5.821	0.542	0.12	0.627	0.131	5.87	0.122	5.26	-0.415	8.765	0.52	0.927	0.385
<b>8</b>	6.314	0.505	0.167	0.575	0.304	5.815	0.113	5.22	-0.174	7.965	0.41	0.891	0.67
<b>9</b>	5.453	0.515	0.172	0.749	0.166	5.74	0.105	5.125	-0.502	8.94	0.515	0.955	0.315
<b>10</b>	5.834	0.47	0.173	0.76	0.206	5.485	0.112	4.825	-0.415	9.3	0.555	0.942	0.385

**DAP: diámetro a la altura del pecho, Log<sub>10</sub> P: logaritmo base 10 del fósforo fácilmente extraíble, % C: porcentaje de carbono, % N: porcentaje de nitrógeno, C.E: Conductividad eléctrica, 1-D micorrizas: recíproco del índice diversidad de Simpson de las secuencias de ectomicorrizas. P: fósforo.**



Cuadro 17. Correlación no paramétrica de Spearman  $\alpha=0.05$ , entre las variables y la diversidad. Los valores significativos ( $p < 0.05$ ) están subrayados.

	Distancia (m)	DAP (m)	Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre)	pH H <sub>2</sub> O	CE dS/m	pH KCl	% C	% N	(1-D) micorrizas	Log <sub>10</sub> P mg/Kg
Distancia (m)	1	-0.321	0.115	-0.576	0.539	-0.176	-0.030	-0.055	-0.236	-0.237	-0.714	<u>0.693</u>
DAP (m)		1	-0.030	-0.139	<u>-0.867</u>	<u>0.685</u>	<u>0.685</u>	0.564	-0.164	0.067	-0.464	0.006
Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo)			1	0.115	0.236	-0.139	-0.006	-0.103	0.345	0.365	0.179	0.395
Densidad g/cm <sup>3</sup>				1	-0.139	0.018	-0.115	-0.042	0.042	0.182	0.679	<u>-0.687</u>
Biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre)					1	-0.442	-0.455	-0.273	-0.042	-0.261	0.286	0.359
pH H <sub>2</sub> O						1	<u>0.879</u>	<u>0.976</u>	<u>-0.745</u>	-0.517	-0.679	0.091
CE dS/m							1	<u>0.842</u>	-0.588	-0.371	-0.607	0.365
pH KCl								1	<u>-0.830</u>	<u>-0.657</u>	-0.679	0.182
% C									1	<u>0.900</u>	<u>0.857</u>	-0.182
% N										1	<u>0.821</u>	-0.244
(1-D) micorrizas											1	-0.667
Log <sub>10</sub> P mg/Kg												1

DAP: diámetro a la altura del pecho, CE: Conductividad eléctrica, % C: porcentaje de carbono, % N: porcentaje de nitrógeno, 1-D micorrizas: recíproco del índice diversidad de Simpson de las secuencias de ectomicorrizas.

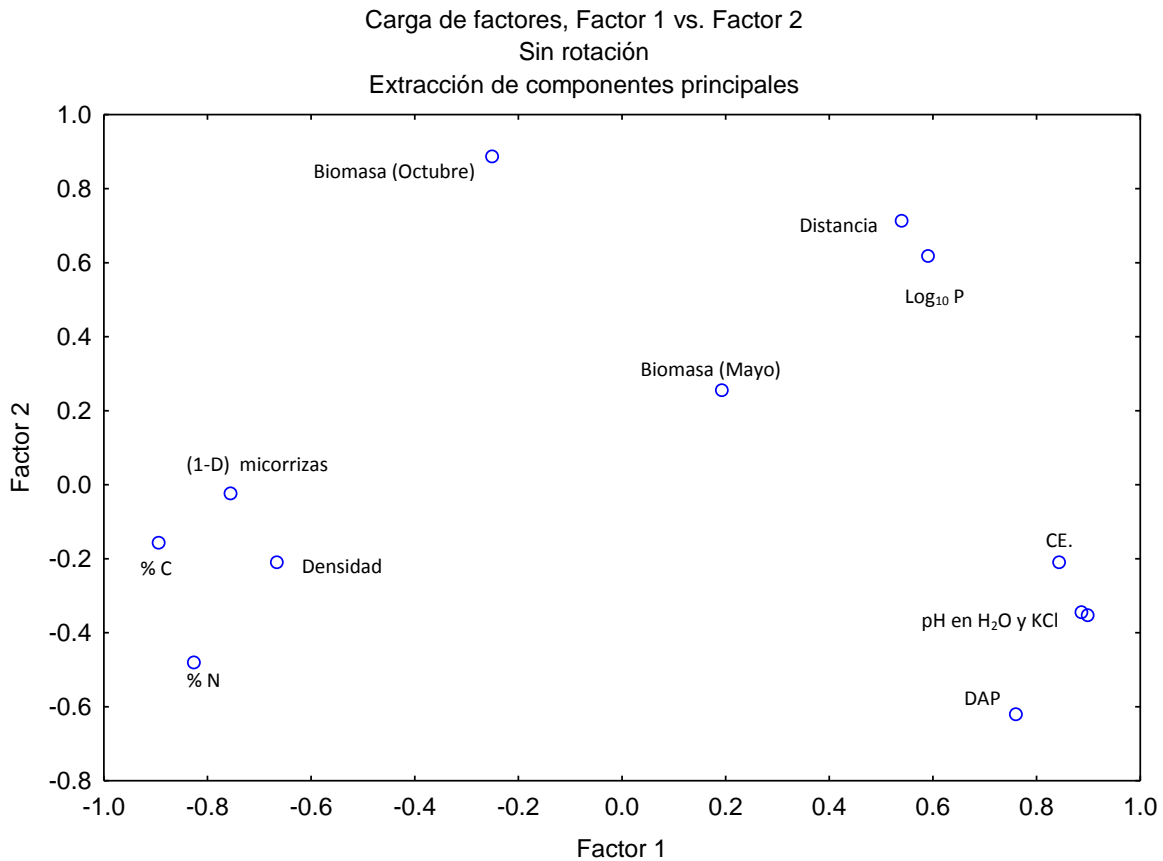
**Cuadro 18. Carga de factores con extracción de componentes principales. Las variables significativas están subrayadas ( $p < 0.1$ ).**

	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>
<u>Distancia (m)</u>	0.539	0.714
DAP (m)	0.760	-0.620
<u>Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo)</u>	0.192	0.256
Densidad g/cm <sup>3</sup>	-0.667	-0.209
<u>Biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre)</u>	-0.251	0.888
pH H <sub>2</sub> O	0.898	-0.353
<u>CE dS/m</u>	0.843	-0.209
pH KCl	0.886	-0.344
<u>% C</u>	-0.895	-0.156
% N	-0.826	-0.480
<u>(1-D) micorrizas</u>	-0.755	-0.023
Log <sub>10</sub> P mg/Kg	0.590	0.618

DAP: diámetro a la altura del pecho, CE: Conductividad eléctrica, % C: porcentaje de carbono, % N: porcentaje de nitrógeno, 1-D micorrizas: recíproco del índice diversidad de Simpson de las secuencias de ectomicorrizas.

**Cuadro 19. Eigenvalues de la extracción de los dos factores.**

	Eigenvalue	% Varianza total	% Var. Acumulada
<b>1</b>	6.118	50.987	50.987
<b>2</b>	2.714	22.623	73.611



**Figura 28. Análisis de factores con extracción de componentes principales. DAP: diámetro a la altura del pecho. Biomasa (octubre): biomasa de raíces secas en el mes de octubre. Biomasa (mayo): biomasa de raíces secas en el mes de mayo. % C: porcentaje de carbono. % N: porcentaje de nitrógeno. Densidad: densidad aparente. (1-D) micorrizas: Índice de Simpson de diversidad de micorrizas. CE: conductividad eléctrica.**

## Discusión

La vegetación en el sitio estudiado presenta diferentes gradientes en las variables tanto de suelo como de vegetación (Cuadro 4). Fue posible obtener 10 parcelas con sitios similares en cuanto a sus variables arbóreas. No obstante en los parámetros físicos químicos del suelo los sitios presentan heterogeneidad. Para los 21 sitios muestreados en el "Zarco", existen correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ), la correlación de  $r^2$  de porcentaje de carbono y de nitrógeno ( $r^2 = 0.931$ ), y la de pH H<sub>2</sub>O y pH KCl ( $r^2 = 0.906$ ) son mayores al 90%, por lo que hay que tener en cuenta que el carbono, y el nitrógeno covarían juntos y los valores de pH tanto en agua como en KCl evidentemente también. El diámetro a la altura del pecho tuvo una distribución multivariada Gaussiana, por lo que es una combinación lineal de sus componentes y por lo tanto cumple con el supuesto de normalidad. En el MANOVA $_{\alpha=0.05}$  encontramos que los árboles tienen una distribución espacial homogénea en cuanto a la distancia promedio entre ellos. Con excepción de la parcela 17 todas las demás produjeron un biomasa de raíces similar durante mayo (Anexo E). En cuanto al diámetro a la altura del pecho, las parcelas 70, 71, 72, 74 presentan un DAP diferente. A partir estos datos discriminamos entre sitios y encontramos parcelas en las cuales se controló la variable arbórea.

Existieron morfotipos dominantes dentro de cada parcela. El morfotipo con el manto externo color anaranjado (naranja recta) fue el dominante (608 micorrizas) en la comunidad. No obstante, los resultados de la secuenciación demostraron que pertenecen a taxa moleculares diferentes (*Inocybe* sp. 11 (aff. *salicis-herbaceae*), *Lactarius fennoscandicus*, *Russula firmula*, *Thelephoraceae* sp. 2., por ejemplo). También, hubo diferencia en la producción de micorrizas por parcela, debido a la diferente producción de raíces, por ejemplo en la parcela dos, existieron núcleos sin producción de raíces en la época de lluvias. La parcela 8 fue significativamente diferente en la producción de las raíces durante el mes de octubre a las demás parcelas. Además, existió un aumento en la producción de raíces entre mayo y octubre, aunque este no fue significativo. La densidad aparente del suelo también fue mayor en dos parcelas, la 9 y 10, aún en sitios con variables arbóreas similares (distancia entre árboles, biomasa de raíces del mes de mayo y DAP (m)).

Hubo un porcentaje de amplificación del 87 al 95 % (Cuadro 11) y la eficiencia de identidad de morfotipos recuperada fue de un 58 a 81 %, debido probablemente a presencia de inhibidores naturales como resina o restos de suelo en las muestras. Aun así, encontramos una riqueza de especies alta. Fueron diferenciadas 87 taxa repartidas entre dos phyla, 15 son Ascomycota y 72

Basidiomycota. La familia Clavulinaceae (*Clavulina cf. cinerea* y *Membranomyces spurius*) presentó la mayor cantidad de secuencias (127). La composición de la comunidad en función del número de especies por género coincide con otros trabajos realizados en este tipo de vegetación, con el hecho de que *Inocybe* es el género que más especies presenta en nuestro trabajo (21), seguido por *Tomentella* (10) y *Russula* (8). La mayor cantidad de especies de *Inocybe* es concordante con lo encontrado en otros trabajos (Vogt *et al.* 1982, Berndt *et al.* 1990, Pillukat 1996, Kernaghan *et al.* 1997, Agerer y Ammirati 1998, Commandini *et al.* 1998, Matsuda e Hijii 1998, Kranabetter *et al.* 1999, Massicotte *et al.* 1999, Matsuda e Hijii 1999a, Matsuda e Hijii 1999b, Eberhardt *et al.* 2000, Kernaghan *et al.* 2003, Laganà *et al.* 2002, Matsuda e Hijii 2004, Izzo *et al.* 2005a, Izzo *et al.* 2005b, Izzo *et al.* 2006, Ishida *et al.* 2007, Nuytinck *et al.* 2007, Kranabetter *et al.* 2009). No obstante la diversidad de *Russula* y *Lactarius* es mayor en latitudes más septentrionales pero Cortinariaceae (posiblemente *Inocybe*) siempre presenta la mayor cantidad de especies. En nuestro caso no encontramos *Cenococcium geophilum*, algo raro ya que es muy común en la mayoría de los ecosistemas, pero es coherente con lo que nos menciona Corrêa y Martins-Loução (2011) que sólo se encuentra en sitios muy estresados.

Si bien la familia Clavulinaceae (*Clavulina cf. cinerea* y *Membranomyces spurius*) presentó la mayor cantidad de secuencias, *Clavulina* sólo está reportada en bosques con *Arctostaphylos*, *Betula*, *Carpinus*, *Fagus*, *Populus*, y *Quercus* además de gimnospermas como *Pinus* y *Tsuga* en Europa (Uehling *et al.* 2012) sólo hay reportes de colectas en filogenias (Olariaga *et al.* 2009) utilizando vouchers de *C. cinerea*, *C. cristata* y *C. rugosa* provenientes de *Abies*, pero no aparece en trabajos sobre micorrizas. Tampoco hay reportes de micorrizas de *Membranomyces spurius* en los 21 trabajos para *Abies* conocidos en el mundo (Vogt *et al.* 1982, Berndt *et al.* 1990, Pillukat 1996, Kernaghan *et al.* 1997, Agerer y Ammirati 1998, Commandini *et al.* 1998, Matsuda e Hijii 1998, Kranabetter *et al.* 1999, Massicotte *et al.* 1999, Matsuda e Hijii 1999a, Matsuda e Hijii 1999b, Eberhardt *et al.* 2000, Kernaghan *et al.* 2003, Laganà *et al.* 2002, Matsuda e Hijii 2004, Izzo *et al.* 2005a, Izzo *et al.* 2005b, Izzo *et al.* 2006, Ishida *et al.* 2007, Nuytinck *et al.* 2007, Kranabetter *et al.* 2009). Ni en los 12 trabajos de hongos de *Abies religiosa* para México (Guzmán 1972, Guzmán y Villareal 1984, Valenzuela *et al.* 2004, Montoya *et al.* 2005, Arteaga y Moreno 2006, Landeros *et al.* 2006, Montoya *et al.* 2007, Villaruel y Cifuentes 2007, Guzmán *et al.* 2009, Franco-Mass y Burrola-Aguilar 2010, Pérez-Moreno *et al.* 2010, Medel *et al.* 2012) y tampoco se encuentra reportada en trabajos de ecología de ectomicorrizas para México (Garibay-Orijel 2008, Morris *et al.* 2008a, Morris *et al.* 2008b, Smith y Pfister 2009, Montoya *et al.* 2010, Reverchon *et al.* 2010,

Aguilar-Aguilar *et al.* 2011, Reverchon *et al.* 2011, Kennedy *et al.* 2011, Hasselquist *et al.* 2011, Reverchon *et al.* 2012, Garibay-Orijel *et al.* 2013), esto es importante porque amplía el rango de distribución de la especie propuesto (Uehling *et al.* 2012) por lo menos hasta el centro de México, además de suponer como árbol hospedero a *A.religiosa*.

De acuerdo con los estimadores de riqueza de especies (Chao 1 y Jack-Knife 1, Cuadro 11 y 12) es posible encontrar mayor cantidad de especies, por lo que un mayor esfuerzo de muestreo (más de 15 micorrizas por núcleo o un mayor número de núcleos, o más parcelas en la zona) permitirá encontrar más especies, pero sólo en ciertas zonas cercanas a las parcelas 9 y 10. Ishida y colaboradores (2007) para bosques mixtos con *Abies homolepis*, extrajeron 644 micorrizas sólo para bosque primario y 10 árboles, y en su estimador Jack-Knife 1 estimó de 60 a 80 especies, por lo que es mayor la cantidad obtenida en nuestra estimación (129). También encontramos más riqueza de especies para nuestro sistema que trabajos anteriores en México por esporomas. Guzmán (2009) es el que más especies de ECM cita por esporomas para *A.religiosa* (39) mientras que en este estudio logramos encontrar 87, no obstante Izzo *et al.* (2005a) encontraron 100 especies en *Abies concolor* y *Abies magnifica* utilizando extracción y secuenciación de ADN, la diferencia radica en que su estudio no es en bosques monoespecíficos ni monodominantes.

La abundancia, y frecuencia relativa se ven resumidas en el valor de importancia de la comunidad, en donde la *Clavulina cf. cinerea* fue la más importante, seguida por *Membranomyces spurius*. (Figura 20), Thelephoraceae sp. 1 está en tercer lugar de importancia no por ser abundante, sino por ser muy frecuente. La dominancia de *Clavulina cf. cinerea* y *Membranomyces spurius* es evidente en las parcelas 1, 4, 5 y 9 mientras que en las parcelas 7 y 8, *Tomentella pilosa* y Thelephoraceae sp. 1 son las dominantes, y en contraste, en la parcela 10 donde *Russula sp. 1* (aff. *olivobrunnea*) es la dominante, coincidiendo en ser la parcela que mayor porcentaje de N tiene (0.555 %) (Figuras 22-28). Comparándolo con el trabajo de Izzo y colaboradores (2005a), en el que estudiaron su comunidad por tres años diferentes, nuestra comunidad de hongos muestreada durante 2011 no es similar a ninguna época de muestreo de su trabajo, ya que *Lactarius* y *Wilcoxina* dominaron en abundancia en 1999, *Rhizopogon* y *Cenocccum* dominaron en 2001 y *Cenocccum* y *Wilcoxina* dominaron en 2002. Por lo que es posible la comunidad cambie entre parcelas al variar el año del muestreo. También es diferente la estructura de la comunidad de *A. religiosa* comparada con el trabajo de Ishida y colaboradores (2007), ya que en este trabajo, *Cenocccum geophilum* y *Tomentella sp. 6* son los más abundantes en estos bosques. También, comparando nuestros resultados con los de Kranabetter *et al.* 2009, nuestra comunidad es

diferente, ya que en su trabajo *Laccaria laccata* y *Piloderma* sp. 1 son los que presentan mayor abundancia.

Encontramos que la diversidad (riqueza y abundancia de especies) es diferente en las parcelas muestreadas (Cuadro 13), ya que hay parcelas con mayor Índice de Simpson (1-D) de especies (parcelas 9 y 10, 1-D= 0.955 y 0.942 respectivamente) y otras con menor diversidad (parcelas 1 y 8, 1-D = 0.775 y 0.891 respectivamente). El promedio (1-D= 0.898 (+-) 0.003) es similar a bosques no monoespecíficos de *Abies homolepis* con valores de 1-D = 0.937 en bosque primario y 0.91 en bosque secundario (Ishida *et al.* 2007). Los cambios en la diversidad de hongos se debe a los cambios en parámetros del suelo como el pH, nitrógeno y carbono (Lilleskov *et al.* 2002, Kranabetter *et al.* 2009, Cox *et al.* 2010)

En el Cuadro 17 con la correlación de Spearman, para la diversidad de ectomicorrizas (1-D) sólo el porcentaje de carbono (% C) y el porcentaje de nitrógeno (% N) son significativos ( $p < 0.05$ ). Por lo cual el efecto de los parámetros de suelo es claro. A lo largo de un depósito de N habrá mayor diversidad (Lilleskov *et al.* 2002, Kranabetter *et al.* 2009, Cox *et al.* 2010), ya que la mayoría de las especies de hongos que dominan en ecosistemas prefieren el  $\text{NH}_4^+$  como fuente de nitrógeno. Además, en nuestro caso la correlación de la diversidad y el pH es negativa, es decir cuando el pH se hace neutro esperamos menor diversidad. La producción de raíces también es un factor promotor de diversidad (Peay *et al.* 2011a). Encontramos que el aumento en DAP (m) y la C.E. (dS/m) se correlacionan de manera negativa a la diversidad. Como han sugerido Wallander y Nylund (1991, 1992), Högberg y colaboradores (2003), Nilsson y Wallander 2003, Treseder y colaboradores (2004), Hobbie (2006), Correã y colaboradores (2008, 2010); Corrêa y Martins-Loução (2012) la dominancia de un grupo cuando hay variación espacial, puede indicar que el grupo de hongos dominante prefiere invertir en micelio, ya que el micelio aumenta cuando disminuye la disponibilidad de N al estar secuestrado por los hongos (Näsholm *et al.* 2013) lo que aumenta la translocación de C por parte de la planta hacia los hongos. Por lo que es posible que *A. religiosa* favorezca la colonización por parte de la familia Clavulinaceae para obtener N ya que el recurso limitante es éste y no el P disponible, porque el N está en mayor cantidad en las parcelas donde domina la familia Clavulinaceae.

La densidad aparente y el  $\text{Log}_{10}$  P (mg/Kg) presentan correlación negativa significativa (-0.687  $p < 0.05$ ). Esto es congruente con los datos de Varela *et al.* (1994), y Varela y Aguilera (1995), quienes mostraron que existe una clara tendencia al aumento de la retención de fosfatos debido a los alófanos presentes. En nuestro caso la técnica de utilizada mide el P fácilmente extraíble o

disponible y no el total, que en su mayoría debe encontrarse secuestrado por los alófanos presentes en los sitios de mayor densidad y por lo tanto se requiere de una dinámica enzimática más compleja para hacerlo disponible por los hongos (Plassard y Dell 2010). Así, donde hay mayor densidad aparente hay menor cantidad de P ya que se infiere una mayor cantidad de alófanos (por la característica de los Andosoles de presentar arcillas de bajo orden estructural) lo que permite una mayor retención de fósforo. Por lo que al conseguir el valor de P total estará positivamente correlacionado con la densidad aparente. La densidad aparente no es un estimador completo del espacio poroso, ya que falta la porosidad determinada por textura e incluir la perturbación por las raíces de *Senecio* y *Eupatorium*. En los sitios con menor densidad (0.5) hay más aire, pero menor capacidad de retener agua y más P (disponible) mientras que en los de densidad media o alta (0.7 g/cm<sup>3</sup>) suponemos hay más alófanos y por lo tanto menos P disponible. En los sitios con baja diversidad (parcelas 1 y 8) encontramos que la densidad aparente es baja (0.5-0.56 g/cm<sup>3</sup>) y sus valores de P son mayores y en las parcelas 9 y 10 poco contenido de P disponible. En el trabajo de Reverchon y colaboradores (2010) con *Pinus*, encontraron que no hay diferencia significativa en diversidad (Índice de Shannon) entre los sitios, aun cuando hay un gradiente de P y de N, pero la diversidad es menor en sitios con densidad de 0.86 g/cm<sup>3</sup>, y el porcentaje de nitrógeno bajo (0.7). También Reverchon y colaboradores (2011) señalan que existe variación intragenérica entre los patrones de fructificación y las características del sitio. Por lo que el suelo y las características que lo conforman son un determinante muy fuerte en la fenología y ecología de los hongos (Tedersoo *et al.* 2012). La densidad aparente debe ser un parámetro para estimar la dominancia de especies en suelos andosólicos, ya que como se ha demostrado, los alófanos son su principal componente porque le confieren baja densidad aparente y nos permite inferir la capacidad de secuestrar fósforo. Un parámetro que no medimos y no es muy utilizado, pero es necesario explorar en futuros estudios, es la saturación de bases (Toljander *et al.* 2006) que explica significativamente el 20% de la varianza de sus datos, en adición del 22.4% de lo explicado por el N.

En el análisis de factores (Cuadro 18), el factor 1 representa la salud del suelo, compuesto por un contenido alto de carbono y nitrógeno, y una buena densidad aparente. El factor 2 representa la producción anual de raíces ya que son los sitios de intercambio con el hospedero. Ambos factores explican el 73.02% de la varianza. El primer factor, en el que el porcentaje de C y N covarian con la diversidad (1-D), mientras que el pH (en agua y KCl) covaría negativamente (-0.898 y -0.86). Esto puede explicar que los sitios con más diversidad tiene un pH ácido, lo que inhibe la actividad microbiana, además de una densidad aparente mayor lo que evita una mayor cantidad de oxígeno,



que es limitante para las bacterias, en especial para las *Pseudomonas* (Moore *et al.* 2006). Con este escenario, en los sitios 1, 4, 5 y 9 que tienen menor diversidad (más dominancia), hay más cantidad de espacio poroso, y el pH es más neutro, lo que permite que las bacterias mineralizan más eficientemente, mitiguen el estrés ambiental y promuevan a la ectomicorrizas de *Clavulina*, no obstante es necesario evaluar experimentalmente este escenario, así también la capacidad de *Clavulina* para desplazar a otras especies por exclusión competitiva.

También, el pH desencadena cambios en la estructura de la comunidad de hongos ECM (Baar, 1996, Erland y Taylor 2002; Kraigher y Al Sayegh Petkovšek 2011). El pH tiene un efecto en la capacidad de intercambio catiónico (CIC). Los cationes intercambiables en pH neutro están adheridos a las moléculas de humus, por lo que es un ambiente muy desfavorable al no estar disponibles en la solución del suelo los nutrientes para los hongos. Así la heterogeneidad del hábitat (Bruns 1995) y su repartimiento entre las especies es un factor adicional al tipo de hospedero (Tedersoo *et al.* 2012) al momento de explicar la diversidad de éstos hongos en el suelo.

En el factor 2 (Cuadro 18), la biomasa de las raíces en el mes de octubre (durante la época de lluvias), tiene un efecto también positivo (0.895) aunque no estadísticamente significativo sobre la diversidad, esto se debe a que con mayor cantidad de raíces, habrá mayores sitios de colonización por parte del micelio de los hongos. En nuestros sitios la cantidad de micorrizas no fue homogénea, ya que en varios núcleos por parcela no se encontraron las 15 micorrizas por núcleo ya que no había raíces (parcelas 1, 4, 5, 7, 8, 9). Newton (1992) afirma que el recurso por el cual compiten los hongos son las raíces ya que ahí es el sitio de intercambio de nutrientes por carbono con la planta. Para esto sugiere que una cantidad de raíces mayor, provee de mayores sitios disponibles para la colonización lo que debe favorecer a aquellos hongos que se dispersan por micelio. Chilvers y Gust (1982) comentan que la infección secundaria vía micelio también está influenciada por la disponibilidad de ápices de las raíces lo que apoya la idea de que las raíces son el recurso primordial de los hongos ECM.

Observamos que en las parcelas 9 y 10 son las que presentan la mayor diversidad, y la mayor cantidad de micorrizas, pero de manera interesante, las parcelas presentaron diferente producción de raíces y diferente producción de micorrizas durante octubre, y no siempre están relacionadas como observamos en la Figura 10 comparada con la producción de micorrizas de la Figura 8. La parcela 8 es la única que presenta una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la producción de raíces pero su producción de micorrizas fue de 114, mientras que la parcela 3 y 10

produjeron más de 135 micorrizas pero no hay diferencias significativas en la producción de raíces. La densidad de los árboles puede afectar la riqueza de los hongos por muchos factores, uno de ellos es la diferencia en la cantidad de raíces en el suelo. En el trabajo de Peay y colaboradores (2007) observan en *Pinus muricata* que la riqueza de especies de hongos ectomicorrízicos aumenta con el área y la densidad de los árboles. Peay y colaboradores (2011a) muestran que la colonización de las plántulas está dada por la diferencia cuantitativa entre la abundancia de las esporas y su reactividad mientras que la colonización de los hongos en árboles maduros depende de la dispersión vía micelio de los hongos y su competencia por las raíces. También señalan que la estrategia óptima para la competencia de los micelios cambia con la densidad de las raíces, porque los gradientes naturales en la densidad contribuyen a patrones predecibles de zonificación espacial o temporal observada en los ensamblajes de comunidades de hongos ECM. Peay y colaboradores (2008) comentan que una heterogeneidad de hábitat permite una mayor diversidad, y esto es cierto en nuestro caso, a nivel de la comunidad.

A una escala más fina existen otros determinantes de la diversidad. Es decir en sitios con más N hay mayor cantidad de especies pertenecientes a la familia Russulaceae. Además el N no sólo promueve la diversidad sino que cambia la composición de la comunidad (Avis *et al.* 2003). A pesar de esto se ha encontrado que un exceso en la cantidad de N disminuye la riqueza y cambia la composición de la comunidad. (Avis *et al.* 2008). En nuestro sitio, el N no disminuye la riqueza pero si cambia la composición de la comunidad en cada parcela. Con esto explicamos que en la parcela 10 exista una dominancia de *Russula* sp. 1 (*aff. olivobrunnea*) y de *R. firmula* ya que tiene mayor porcentaje de N (0.555) y como señala Avis (2012), existen hongos nitrofilicos como los son las *Russulas*, y comparando la parcela 10 y la parcela 1, ésta tiene un porcentaje de nitrógeno de 0.415 y un pH más neutro por lo que domina *Clavulina* cf. *cinérea*. También en la parcela 1 hay menor biomasa de raíces comparada con la parcela 10. Con todo esto, encontramos que aunque haya similitud en las variables arbóreas (Distancia, DAP y biomasa de raíces durante el mes de mayo) la heterogeneidad ambiental del suelo determina la probabilidad de encontrar que al muestrear dos micorrizas éstas pertenezcan a distintas especies.

Así, el factor 1, compuesto por, el pH en agua, el pH en KCl, el porcentaje de carbono, representa la salud del suelo para la diversidad de ectomicorrizas, es decir un sitio con contenido alto de C, N y diversidad es un sitio con salud, mientras que uno con pH casi neutro permite una mayor inmovilización (al tener una capacidad de intercambio catiónico baja) de cationes y por lo tanto con menor salud. El factor 2 representa la producción de raíces durante el mes de octubre,

indicando que a más raíces mayor diversidad (menor dominancia) al existir mayor cantidad de sitios de colonización (Figura 28).

## Conclusiones

1. Los análisis estadísticos multivariados, permitieron discriminar la existencia de parcelas con características de vegetación similares (diez parcelas en total, de las 21 parcelas establecidas), pero aún siendo las diez parcelas similares en vegetación, presentaron un gradiente en el ambiente edáfico.
2. Dentro del bosque monoespecífico de *Abies religiosa*, aún con características arbóreas similares, encontramos 87 especies de hongos ectomicorrízicos distribuidos heterogéneamente en las parcelas, pero estos hongos tienen una diferente composición en la comunidad, dependiendo de la parcela en la que se encuentran, por lo tanto la riqueza y la abundancia son variables al muestreo dentro de la parcela.
3. Las características físico químicas del suelo producen un efecto diferencial sobre la comunidad de hongos ectomicorrízicos, al estructurar de diferente forma a ésta. En la variable edáfica, el factor principal es la salud del suelo (mayor porcentaje de C y N, un pH más ácido), y el factor 2 la biomasa de las raíces en la época de lluvias. Estos dos factores tienen un efecto promotor sobre la diversidad.
4. Existe heterogeneidad espacial de las características suelo aun cuando las parcelas son lo más similares en cuanto a estructura arbórea. Esto debido a la historia del desarrollo particular del suelo (algunas más desarrolladas que otras) en cada parcela de estudio. La heterogeneidad del suelo, genera diferencia en la estructura de la comunidad de los hongos, produciendo diferente diversidad en las parcelas y, por lo tanto en toda la comunidad.

## Referencias

- Agerer, R. (ed) 2002 Colour Atlas of Ectomycorrhizae, 1st – 12<sup>th</sup>. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Agerer, R., Ammirati, J. 1998. Desc. Ectomyc. Vol. 3. 85-91 In. Agerer, R. (Ed). 1998 Colour atlas of ecomycorrhiza. Plate 130. Einhorn Schwäbisc Gmünd.
- Aguilar-Aguilar, S., González-Mendoza, D., Grimaldo-Juarez, O. 2011. Ectomicorrizas asociadas a *Pinus jeffreyi* en el Parque Nacional “Constitución de 1857” en Baja California, México. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Vol. 17(3):325-332.
- Aguilera, N. 1969. Distribución geográfica y características de los suelos derivados de cenizas volcánicas en México. Panel sobre suelos derivados en América Latina. Instituto interamericano de ciencias agrícolas de la OEA. Turrialba, Costa Rica. Memoria. Páginas: A.6.1-A.610.
- Aguilera, N. 1989. Tratado de Edafología de México. Tomo I. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. D.F. 222 p.
- Aguirre-Díaz, G. J., Carrasco-Hernández, J. 1999. Erupciones asociadas a colapsos sectoriales dirigidos en el sector septentrional de la Sierra de las Cruces norte: Reunión Anual de la Unión Geofísica Mexicana. Geos. Vol. 19:319.
- Aguirre-Díaz, G. J., Carrasco-Hernández, J., López-Martínez, M. 1999. Nuevas calderas en el sector central del Cinturón Volcánico Mexicano: Reunión Anual de la Unión Geofísica Mexicana. Geos. Vol. 19.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic alignment search tool. Journal of Molecular Ecology. Vol. 215:403-410.
- Álvarez, V. H. 1982. Efecto de los factores calidad, intensidad y calidad amortiguadora de fosfatos en la evolución de fósforo disponibles de suelos derivados de cenizas volcánicas de la meseta Tarasca. Edo. Michoacán. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

- Amaranthus, M. P. 1998. The importance and conservation of ectomycorrhizal fungal diversity in forest ecosystems: Lessons from Europe and the Pacific Northwest. Gen. Tech. Portland, OR, EUA. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 20 p.
- Anderson, I. C., Chambers, S. M., Cairney, J. W. G. 1999. Intra- and interspecific variation in patterns of organic and inorganic nitrogen utilization by three Australian *Pisolithus* species. Mycological Research. Vol. 103:1579-1587.
- Andren, O., Balandreau, J. 1999. Biodiversity and soil functioning - from black box to can worms? Applied Soil Ecology. Vol. 13:105-108.
- Arteaga, B., Moreno, C. 2006. Los hongos comestibles silvestres de Santa Catarina del Monte Estado de México. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Vol. 12:2:125-148.
- Avis, P. G., McLaughlin, D. J., Dentinger, B.C., Reich, P. B. 2003. Long-term increase in nitrogen supply alters above and below-ground ectomycorrhizal communities and increases the dominance of *Russula* spp. in a temperate oak savanna. New Phytologist. Vol. 160:239-253.
- Avis, P. G., Mueller, G. M., Lussenhop, J. 2008. Ectomycorrhizal fungal communities in two North American oak forests respond to nitrogen addition. New Phytologist. Vol. 179:472-483.
- Avis, P. G. 2012. Ectomycorrhizal iconoclasts: the ITS rDNA diversity and nitrophilic tendencies of fetid *Russula*. Mycologia. Vol. 104(5):998-1007.
- Baar, J. 1996. The ectomycorrhizal flora of primary and secondary stands of *Pinus sylvestris* in relation to soil conditions and ectomycorrhizal succession. Journal of Vegetation Science. Vol. 7(4):497-504.
- Bardgett, R.D., Shine, A. 1999. Linkages between plant litter diversity, soil microbial biomass and ecosystem function in temperate grasslands. Soil Biology & Biochemistry. Vol. 31:317-321.

- Baxter, J. W., Dighton J., 2005. Chapter 19. Diversity-functioning relationships in ectomycorrhizal fungal communities. In: Dighton, J., White, J. F., Oudemans, P. (eds). 2005. The fungal community its organization and role in the ecosystem. Third edition. CRC Press. FL. EUA. 943 p.
- Berndt, R., Kottke, I., Oberwinkler, F. 1990. Ascomycete Mycorrhizas from Pot-Grown Silver-Fir Seedlings (*Abies alba* Mill.) New Phytologist. Vol. 115:471-482.
- Brady, N.C., Weil, R.R., 2008. The nature and properties of soils. 14 edición. Pearson Prentice Hall. EUA. 975 p.
- Bonfante, P., Genre, A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant - fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nature Communications. Vol. 1(4):1-11.
- Bruns, T. D, 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil. Vol. 170:63-73.
- Chilvers, G. A., Gust, L. W. 1982. The development of mycorrhiza population on pot-grow seedling of *Eucalyptus St-Johnii* R. T. Bak. New Phytologist. Vol. 90(4):677-699.
- Coleman, D. C., Crossley, D. A. 1996. Fundamentals of Soil Ecology. Academic Press. EUA. 205 p.
- Commandini, O., Pacioni, G., Rinaldi, A. C., 1998. Fungi in ectomycorrhizal associations of silver fir (*Abies alba* Miller) in Central Italy. Mycorrhiza. Vol. 7:323-328.
- Comandini, O., Rinaldi, A.C., Kuyper, T.W. 2012. Chapter 9. Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: A continuous challenge. In: Pagano, M. (ed). 2012. Mycorrhiza: Occurrence in Natural and restored environment. p. 165-200.
- Corrêa, A., Magel, E., Hampp, R., Martins-Loução, M. A .2010. Carbon allocation in ectomycorrhizal plants at limited and optimal N supply: an attempt at unraveling conflicting theories. Mycorrhiza. Vol. 21(1):35-51.
- Corrêa, A., Strasser, R. J., Martins-Loução, M. A. 2008. Response of plants to ectomycorrhizae in N-limited conditions: which factors determine its variation? Mycorrhiza 18:413-427.

- Corrêa, A., Martins-Loução, M. A. 2011. Chapter 17. C: N Interactions and the Cost: Benefit Balance in Ectomycorrhizae. In: Rai, M., Varma, A. 2011. Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae. Springer. NY. EUA. 458 p.
- Courty, P. E, Franc, A., Pierrat, J. C, Garbaye, J. 2008. Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. Applied Environmental Microbiology. Vol. 74:5792-5801.
- Cox, F., Barsoum, N., Lilleskov, E. A., Bidartondo, M. I. 2010. Nitrogen availability is a primary determinant of conifer mycorrhizas across complex environmental gradients. Ecological Letters. Vol. 13(9):1103-1113.
- Cudlin, P., Kieliszewska-Rokicka, B., Rudawska, M., Grebenc, T., Alberton, O., Lehto, T., Bakker, M. R., Börja, I., Konopka, B., Leski, T., Kraigher, H., Kuyper, T. W. 2007. Fine roots and ectomycorrhizas as indicators of environmental change. Plant Biosystems. Vol. 141(3):406-525.
- Deacon, J. 2006. Chapter 6. Fungal nutrition. Fungal Biology. 4th edition. Blackwell Publishing. RU. 380 p.
- Degens, B. P., Schipper, L. A., Saprling, G.P., Duncan, L. C. 2001. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? Soil Biology and Biochemistry. Vol. 33:1143-1153.
- Dickie, I. A., Richardson, S. J, Wiser, S. K. 2009. Ectomycorrhizal fungal communities and soil chemistry in harvested and unharvested temperate *Nothofagus* rainforests. Canadian Journal of Forest research. Vol. 39:1069-1079.
- Diedhiou, A., Selosse, M.A, Galiana, A., Diabate, M., Dreyfus, B., Ba, A. M., de Faria, S. M, Béna, G. 2010. Multi-host ectomycorrhizal fungi are predominant in a Guinean tropical rainforest and shared between canopy trees and seedlings. Environmental Microbiology. Vol. 12: 2219-2232.



- Dighton, J., y Skeffington, R. A. 1987. Effects of artificial acid precipitation on the mycorrhizas of scot pine seedlings. *New Phytologist*. Vol. 107:191-202.
- Eberhardt, U., Oberwinkler, F., Verbeken, A., Rinaldi, A.C., Pacioni, G., Comandini, O. 2000. *Lactarius* ectomycorrhizae on *Abies alba*: morphological description, molecular characterization, and taxonomic remarks. *Mycologia*. Vol. 92(5):860-873.
- Eltrop, L., Marschner, H. 1996. Growth and mineral nutrition of non-mycorrhizal and mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies*) seedlings grown in semi-hydroponic sand culture 1. Growth and mineral nutrient uptake in plants supplied with different forms of nitrogen. *New Phytologist*. Vol. 133:469-478.
- Erland, S., Taylor, A. F. S. 2002. Chapter 7. Diversity of ectomycorrhizal fungal communities in relation to the abiotic environment. In: van der Heijden, M., Sanders, T. (eds). 2002. The ecology of mycorrhizas. *Ecological Studies Series*, Vol. 157., Springer. Alemania. 469 p.
- Estrada-Torres, A. 2003. Ecología de los hongos ectomicorrizógenos. In: Estrada-Torres, A., Santiago-Martínez, M. G. 2003. Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. 76 p.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. World reference base for soil resources. *World Soil Resources Report 84*, Roma. Italia. 145 p.
- Flores, M., G., Jiménez, J., Madrigal, X., Moncayo, F., Takaki R y F. 1971. Memoria del mapa de tipos de vegetación de la Republica Mexicana. Secretaría de Recursos Hidráulicos. México, D. F. 59 p.
- Franco-Maass, S. C., Burrola-Aguilar, C. 2003. Los hongos comestibles del nevado de Toluca. Capítulo VI. In: Franco-Maass, S. C., Burrola-Aguilar, C. 2003 (compiladores). Los hongos comestibles del nevado de Toluca. Editorial UAEM. México. 147 p.

- García-Calderón, N. E., Krasilnikov., Valera-Pérez M. A., Torres-Trejo, E. 2007. Suelos. In: Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana. Luna, I., Morrone J. J., Espinosa, D. (eds). UNAM. México. 514 p.
- García-Palomo, A., Macías, J. L., Arce, J. L., Capra, L., Garduñoa, V. H., Espindola, J. M. 2002. Geology of Nevado de Toluca Volcano and surrounding areas, central Mexico Boulder, Colorado, Geological Society of America Map and Chart Series MCH089. EUA. 26 p.
- García-Palomo, A., Zamorano, J. J., López-Miguel, C., Galván-García, A., Carlos-Valerio, V., Ortega, R., Macías, J. L. 2008. El arreglo morfoestructural de la Sierra de Las Cruces, México central. Revista Mexicana de Ciencias Geológicas. Vol. 25(1):158-178.
- Gardes, M., Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology. Vol. 2:113-118.
- Garibay-Orijel, R. 2008. Importancia funcional de los hongos ectomicorrícicos. In. Martínez-Ramos, M. 2008. Grupos funcionales, en Capital natural de México, Vol. I. Conocimiento de la biodiversidad. CONABIO. México. 618 p.
- Garibay-Orijel, R., Martínez-Ramos, M., Cifuentes, J. 2009. Disponibilidad de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlan de Juárez, Oaxaca. Revista Mexicana de Biodiversidad. Vol. 80:521-534.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M., Flores-García, A. 2013. Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. Revista Mexicana de Biodiversidad. Vol 84(1):153-169.
- Garza, F., García, J., Castillo, J. 1985. Macromicetos asociados al bosque de *Quecus rysophylla* en algunas localidades del centro del estado de Nuevo León. Revista Mexicana de Micología. Vol. 20:423-438.

- Garza-Ocañas, F. 1986. Hongos ectomicorrizógenos en el estado de Nuevo León. *Revista Mexicana de Micología*. Vol. 2:197-206.
- Gebhardt, H. Coleman, N. T. 1974. Anion adsorption by allophanic tropical soil II. Phosphate adsorption. *Soil Science Society of America Proceedings*. Vol. 38:263-265.
- Gispert, M., Nava, O., Cifuentes, J. 1984. Estudio comparativo del saber popular de los hongos en dos comunidades de la Sierra del Ajusco. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. Vol. 19:253-264.
- Guzmán, G. 1972. Algunos macromicetos, líquenes y mixomicetos importantes en la zona del Volcán Popocatepetl (Amecameca-Tlamacas, México) In: *Guías Botánicas de Excursiones*. 1 Congreso Latinoamericano de Botánica, V Mexicano de Botánica. Sociedad Botánica Mexicana. 17-42 p.
- Guzmán, G., Villareal, L. 1984. Estudio sobre los hongos, líquenes y mixomicetos del cofre de perote, Veracruz, I: Introducción a la Mico-Flora de la región. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. Vol. 19:107-124.
- Guzmán, G., Medel, R., Ramírez-Guillén, F. 2009. Hongos. La diversidad biológica del Estado de México. Estudio de estado. Gobierno del Estado de México. México. 523 p.
- Hasselquist, N.J., Douhan, G. W., Allen, M. F. 2011. First report of the ectomycorrhizal status of boletes on the Northern Yucatan Peninsula, Mexico determined using isotopic methods. *Mycorrhiza*. Vol. 21(6):465-471.
- Hidalgo, C., Etchevers, J. D., Martínez, B. 1986. Determinación de la densidad aparente en suelos de Ando. *Terra*. Vol. 4:3-9.
- Hidalgo, C. 1988. Caracterización y dispersión en suelos de Andosol. Tesis de Licenciatura. Escuela nacional de ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.

- Hobbie, E. A. 2006. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. *Ecology*. Vol. 87:563-569.
- Högberg, M. N., Bååth, E., Nordgren, A., Arnebrant, K., Högberg, P. 2003. Contrasting effects of nitrogen availability on plant carbon supply to mycorrhizal fungi and saprotrophs- a hypothesis based on field observations in boreal forest. *New Phytologist*. Vol. 160:225-238.
- Horton, T. R., Bruns, T. D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*. Vol. 10(8):1855-1871.
- Ingestad, T., Arveby, A. S., Kähr, M. 1986. The influence of ectomycorrhiza on nitrogen nutrition and growth of *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant Physiology*. Vol. 68:575-582.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2011. Anuario estadístico del Estado de Mexico 2011. Documento electrónico  
<http://inegi.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/aee11/info/mex/mapas.pdf>
- 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 Phytologist*. Vol. 174(2):430-472.
- Izzo, A., Agbowo, J., Bruns, T. D. 2005a. Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal community across years in an old-grow mixed-conifer forest. *New Phytologist*. Vol. 166:619-630.
- Izzo, A., Meyer, M., Trappe, J. M., North, M., Bruns, T. D. 2005b. Hypogeous ectomycorrhizal fungal species on roots and in small mammal diet in a Mixed-Conifer Forest. *Forest Science*. Vol. 51:243-254.
- 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*. Vol. 98:374-383.
- Jairus, T, Mpumba, R., Chinoya, S., Tedersoo, L. 2011. Invasion potential and host shifts of Australian and African ectomycorrhizal fungi in mixed eucalypt plantations. *New Phytologist*. Vol. 192:179-187.
- Jones, M.D., Durall, D. M., Tinker, P. B. 1991. Fluxes of carbon and phosphorus between symbionts in willow ectomycorrhizas and their changes with time. *New Phytologist*. Vol. 119:99-106.
- Kennedy, P. G., Garibay-Orijel, R., Higgins, L. M., Ángeles-Argáiz, R. 2011. Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza*. Vol. 6:559-568.
- Kernaghan, G. 2005. Mycorrhizal diversity: Cause y effect? *Pedobiologia*. Vol. 49:511-520.
- Kernaghan, G., Currah, R. S., Bayer, R.J. 1997. Russulaceous ectomycorrhizae of *Abies lasiocarpa* and *Picea engelmannii*. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 75:1843-1850.
- Kernaghan, G., Widden, P., Bergeron, Y., Legare, S., Pare, D., 2003. Biotic and abiotic factors affecting ectomycorrhizal diversity in boreal mixed-woods. *Oikos*. Vol. 102:497-507.
- Kjøller R. 2006. Disproportionate abundance between ectomycorrhizal root tips and their associated mycelia. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 58:214-224.
- Kong-Luz, A. 1998. Ectomycorrhizal Agaricales of Tlaxcala, México. *Miclavinaea*. Vol. 13:13-24.
- Kraigher, H., Al Sayegh-Petkovsěk, S. 2011. Chapter 13. Mycobioindication of Stress in Forest Ecosystems. In: Rai, M., Varma, A. 2011. *Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae*. Springer NY, EUA. 458 p.
- Kranabetter J.M., Hayden S., Wright E.F. 1999. A comparison of ectomycorrhiza communities from three conifer species planted on forest gap edges. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 77. 1193-1198.

- 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*. Vol. 19(2): 99-111.
- Krebs, C. 1999. *Ecological Methodology*. 2nd edition. Addison-Wesley Educational Publishers, Inc. EUA. 624 p.
- Laganà, A., Angiolini, C., Loppi, S., Sañerni, E., Perini, C., Barluzzi, C., De Dominicis, V. 2002. Periodicity, fluctuations and successions of macrofungi in fir forest (*Abies alba* Miller) in Tuscany Italy. *Forest Ecology and Management*. Vol. 169:187-202.
- Landeros, F., Castillo, J., Guzmán, G., Cifuentes, J. 2006. Los hongos (macromicetos) conocidos en el Cerro el Zamorano (Querétaro-Guanajuato). *Revista Mexicana de Micología*. Vol. 22:25-31.
- León, G., Guzmán, G. 1980. Las especies de hongos micorrízicos conocidas en la región de Uxpanapan-Coatzacoalcos-Los Tuxtlas-Papaloapan-Xalapa. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. Vol. 14:27-38.
- 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*. Vol. 83:104-115.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Jector, A., Hooper, D. U., Huston, M.A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., Wardle, D.A. 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science*. Vol. 294:804-808.
- Massicotte, H. B., Molina, R., Tscksberry, L. E., Smith, J. E., Amaranthus, M. P. 1999. Diversity and host specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from three adjacent forest sites by five host species. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 77:1076-1076.
- Matsuda, Y., Hijii, N. 1998. Spatiotemporal distribution of fruitbodies of ectomycorrhizal fungi in an *Abies firma* forest. *Mycorrhiza*. Vol. 8:131-138.

- Matsuda, Y., Hiji, N. 1999a. Characterization and identification of *Strobilomyces confusus* ectomycorrhizas on Momi Fir by RFLP analysis of the PCR-Amplified ITS Region of the rDNA. Journal of Forest Research. Vol. 4:145-150.
- Matsuda, Y., Hiji, N. 1999b. Ectomycorrhizal morphotypes of naturally grown *Abies firma* seedlings. Mycoscience. Vol. 40:217-226.
- Matsuda, Y., Hiji, N. 2004. Ectomycorrhizal fungal communities in an *Abies firma* forest, with special reference to ectomycorrhizal associations between seedlings and mature trees. Canadian Journal of Botany. Vol. 82:822-829.
- Medel, R., Baeza, Y., Mata, G., Trejo, D. 2012. Ascomicetos ectomicorrízicos del Parque Nacional Cofre de perote. Revista Mexicana de Micología. Vol. 35:43-47.
- Molina, R., Massicotte, H., Trappe, J. M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications :357-423. In: Allen, M. F. (Ed). 1992. Mycorrhizal functioning: An integrative plant-Fungal process. Chapman & Hall. NY. EUA. 534 p.
- Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A., Cifuentes, J., Caballero, J. 2005. Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. Fungal diversity. Vol. 17(8):115-143.
- Montoya, A., Méndez-Espinoza, C., Flores-Rivera, R., Kong, A., Estrada-Torres, A. 2007. Hongos tóxicos de Tlaxcala. Libro técnico No. 2. INIFAP . CENID-COMEF. UAT. México. D.F. 85 p.
- Montoya, L., Haug, I., Bandala, V.M. 2010. Two *Lactarius* species associated with a relict *Fagus grandifolia* var. *mexicana* population in a Mexican montane cloud forest. Mycologia. Vol. 102(1):153-62.
- Mora-Alvarez, G., Caballero-Miranda, C., Urrutia-Fucugauchi, J., Uchiumi, S. 1991. Southward migration of volcanic activity in the Sierra de Las Cruces, basin of Mexico? : A preliminary K-Ar dating and paleomagnetic study: Geofísica Internacional. Vol. 30(2):61-70.

- Moreno, C. E. 2001. Métodos para medir biodiversidad. M&T. Manuales y Tesis SA. Vol.1. Zaragoza. España. 86 p.
- Morris, M. H., Pérez-Pérez, M. A. Smith, M. E. Bledsoe, C. S. 2008a. Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a tropical cloud forest. FEMS Microbiology Ecology. Vol. 69:274-287.
- Morris, M. H., Pérez-Pérez, M.A. Smith, M.E. Bledsoe, C. S. 2008b. Multiple species of ectomycorrhizal fungi are frequently detected on individual oak root tips in a tropical cloud forest. Mycorrhiza. Vol. 18:375-383.
- Moore, E. R. B., Tindall, B. J., Martins dos Santos, M. D., Pieper, D. H., Ramos, J. L., Palleroni, N. J. 2006. Nonmedical: Pseudomonas. Chapter 3.3.21. The Prokaryotes. Springer Singapur. 1028 p.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science. Vol. 54:655-670.
- Näsholm, T., Högborg, P., Franklin, O., Metcalfe, D., Keel, S.G., Campbell, C., Hurry, V., Linder, S., Högborg, M.N. 2013. Are ectomycorrhizal fungi alleviating or aggravating nitrogen limitation of tree growth in boreal forests? The New phytologist Vol. 198:214-21.
- Nehls, U. 2008. Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. Journal of Experimental Botany. Vol. 59:1097-1108.
- Newton, A. C, 1992. Towards a functional classification of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza. Vol. 2:75-79.
- Nilsson, L.O., Wallander, H. 2003. Production of external mycelium by ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce forest was reduces in response to nitrogen fertilization. New Phytologist. Vol. 158:409-416.
- Nuytinck, J., Verbeken, A., Miller, S. L. 2007. Worldwide phylogeny of *Lactarius* section *Deliciosi* inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia. Vol. 99(6):820-832.



- Olariaga, I., Jugo, B. M., García-Etxebarria, K., Salcedo, I. 2009 Species delimitation in the european species of *Clavulina* inferred from phylogenetic analyses of ITS region and morphology. *Mycological Research*. Vol. 113:1261-1270.
- Parfitt, R. I. Fraser, A. R., Russell, J. D., Farmer, V. C. 1977. Adsorption on hydrous oxides II: Oxalate, benzoate and phosphate on gibbsite. *Journal of soil science*, Vol. 28:40-47
- Peay, K. G, T. D. Bruns, P. G Kennedy, S.E. Bergemann, M. Garbelotto, 2007. A strong species area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecology Letters*. Vol. 10:470-480.
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., Bruns, T. D. 2008. Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *Bioscience*. Vol. 58(9):799-810.
- Peay, K. Kennedy P. G, Bruns, T. D. 2011a. Rethinking ectomycorrhizal succession: are root density and hyphal exploration types drivers of spatial and temporal zonation? *Fungal Ecology*. Vol. 4:233-240.
- Peña-Cabriales, J. K., Valdés, M. 1973. Antagonismos de los hongos de la micorriza del oyamel (*Abies religiosa*) hacia algunos patógenos de especies forestales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 15(2):107-111.
- Pérez-Moreno, J., Lorenzana-Fernández, A., Carrasco-Hernández, V., Yescas- Pérez, A.. 2010. Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT. Montecillo, Texcoco, Estado de México. México. 167 p.
- Peterson, R. L., Massicotte, H. B., Melville, L. 2001. Mycorrhizas: Anatomy and cell biology. NRC Research press y CABI Publishing. Ottawa y Wallingford. RU. 173 p.
- Phosri, C., Polme, S., Taylor, A. F. S., Koljalg, U., Suwannasai, N., Tedersoo, L. 2012. Diversity and community composition of ectomycorrhizal fungi in a dry deciduous dipterocarp forest in Thailand. *Biodiversity and Conservation*. Vol. 21:2287-2298.

- Pillukat, A. 1996. Desc Ectomyc. Vol. 1:59-64 In. Agerer R. (Ed). 1998. Colour atlas of ectomycorrhiza. Plate 122. Einhorn Schwäbisc Gmünd.
- Plassard, C., Bonafos, B., Touraine, B. 2000. Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporum*, on growth and N utilization in *Pinus pinaster*. Plant Cell and Environment. Vol. 23:1195-1205.
- Plassard, C., Dell, B. 2010. Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. Tree Physiology. Vol. 30: 1129-1139.
- Quintos, M., Varela, L., Valdés, M. 1984. Contribución al estudio de los macromicetos principalmente los ectomicorrízicos en el estado de Durango. Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología. Vol. 19:283-290.
- Rajan, S.S.S. Fox, R. L. 1975. Phosphate adsorption by soils. II. Reaction in tropical acid soils adsorption. Soil Science Society of America Proceedings. Vol. 39:846-851.
- Read, D. J, Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? New Phytologist. Vol. 157(3):475-492.
- Read, D. J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. Experientia. Vol. 47(4):376-390.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M. P., Bonilla-Rosso, G., Pérez-Moreno, J. 2012. Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. FEMS Microbiology ecology. Vol. 80(2):479-487.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M. P., Pérez-Moreno, J. 2011. Soil factors influencing ectomycorrhizal sporome distribution in neotropical forests dominated by *Pinus montezumae*, Mexico. Mycoscience. Vol. 53:203-210.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M. P., Pérez-Moreno, J., Peña-Ramirez, V. M., Siebe, C. 2010. Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae*

- across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, México. Canadian Journal of Forest Research. Vol. 40:1165-1174.
- Ricklef, R. E., Miller, G. L. 1999. Chapter 28. Community development. Ecology. Fourth edition. Freeman and Company. New York. 896 p.
- Rivera-Hernández, J. E., Espinosa-Henze, Á. 2007. Flora del distrito federal. In: Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana. Luna, I., Morrone J. J., Espinosa, D. (eds). UNAM. México. 514 p.
- Rodriguez-Palacios, S. 2009. Arquitectura de paisaje en la microcuenca del Parque Nacional Insurgente Miguel Hidalgo y Costilla. Tesis de licenciatura. Facultad de Arquitectura. Universidad Nacional Autónoma de México. 232 p.
- Romero-Teran, E. 1999. Geología del Volcán Ajusco. Tesis de licenciatura: México, D.F., Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. 63 p.
- Ryberg, M., Larsson, E., Molau, U. 2009. Ectomycorrhizal diversity in *Dryas octopetala* and *Salix reticulata* in an Alpine cliff ecosystem. Arctic and Alpine research. Vol. 41:506-514.
- Rygielwicz, P.T, Andersen, C.P. 1994. Mycorrhizae alter quality and quantity of carbon allocated below ground. Nature. Vol. 369:58-60.
- Rzedowski, J. 2006. Capítulo 17. Bosque de coníferas. In: Vegetación de México. 1 Edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 504 p.
- Saucedo, S. 1990. Caracterización física de los suelos volcánicos de la región de Tlalauquitepec, Sierra Norte de Puebla. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Puebla. Puebla.
- Schüßler, A., Walker, C. 2010. The glomeromycota. A species list with new families and new genera. [http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/amphylo\\_species.html](http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/amphylo_species.html)
- Selosse, M. A., Richard, F., He, X., Simard, S. W. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? Trends in ecology and evolution. Vol. 21(11):621-628.

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2008. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México.

[http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_2008/00\\_intros/pdf.html](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_2008/00_intros/pdf.html).

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2010. Compendio de estadísticas ambientales.

[http://aplicaciones.semarnat.gob.mx/estadisticas/compendio2010/00\\_intros/consideraciones.html](http://aplicaciones.semarnat.gob.mx/estadisticas/compendio2010/00_intros/consideraciones.html).

Smith, M. E., Pfister, D. H. 2009. Tuberculate ectomycorrhizae of angiosperms: the Interaction between *Boletus rubropunctus* (Boletaceae) and *Quercus* species (Fagaceae) in the United States and Mexico. American Journal of Botany. Vol. 96(9):166-1675.

Smith, S. E., Read, D. J. 2008. Chapter 6. Structure and development of ectomycorrhizal roots. Mycorrhizal symbiosis. 3rd Edition. Academic press. Londres. RU. 787 p.

Standing, D., Killham, K. 2007. Chapter 1. The soil environment. In: Modern Soil Microbiology. Second edition. van Elsas, J. D., Jansson, J. K., Trevors, J. T. CRC Press. FL. EUA. 646 p.

Tedersoo, L., Koljag, U., Hallenberg, N., Larsson, K. H. 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. New Phytologist. Vol. 159:153-165.

Tedersoo, L., Bahram, M., Toots, M., Diédhiou, A. G., Henkel, T. W., Kjølner, R., Morris, M. H., Nara, K., Nouhra, E., Peay, K. G., Põlme, S., Ryberg, M., Smith M. E., Kõljalg, U. 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. Molecular ecology. Vol. 21 (17):4160-4170.

Toljander, J. F., Eberhardt, U. E., Toljander, Y. K., Paul, L.R., Taylor, A. F. S. 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in boreal forest. New Phytologist. Vol. 170(4):873-884.

- Treseder, K.K., Masiello, C.A., Lansing, J.L., Allen, M.F. 2004. Species-specific measurements of ectomycorrhizal turnover under N-fertilization: combining isotopic and genetic approaches. *Oecologia* Vol. 138:419-425.
- Treseder, K. K., Allen, M. F. 2002. Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytologist*. Vol. 155:507-515.
- Tuininga, A. R. 2005. Interspecific interaction Terminology: From Mycology to general ecology. In: *The fungal community its organization and role in the ecosystem*. Third edition. Dighton, J., White, J. F., Oudemans, P. (eds). CRC Press. FL. EUA. 943 p.
- Twieg, B., Durall, D. M., Simard, S. W. 2007. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytologist*. Vol. 176:437-447.
- Uehling, J. K., Henkel, T. W., Vilgalys, R., Smith, M.E. 2012. *Membranomyces* species are common ectomycorrhizal symbionts in Northern Hemisphere forests. *Mycorrhiza*. Vol. 22:577-81.
- Valenzuela, R. T. Raymundo y M. R. Palacios. 2004. Macromicetos que crecen sobre *Abies religiosa* en el eje neovolcánico transversal. *Polibotánica*. Vol. 18:33-51.
- Valera, M.A., Cruz-Montalvo, A., Aguilera, N. 1994. Physical, chemical and mineralogical characteristic of Mexico's Ustands and Udands. 20 p. In *Transactions of 15th world congress of soil science*. V. 8B, International Society of Soil Science.
- Valera, M. A., Aguilera, N. 1995. Físicoquímica y mineralogía de andosoles de la región Teziutlán, Estado de Puebla. 63-64 p. In: *Resúmenes in extenso del simposio Universitario de Edafología*. Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Ciencias. UACHapingo-CP, México.
- Varela, L. Estudio de la micorriza y los hongos micorrizógenos en un matorral secundario establecido en el cerro de Tepeticpac, Tlaxcala, México. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

- Villarreal, J. L., Cifuentes, J. 2007. Macromicetos de la cuenca del río magdalena y zonas adyacentes, delegación la Magdalena contreras, México. D.F. Revista Mexicana de Micología. Vol. 24:59-68.
- Vogt, K. A., Grier, C. C., Meier, C. E., Edmonds, R. L. 1982. Mycorrhizal Role in Net Primary Production and Nutrient Cycling in *Abies amabilis* Ecosystems in Western Washington. Ecology. Vol. 63:370-380.
- Wallander, H., Nylund, J. E. 1991. Effects of excess nitrogen on carbohydrate concentration and mycorrhizal development of *Pinus sylvestris* L. seedlings. New Phytologist. Vol. 119:405-411.
- Wu, B., Kazuhide, N., Hogetsu, T. 2002. Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal *Pinus densiflora* seedlings to extraradical mycelia. Mycorrhiza. Vol. 12:83-88.
- Yachi, S., Loreau, M. 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 96(4):1463-1468.

## Anexos

Anexo A. Conceptos de morfotipos



Naranja crema



Naranja recta



Dorada tortuosa



Naranja transparente



Negra



Rosa



Naranja tortuosa



Rojo claro



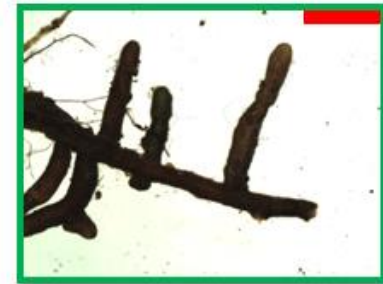
Blanca manto plata



Azul



Rojo oscuro recta



Naranja verde  
*Una barra completa equivale a 0.25 cm a 1x de aumento*

Anexo B. Abundancia absoluta por OTU

Especie	# de secuencias
Atheliaceae sp. 1	1
<i>Chalara microchona</i>	12
<i>Clavulina</i> cf. <i>cinerea</i>	76
<i>Clavulina</i> sp. 1	5
<i>Clavulina</i> sp. 2	2
<i>Clavulina</i> sp. 3 (aff. <i>cinerea</i> )	4
<i>Clavulina</i> sp. 4 (aff. <i>cinerea</i> )	2
<i>Cortinarius</i> cf. <i>ignipes</i>	2
<i>Cortinarius obtusus</i>	3
<i>Cortinarius vernus</i>	1
<i>Fischerula</i> sp. 1 (aff. <i>macrospora</i> )	3
<i>Genabea</i> sp. 1 (aff. <i>sphaerospora</i> )	1
<i>Genea</i> sp. 1	10
<i>Genea</i> sp. 2 (aff. <i>harknessii</i> )	3
<i>Hebeloma albocolossum</i>	1
<i>Helvella</i> sp. 1	13
<i>Humaria</i> sp. 1 (aff. <i>hemisphaerica</i> )	3
<i>Humaria</i> sp. 2 (aff. <i>hemisphaerica</i> )	3
Hyaloscyphaceae sp. 1	3
<i>Hydnobolites</i> sp. 1 (aff. <i>cerebriformis</i> )	4
<i>Hydnobolites</i> sp. 2 (aff. <i>cerebriformis</i> )	2
<i>Hydnotrya cerebriformis</i>	1
<i>Hydnum</i> sp. 1	1
<i>Ilyonectria rufa</i>	4
<i>Inocybe geophylla</i> var. <i>lilacina</i>	4
<i>Inocybe lanatodisca</i>	1
<i>Inocybe</i> sp. 1	11
<i>Inocybe</i> sp. 2	1
<i>Inocybe</i> sp. 3	3
<i>Inocybe</i> sp. 4	3
<i>Inocybe</i> sp. 5 (aff. <i>amblyspora</i> )	15
<i>Inocybe</i> sp. 7 (aff. <i>geophylla</i> )	1
<i>Inocybe</i> sp. 8 (aff. <i>glabrodisca</i> )	4
<i>Inocybe</i> sp. 9 (aff. <i>mixtilis</i> )	4
<i>Inocybe</i> sp. 10 (aff. <i>vulpinella</i> )	2
<i>Inocybe</i> sp. 11 (aff. <i>salicis-herbaceae</i> )	1
<i>Inocybe</i> sp. 12 (aff. <i>pseudoreducta</i> )	1
<i>Inocybe</i> sp. 13 (aff. <i>reisneri</i> )	3
<i>Inocybe</i> sp. 14 (aff. <i>rimosa</i> )	19
<i>Inocybe</i> sp. 15 (aff. <i>serotina</i> )	5
<i>Inocybe</i> sp. 16	6
<i>Inocybe</i> sp. 17 (aff. <i>inodora</i> )	1
<i>Inocybe</i> sp. 18 (aff. <i>neobrunnescens</i> )	6
<i>Inocybe</i> sp. 19	4
<i>Inocybe suaveolens</i>	3
<i>Lactarius fennoscandicus</i>	2
<i>Membranomyces</i> sp. 1 (aff. <i>spurius</i> )	6



<i>Membranomyces spurius</i>	51
<i>Peziza</i> sp. 1 (aff. <i>ostracoderma</i> )	2
<i>Phaeocollybia</i> sp. 1 (aff. <i>sipei</i> )	1
<i>Phaeocollybia</i> sp. 2 (aff. <i>pseudofestiva</i> )	11
<i>Phaeocollybia</i> sp. 3 (aff. <i>spadicea</i> )	1
<i>Piloderma</i> sp. 1 (aff. <i>fallax</i> )	7
<i>Pseudotomentella</i> sp. 1 (aff. <i>tristis</i> )	1
<i>Pseudotomentella</i> sp. 2 (aff. <i>tristis</i> )	2
<i>Russula abietina</i>	1
<i>Russula acrifolia</i>	10
<i>Russula americana</i>	7
<i>Russula</i> cf. <i>chloroides</i>	13
<i>Russula firmula</i>	12
<i>Russula olivacea</i>	1
<i>Russula roseipes</i>	6
<i>Russula</i> sp. 1 (aff. <i>olivobrunnea</i> )	22
<i>Sebacina incrustans</i>	1
<i>Sebacina</i> sp. 1 (aff. <i>epigaea</i> )	1
<i>Sebacina</i> sp. 2 (aff. <i>epigaea</i> )	10
<i>Sebacina</i> sp. 3	9
<i>Sebacina</i> sp. 4	3
<i>Sebacina</i> sp. 5	2
Sebacinaceae sp. 1	4
Sebacinaceae sp. 2	3
<i>Tarzetta</i> sp. 1	7
<i>Tarzetta</i> sp. 2	4
Thelephoraceae sp. 1	39
Thelephoraceae sp. 2	2
Thelephorales sp. 1	3
<i>Tomentella pilosa</i>	16
<i>Tomentella</i> sp. 1	1
<i>Tomentella</i> sp. 2	18
<i>Tomentella</i> sp. 3	10
<i>Tomentella</i> sp. 4	6
<i>Tomentella</i> sp. 5	5
<i>Tomentella</i> sp. 6	2
<i>Tomentella</i> sp. 7	2
<i>Tomentella</i> sp. 8 (aff. <i>fusco-cinerea</i> )	4
<i>Tomentella</i> sp. 9 (aff. <i>lateritia</i> )	4
<i>Tremelloscypha</i> sp. 1 (aff. <i>gelatinosa</i> )	3
<i>Trichophaea</i> sp. 1 (aff. <i>hybrida</i> )	2
<i>Tuber separans</i>	7
<i>Verticillium leptobactrum</i>	2
<i>Xerocomellus</i> sp. 1 (aff. <i>chrysenteron</i> )	7

Las especies subrayadas no desarrollan ectomicorrizas

Anexo C. Datos para el MANOVA $_{\alpha=0.05}$ , los factores son la parcela y la línea, y las variables de respuesta son la distancia, Log<sub>10</sub> DAP, y Log<sub>10</sub> Biomasa en peso seco (g) de raíces mayo

Parcela	Transecto	Distancia (m)	DAP (m)	Biomasa en peso seco (g) de raíces mayo	Log <sub>10</sub> DAP (m)	Log <sub>10</sub> Biomasa en peso seco (g) de raíces mayo
1	1	6.158	0.5785	0.124	-0.23769664	-0.90657831
1	2	5.9075	0.5195	0.201	-0.28441445	-0.69680394
1	3	6.7495	0.5952	0.1553	-0.22533708	-0.80882854
2	1	5.869	0.5989	0.1176	-0.22264569	-0.92959268
2	2	6.396	0.5132	0.0916	-0.28971335	-1.03810453
2	3	5.078	0.5212	0.0916	-0.28299559	-1.03810453
10	1	6.4895	0.5096	0.0776	-0.29277058	-1.11013828
10	2	6.3895	0.4532	0.1606	-0.3437101	-0.79425446
10	3	6.311	0.5247	0.0656	-0.28008894	-1.18309616
25	1	5.5495	0.6148	0.1346	-0.21126614	-0.87095494
25	2	5.621	0.5487	0.2003	-0.26066504	-0.69831905
25	3	5.6675	0.5672	0.227	-0.24626378	-0.64397414
26	1	7.076	0.5368	0.3056	-0.27018749	-0.51484665
26	2	4.945	0.4898	0.126	-0.30998122	-0.89962945
26	3	6.6605	0.5369	0.1316	-0.2701066	-0.88074411
39	1	5.4945	0.4559	0.174	-0.34113041	-0.75945075
39	2	7.788	0.5253	0.154	-0.2795926	-0.81247928

39	3	6.629	0.5915	0.2763	-0.22804525	-0.55861912
42	1	5.5475	0.5831	0.148	-0.23425696	-0.82973828
42	2	5.7255	0.5027	0.05	-0.29869111	-1.30103
42	3	6.1885	0.5403	0.1626	-0.26736503	-0.78887946
47	1	5.7715	0.4427	0.1208	-0.35389048	-0.91793307
47	2	7.5735	0.5599	0.157	-0.25188953	-0.80410035
47	3	5.596	0.5134	0.222	-0.28954414	-0.65364703
50	1	5.3615	0.5095	0.083	-0.29285581	-1.08092191
50	2	5.3545	0.5307	0.2436	-0.27515091	-0.61332272
50	3	5.644	0.5048	0.1886	-0.29688065	-0.72445831
55	1	5.7905	0.452	0.2403	-0.34486157	-0.61924623
55	2	5.2975	0.5088	0.1433	-0.2934529	-0.84375381
55	3	6.4125	0.4481	0.1366	-0.34862506	-0.8645493
9	1	8.166	0.5627	0.154	-0.24972308	-0.81247928
9	2	7.2815	0.5404	0.1276	-0.26728466	-0.89414933
9	3	5.8385	0.5406	0.2503	-0.26712396	-0.60153915
11	1	5.2215	0.5199	0.067	-0.28408018	-1.1739252
11	2	4.38	0.5381	0.118	-0.26913701	-0.92811799
11	3	5.1825	0.511	0.1386	-0.2915791	-0.85823677

17	1	7.981	0.5492	0.537	-0.26026947	-0.27002571
17	2	6.4475	0.5261	0.3923	-0.2789317	-0.40638169
17	3	7.5735	0.4502	0.603	-0.34659451	-0.21968269
41 a	1	6.003	0.3904	0.136	-0.40849019	-0.86646109
41 a	2	5.7115	0.3334	0.2193	-0.4770344	-0.65896137
41 a	3	4.365	0.4459	0.1783	-0.35076253	-0.74884866
41 b	1	5.2665	0.2462	0.106	-0.60871195	-0.97469413
41 b	2	5.5835	0.4141	0.2156	-0.38289477	-0.66635124
41 b	3	5.2165	0.4324	0.131	-0.36411431	-0.8827287
43	1	4.746	0.3993	0.6003	-0.39870069	-0.22163166
43	2	6.388	0.44	0.191	-0.35654732	-0.71896663
43	3	7.0255	0.4798	0.0686	-0.31893976	-1.16367588
70	1	6.809	0.2993	0.1153	-0.52389328	-0.93817069
70	2	3.595	0.2766	0.164	-0.55814782	-0.78515615
70	3	7.565	0.3273	0.0544	-0.48505399	-1.2644011
71	1	7.4905	0.2573	0.168	-0.58956021	-0.77469072
71	2	4.171	0.2548	0.1464	-0.59380058	-0.83445892
71	3	5.5645	0.3289	0.4115	-0.48293613	-0.38563016
72	1	4.392	0.293	0.3641	-0.53313238	-0.43877932

72	2	4.609	0.2266	0.0551	-0.64474009	-1.2588484
72	3	5.1505	0.3651	0.2619	-0.43758817	-0.5818645
73	1	8.915	0.1906	0.1565	-0.7198771	-0.80548566
73	2	4.726	0.6544	0.1859	-0.18415671	-0.73072061
73	3	5.6315	0.5247	0.1038	-0.28008894	-0.98380265
74	1	3.6965	0.0845	0.0837	-1.07314329	-1.07727454
74	2	6.6885	0.1024	0.0462	-0.98970004	-1.33535802
74	3	-	-	0.1845		-0.73400363

Anexo D. Datos para la prueba de t de student  $\alpha=0.05$ . los factores son la parcela y la línea, y las variables de respuesta son  $\text{Log}_{10}$  Biomasa en peso seco de raíces (mayo), y  $\text{Log}_{10}$  Biomasa en peso seco de raíces (octubre).

Parcela	Transecto	Distancia (m)	DAP (m)	Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo)	Densidad $\text{g}/\text{cm}^3$	Biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre)	$\text{Log}_{10}$ Biomasa en peso seco (g) de raíces (mayo)	$\text{Log}_{10}$ Biomasa en peso seco (g) de raíces (octubre)
1	1	6.158	0.5785	0.124	0.7046	0.117	-0.93181414	-0.90657831
1	2	5.9075	0.5195	0.201	0.6675	0.0739	-1.13135556	-0.69680394
1	3	6.7495	0.5952	0.1553	0.611	0.1291	-0.88907376	-0.80882854
2	1	5.869	0.5989	0.1176	0.6453	0.0452	-1.34486157	-0.92959268
2	2	6.396	0.5132	0.0916	0.5866	0.07	-1.15490196	-1.03810453
2	3	5.078	0.5212	0.0916	0.5288	0.099	-1.00436481	-1.03810453
10	1	6.4895	0.5096	0.0776	0.5141	0.5276	-0.27769521	-1.11013828
10	2	6.3895	0.4532	0.1606	0.5616	0.1422	-0.8471004	-0.79425446
10	3	6.311	0.5247	0.0656	0.6577	0.0962	-1.01682493	-1.18309616
25	1	5.5495	0.6148	0.1346	0.6919	0.0951	-1.02181948	-0.87095494
25	2	5.621	0.5487	0.2003	0.6253	0.167	-0.77728353	-0.69831905
25	3	5.6675	0.5672	0.227	0.55	0.1298	-0.88672531	-0.64397414
26	1	7.076	0.5368	0.3056	0.652	0.1732	-0.76145211	-0.51484665
26	2	4.945	0.4898	0.126	0.6769	0.1999	-0.69918721	-0.89962945
26	3	6.6605	0.5369	0.1316	0.664	0.2026	-0.69336056	-0.88074411
39	1	5.4945	0.4559	0.174	0.5704	0.1731	-0.76170293	-0.75945075
39	2	7.788	0.5253	0.154	0.494	0.2474	-0.6066003	-0.81247928
39	3	6.629	0.5915	0.2763	0.5229	0.1319	-0.8797552	-0.55861912
42	1	5.5475	0.5831	0.148	0.5787	0.1341	-0.87257122	-0.82973828
42	2	5.7255	0.5027	0.05	0.5999	0.1452	-0.83803338	-1.30103
42	3	6.1885	0.5403	0.1626	0.7035	0.1142	-0.9423339	-0.78887946
47	1	5.7715	0.4427	0.1208	0.5746	0.2541	-0.59499533	-0.91793307
47	2	7.5735	0.5599	0.157	0.508	0.3237	-0.4898573	-0.80410035
47	3	5.596	0.5134	0.222	0.641	0.3344	-0.47573373	-0.65364703
50	1	5.3615	0.5095	0.083	0.7384	0.2022	-0.69421885	-1.08092191
50	2	5.3545	0.5307	0.2436	0.8114	0.1028	-0.98800689	-0.61332272
50	3	5.644	0.5048	0.1886	0.6972	0.1936	-0.71309465	-0.72445831
55	1	5.7905	0.452	0.2403	0.7508	0.3098	-0.50891859	-0.61924623
55	2	5.2975	0.5088	0.1433	0.7322	0.0887	-1.05207638	-0.84375381
55	3	6.4125	0.4481	0.1366	0.797	0.219	-0.65955589	-0.8645493

Anexo E. Tukey HSD test, del MANOVA<sub>α=0.05</sub>; para la variable Log<sub>10</sub> Biomasa en peso seco de raíces mayo. Los valores significativos están subrayados.

Error: Entre MS = .04957, df = 39.000																					
Parcela	1	2	9	10	11	17	25	26	39	42	43	47	50	55	70	71	72	73	74	41 a	41 b
1		1	1	0.999	1	0.425	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.904	1	1
2	1		0.999	1	1	<u>0.045</u>	0.995	0.999	0.986	1	0.981	1	1	0.999	1	0.944	0.998	1	1	0.998	1
9	1	0.999		0.996	1	0.551	1	1	1	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.829	1	1
10	0.999	1	0.996		1	<u>0.031</u>	0.986	0.995	0.965	1	0.956	0.999	0.999	0.997	1	0.895	0.994	1	1	0.994	1
11	1	1	1	1		0.055	0.998	0.999	0.992	1	0.989	1	1	1	1	0.962	0.999	1	1	0.999	1
17	0.425	<u>0.045</u>	0.551	<u>0.031</u>	0.055		0.669	0.567	0.765	0.066	0.793	0.468	0.417	0.527	<u>0.049</u>	0.891	0.587	0.309	<u>0.009</u>	0.594	0.305
25	1	0.995	1	0.986	0.998	0.669		1	1	0.999	1	1	1	1	0.996	1	1	1	0.74	1	1
26	1	0.999	1	0.995	0.999	0.567	1		1	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.817	1	1
39	1	0.986	1	0.965	0.992	0.765	1	1		0.995	1	1	1	1	0.989	1	1	1	0.652	1	1
42	1	1	1	1	1	0.066	0.999	1	0.995		0.993	1	1	1	1	0.975	1	1	1	1	1
43	1	0.981	1	0.956	0.989	0.793	1	1	1	0.993		1	1	1	0.984	1	1	1	0.623	1	1
47	1	1	1	0.999	1	0.468	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0.881	1	1
50	1	1	1	0.999	1	0.417	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	0.908	1	1
55	1	0.999	1	0.997	1	0.527	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0.845	1	1
70	1	1	0.999	1	1	<u>0.049</u>	0.996	0.999	0.989	1	0.984	1	1	1		0.952	0.999	1	1	0.999	1
71	1	0.944	1	0.895	0.962	0.891	1	1	1	0.975	1	1	1	1	0.952		1	1	0.501	1	1
72	1	0.998	1	0.994	0.999	0.587	1	1	1	1	1	1	1	1	0.999	1		1	0.803	1	1
73	1	1	1	1	1	0.309	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		0.956	1	1
74	0.904	1	0.829	1	1	<u>0.009</u>	0.74	0.817	0.652	1	0.623	0.881	0.908	0.845	1	0.501	0.803	0.956		0.799	0.957
41 a	1	0.998	1	0.994	0.999	0.594	1	1	1	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.799		1
41 b	1	1	1	1	1	0.305	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.957	1	

Anexo F. Tukey HSD test, del MANOVA $_{\alpha=0.05}$ ; para la variable Log<sub>10</sub> DAP. Los valores significativos están subrayados.

Error: Entre MS = .00639, df = 39.000																					
Parcela	1	2	9	10	11	17	25	26	39	42	43	47	50	55	70	71	72	73	74	41 a	41 b
1		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.979	1.000	1.000	0.999	<u>0.020</u>	<u>0.005</u>	<u>0.010</u>	0.785	<u>1.82E-04</u>	0.614	0.244
2	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.996	1.000	1.000	1.000	<u>0.037</u>	<u>0.010</u>	<u>0.019</u>	0.902	<u>1.82E-04</u>	0.772	0.374
9	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.994	1.000	1.000	1.000	<u>0.032</u>	<u>0.008</u>	<u>0.017</u>	0.879	<u>1.82E-04</u>	0.737	0.341
10	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.159	<u>0.049</u>	0.092	0.998	<u>1.82E-04</u>	0.983	0.777
11	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.070	<u>0.019</u>	<u>0.038</u>	0.969	<u>1.82E-04</u>	0.896	0.537
17	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.113	<u>0.033</u>	0.064	0.992	<u>1.82E-04</u>	0.958	0.679
25	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	0.952	1.000	1.000	0.998	<u>0.013</u>	<u>0.003</u>	<u>0.007</u>	0.692	<u>1.82E-04</u>	0.512	0.182
26	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.074	<u>0.021</u>	<u>0.041</u>	0.974	<u>1.82E-04</u>	0.907	0.556
39	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.073	<u>0.020</u>	<u>0.040</u>	0.972	<u>1.82E-04</u>	0.904	0.551
42	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.997	1.000	1.000	1.000	<u>0.040</u>	<u>0.010</u>	<u>0.021</u>	0.911	<u>1.82E-04</u>	0.787	0.389
43	0.979	0.996	0.994	1.000	1.000	1.000	0.952	1.000	1.000	0.997		1.000	1.000	1.000	0.600	0.284	0.434	1.000	<u>1.82E-04</u>	1.000	0.996
47	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	0.126	<u>0.038</u>	0.071	0.994	<u>1.82E-04</u>	0.968	0.711
50	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	0.089	<u>0.025</u>	<u>0.049</u>	0.983	<u>1.82E-04</u>	0.932	0.607
55	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.316	0.116	0.200	1.000	<u>1.82E-04</u>	0.999	0.935
70	<u>0.020</u>	<u>0.037</u>	<u>0.032</u>	0.159	0.070	0.113	<u>0.013</u>	0.074	0.073	<u>0.040</u>	0.600	0.126	0.089	0.316		1.000	1.000	0.912	<u>1.84E-04</u>	0.976	1.000
71	<u>0.005</u>	<u>0.010</u>	<u>0.008</u>	<u>0.049</u>	<u>0.019</u>	<u>0.033</u>	<u>0.003</u>	<u>0.021</u>	<u>0.020</u>	<u>0.010</u>	0.284	<u>0.038</u>	<u>0.025</u>	0.116	1.000		1.000	0.637	<u>1.98E-04</u>	0.804	0.987
72	<u>0.010</u>	<u>0.019</u>	<u>0.017</u>	0.092	<u>0.038</u>	0.064	<u>0.007</u>	<u>0.041</u>	<u>0.040</u>	<u>0.021</u>	0.434	0.071	<u>0.049</u>	0.200	1.000	1.000		0.800	<u>1.87E-04</u>	0.919	0.998
73	0.785	0.902	0.879	0.998	0.969	0.992	0.692	0.974	0.972	0.911	1.000	0.994	0.983	1.000	0.912	0.637	0.800		<u>1.82E-04</u>	1.000	1.000
74	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>	<u>1.84E-04</u>	<u>1.98E-04</u>	<u>1.87E-04</u>	<u>1.82E-04</u>		<u>1.82E-04</u>	<u>1.82E-04</u>
41 a	0.614	0.772	0.737	0.983	0.896	0.958	0.512	0.907	0.904	0.787	1.000	0.968	0.932	0.999	0.976	0.804	0.919	1.000	<u>1.82E-04</u>		1.000
41 b	0.244	0.374	0.341	0.777	0.537	0.679	0.182	0.556	0.551	0.389	0.996	0.711	0.607	0.935	1.000	0.987	0.998	1.000	<u>1.82E-04</u>	1.000	



Anexo G. Tukey HSD test, del MANOVA<sub>α=0.05</sub>; para la variable Distancia. Los valores significativos están subrayados.

Error: Entre MS = 1.1863, df = 39.000																					
Parcela	1	2	9	10	11	17	25	26	39	42	43	47	50	55	70	71	72	73	74	41 a	41 b
1		1.000	1.000	1.000	0.993	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.967	1.000	1.000	1.000	1.000
2	1.000		0.994	1.000	1.000	0.967	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	1.000	0.994		1.000	0.655	1.000	0.979	1.000	1.000	0.996	1.000	1.000	0.945	0.996	0.999	0.992	0.494	1.000	0.926	0.914	0.912
10	1.000	1.000	1.000		0.981	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.934	1.000	1.000	1.000	1.000
11	0.993	1.000	0.655	0.981		0.473	1.000	0.995	0.924	1.000	0.999	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.977	1.000	1.000	1.000
17	1.000	0.967	1.000	1.000	0.473		0.919	0.999	1.000	0.974	0.996	1.000	0.846	0.976	0.993	0.958	0.328	1.000	0.827	0.791	0.788
25	1.000	1.000	0.979	1.000	1.000	0.919		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
26	1.000	1.000	1.000	1.000	0.995	0.999	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.975	1.000	1.000	1.000	1.000
39	1.000	1.000	1.000	1.000	0.924	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	0.824	1.000	0.995	0.996	0.996
42	1.000	1.000	0.996	1.000	1.000	0.974	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000
43	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.996	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.993	1.000	1.000	1.000	1.000
47	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	0.957	1.000	1.000	1.000	1.000
50	1.000	1.000	0.945	1.000	1.000	0.846	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
55	1.000	1.000	0.996	1.000	1.000	0.976	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000
70	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	0.993	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	0.996	1.000	1.000	1.000	1.000
71	1.000	1.000	0.992	1.000	1.000	0.958	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
72	0.967	1.000	0.494	0.934	1.000	0.328	1.000	0.975	0.824	0.999	0.993	0.957	1.000	0.999	0.996	1.000		0.925	1.000	1.000	1.000
73	1.000	1.000	1.000	1.000	0.977	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.925		0.999	1.000
74	1.000	1.000	0.926	1.000	1.000	0.827	1.000	1.000	0.995	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999		1.000	1.000
41 a	1.000	1.000	0.914	1.000	1.000	0.791	1.000	1.000	0.996	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000
41 b	1.000	1.000	0.912	1.000	1.000	0.788	1.000	1.000	0.996	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Anexo H. Tukey HSD test, del MANOVA $_{\alpha=0.05}$ ; para la variable Densidad. Los valores significativos están subrayados.

Error: Entre MS = .00337, df = 18.000										
Parcela	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.848614	0.752347	0.997327	1	0.213704	0.99907	0.713528	0.695594	0.556594
2	0.848614		1	0.998601	0.816441	0.959336	0.996234	1	0.068888	<u>0.04401</u>
3	0.752347	1		0.992431	0.713528	0.986194	0.984483	1	<u>0.047593</u>	<u>0.030114</u>
4	0.997327	0.998601	0.992431		0.995142	0.62868	1	0.987699	0.2556	0.175196
5	1	0.816441	0.713528	0.995142		0.190808	0.998095	0.673251	0.73513	0.598131
6	0.213704	0.959336	0.986194	0.62868	0.190808		0.565471	0.991383	<u>0.006027</u>	<u>0.003786</u>
7	0.99907	0.996234	0.984483	1	0.998095	0.565471		0.976552	0.299775	0.208625
8	0.713528	1	1	0.987699	0.673251	0.991383	0.976552		<u>0.04159</u>	<u>0.026239</u>
9	0.695594	0.068888	<u>0.047593</u>	0.2556	0.73513	<u>0.006027</u>	0.299775	<u>0.04159</u>		1
10	0.556594	<u>0.04401</u>	<u>0.030114</u>	0.175196	0.598131	<u>0.003786</u>	0.208625	<u>0.026239</u>	1	

Anexo I. Tukey HSD test, del MANOVA $_{\alpha=0.05}$ ; para la variable Log<sub>10</sub> Biomasa en peso seco de raíces (octubre). Los valores significativos están subrayados.

.Error: Entre MS = .03634, df = 18.000										
Parcela	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.966261	0.763162	0.999838	0.777359	0.872383	0.999585	0.15339	0.964353	0.847222
2	0.966261		0.170731	0.754198	0.178569	0.248	0.714587	<u>0.015856</u>	0.392968	0.225868
3	0.763162	0.170731		0.969021	1	1	0.97905	0.954186	0.999892	1
4	0.999838	0.754198	0.969021		0.973131	0.992615	1	0.374697	0.999673	0.988753
5	0.777359	0.178569	1	0.973131		1	0.982114	0.948258	0.999928	1
6	0.872383	0.248	1	0.992615	1		0.995779	0.886485	0.999999	1
7	0.999585	0.714587	0.97905	1	0.982114	0.995779		0.411734	0.999877	0.993228
8	0.15339	<u>0.015856</u>	0.954186	0.374697	0.948258	0.886485	0.411734		0.734632	0.907652
9	0.964353	0.392968	0.999892	0.999673	0.999928	0.999999	0.999877	0.734632		0.999995
10	0.847222	0.225868	1	0.988753	1	1	0.993228	0.907652	0.999995	