



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
Ecología

**Estudio de las redes ectomicorrízicas del bosque de *Abies religiosa* (Kunth) Schlechtendal et
Chamisso para determinar su uso potencial en estrategias de restauración**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANDRÉS ARGÜELLES MOYAO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
DR. HANS MARTIN RICKER REYMANN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx. Agosto, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
Ecología

**Estudio de las redes ectomicorrízicas del bosque de *Abies religiosa* (Kunth) Schlechtendal et
Chamisso para determinar su uso potencial en estrategias de restauración**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANDRÉS ARGÜELLES MOYAO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
DR. HANS MARTIN RICKER REYMANN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx. Agosto, 2018

Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de abril de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno ARGÜELLES MOYAO ANDRES con número de cuenta 611021273 con la tesis titulada: "ESTUDIO DE LAS REDES ECTOMICORRIZICAS DEL BOSQUE DE ABIES RELIGIOSA (KUNTH) SCHLECHTENDAL ET CHAMISSO PARA DETERMINAR SU USO POTENCIAL EN ESTRATEGIAS DE RESTAURACIÓN", realizada bajo la dirección del DR. ROBERTO GARIBAY ORJEL:

Presidente	DR. LUIS DAVID ALCARÁZ PERAZA
Vocal:	DRA. MARIANA BENÍTEZ KEINRAD
Secretario:	DR. HANS MARTIN RICKER REYMANN
Suplente:	DRA. MARIA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
Suplente	DR. JOAQUIN CIFUENTES BLANCO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de junio de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR 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 número: 374558 con registro de becario 255120 y numero de CVU 385015. Así como a la Beca Mixta MZO2016, número: 290936 y al proyecto CONACYT-239266.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Roberto Garibay Orijel, Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa, y Dr. Hans Martin Ricker Reymann.

Agradecimientos a título personal

A la M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín por la disposición para dejarme usar el equipo del Laboratorio de Biología Molecular de Zoología.

A Rocío González Acosta por sus pláticas y su buen humor, y su gran capacidad para resolver los asuntos del posgrado.

Al Dr. José Martín García Varela por su labor en el Posgrado en Ciencias Biológicas y por apoyarme en este proceso y tener confianza en mí.

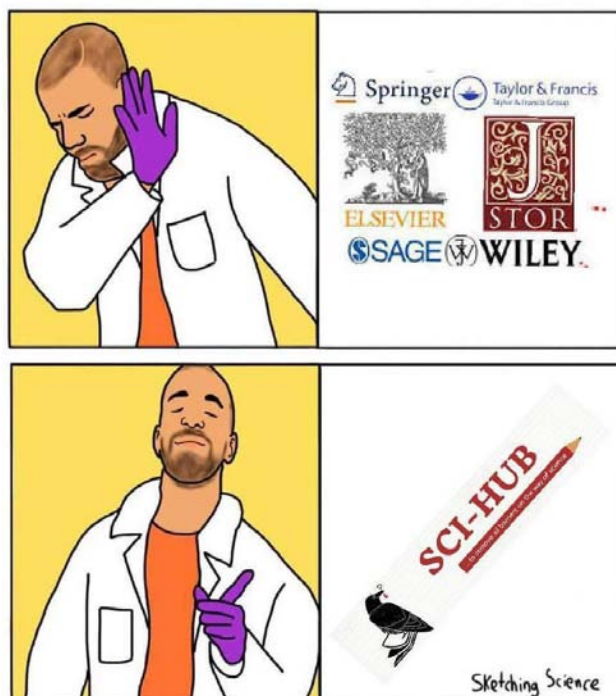
Le agradezco a Julieta Alvarez y a Rodolfo Ángeles por haberme acompañado en esta travesía doctoral, son la alegría del laboratorio y una fuente interminable de conocimientos sobre muchos temas. Los quiero un buen.

También, a la Dra. Noemí Matías, Eduardo Pérez-Pazos, Amaranta Ramírez, Mariana García, Gala Viurcos, Oscar Zárate, Valeria Flores, Abram García, Leopoldo Andrade, les agradezco mucho su apoyo y amistad, así como las interminables risas y buenas experiencias.

Ale Franco, Laura Alicia, Gina Molina, y Cristina Alonso, gracias por compartir el sol, las calicatas y la nieve de zarzamora. Siempre es divertido trabajar con ustedes, y sobretodo porque tienen la paciencia de explicarme muchas cosas de infinitos temas.

A los enanos + Oli, son lo mejor del mundo siempre y los quiero mucho.

A mi familia biológica. Gracias.



“[sobre los *apipiltzin*] Y en rigor, pareciendo flor o siendo fruto, es un animal, por su incapacidad de extraer sus alimentos del aire y de la tierra, y pareciendo vegetal sin tener clorofila, no es vegetal, sino animal, pues, como el lector y como yo, necesita que le elaboren sus carbohidratos y se los sirvan ya hechos”

José Juan Tablada. *Hongos mexicanos comestibles*

“Birds, flowers, insects, stones delight the observant. Why not toadstools?

A tramp after them is absorbing, study of them interesting,
and eating of them health-giving and supremely satisfying”

Capt. Charles McIlvaine. *One Thousand American Fungi*

“Ni Lakatos ni ningún otro han demostrado que la ciencia es mejor que la brujería y que procede de una forma racional. La elección a favor de la ciencia se basa en nuestras preferencias y no en argumentos; preferencias y no argumentos son los que nos conducen a dar determinados pasos dentro de la ciencia”

Paul K. Feyerabend. *¿Por qué no Platón?*

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Distribución del género <i>Abies</i>	5
Cobertura de <i>Abies religiosa</i>	6
Los bosques de <i>Abies religiosa</i> son el refugio invernal de la mariposa monarca y tienen importantes servicios ecosistémicos	7
Estrategias de conservación y rescate de <i>Abies religiosa</i>	8
Importancia de tomar en cuenta a los hongos ectomicorrizógenos para el éxito de la reintroducción forestal o la migración asistida de <i>Abies religiosa</i>	9
Los hospederos determinan a los tipos de hongos presentes y los hongos ectomicorrizógenos son los encargados de establecer la red micorrízica	10
Las propiedades de las redes que pueden usarse en reintroducción de especies forestales	10
El enfoque de la teoría de redes para la reintroducción de <i>Abies religiosa</i>	12
Uso de secuencias de DNA para inventariar la diversidad de sitios naturales	14
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
ESTRUCTURA DE LA TESIS	15
CAPÍTULO I. EL INVENTARIO DE LAS ESPECIES DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS ASOCIADOS CON <i>Abies religiosa</i>	16
Abstract	17
Keywords	17
Introduction	17
Material and Methods	18
Study area	18
Ectomycorrhizae sampling	18
Molecular biology protocols	18
Diversity and community analysis	19
Phylogenetic analysis	19
Geographic distribution and host preferences of the ECM fungi associated with <i>A. religiosa</i>	20
Results	20
Discussion	21
Diversity and community structure	21
The <i>Clavulina-Membranomyces</i> lineage is a main component of the ECM communities in the Neotropics	24
Geographic distribution and host preferences of the ECM fungi associated with <i>A. religiosa</i>	26
Acknowledgments	28
References	28
CAPÍTULO II. LOS HONGOS COMPARTIDOS ENTRE <i>Abies religiosa</i> Y OTROS HOSPEDEROS	30
Abstract	31
Keywords	31
Introduction	31
Material and Methods	32

<i>Sampling site description</i>	32
<i>Soil sampling</i>	33
<i>Molecular biology</i>	33
<i>Bioinformatics processing</i>	34
<i>Biodiversity and statistical analyses</i>	34
<i>Results</i>	34
<i>Taxonomic diversity</i>	34
<i>Alpha and beta diversity of forest soil fungi</i>	34
<i>Soil fungal guilds and salient species</i>	36
<i>Core-diversity of soil fungi in temperate coniferous forests in central Mexico</i>	37
<i>Discussion</i>	37
<i>Patterns of fungal diversity in high mountain temperate forests in the TMVB</i>	37
<i>Most important ectomycorrhizal fungi in high mountain temperate forest in the TMVB</i>	38
<i>Lessons from ectomycorrhizal community ecology for the assisted migration of <i>Abies religiosa</i></i>	39
<i>Robustness and reliability of data when sequencing platforms and bioinformatic pipelines are in constant change</i>	39
<i>Conclusions</i>	40
<i>Acknowledgements</i>	40
<i>References</i>	40
CAPÍTULO III. LAS ESPECIES VEGETALES Y FÚNGICAS INVOLUCRADAS DE LA RED MICORRÍZICA	44
Resumen	46
Palabras clave	46
Introducción	47
Materiales y Métodos	48
Sitio de estudio	48
Muestreo de la rizosfera de plantas	49
Biología molecular	49
Procesamiento bioinformático	50
Análisis de redes	50
Resultados	51
Contexto ecológico de los hongos	51
Propiedades de las redes de <i>Abies religiosa</i>	57
Los nodos fúngicos y vegetales importantes para <i>Abies religiosa</i>	57
Discusión	58
Diversidad de hongos micorrizógenos	58
Los patrones ecológicos de los hongos de la rizósfera no se reflejan en las redes planta-hongo	59
Los nodos más importantes en la interacción planta-hongo del bosque de <i>Abies religiosa</i>	61
Conclusiones	63
Agradecimientos	64
Referencias	64
DISCUSIÓN GENERAL	98
CONCLUSIONES	103
REFERENCIAS	104

Resumen

Abies religiosa es una especie arbórea endémica del centro de México que provee de servicios ecosistémicos como refugio de biodiversidad, captura de carbono y recarga de acuíferos. Esta planta sufre una reducción de sus poblaciones debido a las actividades humanas, y en los escenarios de cambio climático se predice una reducción en su hábitat. Una estrategia de conservación propuesta es la migración asistida; es decir, la reintroducción de plántulas en un nuevo hábitat bajo condiciones idóneas para acoplarlas con el hábitat predicho. En las plantaciones forestales, existe una baja tasa de establecimiento de las plántulas en sitios con poco suelo y ligeramente mayor en sitios con abundante suelo. No obstante, en ambos casos la sobrevivencia mejora con los programas de micorrización. En estos casos, existe la posibilidad de que las especies ectomicorrizógenas usadas, sean desplazadas por los hongos nativos en los sitios de reintroducción, reduciendo la sobrevivencia general. El uso de especies ectomicorrizógenas generalistas con un amplio rango de hospederos reduce esta posibilidad. Por otra parte, la sobrevivencia también mejora cuando se usan plantas facilitadoras que reducen el estrés abiótico; no obstante, se conocen pocas para *Abies religiosa* y existen varias candidatas. Por lo tanto este proyecto tiene como pregunta ¿Cuáles especies de hongos ectomicorrizógenos y cuáles especies de plantas facilitadoras son las que forman la red micorrízica, para proponerlas en la reintroducción de *Abies religiosa*? El objetivo general es analizar la arquitectura de la red micorrízica para detectar a los hongos ectomicorrizógenos y plantas facilitadoras que pueden intervenir en la reintroducción de *Abies religiosa*. Para responder esta pregunta de investigación, planteamos un estudio que comprende tres capítulos. El capítulo I hace un inventario de las especies de hongos ectomicorrizógenos asociadas con *Abies religiosa*. El capítulo II trata sobre los hongos compartidos entre *Abies religiosa* y otros hospederos, y el capítulo III determina las especies vegetales y fúngicas involucradas en la red micorrízica.

En el capítulo I determinamos las especies de hongos ectomicorrizógenos que establecen la simbiosis con *Abies religiosa*. Para esto, establecimos siete parcelas en un bosque monodominante, y usamos cilindros de PVC para extraer el suelo con las ectomicorrizas de las plantas adultas. El ITS fue secuenciado con tecnología Sanger y describimos la estructura de la comunidad de hongos ectomicorrizógenos. Encontramos que la familia Clavulinaceae es la más frecuente y abundante.

Para el capítulo II recolectamos el suelo de sitios cubiertos con *Abies religiosa*, y comparamos la diversidad de hongos con la de sitios cubiertos con *Pinus montezumae* y *Pinus*

hartwegii en el centro de México. A los hongos del suelo les secuenciamos masivamente la región ITS2 para en lo posible identificarlos y analizar la estructura de la comunidad. Analizando los resultados, calculamos que el menor recambio de especies fue entre los suelos de *Abies religiosa* y *Pinus montezumae*. Asimismo, encontramos que los hongos ectomicorrizógenos dominantes pertenecen a las familias de Russulaceae, Clavulinaceae, Inocybaceae y Atheliaceae.

En el capítulo III generamos información sobre las posibles plantas facilitadoras y los hongos que forman la red micorrízica. Recolectamos raíces de los arboles adultos y jóvenes de *Abies religiosa* para secuenciar masivamente el ITS2 de los hongos para identificar el DNA. Adicionalmente, secuenciamos el DNA de la rizósfera de 17 plantas potencialmente facilitadoras. Con los datos construimos y analizamos una red bipartita entre plantas y hongos. Como resultados, obtuvimos que *Acaena elongata*, *Baccharis conferta*, *Dryopteris pseudofilix-mas*, *Fuchsia thymifolia*, *Muhlenbergia macroura*, *Muhlenbergia nigra*, *Roldana barba-johannis*, y *Salix paradoxa* son potenciales plantas facilitadoras. Asimismo, los hongos de las familias Claroideoglomeraceae, Cortinariaceae, Glomeraceae y de los géneros *Clavulina*, *Endogone*, *Genea*, *Geopora*, *Humaria*, *Hydnobolites*, *Hydnotrya*, *Hymenogaster*, *Inocybe*, *Rhodoscypha*, *Russula*, y *Tomentella* son los enlaces entre las plantas porque son los hongos más frecuentes y con menor distribución de grado (*degree distribution*) que conectan a las plántulas de *Abies religiosa* con las potenciales plantas facilitadoras.

En conclusión, recomiendo como plantas facilitadoras para establecer plántulas de *Abies religiosa* a *Baccharis conferta*, *Muhlenbergia macroura*, *M. nigra*, y *Salix paradoxa* porque tienen a los hongos micorrizógenos más frecuentes y con la mayor conectividad, la menor distribución de grado y el menor camino más corto promedio. Asimismo, el hábitat de *Pinus montezumae* es ideal para reintroducir las plántulas de *Abies religiosa*, porque tiene menos recambio de especies de hongos en el suelo. De la misma forma, los hongos señalados en el capítulo III pueden conectar a las plántulas de *Abies religiosa* con las plantas facilitadoras favoreciendo el establecimiento en campo. De estos hongos, es necesario utilizar a los de las familias Clavulinaceae, Russulaceae e Inocybaceae porque son hongos de amplia distribución y tienen menor probabilidad de ser desplazados por los hongos nativos.

Abstract

Abies religiosa is an endemic tree from central Mexico that provides ecosystem services, such as refuge for biodiversity, carbon sequestration, and groundwater recharge. The populations of this species have been reduced due to human activities, and the reduction of its habitat is predicted in climate change scenarios. A proposed conservation strategy is assisted migration. With this strategy the saplings are re-introduced into a new habitat under ideal conditions, to couple the population with the predicted habitat. In the reforestation programs in sites with little soil, a lower sapling establishment rate exists than in sites with abundant soil. In both scenarios, however, the sapling survival rate improves with the use of mycorrhizal fungi. If these fungi are displaced by native fungi, the survival rate diminishes. One solution is to use generalist ectomycorrhizal fungi, with a large range of host-compatibility. Also, the sapling survival is improved with the use of facilitator plants, which reduce abiotic stress. Few facilitator plants are documented for *Abies religiosa*, but several candidate species exists in Mexico. Therefore the present study poses the following research question: Which ectomycorrhizal fungal species and which facilitator plants form a mycorrhizal network, and thus should be proposed for reintroduction of *Abies religiosa*? The general objective of this study is to analyze the mycorrhizal network architecture to detect the ectomycorrhizal fungal species and the potential facilitator plants involved in the *Abies religiosa* mycorrhizal network. To answer this question, our study comprises three chapters. Chapter I present the inventories of ectomycorrhizal fungal species of *Abies religiosa* adult. In chapter II the ectomycorrhizal fungal species turnover between *Abies religiosa* adults and other coniferous ectomycorrhizal host is analyzed. Chapter III is about the determination of the plant and fungal species involved in the mycorrhizal network.

In chapter I we determined the ectomycorrhizal fungal species associated with *Abies religiosa*. To achieve this, we established seven plots in a monodominant forest, and we sampled with soil cores to obtain the ectomycorrhizal root tips. The ITS region was sequenced with a Sanger platform, to describe the ectomycorrhizal fungal community. It turned out that the Clavulinaceae family is the most frequent and abundant family.

In chapter II we compared the soil fungal diversity from two *Abies religiosa* forests with the soil fungal diversity from *Pinus montezumae* and *Pinus hartweggi* forests in central Mexico. To achieve this, the fungal ITS2 region was Illumina-sequenced, and the NCBI database was used to assign an identity to the DNA whenever possible. With the resulting data, the fungal community structure was analyzed. The lowest species turnover between the

Abies religiosa and *Pinus montezumae* forest was calculated. We found that the ectomycorrhizal fungi of the families Russulaceae, Clavulinaceae, Inocybaceae, and Atheliaceae were the most frequent and abundant.

In chapter III we suggest potential facilitator plant species and mycorrhizal fungi that conform the mycorrhizal network. For that purpose we collected roots from *Abies religiosa* adults and saplings, sequenced with the Illumina platform the fungal ITS2 region, and again used the NCBI database to assign an identity to the DNA whenever possible. Additionally, we sequenced the DNA from the rhizosphere of 17 potential facilitator species. With the data, a bipartite network between plants and mycorrhizal fungi was constructed. The following species resulted to be potential facilitator plants: *Acaena elongata*, *Baccharis conferta*, *Dryopteris pseudofilix-mas*, *Fuchsia thymifolia*, *Muhlenbergia macroura*, *Muhlenbergia nigra*, *Roldana barba-johannis*, and *Salix paradoxa*. The mycorrhizal fungi from the families Claroideoglomeraceae, Cortinariaceae, Glomeraceae, and from the genera *Clavulina*, *Endogone*, *Genea*, *Geopora*, *Humaria*, *Hydnobolites*, *Hydnotrya*, *Hymenogaster*, *Inocybe*, *Rhodoscypha*, *Russula*, and *Tomentella* are the main links between the plants. These fungi are the most frequent and have the lowest degree distribution, connecting the *Abies religiosa* saplings with the potential facilitator plants.

In conclusion, I recommend *Baccharis conferta*, *Muhlenbergia macroura*, *M. nigra*, and *Salix paradoxa* as facilitator plant species for the field establishment of *Abies religiosa*, due to their association with the mycorrhizal fungi with the lowest node degree distribution, and lowest average shortest path. The *Pinus montezumae* habitat is also recommended for *Abies religiosa* reintroduction, due to its lower fungal species turnover, compared with *Pinus hartwegii*. Similarly, the mycorrhizal fungi described in chapter III can link *Abies religiosa* saplings with the facilitator plants, improving the field establishment. Clavulinaceae, Russulaceae and Inocybaceae fungi should be preferred, because they have wide host preferences and consequently lower probabilities to be displaced by native fungi.

Introducción

Abies religiosa es una especie arbórea cuyas poblaciones están disminuyendo debido a disturbios antrópicos y de cambio climático. Para evitar esto, ya se investiga la migración asistida como estrategia de conservación de la especie. Esta estrategia implica la reintroducción masiva de la especie hacia su hábitat predicho. No obstante, en la reintroducción arbórea existe el problema del bajo establecimiento en campo de las plantas. Lo anterior puede ser solucionado de dos formas: utilizando plantas facilitadoras que mejoren la sobrevivencia de la especie de interés porque disminuyen el estrés ambiental, o con el uso de hongos micorrizógenos que mejoran el establecimiento de las plantas. Para *Abies religiosa* está poco documentado cuáles hongos pueden beneficiar su sobrevivencia en campo, por lo cual éste conocimiento es fundamental para el éxito de la micorrización en vivero y sobrevivencia en campo. Asimismo, existen pocas especies facilitadoras conocidas para esta especie, y la selección de especies candidatas puede ser optimizada al seleccionar aquellas plantas que compartan hongos micorrizógenos con *Abies religiosa*.

A continuación, se analiza la importancia de *Abies religiosa* en los ecosistemas, su cobertura, servicios ecosistémicos, la importancia de tomar en cuenta a los hongos ectomicorrizógenos para el éxito de las estrategias de conservación, y la aplicación de la teoría de redes en la ciencia forestal para la reintroducción en campo con hongos ectomicorrizógenos y plantas facilitadoras.

Distribución del género *Abies*

El género *Abies* tiene una compleja historia evolutiva y biogeográfica. Este género se considera como “fuera de América”, es decir, las especies migraron de Norte América a Asia Oriental a través del puente de Bering hace 21,000–14,000 años, siendo este tipo de migración un fenómeno poco común en la biogeografía de las plantas (Wang y Ran 2014; Xiang et al 2015; Tedersoo 2017). También, es el segundo género más diverso en la familia Pinaceae después de *Pinus* (Gernandt y Pérez-De La Rosa 2014), y tiene el inicio de su diversificación en el Paleoceno (65 Ma) (Xiang et al 2015). A nivel mundial, *Abies* tiene entre 49 y 59 especies, dependiendo del autor (Murata et al 2014; Semerikova y Semerikov 2014), mientras que en México se reconocen entre seis y diez especies por morfología y 8 taxa utilizando datos genéticos (Martínez-Méndez et al 2016). En ambos casos, solo dos especies se comparten entre México y otros países: *Abies concolor* con Estados Unidos de América (EUA) y *Abies guatemalensis* con Guatemala (Aguirre-Planter et al 2012; Martínez-Méndez

et al 2016). Además, este género presenta una afinidad holártica (Rzedowski 2006) en las regiones boreales y templadas de Norte América (Canadá, EUA y México), Eurasia, y en la región montañosa de Guatemala (Vicente Martínez Arévalo 2013). Los bosques de *Abies* son el cuarto recurso maderable de México; no obstante, abarcan un área pequeña del país (~1,436 km²), lo que es menor al <0.1% de la superficie nacional (Martínez-Méndez et al 2016). En particular para *Abies religiosa*, esta superficie disminuye por disturbio antropogénico y por el cambio climático (Ramírez et al 2015).

Cobertura de *Abies religiosa*

La república mexicana cuenta con una superficie continental terrestre de 1,959,248 km² (INEGI 2016), y 446,640 km² (~23%) de esta superficie es de sierra con clima templado-alpino, cuya vegetación principal es de encino-pino en zonas con altitud superior a 2,000 m.s.n.m., pinos de altura de 3,200 a 4,000 m.s.n.m, y pastizal alpino en altitudes mayores a 4,000 m.s.n.m. Además, en México la superficie potencial de bosque templado es de 439,556 km² y la existente tiene 323,305 km² (SEMARNAT 2014). De esta superficie, están conservados 211,949 km², esto representa una tasa de deterioro del ~35% (CONABIO 2016).

La orografía montañosa funge como barrera geográfica entre ecosistemas, y el límite más conocido es la Faja Volcánica Transmexicana (FVT). Esta faja, tiene una superficie aproximada de 119,540 km², y se extiende del oeste al este de México (Mastretta-Yanes et al 2015). *Abies religiosa* es una especie endémica que se distribuye en esta bioregión.

Abies religiosa (Kunth) Schltdl. & Cham, también conocido como Abeto, Oyamel, Jalacote, Acxoyatl (Hernández de Toledo 1942) se distribuye entre los 2,600–3,400 m.s.n.m en la FVT. Esta especie forma bosques monodominantes en sitios conservados pero llegan a presentar especies en el sotobosque como *Alnus jorullensis*, *Salix paradoxa*, *Comarostaphyllis discolor*, *Quercus laurifolia*, y *Arbutus xalapensis*, pero en muy baja proporción (Rzedowski 2006). También, algunos de estos bosques son el área de refugio invernal de la mariposa monarca en donde se han perdido o dañado 4,300 ha (Ramírez et al 2015) principalmente por disturbio humano (Inamine et al 2016; Stenoien et al 2016).

En los bosques templados de México existe una tasa alta de extinción local. Es decir, el área de bosque primario ha sido reducida en los últimos veinte años, y en particular, México es el tercero de la lista de países que han registrado una mayor disminución (Sáenz-Romero et al 2012; Miranda-Aragón et al 2012; Pérez-Moreno y Martinez-Reyes 2014). En el país, la

superficie potencial de bosque de Oyamel es de 402,462 ha, mientras que la superficie de bosque primario hasta 2011 es de 149,458 ha. En 1971, el área total estimada de *Abies religiosa* era de ~313,478 ha, por lo que la reducción de la superficie se calculó en ~52% (Rzedowski 2006; Burrola-Aguilar et al 2013; SEMARNAT 2014). Adicionalmente, los modelos de cambio climático han predicho una reducción del ~96% de la superficie actual para el año 2090 (Sáenz-Romero et al 2012). Por lo que observamos que las poblaciones de *Abies religiosa* están disminuyendo de manera alarmante.

El bosque de *Abies religiosa* más estudiado es la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca (RBMM). En este lugar, el disturbio se debe a la tala ilegal, siendo la tasa anual de disturbio entre 0–2%, mientras que para el Nevado de Toluca, la tasa anual de disturbio fue de 0.8% para los años comprendidos entre 1972– 2000, y para el Parque Nacional Izta-Popo la tasa de deforestación fue de 0.35% del año 1970 al 2000 (Ramírez et al 2015). Por consecuencia de esta reducción de superficie, los servicios ecosistémicos y sociales de los bosques de *Abies religiosa* están en riesgo de perderse (Sáenz-Romero et al 2012; Ramírez et al 2015; Sáenz-Romero et al 2016; Ortiz-Bibian et al 2017).

Los bosques de *Abies religiosa* son el refugio invernal de la mariposa monarca y tienen importantes servicios ecosistémicos

La migración de la mariposa monarca *Danaus plexippus* (L.) (Nymphalidae: Danainae) desconociendo fronteras políticas es un fenómeno ampliamente reconocido en el mundo por su magnitud y singularidad (*uniqueness*). Cada año, miles de mariposas migran desde el sur de Canadá, y el noreste de EUA, hacia doce montañas en la Faja Volcánica Transmexicana para pasar el invierno (Noviembre-Marzo). Posteriormente, en el invierno tardío, las mariposas refugiadas migran de regreso al norte donde se aparean y ponen huevos en las plantas del género *Asclepias*, que se distribuyen el norte de México y el sur de EUA. La siguiente generación migra hacia el sur de Canadá y a los estados de la costa este de EUA, donde producen 3 o 4 generaciones más antes de comenzar el viaje de regreso anual (Inamine et al 2016; Stenoien et al 2016).

Las poblaciones de mariposas están declinando y la migración anual está amenazada principalmente por las actividades humanas. Las poblaciones de mariposas disminuyeron en los sitios de refugio del año 1995 a la fecha (Vidal y Rendón-Salinas 2014; Inamine et al 2016; Oberhauser et al 2016), y se atribuye a los siguientes tres factores: el cambio de uso de

suelo forestal (*Abies religiosa*) al agrícola, la disminución de las poblaciones de *Asclepias* spp. por el uso de herbicidas y por la reducción en la disponibilidad de néctar (Stenoien et al 2016). La pérdida de los bosques de *Abies religiosa* no solo limita el área de refugio invernal de la mariposa monarca, sino también disminuye los servicios ecosistémicos que estos bosques proveen.

Los bosques de *Abies religiosa* son componentes esenciales de los ecosistemas. Estos bosques son sitios importantes de recarga de mantos acuíferos (Jujnovsky et al 2012), y son un almacén de carbono en su biomasa (Fragoso-López et al 2017). Asimismo, los bosques de Oyamel tienen una producción alta de hongos comestibles silvestres, así como una gran riqueza de especies fúngicas (Burrola-Aguilar et al 2013; Oros-Ortega et al 2017). También, las poblaciones humanas asociadas a estos bosques han aprovechado los productos forestales no maderables desde tiempos inmemoriales, siendo los hongos comestibles una fuente de ingresos, y de alimentación durante la época de lluvias (Montoya et al 2005; Pacheco-Cobos et al 2010; Montoya et al 2012). Por lo tanto, los bosques de *Abies religiosa* son una especie simbiote mutualista con los humanos, las mariposas monarcas y los hongos.

Estrategias de conservación y rescate de *Abies religiosa*

Como hemos dicho, *Abies religiosa* es una especie forestal muy importante; no obstante, no está en ninguna categoría de protección especial. Esta especie vegetal no está protegida porque sus poblaciones no están severamente fragmentadas, pero sí hay una reducción de su superficie actual debido a cambios antropogénicos como la tala y el cambio de uso de suelo (Martínez-Méndez et al 2016). Además, el hábitat actual del Oyamel y el predicho en los modelos de cambio climático no se sobrelapan. En trece años, el modelo predice una reducción del ~69% en su superficie actual; asimismo prevé una reducción del ~87% para el año 2060 y para el fin del siglo se pronostica una reducción del ~96% (Sáenz-Romero et al 2012). El cambio climático, se hipotetiza, causa un estrés en los árboles debido al aumento en la temperatura y una reducción en la precipitación, aumentando la susceptibilidad a pestes y plagas (Ramírez et al 2015).

Las áreas que no contienen a estos árboles pero, que en los modelos se predice tendrán un clima óptimo para la distribución de éste abeto en 2030, son las áreas prioritarias para la reintroducción arbórea, y está modelado que el hábitat idóneo se desplazará hacia altitudes mayores (Ramírez et al 2015). La estrategia de manejo propuesta para *Abies religiosa* es la

migración asistida (Sáenz-Romero et al 2012). En este esquema de ingeniería ecológica, las plántulas se siembran en el hábitat idóneo para hacer coincidir las poblaciones con su ambiente óptimo predicho (Maier y Simberloff 2016; Sáenz-Romero et al 2016). No obstante, la colonización de los genotipos no adaptados localmente al ambiente nuevo, puede ser una barrera en el establecimiento de los árboles en las nuevas condiciones (Simard 2012; Bingham y Simard 2013), y constituye un problema a solucionar en los programas de migración asistida.

Importancia de tomar en cuenta a los hongos ectomicorrizógenos para el éxito de la reintroducción forestal o la migración asistida de *Abies religiosa*

Dentro de los planes de reintroducción arbórea, existen problemáticas forestales y económicas, pero también biológicas a considerar, como es el bajo éxito del establecimiento de las plantas (Grossnickle y Ivetić 2017). Usualmente debido a que los suelos han perdido su estructura y su diversidad microbiana, y por lo tanto su función. Para rehabilitar la función del suelo existen agrotécnicas que lo rehabilitan, pero tienen el inconveniente de presentar un alto coste económico (Walker y Mallik 2009; Schie y Haider 2015).

Una propuesta para mejorar la supervivencia es incorporar a los hongos ectomicorrizógenos. Los hongos establecen diferentes relaciones con las plantas tanto mutualistas como antagonistas; en las relaciones benéficas, pueden ayudar a la germinación de plantas, y a su establecimiento en campo (Bingham y Simard 2011; Bingham y Simard 2013; Pérez-Moreno y Martínez-Reyes 2014; Nara 2015). Adicionalmente, otra estrategia de reforestación sugerida es el uso de hospederos alternos que permitan la facilitación de las plántulas (Verdú y Valiente-Banuet 2008; Valiente-Banuet et al 2014; Nara 2015). El anterior esquema fue aplicado exitosamente en la reintroducción de *Pseudotsuga menziesii* en la que el uso de un hospedero alternativo (*Betula papyrifera* o *Arctostaphylos glandulosa*) aumentó la supervivencia de las plántulas. El mecanismo propuesto fue que la planta facilitadora logró restaurar la red ectomicorrízica porque albergaba los mismos hongos que facilitaron a *Pseudotsuga menziesii* (Horton et al 1999; Simard 2012). Por lo tanto, ambos métodos pueden ser usados para mejorar la supervivencia de las plantas de *Abies religiosa*.

Como se mencionó, la supervivencia de plántulas en campo mejora con el uso de plantas micorrizadas. Esta estrategia lleva varios años de uso en México para la micorrización y establecimiento en campo plántulas de *Pinus* (CONAFOR 2010; Pérez-Moreno y Martínez-

Reyes 2014), pero no para el caso de *Abies religiosa*. Para esta planta, aún falta conocer algunos aspectos de su ecología, para poder proponer una estrategia integral. Por eso, conocer los hongos asociados exclusivamente con *Abies religiosa* y cuáles se comparten con otros hospederos alternativos en distintos sitios, permite sugerir especies ectomicorrizógenas de amplia distribución que son candidatas para inocular a los hospederos facilitadores. Estos hongos restablecen la red micorrízica, y aseguran la supervivencia de los genotipos de las plantas a reforestar en los sitios con el hábitat óptimo predicho.

Los hospederos determinan a los tipos de hongos presentes y los hongos ectomicorrizógenos son los encargados de establecer la red micorrízica

El estudio de las comunidades de hongos presentes en el suelo con tecnología de secuenciación masiva permite conocer los microorganismos que forman el banco de propágulos de hongos ectomicorrizógenos (Schmidt et al 2013; Tedersoo et al 2014; Mundra et al 2016). Esto es importante porque a partir de estos reservorios, se establece la asociación simbiótica de los hongos con las plantas hospederas (Koide et al 2011). La información es importante para la toma de decisiones, porque la micorrización falla en el caso de inocular con especies de hongos ectomicorrizógenos a hospederos poco compatibles; por ejemplo, la inoculación de *Pinus patula* y *Pinus hartwegii* con *Clavulina aff. cinerea* no fue exitosa (Perea-Estrada et al 2009) porque este hongo tiene preferencia por *Abies religiosa* (Argüelles-Moyao et al 2017). Asimismo, la inoculación de ésta planta con *Inocybe splendens* falló en mejorar el establecimiento en campo ya que fue sustituida por hongos nativos (Flores-Rentería et al 2017). No obstante el uso de suelo forestal y la colonización con hongos nativos si mejoró el establecimiento significativamente. Por lo tanto, la selección del inóculo micorrízico es de vital importancia una micorrización exitosa.

Las propiedades de las redes que pueden usarse en reintroducción de especies forestales

Los sistemas son el todo compuesto por varias partes. La etimología proviene de *σύστημα* que significa “con arreglo, con composición” (OED Online 2017). Estos sistemas pueden ser simples o presentar propiedades complejas. Es decir, la interacción entre los componentes desarrolla propiedades nuevas o “emergentes” que están ausentes en las partes, y se conoce

como auto-organización. Este fenómeno es la emergencia de orden en sistemas desordenados a partir de reglas simples y sin un organizador central (Mitchell 2009; Voit 2013).

Los sistemas complejos pueden ser no adaptativos (como los huracanes o la turbulencia del agua) y adaptativos (los que tienen una respuesta a las perturbaciones). Por lo tanto, los sistemas biológicos pueden ser entendidos como sistemas complejos adaptativos. Así, estos sistemas presentan las siguientes propiedades: 1) rasgos globales que no pueden ser considerados como la suma de las propiedades de los componentes individuales, 2) usan y producen información, 3) tienen capacidad de respuesta (también llamado adaptación, pero debe entenderse en el sentido plástico y no como adaptación en el sentido de la síntesis expandida), y de reacción a las perturbaciones (Mitchell 2009).

El pensamiento de redes es la base fundamental del pensamiento en sistemas complejos, porque permite entender las interacciones entre las partes que componen al sistema. Las redes biológicas, están compuestas de nodos (especies, genes, ecosistemas, etc.), y enlaces (interacciones positivas o negativas). Las redes unipartitas involucran a un gremio (por ejemplo interacción planta-planta), y las bipartitas a dos o más gremios funcionales (las relaciones mutualistas entre hongos-plantas).

En las relaciones ecológicas, las especies pueden mostrar varios niveles de preferencia o especialización, resultando en que algunas especies están más frecuentemente conectadas, por sus interacciones, que lo esperado por azar (Bahram et al 2014). En estos casos, algunas especies están desproporcionadamente más conectadas con otras, lo que permite que puedan ser usadas en restauración o reintroducción, porque el uso permite una enorme ganancia en biodiversidad (Pocock et al 2012).

El análisis de redes es usado para explorar las propiedades estructurales, matemáticas, y estadísticas de un conjunto de nodos y la conexión entre ellos. Como mencionamos anteriormente, los organismos forman redes de interacción. En este caso existen dos tipos principales de redes, las redes de mundo pequeño y las libres de escala. Las de mundo pequeño, son colecciones de nodos (especies) conectados por enlaces (interacciones), y que la mayoría de los participantes tienen pocos enlaces (también llamado distribución de grado o *degree distribution*), pero hay un número pequeño de enlaces de larga distancia, que resulta en una distancia promedio baja y un menor camino más corto promedio (*low average path lenght*) (Mitchell 2009; Voit 2013).

Asimismo, las redes libres de escala son las que presentan una distribución de potencias. Es decir, la vasta mayoría de nodos tienen un bajo grado de enlaces conectándolos y sólo una diminuta fracción de nodos tienen un alto grado de enlaces, por eso se les denominan *hubs*. Debido a esta propiedad, las redes libres de escala presentan la tendencia de ser robustas ante una falla aleatoria de nodos, pero vulnerables a la eliminación dirigida de los *hubs* (Mitchell 2009). Para el caso de los hongos asociados con los árboles, la reducción de un árbol muy conectado es equivalente a la pérdida de un *hub*, por lo que eliminar a un árbol en concreto extingue localmente a muchas especies de hongos (Beiler et al 2010).

La topología de una red es su organización interna. Los estudios sobre hongos formadores de redes ectomicorrízicas concluyen que existen distintos niveles de interacción, lo que resulta en distintas topologías de la red ectomicorrízica (Beiler et al 2010; Beiler et al 2012; Toju et al 2013a; Toju et al 2013b; Toju et al 2014; Bahram et al 2014; Beiler et al 2015; Taudiere et al 2015; Tu et al 2015). Hay estudios que se enfocan a las propiedades biológicas que aparecen con determinada topología de la red (número de nodos, conectividad, grado de agrupamiento, modularidad y anidamiento), y los usan como indicador de la salud del sitio; por ejemplo, un alto nivel de anidamiento (la presencia de una especie que interactúa con muchas especies) refleja la capacidad de resistencia o resiliencia del ecosistema (Bascompte y Jordano 2007; Fontaine et al 2011). Asimismo, la modularidad (la formación de subgrupos) refleja el grado de independencia que puede ser usado para manejo forestal al detectar unidades de paisaje (Simard 2012). La conectividad (el número mínimo de nodos necesarios para desconectar a una red) o el número de nodos asociados, reflejan los gremios o individuos que son los más vulnerables, ya que al ser removidos quitarían una enorme biodiversidad asociada, y por lo tanto deben estar sujetos a protección especial (Simard et al 2013).

El enfoque de la teoría de redes para la reintroducción de *Abies religiosa*

Las plantas facilitadoras permiten el establecimiento de otras plantas. En particular, se conoce como “síndrome de planta nodriza” al efecto benéfico de una planta adulta en las plántulas jóvenes (Lara-González et al 2009; Sánchez-Velásquez et al 2011; Rivas-Rivas et al 2017). Para *Abies religiosa*, está documentado una mejoría en su establecimiento en campo con el uso de plantas facilitadoras. En detalle, los géneros *Baccharis* y *Lupinus* son plantas facilitadoras de *Abies religiosa* (Lara-González et al 2009; Sánchez-Velásquez et al 2011;

Ortiz-Bibian et al 2017; Rivas-Rivas et al 2017); sin embargo, no se tiene documentado otras plantas con este potencial.

Asimismo, las plantas establecen una relación simbiótica mutualista con hongos de distintos phyla y esto mejora su supervivencia en campo (Nara 2015a; van der Heijden et al 2015; Pickles y Simard 2016). Las redes micorrízicas crean rutas subterráneas en las que las plantas intercambian carbono, nutrientes o agua, y estos patrones dependen de los gradientes fuente-sumidero entre las plantas involucradas en la red. También, las redes tienen una función fundamental en el crecimiento, competencia y dinámica forestal (Bingham y Simard 2011). Por lo tanto, podemos integrar el uso de plantas facilitadoras con los hongos micorrizógenos.

Los bosques templados tienen tasas lentas de recuperación, y el cambio de uso de suelo para uso agrícola es considerado como el mayor disturbio antropogénico (Calderon-Aguilera et al 2012). Precisamente, a partir de la experiencia de reintroducción de *Pseudotsuga menziesii* (Horton et al 1999) en la que un hospedero facilitador (*Arctostaphylos glandulosa*) permite el establecimiento de las plántulas, y aumenta la supervivencia de ellas al restaurar la red ectomicorrízica (Bingham y Simard 2011; Simard 2012), es muy plausible que con el estudio de los integrantes de la red de *Abies religiosa* estemos en condiciones de sugerir especies facilitadoras que ayuden en la reintroducción para esta especie, con ayuda de los hongos ectomicorrizógenos. Por lo tanto, proponer una estrategia útil de reintroducción de plantas de *Abies religiosa*, implica subsanar la falta de conocimiento de especies de hongos ectomicorrizógenos asociados a las plantas juveniles, y la interacción de estos con las posibles plantas facilitadoras.

La restauración ecológica se define como “una actividad intencional que inicia o acelera la recuperación de un ecosistema con respecto a la salud, integridad y sustentabilidad” (Grossnickle y Ivetić 2017). Con esto en mente, al intentar restaurar un ecosistema debemos conocer el estado saludable del ecosistema al que intentamos regresar. Por esto, los inventarios son muy importantes ya que nos dicen como es el sitio antes de un disturbio. Así, el conocimiento de la diversidad de las plantas y los hongos presentes en el suelo es muy importante porque permite documentar a los hongos ectomicorrizógenos y otros hongos, asociados con las plantas en condiciones normales (Beiler et al 2010; Toju et al 2013b; Bahram et al 2013; Taudiere et al 2015). Por último, debido a que las comunidades de hongos ectomicorrizógenos de los bosques saludables y los declinantes tienen una composición

diferente entre ellos (Horton et al 2013) es necesario conocer la diversidad de sitios naturales para el éxito de cualquier proyecto de restauración.

Uso de secuencias de DNA para inventariar la diversidad de sitios naturales

Los hongos son un grupo muy diverso en el suelo a nivel global (Tedersoo et al 2014). Esta diversidad comprende taxa de hongos aún no descritos, que con análisis posteriores se han logrado colocar a nivel de orden y clase (Tedersoo et al 2017). Para el análisis de esta diversidad es necesaria la toma de muestra de suelo y raíces de varios sitios, y la única herramienta que permite analizar la diversidad de manera eficiente es la secuenciación masiva de DNA. No obstante, eso genera ciertas problemáticas a tomar en cuenta, porque involucra utilizar MOTU's (*Molecular Operational Taxonomic Units* (Floyd et al 2002), en lugar de especies.

La conceptualización y delimitación de las especies (de Queiroz 1998; de Queiroz 2007) a menudo es mixta y orientada a las necesidades y limitaciones del usuario; lo anterior da por resultado que las descripciones de la diversidad de hongos, sean diferentes entre estudios (Hughes et al 2009). Por lo tanto, el uso de MOTU's es un criterio operativo y no corresponden a algún criterio de delimitación de especies (Ryberg 2015). La región de DNA que se utiliza para construir los MOTU's es variable entre estudios, pero comúnmente se utiliza la región ITS (*Internal transcribed spacer*). Esta región fue designada como el código de barras de los hongos (Schoch et al. 2012). El uso de ITS para nombrar especies es práctico por ser un punto de partida, pero puede clasificar incorrectamente a los organismo por ser un *locus* multicopia (Schoch et al 2012; Lindner et al 2013). No obstante, para estudiar la diversidad, el uso del 3% de variación para delimitar las secuencias permite recuperar el 99% de la heterocigosis (Hughes et al 2009), y sólo al aplicarlo en grupos recientes, en los que el ITS no ha acumulado suficiente variación, sería errónea la delimitación de especies, por lo que se necesitan análisis filogenéticos para reconstruir correctamente el árbol de especies (Ryberg 2015). Por lo tanto, la aproximación con MOTU's permite tener una buena idea de los taxa presentes en los sitios de estudio, y enfocar la delimitación en las especies importantes ecológicamente.

Pregunta de investigación

¿Cuáles especies de hongos ectomicorrizógenos y cuáles especies de plantas facilitadoras son las que forman la red micorrízica, para proponerlas en la reintroducción de *Abies religiosa*?

Objetivo general

Analizar la arquitectura de la red micorrízica para detectar a los hongos ectomicorrizógenos y plantas facilitadoras que pueden intervenir en la reintroducción de *Abies religiosa*.

Objetivos particulares

Conocer cuáles hongos son los que establecen la simbiosis en plantas de *Abies religiosa* adultas.

Comparar la diversidad de los hongos del suelo del Zarco y en la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca (RBMM) en el contexto de la diversidad de hongos del suelo de otros ecosistemas de coníferas del Neotrópico mexicano.

Determinar la estructura de la red de hongos asociados a las raíces de plantas potencialmente facilitadoras.

Estructura de la tesis

Para responder nuestra pregunta de investigación y los objetivos, elaboramos un programa de investigación dividido en tres capítulos. Los resultados se presentan en cada uno de ellos. En el capítulo I se determinan cuáles hongos establecen la simbiosis ectomicorrizica con las plantas adultas de *Abies religiosa*, y se documenta las especies asociadas con este género. En el capítulo II se compara la diversidad de los hongos presentes en el suelo (resaltando los ectomicorrizógenos), asociados a dos sitios con *Abies religiosa* y otros tres sitios: uno con *Pinus montezumae*, otro con *Pinus hartwegii*, y otro mixto. En el capítulo III se construye una red bipartita de interacción planta–hongo, y proponemos varias especies de plantas y de hongos micorrizógenos que pueden facilitar el establecimiento de *Abies religiosa*. Finalmente, se discute todos los resultados para resaltar la importancia de las plantas facilitadoras y los hongos micorrizicos en la reintroducción de plántulas de *Abies religiosa* así como la explicación de los resultados a partir de la teoría ecológica de los hongos micorrizógenos.

Capítulo I. El inventario de las especies de hongos ectomicorrizógenos asociados con *Abies religiosa*

En este capítulo se describe a las especies de hongos ectomicorrizógenos que establecen las simbiosis con *Abies religiosa*. Para esto, extrajimos a las micorrizas del suelo con núcleos de PVC en parcelas homogéneas en sus características arbóreas y de suelo. A estos órganos, les extrajimos el DNA y secuenciamos la región ITS2. Con una comparación contra la base de datos del NCBI les asignamos un nombre.

Con esta información y los datos de abundancia analizamos la estructura de la comunidad. En esta investigación resaltamos la importancia de la familia Clavulinaceae como simbiote dominante y su relevancia en los hospederos monodominantes distribuidos cerca del ecuador.

La información se presenta en un artículo publicado en la revista *Mycorrhiza* (2017) 27:53–65, con el título “***Clavulina-Membranomyces* is the most important lineage within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa***”

Clavulina-Membranomyces is the most important lineage within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*

Andrés Argüelles-Moyao^{1,2} · Roberto Garibay-Orijel¹ ·
Laura Margarita Márquez-Valdelamar¹ · Elsa Arellano-Torres

Received: 25 January 2016 / Accepted: 3 August 2016 / Published online: 25 August 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract *Abies religiosa* is an endemic conifer of Mexico, where its monodominant forests are the winter refuge of the monarch butterfly. Due to climate change, it has been estimated that by 2090, *A. religiosa* populations will decline by 96.5 %. To achieve success, reforestation programs should consider its ectomycorrhizal (ECM) fungi. We used ITS nrDNA sequences to identify the ECM fungi associated with *A. religiosa* and, based on its abundance and frequency, determined the diversity and community structure in a pure *A. religiosa* forest near Mexico City. Using sequence metadata, we inferred the species geographic distribution and host

preferences. We conducted phylogenetic analyses of the Clavulinaceae (the most important family). The ECM community held 83 species, among which the richest genera were *Inocybe* (21 species), *Tomentella* (10 species), and *Russula* (8 species). Besides its low species richness, the *Clavulina-Membranomyces* lineage was the most dominant family. *Clavulina* cf. *cinerea* and *Membranomyces* sp. exhibited the highest relative abundance and relative frequency values. Phylogenetic analyses placed the Clavulinaceae genotypes in three different clades: one within *Membranomyces* and two within *Clavulina*. A meta-analysis showed that the majority of the ECM fungi (45.78 %) associated with *A. religiosa* in Mexico have also been sequenced from North America and are shared by Pinaceae and Fagaceae. In contrast, because they have not been sequenced previously, 32.2 % of the species have a restricted distribution. Here, we highlight the emerging pattern that the *Clavulina-Membranomyces* lineage is dominant in several ECM communities in the Neotropics, including *Aldinia* and *Dicymbe* legume tropical forests in the Guyana Shield, the *Alnus acuminata* subtropical communities, and the *A. religiosa* temperate forests in Mexico.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00572-016-0724-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Roberto Garibay-Orijel
rgaribay@ib.unam.mx

Andrés Argüelles-Moyao
evoandres@gmail.com

Laura Margarita Márquez-Valdelamar
lmarquez@ib.unam.mx

Elsa Arellano-Torres
elsa_arellano@ciencias.unam.mx

¹ Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, DF C.P. 04510, México

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio B, 1° Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, DF C.P. 04510, México

³ Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, DF C.P. 04510, México

Keywords Fungal community ecology · ITS nrDNA · Religious fir · Trans-Mexican Volcanic Belt · *Clavulina* · *Membranomyces*

Introduction

Fir (*Abies*) forests are distributed in the northern hemisphere and have a geographic boreal affinity (Rzedowski 2006). This genus comprises 49 species (Xiang et al. 2009) that inhabit regions from coastal areas to alpine mountains where they are commonly mixed with *Larix* and *Picea* (Eckenwalder 2009).

Fir forests have been recognized as important biodiversity reservoirs of organisms such as saprotrophic and ectomycorrhizal (ECM) fungi (Kranabetter et al. 2009; Schirkonyer 2013; Ważny 2014; Rudawska et al. 2016).

Abies religiosa (Kunth) Schltdl. & Cham., known as “sacred fir,” is an endemic species from central Mexico that forms extensive monodominant forests on humid mountain slopes from 2600 to 3200 m.a.s.l. These forests provide important ecosystem services. For example, they serve as the unique winter refuge for migrating populations of monarch butterflies (*Danaus plexippus*) from Canada and the USA (Manzo-Delgado et al. 2013). Furthermore, they have the highest water retention capacity in central Mexico and thus are the main water source for aquifers in the region (Jujnovsky et al. 2012). Sacred fir forests also sustain the largest richness and productivity of wild edible mushrooms in central Mexico (Burrola-Aguilar et al. 2013). Local indigenous communities inhabiting these forests have used its non-timber products for centuries; edible fungi are an important source of nutrition and the main income generator during the rainy season for many families in “La Malinche” National Park in Tlaxcala, Mexico (Montoya et al. 2005, 2012; Pacheco-Cobos et al. 2010).

Unfortunately, sacred fir forests are considerably affected by land cover transformation and climate change. Mexico has experienced the third highest decrease in primary forest area over the past two decades, after Brazil and Gabon (Miranda-Aragón et al. 2012). Habitat loss scenarios driven by climate change have forecast a reduction of 96.5 % of sacred fir forest area by 2090 (Sáenz-Romero et al. 2012). Consequently, the ecosystem and social services provided by these forests are severely threatened. Because sacred fir has a low recruitment ratio and slow growth, Sáenz-Romero et al. (2012) proposed assisted migration as one alternative to avoid extinction of the species. Given that *A. religiosa* is an obligate ECM symbiont and that the establishment of the seedlings of close relatives of *Pseudotsuga* is facilitated by the presence of mycorrhizal networks (Bringham and Simard 2011), further studies should focus on the ECM symbionts of *A. religiosa*. Studies examining the ecology of ECM fungi from five different *Abies* species from northern areas (Canada, Germany, Japan, Poland, and the USA) have been reported by Izzo et al. (2005), Ishida et al. (2007), Kranabetter et al. (2009), Schirkonyer (2013), Ważny (2014), and Rudawska et al. (2016). However, no previous studies have assessed ECM fungal diversity in neotropical *A. religiosa* forests using DNA sequences from root tips. Consequently, the community of ECM fungi associated with this endemic neotropical tree is unknown.

The objectives of this study were (1) to analyze the diversity of the symbiotic ECM fungi of *A. religiosa* forests of “El Zarco,” Mexico; (2) to determine the structure of the ECM community; (3) to analyze the phylogenetic position and ecological importance of the *Clavulina-Membranomyces* lineage; and (4) using a meta-analysis of DNA sequences from

GenBank, to discuss the geographic distribution and host preferences of the ECM fungi associated with *A. religiosa*.

Materials and methods

Study area

This study was performed in a monodominant *A. religiosa* forest in “El Zarco,” in the mountain range called “Sierra de las Cruces,” Estado de Mexico (N 19.293; W -99.355), in the central part of the Trans-Mexican Volcanic Belt. This mountain range separates the Lerma basin from the Mexico basin in a NNW-SSE orientation (García-Palomo et al. 2008). The soil types include medium-texture humic andosol and medium-texture oeric andosols. The site has a mean annual temperature of 10.2 °C and a mean annual rainfall of 1242 mm (INEGI 2011). These forests are characterized by a dominant overstory composed only of *A. religiosa* trees, without other ECM symbionts in the understory. We selected seven sites from among a previous set of 21 40 × 40 m sites based on similarity in tree composition, tree breast height diameter, and average distance between trees. These sites are located in a 6.25-km² area (Supplementary Fig. 1). Within each site, we established three parallel 40-m transects separated by 20 m. Removing the fallen leaves, we collected the first 30 cm of soil in three soil core samples from each transect (at 0, 20, and 40 m) using 2.5 × 30 cm PVC tubes. In total, we sampled 63 soil cores from 7 collection sites. The soil cores were placed in labeled plastic bags and then refrigerated at 4 °C.

Ectomycorrhizae sampling

For each soil core, we separated the mycorrhizal systems by gently rinsing the soil in a set of sieves (i.e., 2 and 0.850 mm) with running tap water. All root tips taken from both sieves were recovered and stored in plastic containers with distilled water at 4 °C. We cleaned and separated all turgid mycorrhizae using a stereomicroscope. From each soil core, we randomly selected 15 mycorrhizae using a Petri dish with a numbered grid. Ectomycorrhizae were individually stored in Eppendorf tubes with distilled water and kept cold for 1 or 2 days until DNA extraction.

Molecular biology protocols

We extracted DNA from the mycorrhizae using the Xnap kit (Sigma-Aldrich). DNA extraction was performed in PCR plates; in each well, we added 10 µl of extraction solution and placed a 1-mm piece of mycorrhiza. The plate was heated at 65 °C for 10 min, 95 °C for 10 min, and maintained at 4 °C in a thermal cycler (Applied Biosystems). Next, 30 µl of extraction solution was added

to each well, followed by incubation for 30 min at room temperature (Garibay-Orijel et al. 2013). The DNA solution was transferred to a new PCR plate to remove the organic debris and kept at -20°C . The rDNA ITS region was amplified using ITS1F and ITS4 primers (White et al. 1990; Gardes and Bruns 1993) with parameters reported by Ángeles-Argáiz et al. (2016) and Redextract-N-Amp master mix (Sigma-Aldrich). For amplification, we used the following protocol: 94°C for 3 min; 34 cycles of 94°C for 1 min, 51°C for 1 min, and 72°C for 1 min; followed by 72°C for 8 min; and, finally, storage at 4°C . The quality of the amplicons was assessed by 1 % agarose gel electrophoresis. Good-quality amplicons were cleaned using 1 μl of EXO-SAP-IT (Affymetrix) and 1 μl of PCR water for every 3.5 μl of PCR sample in a thermocycler at 37°C for 45 min, followed by 80°C for 15 min, and maintenance at 4°C . The clean PCR products were sequenced in the reverse direction with ITS4 primer in the “Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud” at the Biology Institute, “Universidad Nacional Autónoma de México.”

The DNA sequences were edited and grouped into molecular taxonomic operation units (MOTUs) at a nucleotide similarity of 97 % in Geneious 7 (Biomatters). To assign taxonomic identity to the MOTUs, we conducted a BLAST search (Altschul et al. 1990) in GenBank (NCBI) using only voucher specimen sequences. Conspecific sequences were considered to be those sequences with more than 97 % of pairwise identity (Nilsson et al. 2008; Peay et al. 2008; Setaro et al. 2012). Because of the low coverage of the *Ascomycota* sequences, we used the best bit score instead of the pairwise identity. The most representative sequence of each MOTU was deposited in the nucleotide database of GenBank under accession numbers KF041342–KF041433.

Diversity and community analysis

For each sampling site and for the entire study area, we computed the nonparametric richness estimator CHAO1 and the Simpson diversity index using Biodiversity Pro 2.0 (McAleece et al. 1997). We compared the species composition associated with *A. religiosa* and other *Abies* species published by Izzo et al. (2005), Ishida et al. (2007), Kranabetter et al. (2009), Schirkonyer (2013), Ważny (2014), and Rudawska et al. (2016). Given that (a) the DNA sequences of these studies were produced at different times and (b) the identification of environmental samples depended on the reliability of the database at the moment of the BLAST search, we retrieved the DNA sequences of the abovementioned studies from GenBank and analyzed them again by BLAST to rename the sequences using the same criteria. Species that remained “unknown” were removed from the database. The

similarity between each study was analyzed by a cluster analysis with the Jaccard similarity index and UPGMA as the clustering algorithm. Both analyses were conducted using Past v3 (Hammer et al. 2001).

To analyze the community structure, we computed the relative abundance of species (the number of sequences of each species divided by the total number of sequences) and the relative frequency of species (the number of collection sites in which each species was present divided by the total number of plots). In addition, we calculated the ecological importance value (EIV) of the species by adding the relative abundance and relative frequency of each species (Horton and Bruns 2001).

Phylogenetic analysis

We performed phylogenetic analyses to conduct more reliable species recognition and identification within Clavulinaceae (the family with the highest EIV) and Sebacinaceae. The ITS sequences of *Clavulina* and *Membranomyces* were grouped into genets (100 % genetic similarity); genet sequences were deposited in the nucleotide database of GenBank under the accession numbers KP645350–KP645356. For the phylogenetic analyses, we excluded two short sequences (<300 bp) and included sequences published in previous phylogenetic analyses of the family (Olariaga et al. 2009; Kennedy et al. 2012; Uehling et al. 2012). The alignment was conducted in MAFFT v.7 (Katoh and Toh 2008) by removing sequences with ambiguities and short sequences and including *Multiclavula mucida* (DQ521417) as the outgroup. This alignment was adjusted manually in Mesquite v.2.75 (Maddison and Maddison 2011). We used the corrected Akaike information criterion (CAI) and the Bayesian information criterion (BIC) in jModelTest 0.01 (Posada 2008) to evaluate the better substitution model. Maximum likelihood analysis was performed in PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010) using the HKY85 substitution model; branch support (MLb) was achieved using 1000 bootstrap repetitions. Topology search was conducted using Best to optimize tree topology, branch length, and substitution rate. The Bayesian inference analysis was run in MrBayes 3.2.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) using the HKY85 substitution model, Gamma rate variation with 4 Monte Carlo chains, and a heated chain temp of 0.2 with 10,000,000 generations. The trees were sampled every 400 generations, and 25 % were dismissed as “burn-in.” Branch support was calculated using Bayesian posterior probabilities (Bpp). For Sebacinaceae, we followed the taxonomic criteria and DNA sequences reported by Oberwinkler et al. (2014) and Weiß et al. (2016) using the same analyses described above with the GTR substitution model and *Serendipitella indica* (KF061284) as outgroup.

Geographic distribution and host preferences of the ECM fungi associated with *A. religiosa*

The potential use of ECM fungi for reforestation and the assisted migration of *A. religiosa* do not depend only on knowledge of their root tip abundance. Candidate species for inoculation should have wider distributions and the ability to form ectomycorrhizae with other hosts, to establish robust mycorrhizal networks, and to favor nursing effects on *A. religiosa* seedlings. To analyze this, we assumed the conformation of MOTUs with a nucleotide similarity of 97 % as a good proxy of ECM fungus species (Nilsson et al. 2008; Peay et al. 2008; Setaro et al. 2012). In consequence, we downloaded and analyzed the metadata from all sequences (including voucher and environmental samples) with 97 % or more nucleotide similarity from GenBank. Using these data, we inferred the geographic distribution of each species and its host preferences by computing the frequencies of countries and bioregions, as well as the host species, genera, and families. Using GenBank sequences for metadata analysis must be done with caution since GenBank is not a curated database and includes some unreliable sequences (Tedersoo et al. 2011). To minimize this problem, we excluded from the analysis unpublished sequences and we made conclusions only on those MOTUs with a large amount of robust metadata. Meta-analysis of GenBank sequences have been used to analyze the geographic distribution and host associations of *Tuber* (Bonito et al. 2010), to infer the distribution and plant associations of *Russula* (Looney et al. 2016), to infer the biogeographic patterns of soil fungi (Meiser et al. 2014), to study the distribution of biological traits across nitrophilic *Russula* (Avis 2012), and to generate distribution maps of ECM fungi inferring the environmental variables explaining species distribution (Tse-Laurence and Bidartondo 2011).

Results

We randomly selected a total of 856 mycorrhizae and sequenced 797 good PCR products (93.11 % PCR efficiency). We recovered useful sequences from 591 samples, representing a sequencing efficiency of 69 %. The sequences were grouped into 87 species with a nucleotide similarity of 97 %. Among these, 83 species were ECM (570 root tips), excluding *Hyaloscypha* sp. 1, *Ilyonectria rufa*, *Infundichalara microchona*, and *Verticillium leptobactrum*. Sixty-eight ECM species belonged to the Basidiomycota, and 15 were Ascomycota belonging to 15 families. Families that exhibited higher species richness were Inocybaceae (21 species), Thelephoraceae (15 species), Russulaceae, and Sebacinaceae (9 species) (Fig. 1). Genera with a high number

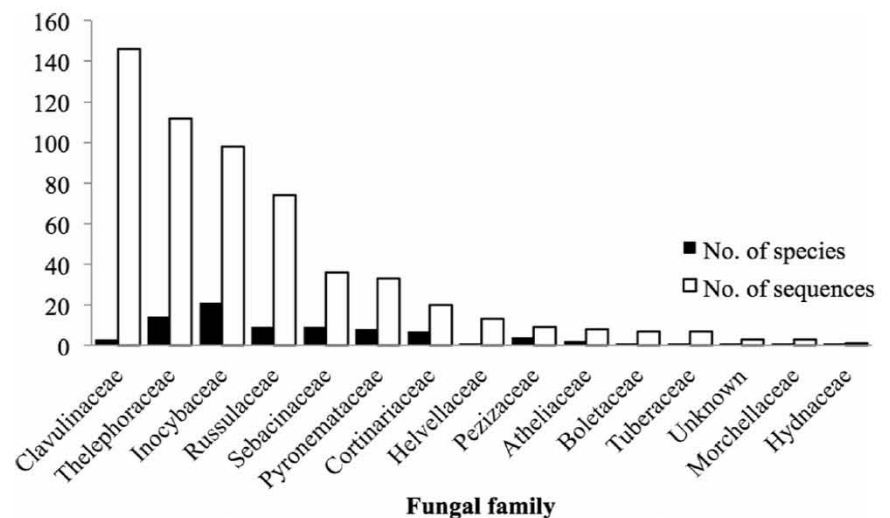
of species were *Inocybe* (21), followed by *Tomentella* (10 species) and *Russula* (8 species). See Table 1 for a complete list of species and their best BLAST matches.

The mean species richness per site was 21 ± 6.3 SD and ranged from 15 (site 2) to 32 (site 7). The mean within-site diversity (1-D) was 0.890 ± 0.059 SD. Site 7 had the lowest dominance, highest diversity, and richness estimated in 44.5 species according to CHAO1. In contrast, site 1 had the highest dominance and lowest diversity, and site 2 had the lowest species richness estimation of 17.5 species (Table 2).

The community was dominated by four families (Clavulinaceae, Thelephoraceae, Inocybaceae, and Russulaceae) that formed 75.96 % of all mycorrhizae (Fig. 1). Clavulinaceae was notable because, despite its relatively low species richness, it was the most dominant family. Two members of this family, *Clavulina* cf. *cinerea* and *Membranomyces* sp., had the highest relative abundance (0.144 and 0.109, respectively), followed by *Thelephoraceae* sp. 1 (0.068) and *Russula* sp. 1 (0.039) (Fig. 2). The only species present in up to five collection sites (relative frequency=0.032) were *C. cf. cinerea*, *Membranomyces* sp., and *Tomentella* sp. 2 (Fig. 2). The most important species in the community according to the EIV were *C. cf. cinerea* (0.177), *Membranomyces* sp. (0.142), and *Thelephoraceae* sp. 1 (0.088) (Fig. 2).

The maximum likelihood (Fig. 3) and Bayesian analyses (not shown) were concordant and placed our Clavulinaceae genotypes in three different clades: one was within the *Membranomyces* clade and two were within the *Clavulina* clade. The *Membranomyces-Clavulicium* clade was not supported (MLb=43.7, Bpp=0.556). Within this clade, our three genotypes (KP645353–KP645355) were grouped together with *M. spurius* JQ638713 and *M. delectabilis* (as *Clavulicium delectabile*) JX287344 (MLb=90, Bpp=1). Genotype KP645350 was placed together with a *Clavulina* sp. associated with *Alnus* spp. in Mexico as the external group of the *C. cinerea* var. *gracilis* clade (MLb=72.5, Bpp=0.555). Genotype KP645352 was grouped (MLb=99.7) with other *Clavulina* sequences from Mexico that were associated with *Quercus* as the sister group of *Clavulina rugosa* (MLb=46, Bpp=0.644) (Fig. 3). The maximum likelihood (Supplementary Fig. 2) and Bayesian analyses (not shown) were concordant and placed our Sebacinaceae genotypes in five different clades: One genotype (KF041385) was included in the *Tremelloscypha dichroa* clade (MLb=96.9, Bpp=1), one genotype (KF041344) within the *Helvellosebacina helvelloides* clade (MLb=97.6, Bpp=1), and three genotypes (KF041413, KF041414, KF041428) within the *Sebacina dimitica* clade (MLb=59, Bpp=0.893); the genotype KF041415 was the external group of the *Sebacina incrustans* clade (MLb=52.9, Bpp=0.821), the genotype KF041421 was placed within this clade (MLb=92.5, Bpp=0.981), and two genotypes (KF041412, KF041431) were placed as independent clades within *Sebacina* (MLb=45, Bpp=0.697).

Fig. 1 Mycorrhizal abundance and ectomycorrhizal species richness among families. Number of species (black) and number of sequences (white)



Of the 83 ECM species associated with *A. religiosa*, 59 have already been identified based on their DNA sequences in previous ECM studies of fungi; 28 have not been identified before. Twenty-five species have a Holarctic distribution, whereas 12 are distributed in Europe and the Nearctic, 10 in the Nearctic, 6 only in Mexico, 1 in Asia and the Nearctic, and 1 in the Holarctic and the Neotropics (Supplementary Table 1). Most species are shared with North America, particularly with the USA (37), Mexico (27), and Canada (25). The region with the second most shared species is Europe, with Germany sharing 20 species (Fig. 4). The species with the widest distributions are *Sebacina dimitica* which has been found in 18 countries and *Russula acrifolia* which has been found in 14 countries in the Holarctic. Other species with a Holarctic distribution that were found in more than 10 countries are *Hyaloscypha* sp. 1 (not ECM), *Ilyonectria rufa* (not ECM), *Tomentella pilosa*, *Lactarius fennoscandicus*, and *Humaria hemisphaerica*. Regarding host preference, eight species are generalists (have been reported to form mycorrhizae with five or more botanical families); among these, the most prominent are *Sebacina dimitica*, *S. epigaea*, *Hyaloscypha* sp. 1 (not ECM), and *Russula acrifolia* which are symbionts of 25, 25, 23, and 17 host species, respectively (Supplementary Table 2). *Abies religiosa* shares most of its ECM species (37) with other tree genera in the Pinaceae, in particular with *Pinus*, *Picea*, and *Pseudotsuga*, and shares 30 species with Fagaceae, mainly with *Quercus* and *Fagus* (Fig. 5).

Discussion

Diversity and community structure

The ECM fungus richness found in this study (83 species) is lower to that found in other studies that included *Abies* as an

ECM host. The studies conducted by Ishida et al. (2007) and Izzo et al. (2005) revealed a higher richness (205, 101 species); however, both studies examined forests with eight and four ECM hosts, respectively. Despite a good sequencing efficiency (69 %), the CHAO 1 richness estimator calculated the potential presence of 145 ECM species in the area (Table 2). Additionally, the diversity of the *A. religiosa* forest (1-D=0.890) was found to be similar to that of the primary forest of *Abies homolepis* (1-D=0.937) (Ishida et al. 2007); it also had one of the highest species richness numbers when compared to other monodominant *Abies* forests.

A total of 99 lineages of fungi have been found on the roots of *Abies* spp. worldwide, 80 of which correspond to ECM taxa. However, 57 lineages have only been found in one study. Forty-two lineages have been found in more than one species of *Abies*; the most common and diverse genera are *Russula*, *Cortinarius*, *Inocybe*, and *Tomentella*. *Inocybe* was the richest genus in the *A. religiosa* forests, whereas *Russula* was the richest genus in *A. homolepis* (Ishida et al. 2007) and *A. alba* (Ważny 2014), *Piloderma* in *A. concolor* and *A. magnifica* (Izzo et al. 2005), and *Cortinarius* in *A. lasiocarpa* (Kranabetter et al. 2009) and *A. alba* (Rudawska et al. 2016) (Fig. 6). The cluster analysis revealed a low similarity in ECM community composition between different *Abies* forests. Two groups were formed; the first corresponds to the forests with the highest species richness (*A. religiosa*, *A. homolepis*, *A. concolor*, *A. magnifica*), and the second consists of the forests with lower richness (*A. alba* and *A. lasiocarpa*). The most similar ECM communities were those of *A. alba* in Poland (Ważny 2014; Rudawska et al. 2016); and those of *A. religiosa* (this work) with *A. homolepis* reported by Ishida et al. (2007) (Supplementary Fig. 3). Although *Russula*, *Cortinarius*, and *Tomentella* were important in the *A. religiosa* ECM community, *Inocybe* was the richest genus with an outstanding richness of 21 species. The cut-off value of

Table 1 Taxonomic identification of ectomycorrhizal fungi associated to *Abies religiosa*

GenBank accession	Species	Pairwise identity %	Bit score	Closest GenBank sequence	Name
KF041416	Atheliaceae sp. 1	99.0	549.51	EF372399	Atheliaceae sp.
KP645350	<i>Clavulina</i> cf. <i>cinerea</i>	99.3	1076.09	EU862222	<i>Clavulina</i> cf. <i>cinerea</i>
KP645352	<i>Clavulina</i> aff. <i>rugosa</i>	99.7	702.80	KC152082	<i>Clavulina</i> sp.
KF041392	<i>Cortinarius</i> cf. <i>ignipes</i>	98.2	958.87	GQ159768	<i>Cortinarius</i> cf. <i>ignipes</i>
KF041425	<i>Cortinarius obtusus</i>	97.8	973.30	AJ438981	<i>Cortinarius obtusus</i>
KF041423	<i>Cortinarius vernus</i>	98.7	814.61	GQ159826	<i>Cortinarius vernus</i>
KF041359	<i>Fischerula</i> sp. 1	83.1	403.44	JN048882	<i>Fischerula macrospora</i>
KF041352	<i>Genabea</i> sp. 1	75.7	338.52	JF908764	<i>Genabea sphaerospora</i>
KF041364	<i>Genea</i> sp. 1	92.1	677.55	AY920529	<i>Genea</i> sp.
KF041369	<i>Genea</i> sp. 2	99.4	798.37	FN669199	<i>Genea</i> sp.
KF041347	<i>Hebeloma albocolossum</i>	99.8	939.85	AY308583	<i>Hebeloma albocolossum</i>
KF041365	<i>Helvella</i> cf. <i>lacunosa</i>	99.6	657.71	KC016117	<i>Helvella</i> cf. <i>lacunosa</i>
KF041344	<i>Helvellosebacina helveloides</i>	93.0	618.04	KM576574	<i>Sebacina</i> sp.
KF041357	<i>Humaria hemisphaerica</i>	99.7	663.12	KC152113	<i>Humaria hemisphaerica</i>
KF041427	<i>Humaria</i> sp. 2	79.9	470.16	EU819470	<i>Humaria hemisphaerica</i>
KF041356	Hyaloscyphaceae sp. 1 ^a	98.4	549.51	HQ157908	Hyaloscyphaceae sp.
KF041380	<i>Hydnobolites</i> sp. 1	94.4	769.52	JN102461	<i>Hydnobolites</i> sp.
KF041398	<i>Hydnobolites</i> sp. 2	95.9	801.98	JX414186	<i>Hydnobolites</i> sp.
KF041348	<i>Hydnotrya cerebriformis</i>	98.3	829.03	KC152119	<i>Hydnotrya cerebriformis</i>
KF041418	<i>Hydnum</i> sp. 1	92.5	710.01	KM576414	<i>Hydnum</i> sp.
KF041424	<i>Ilyonectria rufa</i> ^a	100	767.72	KM248541	<i>Ilyonectria rufa</i>
KF041354	<i>Infundichalara microchona</i> ^a	97.7	722.63	KF359590	<i>Infundichalara microchona</i>
KF041367	<i>Inocybe griseovelata</i>	99.0	931.82	KC305453	<i>Inocybe griseovelata</i>
KF041419	<i>Inocybe lanatodisca</i>	98.9	870.51	JQ408762	<i>Inocybe lanatodisca</i>
KF041376	<i>Inocybe lilacina</i>	98.6	969.69	HQ604296	<i>Inocybe lilacina</i>
KF041346	<i>Inocybe</i> sp. 8	85.3	407.04	FN550930	<i>Inocybe</i> cf. <i>flocculosa</i>
KF041386	<i>Inocybe</i> sp. 9	92.7	650.50	HQ604599	<i>Inocybe praetervisa</i>
KF041383	<i>Inocybe</i> sp. 10	85.0	655.91	EF644109	<i>Inocybe pseudoreducta</i>
KF041384	<i>Inocybe</i> sp. 11	92.6	533.28	AM882974	<i>Inocybe</i> cf. <i>reisneri</i>
KF041351	<i>Inocybe</i> sp. 12	96.3	955.27	FJ904146	<i>Inocybe rimosa</i>
KF041377	<i>Inocybe</i> sp. 13	87.1	533.12	AM882899	<i>Inocybe</i> cf. <i>tenebrosa</i>
KF041426	<i>Inocybe</i> sp. 14	97.8	975.10	JF908230	<i>Inocybe</i> sp.
KF041430	<i>Inocybe</i> sp. 15	89.1	789.36	HQ604520	<i>Inocybe inodora</i>
KF041422	<i>Inocybe</i> sp. 16	90.1	563.94	KM576457	<i>Inocybe</i> sp.
KF041420	<i>Inocybe</i> sp. 17	90.8	762.31	JF908184	<i>Inocybe</i> sp.
KF041378	<i>Inocybe</i> sp. 1	93.0	616.23	JF908184	<i>Inocybe</i> sp.
KF041403	<i>Inocybe</i> sp. 2	94.8	801.98	JF908184	<i>Inocybe</i> sp.
KF041395	<i>Inocybe</i> sp. 3	92.5	618.04	EU819475	<i>Inocybe</i> sp.
KF041394	<i>Inocybe</i> sp. 4	91.7	708.21	AM882908	<i>Inocybe amblyspora</i>
KF041342	<i>Inocybe</i> sp. 5	96.1	807.39	JF899559	<i>Inocybe geophylla</i>
KF041374	<i>Inocybe</i> sp. 6	82.4	601.81	HQ604480	<i>Inocybe glabrodisca</i>
KF041379	<i>Inocybe</i> sp. 7	82.9	527.87	HQ604487	<i>Inocybe mixtilis</i>
KF041358	<i>Inocybe</i> sp. 8	91.4	746.08	AM882798	<i>Inocybe umbratica</i>
KF041388	<i>Lactarius fennoscandicus</i>	97.4	762.31	EF685061	<i>Lactarius fennoscandicus</i>
KP645353	<i>Membranomyces</i> sp.	98.7	928.22	JQ638713	<i>Membranomyces spurius</i>
KF041396	<i>Peziza</i> sp. 1	94.7	798.37	EU819461	<i>Peziza ostracoderma</i>
KF041343	<i>Phaeocollybia</i> sp. 1	87.1	560.33	EU644705	<i>Phaeocollybia sipei</i>
KF041363	<i>Phaeocollybia</i> sp. 2	94.6	942.64	KF219595	<i>Phaeocollybia pseudofestiva</i>
KF041417	<i>Phaeocollybia</i> sp. 3	95.0	1003.96	EU669364	<i>Phaeocollybia spadicea</i>

Table 1 (continued)

GenBank accession	Species	Pairwise identity %	Bit score	Closest GenBank sequence	Name
KF041370	<i>Piloderma</i> sp. 1	92.1	655.91	FN669236	<i>Piloderma</i> sp.
KF041350	<i>Pseudotomentella</i> sp. 1	91.1	637.87	AF274771	<i>Pseudotomentella tristis</i>
KF041390	<i>Pseudotomentella</i> sp. 2	88.5	571.15	HG796916	<i>Pseudotomentella</i> sp.
KF041432	<i>Russula acrifolia</i>	99.0	765.91	DQ421998	<i>Russula acrifolia</i>
KF041401	<i>Russula</i> aff. <i>firmula</i>	99.2	931.82	JF834342	<i>Russula</i> aff. <i>firmula</i>
KF041387	<i>Russula</i> aff. <i>olivacea</i>	99.6	803.78	EU284014	<i>Russula</i> aff. <i>olivacea</i>
KF041372	<i>Russula americana</i>	99.7	955.27	KC152211	<i>Russula americana</i>
KF041402	<i>Russula</i> cf. <i>chloroides</i>	98.1	816.41	DQ422016	<i>Russula</i> cf. <i>chloroides</i>
KF041353	<i>Russula</i> sp. 1	100	753.29	KC152213	<i>Russula</i> sp.
KF041349	<i>Russula</i> sp. 2	96.8	774.93	EU711976	<i>Russula</i> sp.
KF041433	<i>Russula</i> sp. 3	98.9	841.66	KC152218	<i>Russula</i> sp.
KF041414	<i>Sebacina dimitica</i> 1	97.7	891.20	KP783469	<i>Sebacina dimitica</i>
KF041428	<i>Sebacina dimitica</i> 2	96.1	811.0	JF273542	<i>Sebacina</i> sp.
KF041413	<i>Sebacina dimitica</i> 3	96.5	877.72	JF273552	<i>Sebacina</i> sp.
KF041421	<i>Sebacina incrustans</i>	99.0	908.38	EF655701	<i>Sebacina incrustans</i>
KF041415	<i>Sebacina</i> aff. <i>incrustans</i>	98.6	884.94	EU444543	<i>Sebacinaceae</i> sp.
KF041431	<i>Sebacina</i> sp. 1	99.7	807.39	EU444538	<i>Sebacina</i> sp.
KF041412	<i>Sebacina</i> sp. 2	97.8	940.84	KF000421	<i>Sebacina epigaea</i>
KF041371	<i>Tarzetta</i> sp. 1	86.2	342.12	DQ974820	<i>Tarzetta</i> sp.
KF041381	<i>Tarzetta</i> sp. 2	77.1	347.53	DQ974820	<i>Tarzetta</i> sp.
KF041366	<i>Thelephoraceae</i> sp. 1	92.3	767.72	U83472	<i>Thelephoraceae</i> sp.
KF041399	<i>Thelephoraceae</i> sp. 2	96.0	708.21	U83474	<i>Thelephoraceae</i> sp.
KF041360	<i>Thelephorales</i> sp. 1	80.4	237.53	JX030242	<i>Thelephorales</i> sp.
KF041408	<i>Tomentella lateritia</i>	97.9	874.12	KF275145	<i>Tomentella lateritia</i>
KF041404	<i>Tomentella pilosa</i>	99.2	915.59	AJ421252	<i>Tomentella pilosa</i>
KF041345	<i>Tomentella</i> sp. 1	98.7	969.69	EF644116	<i>Tomentella</i> sp.
KF041400	<i>Tomentella</i> sp. 2	97.2	832.64	KM576654	<i>Tomentella</i> sp.
KF041405	<i>Tomentella</i> sp. 3	94.5	796.57	HQ215810	<i>Tomentella</i> sp.
KF041406	<i>Tomentella</i> sp. 4	97.1	940.84	HQ215814	<i>Tomentella</i> sp.
KF041407	<i>Tomentella</i> sp. 5	98.7	967.89	HQ215815	<i>Tomentella</i> sp.
KF041409	<i>Tomentella</i> sp. 6	96.7	856.08	JX145395	<i>Tomentella fuscocinerea</i>
KF041411	<i>Tomentella</i> sp. 7	93.5	827.23	DQ974780	<i>Tomentella</i> sp.
KF041410	<i>Tomentella</i> sp. 8	96.1	832.64	AF272926	<i>Tomentella lateritia</i>
KF041385	<i>Tremelloscypha dichroa</i>	96.4	733.45	KF061280	<i>Tremelloscypha dichroa</i>
KF041393	<i>Trichophaea</i> sp. 1	95.6	812.80	DQ200834	<i>Trichophaea</i> cf. <i>hybrida</i>
KF041375	<i>Tuber</i> cf. <i>separans</i>	98.6	895.76	KC152255	<i>Tuber</i> cf. <i>separans</i>
KF041429	<i>Verticillium leptobactrum</i> ^a	99.0	838.05	AB214657	<i>Verticillium leptobactrum</i>
KF041368	<i>Xerocomus</i> sp. 1	98.4	1047.24	EU569235	<i>Xerocomus</i> sp.

ECM fungal sequences were compared against the NCBI database by using BLAST and filtering uncultured sequences. In Clavulinaceae and Sebacinaceae, we assigned the taxonomic identity using a phylogenetic approach (see the “Materials and methods” section for details)

^a Do not develop ectomycorrhizae, according Tedersoo et al. (2010)

97 % has been proposed as adequate to separate *Inocybe* species (Ryberg et al. 2008). Because the sequences of our *Inocybe* species remained separate even if lower cut-off values (90 %) were applied, the number of recognized species did not result from the method applied for MOTU conformation. According to Matheny et al. (2009), the Neotropics are not rich in *Inocybe*,

whose species are immigrant taxa from Africa and the northern temperate zone. However, that study focused on lowland Neotropics. *Abies religiosa* forests are located in the Trans-Mexican Volcanic Belt representing the transition between the Neotropics and the Nearctic. As demonstrated for many biological groups, this forest likely holds a high richness of *Inocybe*

Table 2 Diversity values

Site	Species richness	Dominance (D)	Simpson diversity index (1-D)	CHAO 1
1	16	0.225	0.775	29.25
2	15	0.101	0.899	17.5
3	18	0.143	0.857	32.5
4	21	0.073	0.927	24.13
5	18	0.109	0.891	31.25
6	27	0.064	0.936	46
7	32	0.058	0.942	44.5
Whole area	87	0.047	0.953	145.3

due to a mixture of Neotropical and Nearctic species. The *A. religiosa* ECM community analyzed in this study exhibited a series of distinctive features. For example: it showed an enrichment of *Inocybe* species, a low frequency of *Cortinarius* species, and high richness of Sebaciniales; good representation of *Genea* and *Hydnobolites*; and for the first time, associations with *Phaeocollybia*, *Tremelloscypha*, *Helvella*, *Humaria*, and *Tarzetta* (Fig. 6). Another unique feature of this community is the dominance of Clavulinaceae species; *C. cf. cinerea* and *Membranomyces* sp. accounted for 25 % of all mycorrhizae. Only the communities of *Alnus acuminata* in Mexico (Kennedy et al. 2011) and that of *Dicymbe* and *Aldina* in the Guyana Shield (Smith et al. 2011) were dominated by *Clavulina* species.

The *Clavulina-Membranomyces* lineage is a main component of the ECM communities in the Neotropics

Clavulina cf. cinerea was the most abundant species, accounting for 14.39 % of the ectomycorrhizae in the

community. Although it was present in five sampling sites, it was not evenly distributed (mean = 16.4, SD = 15.21). Both phylogenetic analyses placed it close to the *C. cinerea* var. *gracilis* clade recognized by Olariaga et al. (2009); however, due to weak support values, we decided to be conservative and to name it *Clavulina cf. cinerea*. This same species (99.8 % nucleotide similarity) was found to be the most dominant fungus in subtropical *Alnus acuminata* forest and the third most abundant fungus in *Alnus jorullensis* temperate forest ECM communities in central Mexico (Kennedy et al. 2011). The BLAST search retrieved 25 sequences (nucleotide similarity >98 %) from the Holarctic (Canada, the USA, Austria, Germany, Spain, Portugal, Iran, and China) that were associated with a variety of angiosperms and gymnosperms (*Fagus sylvatica*, *Populus tremula*, *Quercus* spp., *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus* spp.).

A *Membranomyces* sp. was the second most abundant (11 %) ECM fungus on root tips in the community; it was evenly distributed among five sampling sites (mean = 12.4, SD = 4.51). Both phylogenetic analyses placed it in a highly supported clade (MLb = 90, Bpp = 1) with sequences of

Fig. 2 Ecological importance value (EIV) of the species. Relative abundance (black) and relative frequency (white)

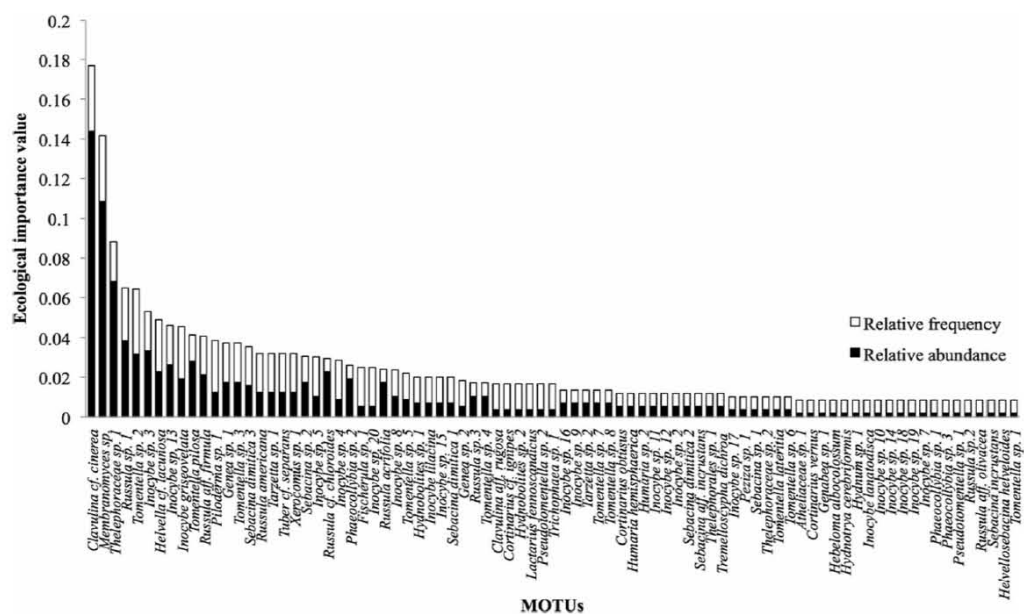


Fig. 3 Phylogenetic tree of the maximum likelihood analysis of the ITS region of *Clavulinaceae*. Branch support is depicted by bootstrap proportions. Ab = *Abies*, Al = *Alnus*, Be = *Betula*, Cas = *Castanea*, Co = *Coccoloba*, Cnopsis, *Castanopsis*, Cor = *Corylus*, Dy = *Dycimbe*, Fa = *Fagus*, Nt = *Nothofagus*, P = *Pinus*, Pi = *Picea*, Po = *Populus*, Q = *Quercus*, Sa = *Salix*, Ti = *Tilia*. Sequences from this study are highlighted in **bold** and *italics*

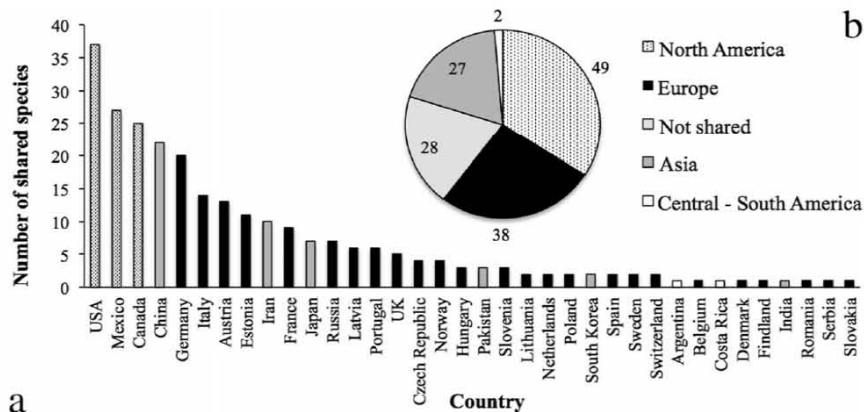


M. spurius and *Clavulicium delectabile*. However, *C. delectabile* is a synonym of *M. delectabilis* (Larsson et al. 2004). Indeed, the nomenclature of *Clavulicium* has been questioned because the *Clavulicium* type specimen is probably a sister clade of Stereopsidales (Sjökvisst et al. 2014). Although our sequences were more similar to *M. spurius* (JQ638713), the remaining *M. spurius* sequences were outside this clade. Additionally, our sequences made up the sister group of *M. delectabilis* (MLb=66, Bpp=0.78). Consequently, we decided to name our species *Membranomyces* sp. Species on this genus are common ECM symbionts in Holarctic forests, and their DNA sequences are usually misidentified in public databases (Uehling et al. 2012). Coincidentally, our BLAST analysis revealed 13 sequences in GenBank (nucleotide similarity >98 %), most of which were from ECM

environmental samples from the USA or Canada and named “uncultured Clavulinaceae” or “*Clavulina* sp.” Our data show that this species has a southernmost distribution at the interface of the Neartic and Neotropics and that at this latitude, it can play a significant role in ECM communities.

Clavulina aff. *rugosa* was a rare fungus in the community; it presented only two mycorrhizae distributed in two sites. Both phylogenetic analyses placed it in the sister clade of *C. rugosa* together with ECM and voucher sequences of *Clavulina* associated with the subtropical *Quercus* forest in southwest Mexico (Morris et al. 2009). The BLAST search only retrieved one sequence (KC152082) with more than 97 % nucleotide similarity, which belonged to a *Clavulina* sp. voucher from central Mexico. The available data suggest that this is an unnamed *Clavulina* species that is endemic to

Fig. 4 Geographic distribution of ectomycorrhizal species associated with *Abies religiosa*. **a** The number of shared species by country. **b** The number of species in each geographic region



temperate and subtropical forests of Mexico associated with *Quercus* and *A. religiosa*.

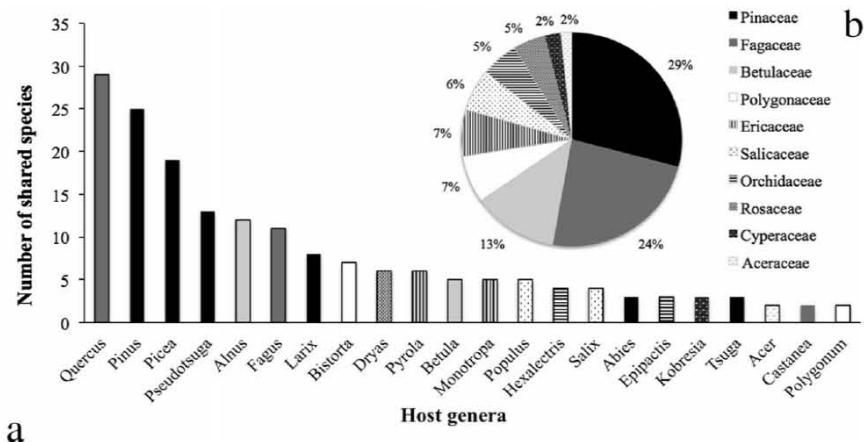
The southern Neotropics are the main center of species richness, genetic diversity, and morphological diversity of the *Clavulina* lineage; approximately 34 % of the clades are distributed in this region (Smith et al. 2011). In ecosystems as the rainforest dominated by the leguminous *Dicymbe corymbosa*, *D. altsonii*, and *Aldina insignis* in Guyana, the Clavulinaceae richness is exceptional. Up to 21 *Clavulina* MOTUs were found to be associated with these plants, and this genus was also found to be the most important in terms of mycorrhizal abundance (Smith et al. 2011). In the northern Neotropics, *Clavulina* species are also dominant in several ECM communities; they are the most abundant ECM fungi in *Alnus* forests (Kennedy et al. 2011), and together with *Membranomyces*, they dominate the *A. religiosa* ECM community. This lineage has the fourth relative abundance of *Pinus montezumae* seedlings in central Mexico (Reverchon et al. 2010) and the fourth greatest abundance in the roots of *Quercus crassifolia* subtropical forests in southwestern Mexico (Morris et al. 2009). These data suggest that the *Clavulina-Membranomyces* lineage is a prominent player in Neotropical ECM communities, being a highly diversified group that is able to develop and dominate in a series

of ecosystems, from high-altitude temperate forests to lowland rainforests.

Geographic distribution and host preferences of ECM fungi associated with *A. religiosa*

Historically, fungi were thought to be free from dispersal barriers and to have wide distributions. However, this assumption has been challenged by recent molecular studies demonstrating that the distributions of most fungi reflect the same major dispersal barriers that drive vicariance events in other organisms (Peay et al. 2010; Tedersoo et al. 2014). Indeed, in conifer temperate forests of North America, the fungal community composition is strongly delineated by the geographic region (Talbot et al. 2014). As a consequence, geographic endemism is a key feature of fungal communities (Bahram et al. 2013; Talbot et al. 2014). Of the ECM fungi associated with *A. religiosa*, 32.2 % have not been found previously in DNA-based ECM fungal community studies, including those conducted in Mexico. Because the Nearctic is one of the better-sampled bioregions for environmental samples of fungi, to our knowledge, these species have a restricted distribution in the Neotropics, specifically in the Trans-Mexican Volcanic Belt. This percentage corresponds to the calculated endemism in Mexico of 50 % for vascular plants,

Fig. 5 Host preferences of ectomycorrhizal species associated with *Abies religiosa*. **a** The number of shared species by host genera. **b** The percentage of species shared by botanical family



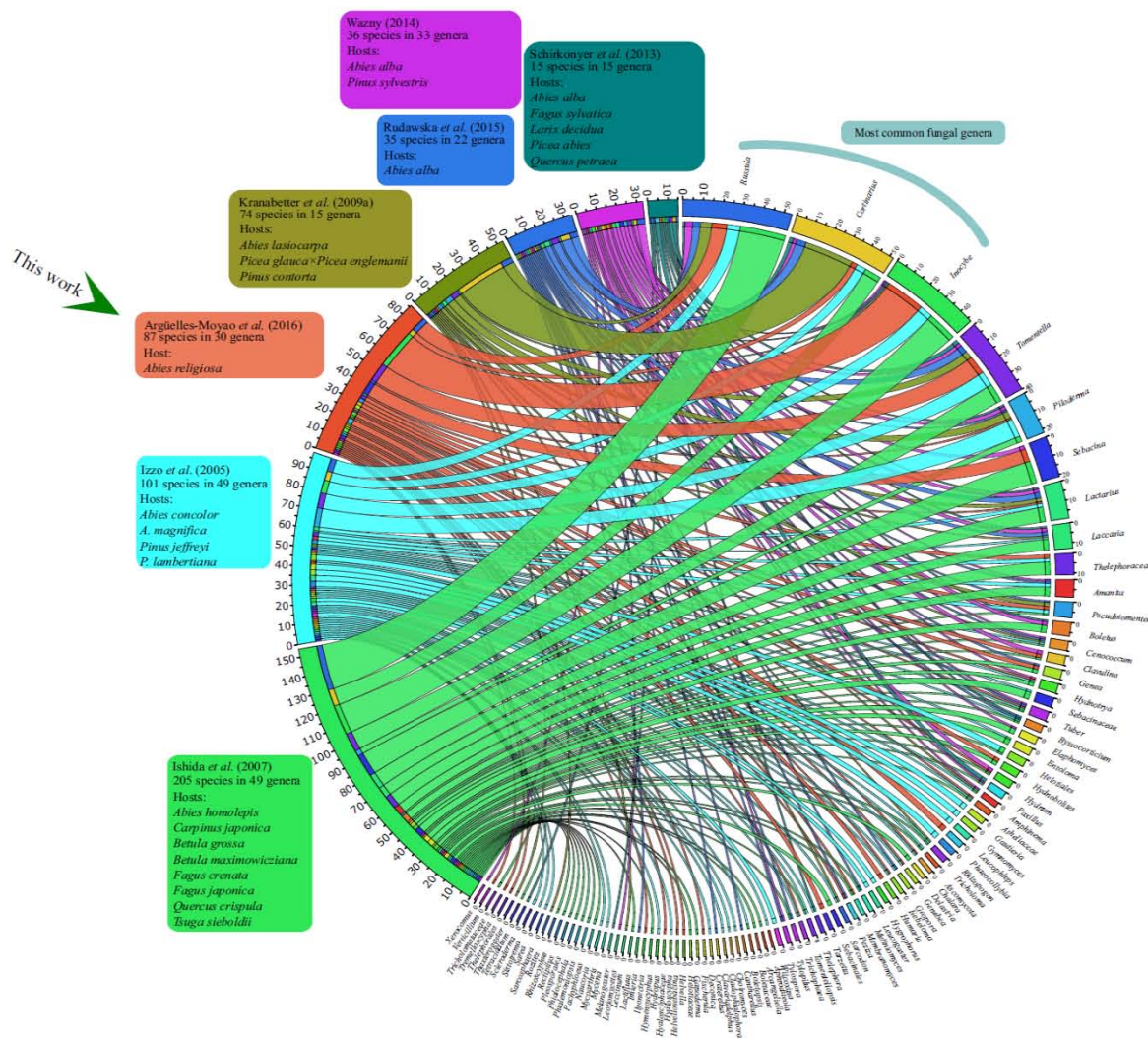


Fig. 6 Circular plot from seven studies including *Abies* ectomycorrhizae (Izzo et al. 2005; Ishida et al. 2007; Kranabetter et al. 2009; Schirakonyer 2013; Wazny 2014; Rudawska et al. 2016; and this work). The sequences were retrieved from GenBank and compared again with BLAST to

rename unknown sequences. The species that remained unknown were then removed from the database. Each color represents one work, and the ribbon thickness represents the number of species within each genera. The plot was generated using Circos.ca (Krzywinski et al. 2009)

55 % for reptiles, and 32 % for mammals (Rzedowski 1991; Fa and Morales 1998; Villela 1998).

Understanding the natural distribution of ECM species and their soil, climate, and host preferences is of major importance in order to improve their rational use, conservation, and application in forestry practices. Among all ECM fungi associated with *A. religiosa*, *Sebacina dimitica* has a wider geographic distribution across the Holartic region (Supplementary Table 1). It is also the most generalist species and has been found associated with Polygonaceae, Fagaceae, Rosaceae, Orchidaceae, Ericaceae, and Salicaceae; however, it has a strong preference for Pinaceae (Supplementary Table 2). *Russula acrifolia* also has a wide distribution across the Holarctic, and it is particularly common in North America (Supplementary Table 1). It is a very plastic symbiont that is able to form ectomycorrhizae, orchid mycorrhiza, and monotropoid mycorrhizae. This species is

recognized as a host generalist and, identified as *Russula* aff. *acrifolia*, it forms mycorrhiza with *Monotropa uniflora* in *A. religiosa* forests in central Mexico (Kong et al. 2015).

We propose that these two species, together with *Clavulina* cf. *cinerea*, *Membranomyces* sp., and *Thelephoraceae* sp. 1 (the most important species in the community), should be used in consortia for the inoculation of *A. religiosa* seedlings. This procedure would equip plants with a set of ECM fungi that are already adapted to local soils and climate, able to produce abundant mycorrhizae, and with the capacity to connect the seedlings with nurse plants through mycorrhizal networks. To achieve this goal, research should focus on the possible production of inocula applicable on a large scale (either via spores or mycelia), as well as on their capacity to establish ectomycorrhizae in coinoculation experiments in the greenhouse and in the field.

Acknowledgments This research was funded by the Universidad Nacional Autónoma de México grant PAPIIT-IN218210 and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant CONACYT-239266. AAM received from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) two fellowships for graduate studies 314537 and 374558. This article is a requisite for AAM to obtain the PhD degree by the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. AAM offers recognition to Julieta Alvarez Manjarrez for her invaluable help in the phylogenetic analyses. We thank the contribution of two anonymous reviewers and the editor.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ángeles-Argáiz RE, Flores-García A, Ulloa M, Garibay-Orijel R (2016) Commercial *Sphagnum* peat moss is a vector for exotic ectomycorrhizal mushrooms. *Biol Invasions* 18:89–101. doi:10.1007/s10530-015-0992-2
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic alignment search tool. *J Mol Ecol* 215:403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Avis PG (2012) Ectomycorrhizal iconoclasts: the ITS rDNA diversity and nitrophilic tendencies of fetid *Russula*. *Mycologia* 104:998–1007. doi:10.3852/11-399
- Bahram M, Kõljalg U, Courty PE et al (2013) The distance decay of similarity in communities of ectomycorrhizal fungi in different ecosystems and scales. *J Ecol* 101:1335–1344. doi:10.1111/1365-2745.12120
- Bonito GM, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R (2010) Global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Mol Ecol* 19:4994–5008
- Bringham MA, Simard S (2011) Ectomycorrhizal networks of *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* trees facilitate establishment of conspecific seedlings under drought. *Ecosystems* 15:188–199. doi:10.1007/s10021-011-9502-2
- Burrola-Aguilar C, Garibay-Orijel R, Argüelles-Moyao A (2013) *Abies religiosa* forests harbor the highest species density and sporocarp productivity of wild edible mushrooms among five different vegetation types in a neotropical temperate forest region. *Agrofor Syst* 87:1101–1115. doi:10.1007/s10457-013-9623-z
- Eckenwalder JE (2009) *Conifers of the world: the complete reference*. Timber press, London
- Fa JE, Morales LM (1998) Patrones de diversidad de mamíferos de México. In: Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa JE (eds) *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología. UNAM, México, pp 315–352
- García-Palomo A, Zamorano JJ, López-Miguel C, Galván-García A, Carlos-Valerio V, Ortega R, Macías JL (2008) El arreglo morfoestructural de la Sierra de Las Cruces, México central. *Rev Mex Cienc Geol* 25:158–178
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113–118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
- 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. *Rev Mex Biodivers* 84:153–169. doi:10.7550/rmb.29839
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4:1–9
- Horton TR, Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Mol Ecol* 10:1855–1871. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01333.x
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2011) Anuario estadístico del Estado de México. <http://inegi.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/aee11/info/mex/mapas.pdf>. Accessed 14 May 2013
- Ishida TA, Kazuhide N, Hogetsu T (2007) Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytol* 174:430–472. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02016.x
- Izzo A, Agbowo J, Bruns TD (2005) Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytol* 166:619–630. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01354.x
- Jujnovsky J, González-Martínez TM, Cantoral-Uriza EA, Almeida-Leñero L (2012) Assessment of water supply as an ecosystem service in a rural-urban watershed in southwestern Mexico City. *Environ Manag* 49:690–702. doi:10.1007/s00267-011-9804-3
- Katoh K, Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform* 9:286–298. doi:10.1093/bib/bbn013
- Kennedy PG, Garibay-Orijel R, Higgins LM, Ángeles-Argáiz R (2011) Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza* 6:559–568. doi:10.1007/s00572-011-0366-2
- Kennedy PG, Matheny PB, Ryberg KM et al (2012) Scaling up: examining the macroecology of ectomycorrhizal fungi. *Mol Ecol* 21:4151–4154. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05703.x
- Kong A, Cifuentes J, Estrada-Torres A, Guzmán-Dávalos L, Garibay-Orijel R, Buyck B (2015) Russulaceae associated with mycoheterotroph *Monotropa uniflora* (Ericaceae) in Tlaxcala, Mexico: a phylogenetic approach. *Cryptogam Mycol* 36(4):479–512. doi:10.7872/crym/v36.iss4.2015.479
- Kranabetter JM, Durall DM, MacKenzie WH (2009) Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. *Mycorrhiza* 19:99–162. doi:10.1007/s00572-008-0208-z
- Krzywinski M, Schein J, Birol I et al (2009) Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* 19:1639–1645. doi:10.1101/gr.092759.109
- Looney BP, Ryberg M, Hampe F, Sanchez-Garcia M, Matheny PB (2016) Into and out of the tropics: global diversification patterns in a hyperdiverse clade of ectomycorrhizal fungi. *Mol Ecol* 25:630–647
- Larsson KH, Larsson E, Kõljalg U (2004) High phylogenetic diversity among corticioid homobasidiomycetes. *Mycol Res* 108:983–1002. doi:10.1017/S0953756204000851
- Maddison WP, Maddison DR (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>
- Manzo-Delgado L, López-García J, Alcántara-Ayala I (2013) Role of forest conservation in lessening land degradation in a temperate region: the Monarch Butterfly Biosphere Reserve, Mexico. *J Environ Manage*. doi:10.1016/j.jenvman.2013.11.017
- Matheny PB, Aime MC, Bougher NL, Buyck B, Desjardin DE, Horak E, Kropp BR, Lodge DJ, Soyong K, Trappe JM, Hibbett DS (2009)

- Out of the Palaeotropics? Historical biogeography and diversification of the cosmopolitan ectomycorrhizal mushroom family *Inocybaceae*. *J Biogeogr* 36:577–592
- Meiser A, Balint M, Schmitt I (2014) Meta-analysis of deep-sequenced fungal communities indicates limited taxon sharing between studies and the presence of biogeographic patterns. *New Phytol* 201:623–635. doi:10.1111/nph.12532
- McAleece N, Lambsshead P, Paterson G, Gage I (1997) Biodiversity Professional V2.0. The Natural History Museum and the Scottish Association for Marine Science, Argyll, Scotland
- Miranda-Aragón L, Treviño-Garza EJ, Jiménez-Pérez J et al (2012) Modeling susceptibility to deforestation of remaining ecosystems in North Central Mexico with logistic regression. *J For Res* 23: 345–354. doi:10.1007/s11676-012-0230-z
- Montoya A, Kong A, Estrada-Torres A, Cifuentes J, Caballero J (2005) Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Divers* 17:115–143
- Montoya A, Torres-García EA, Kong A, Estrada-Torres A, Caballero J (2012) Gender differences and regionalization of the cultural significance of wild mushrooms around La Malinche volcano, Tlaxcala, Mexico. *Mycologia* 1004:826–834. doi:10.3852/11-347
- Morris MH, Pérez-Pérez MA, Smith ME, Bledsoe CS (2009) Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a tropical cloud forest. *FEMS Microbiol Ecol* 69:274–287
- Nilsson R, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H (2008) Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinform Online* 4:193–201
- Olariaga I, Jugo BM, García-Etxebarria K, Salcedo I (2009) Species delimitation in the European species of *Clavulina* (Cantharellales, Basidiomycota) inferred from phylogenetic analyses of ITS region and morphological data. *Mycol Res* 113:1261–1270. doi:10.1016/j.mycres.2009.08.008
- Oberwinkler F, Riess K, Bauer R, Garnica S (2014) Morphology and molecules: the Sebaciales, a case study. *Mycol Prog* 13:445–470. doi:10.1007/s11557-014-0983-1
- Pacheco-Cobos L, Rosetti M, Cuatrecasas C, Hudson R (2010) Sex differences in mushroom gathering: men expend more energy to obtain equivalent benefits. *Evol Hum Behav* 31:289–297. doi:10.1016/j.evolhumbehav.2009.12.008
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD (2008) Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience* 58:799–810. doi:10.1641/B580907
- Peay KG, Bidartondo MI, Arnold AE (2010) Not every fungus is everywhere: scaling to the biogeography of fungal-plant interactions across roots, shoots and ecosystems. *New Phytol* 185:865–867
- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083
- Reverchon F, Ortega-Larrocea MP, Pérez-Moreno J, Peña-Ramírez VM, Siebe C (2010) Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, México. *Can J For Res* 40:1165–1174
- Rudawska M, Pietras M, Smutek I et al (2016) Ectomycorrhizal fungal assemblages of *Abies alba* Mill. outside its native range in Poland. *Mycorrhiza* 26(1):57–65. doi:10.1007/s00572-015-0646-3
- Ryberg M, Nilsson RH, Kristiansson E, Töpel M, Jacobsson S, Larsson E (2008) Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: a case study in *Inocybe* (Basidiomycota). *BMC Evol Biol* 8:50. doi:10.1186/1471-2148-8-50
- Rzedowski J (1991) Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Bot Mex* 14:3–21
- Rzedowski J (2006) Capítulo 17. Bosque de coníferas. In: Rzedowski J (2006) Vegetación de México. First digital edition. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp 295–327.
- Sáenz-Romero C, Rehfeldt GE, Duval P, Lindig-Cisneros RA (2012) *Abies religiosa* habitat prediction in climatic change scenarios and implications for monarch butterfly conservation in Mexico. *Ecol Manag* 275:98–106. doi:10.1016/j.foreco.2012.03.004
- Setaro SD, Garnica S, Herrera PI, Suárez JP, Göker M (2012) A clustering optimization strategy to estimate species richness of Sebaciales in the tropical Andes based on molecular sequences from distinct DNA regions. *Biodivers Conserv* 21: 2269–2285. doi:10.1007/s10531-011-0205-y
- Schirky U (2013) Ectomycorrhizal diversity at five different tree species in forests of the Taunus Mountains in Central Germany. *Open J Ecol* 3:66–81. doi:10.4236/oje.2013.31009
- Sjökvist E, Pfeil BE, Larsson E, Larsson KH (2014) Stereopsidales—a new order of mushroom-forming fungi. *PLoS One* 9(4):e95227. doi:10.1371/journal.pone.0095227
- Smith ME, Henkel TW, Catherine-Aime M, Fremier AK, Vilgalys R (2011) Ectomycorrhizal fungal diversity and community structure on three co-occurring leguminous canopy tree species in a Neotropical rainforest. *New Phytol* 192:699–712. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03844.x
- Talbot JM, Bruns TD, Taylor JW, Smith DP, Branco S, Glassman SI, Erlandson S, Vilgalys R, Liaoc HL, Smith ME, Peay KG (2014) Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *PNAS* 111(17):6341–6346
- Tse-Laurence MA, Bidartondo MI (2011) Mapping fungi from below ground: online genetic resources and ectomycorrhizal geographic distributions. *iForest* 4:252–255. doi:10.3832/ifor0599-008
- Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217–263. doi:10.1007/s00572-009-0274-x
- Tedersoo L, Abarenkov K, Nilsson RH, Schüssler A, Grelet WA, Kohout P, Oja J, Bonito GM, Veldre V, Järis T, Ryberg M, Larsson KH, Kõljalg U (2011) Tidying up international nucleotide sequence databases: ecological, geographical and sequence quality annotation of ITS sequences of mycorrhizal fungi. *PLoS One* 6:e24940. doi:10.1371/journal.pone.0024940
- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S et al (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346:1078. doi:10.1126/science.1256688
- Uehling JK, Henkel TW, Vilgalys R, Smith ME (2012) *Membranomyces* species are common ectomycorrhizal symbionts in Northern Hemisphere forests. *Mycorrhiza* 22:577–581. doi:10.1007/s00572-012-0457-8
- Villela OF (1998) Herpetofauna de México: distribución y endemismo. In: Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa JE (eds) Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, UNAM, México, pp 251–278
- Ważny R (2014) Ectomycorrhizal communities associated with silver fir seedlings (*Abies alba* Mill.) differ largely in mature silver fir stands and in Scots pine forecrops. *Ann For Sci* 71: 801–810. doi:10.1007/s13595-014-0378-0
- Weiß M, Waller F, Zuccaro A, Selosse M-A (2016) Sebaciales—one thousand and one interactions with land plants. *New Phytol* 211: 20–40. doi:10.1111/nph.13977
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds) PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, CA, USA, pp 315–322
- Xiang Q, Xiang JQ, Guo Y, Zhang X (2009) Phylogeny of *Abies* (Pinaceae) inferred from nrITS sequence data. *Taxon* 58:141–152. doi:10.1046/j.0028-646x.2003.00792.x

Capítulo II. Los hongos compartidos entre *Abies religiosa* y otros hospederos

En este capítulo se compara la diversidad de los hongos del suelo del Zarco y en la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca (RBMM) en el contexto de la diversidad de hongos del suelo de otros ecosistemas de coníferas del Neotrópico mexicano. Para esto recolectamos suelo de cinco sitios de coníferas y secuenciamos la región ITS2 de los hongos del suelo con la plataforma Illumina.

Con los resultados, calculamos los hongos más frecuentes y más abundantes, así como la diversidad alfa y beta en los sitios. Asimismo, hicimos análisis multivariados para conocer la influencia de la vegetación, la altitud, la distancia al ecuador y la distancia entre los sitios sobre las comunidades de hongos. Con base en los resultados, determinamos que el hábitat de *Pinus montezumae* es el menos diferente respecto a la composición de hongos del suelo y esta planta puede ser una potencial planta facilitadora del establecimiento de *Abies religiosa*. Además, algunos hongos de las familias Russulaceae, Clavulinaceae, Inocybaceae son especies generalistas que pueden ser los enlaces de la red micorrízica.

La información se presenta en un artículo publicado en la revista *Mycorrhiza* (2018) <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0841-0> con el título “**Ectomycorrhizal fungal communities in high mountain conifer forests in central Mexico and their potential use in the assisted migration of *Abies religiosa***”



Ectomycorrhizal fungal communities in high mountain conifer forests in central Mexico and their potential use in the assisted migration of *Abies religiosa*

Andrés Argüelles-Moyao^{1,2} · Roberto Garibay-Orijel¹ 

Received: 13 December 2017 / Accepted: 29 May 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Abies religiosa forests in central Mexico are the only overwinter refuge of the monarch butterfly and provide important ecosystem services. These forests have lost 55% of their original area and as a consequence, diversity and biotic interactions in these ecosystems are in risk. The aim of this study was to compare the soil fungal diversity and community structure in the *Abies religiosa* forests and surrounding *Pinus montezumae*, *Pinus hartwegii*, and coniferous mixed forest plant communities to provide data on ecology of mycorrhizal interactions for the assisted migration of *A. religiosa*. We sampled soil from five coniferous forests, extracted total soil DNA, and sequenced the ITS2 region by Illumina MiSeq. The soil fungi community was integrated by 1746 taxa with a species turnover ranging from 0.280 to 0.461 between sampling sites. In the whole community, the more abundant and frequent species were *Russula* sp. (aff. *olivobrunnea*), *Mortierella* sp.1, and *Piloderma* sp. (aff. *olivacearum*). The ectomycorrhizal fungi were the more frequent and abundant functional group. A total of 298 species (84 ectomycorrhizal) was shared in the five conifer forests; these widely distributed species were dominated by Russulaceae and Clavulinaceae. The fungal community composition was significantly influenced by altitude and the lowest species turnover happened between the two *A. religiosa* forests even though they have different soil types. As *Pinus montezumae* forests have a higher altitudinal distribution adjacent to *A. religiosa* and share the largest number of ectomycorrhizal fungi with it, we suggest these forests as a potential habitat for new *A. religiosa* populations.

Keywords Fungal ecology · Beta diversity · Functional groups · Environmental decision-making · Monarch butterfly habitat

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00572-018-0841-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Roberto Garibay-Orijel
rgaribay@ib.unam.mx

Andrés Argüelles-Moyao
evoandres@gmail.com

¹ Laboratorio de Sistemática, Ecología y Aprovechamiento de Hongos Ectomicorrizicos, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, C.P. 04510 Mexico City, CDMX, Mexico

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Edificio B, 1° Piso, Unidad de Posgrado, Circuito de Posgrados, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, C.P. 04510 Mexico City, CDMX, Mexico

Introduction

The high species extinction rate in the Anthropocene (Pievani 2014) is driving to a dramatic loss of lineages constraining the functionality of ecosystems and reducing our ability to adapt to a changing environment. In Mexico, the area of primary temperate forest has been reduced substantially over the previous 20 years. This has been particularly severe for *Pinus* and *Quercus* species (Miranda-Aragón et al. 2012) and for *Abies religiosa* (Ramírez et al. 2015). High altitude conifer forests are among the most imperiled ecosystems in the Trans-Mexican Volcanic Belt in central Mexico due to climate change and deforestation. Temperate forests in these mountains are characterized by an alpine monodominant *Pinus hartwegii* forest at elevations above 3500 m, followed by *Pinus montezumae* from 3000 to 3500 m and *A. religiosa* from 2800 to 3000 m.

Abies religiosa forests in central Mexico are the only overwinter refuge of the monarch butterfly (*Danaus plexippus*). This habitat has undergone an area reduction of 55% over the previous 40 years due to human population growth, habitat loss, and deforestation (Ramírez et al. 2015; Stenoien et al. 2016). As a consequence of this habitat reduction, the overwinter refuge area of the monarch butterfly has dramatically decreased (Espeset et al. 2016). Additionally, global warming scenarios estimate that *A. religiosa* forest potential habitat will decrease 70% by 2030 (Sáenz-Romero et al. 2012). This habitat loss also affects important ecosystem services such as aquifer recharge, carbon sequestration, soil buffer capabilities, high rates of edible mushroom production, and refuge for biodiversity (Pacheco-Cobos et al. 2010; Jujnovsky et al. 2012; Burrola-Aguilar et al. 2013; Manzo-Delgado et al. 2014; Fragoso-López et al. 2017; Argüelles-Moyao et al. 2017).

Assisted migration has been proposed as a strategy to mitigate local *Abies religiosa* population extinction (Sáenz-Romero et al. 2012; Ramírez et al. 2015). In this scheme of ecological engineering, saplings should be planted in an ideal future habitat such that their new populations coincide with their optimal predicted habitat (Dumroese et al. 2015; Sáenz-Romero et al. 2016). However, there are barriers to the establishment of plants in new habitats as plant genotypes might be not adapted to the new environment (Thomas et al. 2014). Consequently, reintroduction programs present low rates of sapling establishment (Grossnickle and Ivetić 2017). Establishment restrictions should be solved to increase the success of the assisted migration of *A. religiosa*.

The adaptation of ectomycorrhizal saplings to new field conditions can be improved through the use of its mycorrhizal fungal partners (Nara 2015). This procedure has been used in Mexico for the reintroduction and field establishment of *Pinus* spp. (Pérez-Moreno and Martínez-Reyes 2014); however, it has not been applied to *A. religiosa*. Inoculation experiments with *Inocybe splendens* failed to improve *A. religiosa* establishment since it was replaced by native fungi (Flores-Rentería et al. 2017). This demonstrates that ECM fungi selected for inocula should be good field competitors and have an important role in the ECM soil community.

The coupling of ectomycorrhizal fungi with *A. religiosa* assisted migration can be boosted using data from soil fungal communities. Massive sequencing technologies allow the study of mycelia and propagule banks in the whole soil fungal community (Schmidt et al. 2013; Tedersoo et al. 2014). These techniques together with bioinformatic tools like FUNGuild (Nguyen et al. 2015a) allow to analyze the taxonomic and functional diversity of fungal communities.

In this paper, we propose the use of fungal soil community data to integrate the ectomycorrhizal associations of *A. religiosa* into its assisted migration decision-making. Ecological analyses are able to identify habitats with lower

dissimilarity in fungal community and similar functional diversity to *A. religiosa* forests. In particular, the presence of similar ectomycorrhizal fungal communities on the reintroduction sites should help in the settling of saplings compared to habitats without them (Nara 2015). Additionally, the analysis of fungi associated to different vegetation communities can identify potential facilitator plants to form ectomycorrhizal networks with *A. religiosa* saplings. Facilitator plants help in the field establishment of saplings (Sánchez-Velásquez 2011) and are particular useful for ectomycorrhizal plants (Nara 2015). This is thanks to the restoring of the common mycorrhizal network that improves the water and nutrient allocation and also reduces the environmental stress (Horton et al. 1999; Bingham and Simard 2011; Nara 2015). In the high mountain temperate forest of central Mexico, we hypothesize a high soil fungal diversity and lower species turnover between the two ectomycorrhizal host *A. religiosa* and *P. montezumae* because they use to intermingle in the transition zones of their communities.

In order to set a baseline of knowledge on the taxonomic and functional diversity of soil fungi from the high mountain temperate forests of central Mexico, the objectives of this research were (1) to characterize the soil fungal diversity associated to *Abies religiosa*, *Pinus montezumae*, *Pinus hartwegii*, and mixed conifer forests, (2) to analyze the shared ectomycorrhizal fungal diversity in these communities, (3) to determine the ectomycorrhizal fungi with the highest relative frequency and relative abundance, and (4) to use these data to propose strategies for the assisted migration of *A. religiosa*.

Materials and methods

Sampling site description

We selected five sampling sites in high mountain temperate forests on the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB) in central Mexico, located around 19° N (Fig. 1). The TMVB is an important bioregion that extends 119,540 km² in the West–East direction, concentrating stratovolcanoes with an altitude higher than 3000 m. This mountain range emerged in last 15 MYr and has a high plant biodiversity (Mastretta-Yanes et al. 2015). In general, the TMVB has a subtropical highland temperate climate with dry winters and warm summers (Cwb) (Kottek et al. 2006), where the rainfall season is concentrated from June to November. The five sampling sites correspond to conifer forests (*Abies religiosa*, *Pinus hartwegii*, and *P. montezumae*) in which *Alnus jorullensis*, *Salix paradoxa*, *Comarostaphylis discolor*, *Quercus laurifolia*, and *Arbutus xalapensis* may be scattered. However, the sampling sites were selected to exclude these plants. The five sites have an altitude range between 3002 and 3849 m, mean annual temperature between 10 and

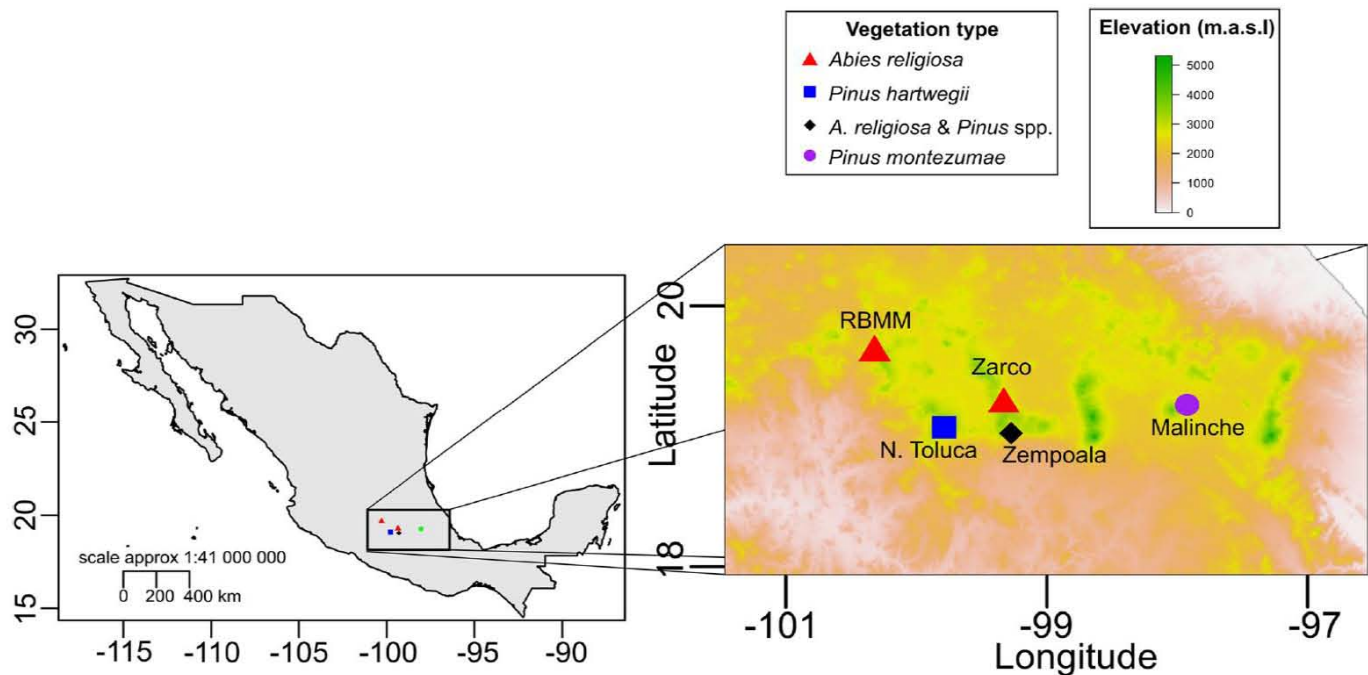


Fig. 1 Location of sampled high mountain conifer forests in the Trans-Mexican Volcanic Belt

12.1 °C, and annual precipitation between 940 and 1322 mm (Table S1). In detail, two of the five sampling sites are separated by 107 km and represent monodominant stands of *A. religiosa* forests. “Zarco” is located in Estado de México state; the Monarch Butterfly Biosphere Preserve is located in Michoacán state (RBMM). The other three sampling sites represent different *Pinus* forests. These three sites are separated from the monarch butterfly preserve by a distance range between 82 and 240 km. “Nevado de Toluca” volcano is in Estado de México state (N. Toluca) and represents a monodominant *P. hartwegii* forest. “Malinche” volcano is in Tlaxcala state and represents a monodominant *P. montezumae* forest. “Zempoala” lake site is in Morelos state and has a mixed forest of *P. hartwegii*, *P. montezumae*, *P. teocote*, and *A. religiosa*. All sites have humic andosols with the exception of RBMM that has an ocric andosol.

Soil sampling

In each sampling site of 50 × 50 m, we collected two soil cores from 20 randomly selected trees separated by at least 8 m. The organic debris was removed, and soil cores were collected 1.5 m from each tree with polyvinyl chloride (PVC) tubes (5 × 5 cm) (Tedersoo et al. 2014). Each soil subsample was deposited in a plastic bag without rocks, pebbles, or large roots. We mixed the 40 subsamples from each site to create a compound soil sample. To each compound soil sample, we added a small paper bag containing silica to remove soil humidity. In the laboratory, the soil samples were spread individually in metallic trays that were previously disinfected with

distilled water, commercial chlorine, and 70% alcohol. Later, the samples were covered with a paper towel and silica and the metallic tray with a disinfected plastic box to avoid ambient spore deposits. Finally, the dried samples were pulverized inside a plastic bag with a gum hammer and stored at room temperature for DNA extraction.

Molecular biology

DNA was extracted from the soil samples using the PowerMAX Soil DNA Isolation Kit (MO Bio, CA, USA) by adding 2 g of soil to each tube according to the manufacturer’s protocol. The internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of two technical replicates by site was polymerase chain reaction (PCR) amplified using HOT FirePol Blend Master Mix (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). We used five specific ITS3 forward primers designed to amplify 95% of the fungi and one ITS4 universal reverse primer. The PCR conditions were as follows: 95 °C for 15 min; followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s; and a final step at 72 °C for 10 min. Finally, the PCR amplification was verified on a 1% agarose gel (Tedersoo et al. 2014). The PCR products were then paired-end sequenced with Illumina MiSeq at the University of Tartu, Estonia.

Bioinformatics processing

DNA sequences were analyzed as previously reported (Bahram et al. 2012). Briefly, Mothur (Schloss et al. 2009) was used to decompress and trim the fastq file (*maxambig* =

0, $qwindowaverage = 30$, $qwindowsize = 15$). Subsequently, the sequences were recompressed using a Python script and assembled using PandaSeq (Masella et al. 2012). The sequences per site were then grouped using Mothur, and chimeric sequences were filtered using USEARCH (Edgar 2010). The fungal ITS region was extracted with ITSx software (Bengtsson-Palme et al. 2013), and the sequences were clustered with CD-HIT (Fu et al. 2012) into MOTUs at 97% similarity as an accepted standard threshold of intraspecific variation (Peay et al. 2008). Finally, each MOTU was compared using BLAST against the UNITE and INSDC databases (Kõljalg et al. 2013). Once MOTUs were given a taxonomic identity, they were treated as species. As next generation sequencing is very sensitive, it can detect very small amounts of DNA, i.e., from 5 ng up to 20 µg of DNA depending on Prep Kit (Doyle 2015). Particularly, when sequencing in Illumina platforms, the number of fungal species sequences in environmental samples can range from one to hundreds of thousands (Cho et al. 2017). As a consequence, the final inventory includes a large number of MOTUs with one or few sequences. To avoid PCR or sequencing artifacts, some authors filter from the final data set the “unique” species, that is, species with only one sequence (N-1) (Tedersoo et al. 2015a; Barnes et al. 2016). However, other authors have more strict criteria filtering species removing up to ten sequences (N-9) (Dickie 2010; Nguyen et al. 2015b). We decided to follow the conservative approach removing species with less than ten sequences. This decision should be understood as a trade-off where the final data set increases in reliability by removing methodological bias and opportunistic species; but in the other hand, it may represent an underestimation of richness since truly rare species or groups with low affinity for PCR primers are eliminated. In this paper, all richness estimations follow the N-9 filtering rule; however, to facilitate contrast with published data, we also provide the N-1 numbers.

Biodiversity and statistical analyses

An abundance table was generated containing the number of sequences per species by forest type. The sum of relative abundance and relative frequency of species was recorded as the ecological importance value (EIV) (Horton and Bruns 2001). In brief, the relative abundance of each species was calculated dividing the sequence abundance per species by the sum of all species sequence abundance. Similarly, the relative frequency of each species was calculated dividing its absolute frequency by the total absolute frequency sum. Finally, the relative abundance and the relative frequency were summed to obtain the EIV. With the intention of normalize Illumina amplicon bias, we also computed the natural logarithm of each abundance value as the ecological importance value natural logarithm (ln EIV).

The sequence number was used to calculate the alpha diversity using the Simpson diversity index (1-D), the Shannon-Weaver index, and the Pielou index. Furthermore, a rarefaction curve was generated, and the beta diversity index of Sørensen and Jaccard was calculated. Unweighted pair group method with arithmetic mean clustering using the binary distance (UPGMA) was performed to analyze the species dissimilarity between sites. A detrended correspondence analysis (DCA) and permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) were applied to analyze the influence of vegetation, altitude, equator distance, and distance on the soil fungal community (Bahram et al. 2013; Talbot et al. 2014).

The fungal guild and nutrition mode of the species in the soil fungal community and core-diversity were determined with FUNGuild v.1 (Nguyen et al. 2015a). All statistical analyses were conducted in R v. 3.2.5 (R Core Team 2014) using the “vegan” (Oksanen et al. 2016), “phangorn” (Schliep 2011), and “pvcust” (Suzuki and Shimodaira 2015) libraries.

Results

Taxonomic diversity

In total, 215,772 soil fungi ITS2 sequences were grouped into 1746 MOTUs at 97% similarity. Altogether, 43% (754) of these fungi were Ascomycota, 39% (675) were Basidiomycota, 6% (101) were Zygomycota, 1% (16) was Rozellomycota, and less than 1% was Chytridiomycota (9) or Glomeromycota (1). Additionally, 11% (190) of the species could not be assigned to the phylum level. Assigned species belonged mostly to Agaricomycetes with 42% (633), followed by Leotiomycetes with 13% (199) and Eurotiomycetes with 9% (141). The most species enriched order was Agaricales with 15% (207), followed by Helotiales with 11% (150) and Thelephorales with 10% (136). The most enriched family was Thelephoraceae with 11% (131), followed by Russulaceae with 8% (97) and Sebacinaceae with 6% (77). *Mortierella* was the richest genus with 8% (65) of species, followed by *Russula* with 7% (56) and *Inocybe* with 6% (51). In the N-1 data set, 227,272 ITS2 sequences were grouped into 4775 MOTUs. A total of 1999 species were Ascomycota, 1746 were Basidiomycota, 251 were Zygomycota, 61 were Rozellomycota, 54 were Chytridiomycota, and 32 were Glomeromycota. A full comparison of N-9 and N-1 richness data sets is presented in Tables S2–S4.

Alpha and beta diversity of forest soil fungi

The lineage diversity was relatively even between sampling sites; however, the *Pinus hartwegii* forest in N. Toluca had the lowest lineage diversity with fewer orders, families, and

Table 1 Soil fungal taxonomic rank diversity in high mountain temperate conifer forests of the Trans-Mexican Volcanic Belt

Sampling site	Phylum	Class	Order	Family	Genera
Zempoala	6	18	50	86	160
Malinche	6	17	51	85	161
Zarco	5	18	50	80	152
N. Toluca	5	17	48	73	137
RBMM	6	18	50	83	164

Zempoala, Lagunas de Zempoala; Malinche, Malinche volcano; Zarco, El Zarco; N. Toluca, Nevado de Toluca volcano; RBMM, Biosphere Monarch Butterfly Preserve

genera (Table 1). The mixed forest in Zempoala had the greatest species richness (1166), while the *P. hartwegii* forest in N. Toluca had the lowest (885) (Fig. 2). The sequence abundance differed between forest types; 53,528 sequences were recovered from *A. religiosa* (RBMM), but only 25,002 were recovered from *P. hartwegii* (N. Toluca). However, the *P. hartwegii* forest had the highest Simpson, Shannon-Weaver, and Pielou diversity indexes (0.992, 5.733, and 0.795, respectively), whereas the *A. religiosa* forest in the RBMM had the lowest diversity (0.932, 4.735, and 0.628, respectively) (Table 2). The Sørensen's species dissimilarity between forests ranged from 0.280 to 0.462 and in Jaccard were 0.810 to 0.919 (Table 3 and Table S5). The lower species turnover was observed between the two *A. religiosa* forests (Zarco and RBMM), and the

Table 2 Species diversity indexes per forest site

Sampling site	Diversity index			Number of species	Number of sequences
	1-D	H	J		
Zempoala	0.992	5.780	0.763	1166	47,726
Malinche	0.974	5.156	0.683	1089	51,464
Zarco	0.987	5.259	0.709	984	38,052
N. Toluca	0.992	5.733	0.795	885	25,002
RBMM	0.932	4.735	0.628	1103	53,528

Zempoala, Lagunas de Zempoala; Malinche, Malinche volcano; Zarco, El Zarco; N. Toluca, Nevado de Toluca volcano; RBMM, Biosphere Monarch Butterfly Preserve; 1-D, Simpson diversity index; H, Shannon-Weaver index; J, Pielou diversity index

highest species turnover was identified between *P. hartwegii* (N. Toluca) and the mixed forest (Zempoala) (Table 3).

The rarefaction analysis per site revealed that the sampling asymptote was not attained, and fewer species of fungi was found in N. Toluca and Zarco than in the other forests when the sample is compared at 25,002 sequences (Fig. 3). Also, the UPGMA analysis clustered the two *A. religiosa* forests with *P. montezumae* forest (Malinche) and the mixed forest of *A. religiosa* and *Pinus* spp. (Zempoala). These four sites were highly supported in one group excluding the *P. hartwegii* forest (N. Toluca) (Fig. S1). Additionally, the DCA analysis indicated that the altitude

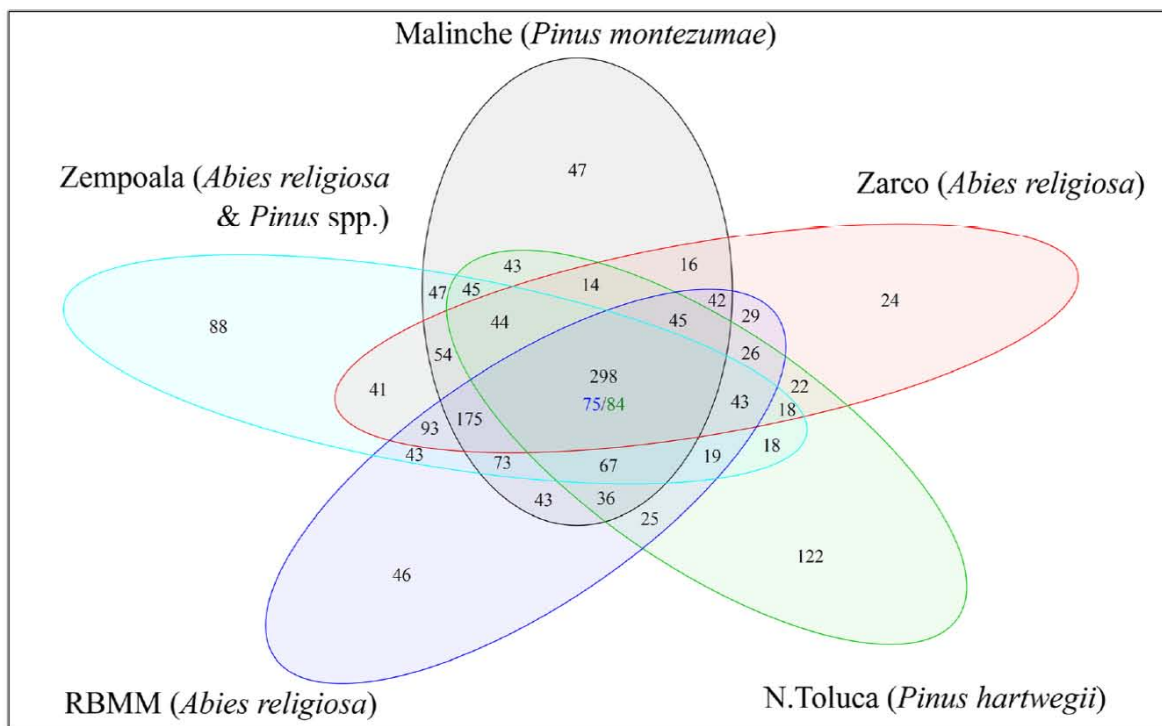
**Fig. 2** Species number in the soil fungal community and core-diversity in high mountain conifer forests of the Trans-Mexican Volcanic Belt. In the center is shown the total number of shared species (upper; black), saprobe species (bottom left; blue), and ectomycorrhizal species (bottom right; green)

Table 3 Species turnover on sampling sites based on the Sørensen dissimilarity

	Zempoala	Malinche	Zarco	N. Toluca	RBMM
Zempoala	0	0.288	0.287	0.462	0.285
Malinche	0.288	0	0.336	0.400	0.289
Zarco	0.287	0.336	0	0.454	0.280
N. Toluca	0.462	0.400	0.454	0	0.438
RBMM	0.285	0.289	0.280	0.438	0

Zempoala, Lagunas de Zempoala; Malinche, Malinche volcano; Zarco, El Zarco; N. Toluca, Nevado de Toluca volcano; RBMM, Biosphere Monarch Butterfly Preserve

was the most important environmental variable underlying the structure of these fungal communities (Fig. S2). Finally, the PERMANOVA indicated that the diversity of the soil fungal communities was significantly influenced by the site altitude ($F_{1,3} = 1.622$; $P = 0.033$), which explained 32% of the variance (Table 4) and was not dependent on the distance between sampling sites.

Soil fungal guilds and salient species

FUNGuild assigned 997 species of 1746 into some fungal guild. Assigned species belonged to the following fungal guilds: 41% (445) of the species were ectomycorrhizal, 36% (333) were saprobes, and one forms arbuscular mycorrhiza (Table S6 and Fig. 4). The fungal guild with more DNA sequences (89,725) was the ectomycorrhizal, followed by saprotrophs with 40,497 sequences and animal pathogens with 3594 sequences (Table S7 and Fig. S3). Finally, 41% (227) of the fungi had an agaricoid habit, and 18% (99) had a resupinate one (Table S8).

Table 4 PERMANOVA comparison between global and local factors affecting the fungal communities

Environmental variable	Df	SS	MS	F. model	R^2	P value
Distance to RBMM (km)	1	0.327	0.327	1.300	0.260	0.125
Altitude (m)	1	0.389	0.389	1.545	0.309	0.033*
Distance to equator (km)	1	0.289	0.289	1.150	0.230	0.267
Residuals	1	0.252	0.252	1.300	0.200	
Total	4	1.256			1.000	

Df, degrees of freedom; SS, sum of squares; MS, mean squares; F. model, F-statistical modeled. *Significant P values ($P < 0.05$)

The fungal species with the highest importance values in the soil were *Mortierella* sp.1 SH014923.07FU (ln EIV = 0.004), *Mortierella* sp. 2 SH180110.07FU (ln EIV = 0.004), *Mortierella humilis* SH014923.07FU (ln EIV = 0.004), and *Pseudoeurotium* SH215932.07FU (ln EIV = 0.003). The most important ectomycorrhizal fungi were *Russula* SH008602.07FU (aff. *olivobrunnea*) (ln EIV = 0.003), *Russula* SH031813.07FU (aff. *brevipes*) (ln EIV = 0.003), and *Piloderma* SH197924.07FU (aff. *olivaceum*) (ln EIV = 0.003) (Table S4). The richest ectomycorrhizal genera in the soil community were *Russula* (56 species), *Inocybe* (51), *Tomentella* (36), *Sebacina* (24), and *Amanita* (12).

The *Abies religiosa* forests shared 609 fungal species with the mixed forest in Zempoala; 109 were ectomycorrhizal fungi. Correspondingly, it shared 560 species with the *P. montezumae* forest in Malinche; 169 were ectomycorrhizal fungi. Similarly, it shared 412 fungal species with *P. hartwegii*; 109 were ectomycorrhizal fungi (Table S4 and Fig. S4). *Abies religiosa* forests had a total richness of 1336 species and a shared richness of 751 species, of which 235 were ectomycorrhizal; the richest genera were *Russula* (54 species), *Inocybe* (50), and *Tomentella* (32) (Fig. S4).

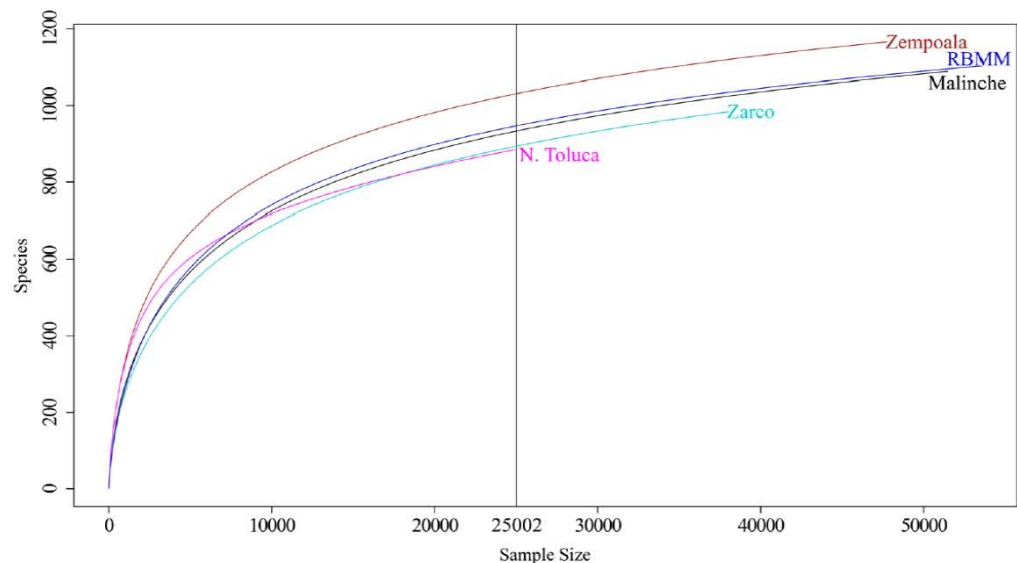
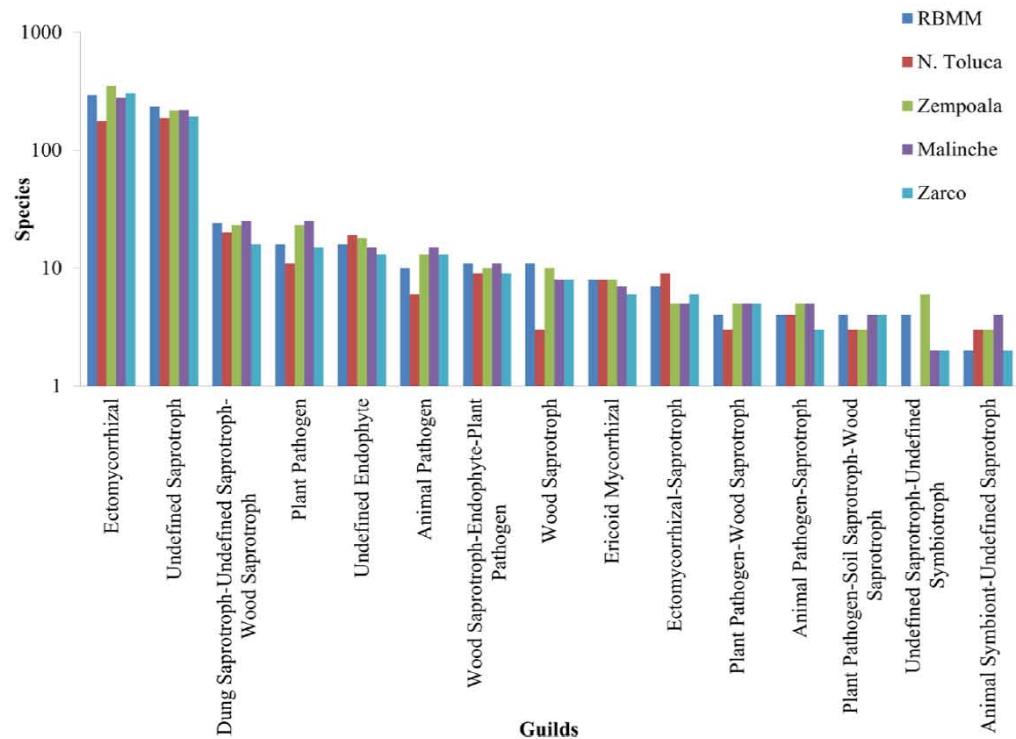
Fig. 3 Rarefaction comparison between sampling sites

Fig. 4 Richness of soil fungal guilds in the high mountain conifer forests of the Trans-Mexican Volcanic Belt. Only the richest species guilds are shown



Core-diversity of soil fungi in temperate coniferous forests in central Mexico

The core-diversity (species shared by all sampling sites) was comprised of 298 soil fungal species (17% of the whole community). The 42% (84) of the assigned species were ectomycorrhizal and 37% (75) were saprobes (Table S9). Regarding fungal growth morphology, 41% (43) of the species had an agaricoid habit and 13% (14) had a resupinate habit (Table S10). The most ecological important ectomycorrhizal fungi in the core-diversity were *Russula* SH008602.07FU (aff. *olivobrunnea*) (ln EIV = 0.003), *Russula* SH031813.07FU (aff. *brevipes*) (ln EIV = 0.003), *Russula* SH187356.07FU (aff. *abietina*) (ln EIV = 0.003), and *Clavulina rugosa* SH220226.07FU (ln EIV = 0.003). (Table S4 and Fig. S5). The richest genera in the core-diversity were *Russula* (14 species), *Inocybe* (12), *Clavulina* (6), and *Sebacina* (5).

Discussion

Patterns of fungal diversity in high mountain temperate forests in the TMVB

The richness and abundance of fungal species in TMVB temperate forests are comparable to those found in other studies with similar structure and habitat type. In particular, we recovered a larger number of fungal species (N-9 = 1746) in comparison to the ca. 1200 species (N-1 filtering) in a study with a

similar sampling conducted in Papua New Guinea (Tedersoo et al. 2015a). However, our study demonstrated a lower number of species than the 4913–6033 species (N-1 filtering) in an analogous high-latitude temperate ecosystems in Estonia and Finland (Tedersoo et al. 2015b), lower than the 3265 fungal species in a *Pinus* forest in CA, USA (Glassman et al. 2017), and lower than the 10,434 species number (N-1 filtering) in a *Quercus* forest in Liaoning, China (He et al. 2016). However, with the same filtering criteria (N-1) used in those studies, we recovered a much larger species richness (N-1 = 4775) which is closer to the Estonia–Finland diversity and higher than the USA forests. Therefore, the soil fungal diversity in the TMVB seems to be underestimated when using the N-9 filtering.

The data filtering has an influence in diversity descriptions. The Glomeromycota phylum presented only one species in an area of 200 km² with the N-9 data set. This represents a unrealistic number of species compared with 21–30 species present in temperate forests in Finland and Estonia (Tedersoo et al. 2015b) or the four Glomeromycota species reported for Mexico by Tedersoo et al. (2014), both studies using the N-1 criteria. In the N-1 data set, we recovered 32 arbuscular mycorrhiza (AM) fungi, which is a much higher AM richness than previously reported for Mexico by Tedersoo et al. (2014). Additionally to the filtering, Öpik et al. (2013) suggested that the ITS region alone underestimates the Glomeromycota richness. Our data (N-1) suggest a considerable diversity of Glomeromycota in the temperate coniferous forests of the TMVB.

The TMVB is a bioregion with a high species diversity (Mastretta-Yanes et al. 2015). The high mountain temperate

forests in this bioregion have a unique set of characteristics. It is the convergence region between the Nearctic and Neotropical biogeographic realms and has a high plant diversity in the overstory and understory, and it is particularly enriched in Pinaceae and Asteraceae (Redonda-Martínez and Villaseñor-Ríos 2011; Gernandt and Pérez-De La Rosa 2014). Also, the TMVB is located in medium latitude (19° N); it has a large orographic heterogeneity and presents heavy precipitation and a mesothermal climate. All these characteristics promote the plant, animal, and fungal species richness in this region.

The variation in fungal species turnover reflects the biological diversity in soils. We observed a comparable Sørensen dissimilarity values in our system with an analogous system in Canada with *Pseudotsuga menziesii* (Kranabetter et al. 2015a) and a temperate meadow in Germany (Schmidt et al. 2013). Additionally, our Jaccard dissimilarity values (Table S3) were similar to those previously determined for Amazonian rainforests (Peay et al. 2013). All these observations support the two global patterns that converge in high altitude *Abies religiosa* and *Pinus* spp. forests: the fungal communities are more dissimilar in inter-tropical systems and the ectomycorrhizal fungi are more diverse at higher latitudes than at the equator (Bahram et al. 2013; Tedersoo et al. 2014; Bahram et al. 2015). These indicate a high species turnover in our coniferous ecosystems similar to tropical rainforest ecosystems and a high alpha diversity similar to higher-latitude ectomycorrhizal-enriched temperate forests.

Our results point to the plant host species as responsible for the dissimilarity between soil fungal communities. In the two *A. religiosa* forests separated by 107 km, the Sørensen dissimilarity was 0.280; in contrast, the dissimilarity between the *P. hartwegii* forest of N. Toluca and the mixed forest of Zempoala, separated by 50 km, was 0.462. At a global scale, host type has already been proved as one of the major drivers of ectomycorrhizal and saprophytic fungal community composition (Buée et al. 2011; Tedersoo et al. 2015b; Nguyen et al. 2016) rather than the spatial distance (Talbot et al. 2014).

At a local scale, soil variables as pH (Tedersoo et al. 2014), soil carbon to nitrogen ratio (Soudzilovskaia et al. 2015), and soil N (Reverchon et al. 2012b) are main significant drivers of fungal communities. The five temperate conifer forests studied here develop in the higher parts of volcanoes (12–2 million years) on young volcanic soils (andosols). Most of them have humic andosols with the exception of RBMM that has an oeric andosol. As the only two forests with different soil type Zarco (*A. religiosa* on humic andosol) and RBMM (*A. religiosa* on oeric andosol) had the higher species similarity, soil type did not structure soil fungal communities in the high mountain conifer forests of the TMBV. Soil nutrient contents should be taken into account when addressing the effect of small-scale habitat heterogeneity on soil fungal communities.

The soil fungal community varies with the altitude because the altitude determines the vegetation. The soil fungal composition was found to be significantly affected by the sampling site altitude ($F_{1,3} = 1.622$; $P = 0.033$; Table 4) and not by the spatial distance. This result is consistent with previous reports showing local diversity patterns as a function of altitude (Bahram et al. 2012; Geml et al. 2014). Also, we found a high species turnover which is not dependent of the distance between sampling sites (Talbot et al. 2014) and it is dependent of the host type. Indeed, in the mountain slopes of the Trans-Mexican Volcanic Belt, the composition of vegetation is determined by altitude (Rzedowski 2006) and so the accompanying soil fungi.

Most important ectomycorrhizal fungi in high mountain temperate forest in the TMVB

The most important functional groups at a global level are saprobes and ectomycorrhizal fungi. In our ecosystems, saprobes presented lower proportions than ectomycorrhizal fungi, in contrast to reported global patterns (Tedersoo et al. 2014). In the conifer forests in the TMBV, ectomycorrhizal fungi dominated the whole soil community and the core-diversity. In particular, *Russula* sp. SH008602.07FU (aff. *olivobrunnea*) was the most abundant and frequent ectomycorrhizal fungus (7% of total sequences in all sampling sites) in the whole community, followed by *Piloderma* sp. SH197924.07FU (aff. *olivaceum*). In general, *Russula* sp. (aff. *olivobrunnea*) has been reported to be an important fungus in *A. religiosa* and *Pseudotsuga menziesii* forests, where it also develops monotropoid mycorrhizas (Kong et al. 2015). Also, *Piloderma* sp. (aff. *olivaceum*) is a common fungal inhabitant of high mountain forests (3500–4100 m) in the TMVB (Baeza-Guzmán et al. 2017) and this species is also able to associate with other plant hosts such as *Pinus sylvestris* (Heinonsalo et al. 2015).

In contrast to the whole community, the core-diversity was dominated by Russulaceae, Clavulinaceae, Inocybaceae, and Atheliaceae families. These families are commonly associated with *Pinus* and *Abies* (Uehling et al. 2012; Buscardo et al. 2014; Ważny 2014; Benucci et al. 2016; Argüelles-Moyao et al. 2017). In particular, the members of these families are colonizers of *Pinus montezumae* adult and seedling roots in the TMVB (Reverchon et al. 2012a). Additionally, our sampling sites were mature forest stands in which a dominance towards Russulaceae species was expected (Dickie et al. 2013; Kyaschenko et al. 2017). Furthermore, the Atheliaceae family is also frequently identified in mature forest stands (Kyaschenko et al. 2017) and is a common fungal family inhabitant of high mountain forests (Baeza-Guzmán et al. 2017) with persistent and viable propagules on the TMBV soil (Garay-Serrano et al. 2018). Finally, the functional role of Inocybaceae and Clavulinaceae should be studied in detail

due to their prominence in tropical and subtropical ecosystems (Matheny et al. 2009; Smith et al. 2011; Argüelles-Moyao et al. 2017) and as potential actors in *Abies religiosa* reintroduction due to their presence in the five sites.

Specifically, the mixed forest of Zempoala showed that there are some core species that were indeed favored by the coexistence of *A. religiosa* and *P. montezumae* like *Inocybe* sp_4052 (SH032655.07FU), *Piloderma* sp_5461 (SH197924.07FU), *Inocybaceae* sp_4234 (SH187316.07FU), *Inocybe* sp_1070 (SH199812.07FU), *Sebacinaceae* sp_2751 (SH214642.07FU), *Thelephoraceae* sp_1285 (SH189522.07FU), and *Clavulina* sp_718. These species can form mycorrhizal networks between these hosts reinforcing the possible role of mycorrhizal associations on the assisted migration of *A. religiosa*.

Lessons from ectomycorrhizal community ecology for the assisted migration of *Abies religiosa*

The field establishment of *Abies religiosa* depends on the fungal species present in its potential new habitat, particularly ectomycorrhizal ones. Ectomycorrhizal species with the highest ecological importance (In EIV) and present in the core-diversity (present in the current distribution and potential new habitats) were *Russula* sp. SH008602.07FU (aff. *olivobrunnea*), *Russula* sp. SH031813.07FU (aff. *brevipes*), *Russula abietina* SH187356.07FU, *Clavulina rugosa* SH220226.07FU, *Inocybe* sp. SH187316.07FU (aff. *flocculosa*), and *Inocybe subnudipes* SH000056.07FU. These fungi could be the most probable colonizers of *A. religiosa* saplings on new habitats because they occur with a high frequency and abundance in the five sites. Indeed, *Inocybe* species are well-known as pioneer colonizers (Nara 2015) and colonizers of *P. montezumae* (Reverchon et al. 2012a; Garay-Serrano et al. 2018). The shared ectomycorrhizal fungal species in the five sampling sites reveal the potential fungi that could improve the field establishment and should be experimentally evaluated to use them in mycorrhization programs.

Assisted migration has been proposed as a management strategy for *A. religiosa*. Current plans to rescue this species involve massive reforestation at progressive altitudes and the use of local nurse plants to protect the saplings (Ortiz-Bibian et al. 2017). Using our data on the community structure and beta diversity of ectomycorrhizal fungi, we infer that *P. montezumae* and *P. hartwegii* are two potential nurse hosts of *A. religiosa*; however, *A. religiosa* shared more ectomycorrhizal fungi with *P. montezumae* than with *P. hartwegii* (Fig. S4). As *P. montezumae* populations use to mix with *A. religiosa* in transition zones, the transfer of saplings to the lower altitudinal limits of *P. montezumae* should improve the *A. religiosa* establishment, thanks to a lower divergence in soil ectomycorrhizal fungi (Kranabetter et al.

2015b). The shared mycobionts should give access to the saplings to the functional diversity of ectomycorrhizal communities allowing them to connect to the mycorrhizal network (Bingham and Simard 2011). During the assisted migration process, the selection of plant germplasm should consider local adaptations (Thomas et al. 2014) to avoid plant genotype maladaptations (Kranabetter et al. 2015b) that could conceal the ectomycorrhizal effect.

Robustness and reliability of data when sequencing platforms and bioinformatic pipelines are in constant change

High throughput sequencing platforms have revolutionized fungal ecology (Truong et al. 2017). These technologies have a high rate of cost/benefit and their error rates have been diminishing (Glenn 2011). Since the monopoly of Sanger sequencing was broken, second and third generation sequencing platforms entered a technology race. Thanks to this, each year, sequencing costs are lower and the number of sequences per run increases (Glenn 2011). However, the number of species and sequences per species is dependent on sampling, PCR, sequence platform, and bioinformatic pipeline (Tedersoo et al. 2010; Bálint et al. 2014; Tedersoo et al. 2014; Anslan et al. 2017). Thus, in a time when sequencing platforms and bioinformatic pipelines are constantly changing, it is hard to find two studies with the same method making comparisons between studies difficult. Moreover, the chance of massive sequencing of environmental samples raised the promise of monitoring microbial communities across time and space (Peay and Bruns 2014). So, it should be mandatory that papers and databases on environmental sequences of fungi have a minimum set of common data and methods to make them comparable now and usable in the future.

In this paper, we aimed to set a baseline for the study and monitoring of soil fungi communities in temperate forests of Mexico. To do so, the methods are standard and repeatable to allow the incorporation of additional sampling sites in the future; they also are comparable to those employed by Tedersoo et al. (2014) and taxonomical allocation of species follows the species hypothesis proposed in UNITE (Kõljalg et al. 2013) to allow its incorporation in global soil fungi databases and future comparisons. A weak point of all fungi environmental sequencing projects is the use of an arbitrary cutoff criteria for taxa delimitation. We used the 97% cutoff value as it is the standard in fungi ecology (Peay et al. 2008); however, this criterion clusters sister species which recently diverged (Ryberg 2015). The recent diversification of taxa is a problem for ectomycorrhizal genera as *Clavulina* and others (Kennedy et al. 2012). As a consequence, the 97% cutoff probably underestimates fungi soil diversity. The removal of rare species (N-9 filtering rule) is a reliable strategy to measure the community diversity and dissimilarity; however, the cost is the

loss of real rare species in which a non-arbitrary clustering method would be a better choice (Frøslev et al. 2017). As we are making inferences on shared and abundant taxa, we chose the trade-off between good data reliability versus hyper-detailed soil diversity. Finally, to facilitate the comparison of our data in this paper and in the future, we explicitly present diversity numbers with a strict filtering rule (N-9) and a loose one (N-1); additionally, both data bases are made fully accessible as [supplementary tables](#).

Conclusions

The high mountain coniferous forests in the TMVB have high soil fungal species richness (alpha diversity) and species turnover (beta diversity) and their soil communities are dominated by ectomycorrhizal fungi. Our data support the suggestion that Mexico is an ectomycorrhizal host-spot (Tedersoo 2017). In these ecosystems, the species diversity is dependent on the altitude rather than the distance between sampling; and because all these forests develop in volcanic soils, soil does not have a strong influence on fungal community structure. The Russulaceae, Atheliaceae, Clavulinaceae, and Inocybaceae families are the main sources of the ectomycorrhizal propagules in these soils. Based on mycorrhizal associations, the best potential ecosystems for the reintroduction of *Abies religiosa* are *Pinus montezumae* forests due their lower fungal species turnover and large number of shared ectomycorrhizal species. Finally, considering climate change scenarios, forestry experimental approaches should be used to integrate these ideas into the assisted migration of *A. religiosa* and couple ectomycorrhizal fungal ecology with forest management practices.

Acknowledgements AAM thanks Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for financial support of Sc.D studies (grant 374558). We thank I. Liiv and R. Puusepp for their help in Illumina sample preparation, S. Aslan and M. Bahram for their support in bioinformatics procedures, and L. Tedersoo for providing the sequencing service in the University of Tartu. We thank the contribution of two anonymous reviewers and the editor.

Funding This work was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant CONACYT-239266).

References

- Anslan S, Bahram M, Hiiesalu I, Tedersoo L (2017) PipeCraft: flexible open-source toolkit for bioinformatics analysis of custom high-throughput amplicon sequencing data. *Mol Ecol Resour* 17:e234–e240. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12692>
- Argüelles-Moyao A, Garibay-Orijel R, Márquez-Valdelamar LM, Arellano-Torres E (2017) Clavulina-Membranomyces is the most important lineage within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza* 27:53–65. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0724-1>
- Baeza-Guzmán Y, Medel-Ortiz R, Garibay-Orijel R (2017) Caracterización morfológica y genética de los hongos ectomicorrízicos asociados a bosques de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional Cofre de Perote, Veracruz. *Rev Mex Biodivers* 88:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.01.027>
- Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Zarre S, Tedersoo L (2012) Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytol* 193:465–473. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03927.x>
- Bahram M, Kõljalg U, Courty PE, Diédhiou AG, Kjoller R, Põlme S, Ryberg M, Veldre V, Tedersoo L (2013) The distance decay of similarity in communities of ectomycorrhizal fungi in different ecosystems and scales. *J Ecol* 101:1335–1344. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12120>
- Bahram M, Peay KG, Tedersoo L (2015) Local-scale biogeography and spatiotemporal variability in communities of mycorrhizal fungi. *New Phytol* 205:1454–1463. <https://doi.org/10.1111/nph.13206>
- Bálint M, Schmidt PA, Sharma R, Thines M, Schmitt I (2014) An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecol Evol* 4:2642–2653. <https://doi.org/10.1002/ece3.1107>
- Barnes CJ, Maldonado C, Frøslev TG, Antonelli A, Rønsted N (2016) Unexpectedly high beta-diversity of root-associated fungal communities in the Bolivian Andes. *Front Microbiol* 7:1377. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01377>
- Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A, de Wit P, Sánchez-García M, Ebersberger I, de Sousa F, Amend AS, Jumpponen A, Unterseher M, Kristiansson E, Abarenkov K, Bertrand YJK, Sanli K, Eriksson KM, Vik U, Veldre V, Nilsson RH (2013) Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol Evol* 4:914–919. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12073>
- Benucci GMN, Lefèvre C, Bonito G (2016) Characterizing root-associated fungal communities and soils of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) stands that naturally produce Oregon white truffles (*Tuber oregonense* and *Tuber gibbosum*). *Mycorrhiza* 26:1–10. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0677-9>
- Bingham MA, Simard SW (2011) Do mycorrhizal network benefits to survival and growth of interior Douglas-fir seedlings increase with soil moisture stress? *Ecol Evol* 1:306–316. <https://doi.org/10.1002/ece3.24>
- Buée L, Maurice J-P, Zeller B, Andrianarisoa S, Ranger J, Courtcuise R, Marçais B, le Tacon F (2011) Influence of tree species on richness and diversity of epigeous fungal communities in a French temperate forest stand. *Fungal Ecol* 4:22–31. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.07.003>
- Burrola-Aguilar C, Garibay-Orijel R, Argüelles-Moyao A (2013) *Abies religiosa* forests harbor the highest species density and sporocarp productivity of wild edible mushrooms among five different vegetation types in a neotropical temperate forest region. *Agrofor Syst* 87:1101–1115. <https://doi.org/10.1007/s10457-013-9623-z>
- Buscardo E, Rodríguez-Echeverría S, Freitas H, de Angelis P, Pereira JS, Muller LAH (2014) Contrasting soil fungal communities in Mediterranean pine forests subjected to different wildfire frequencies. *Fungal Divers* 70:85–99. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0294-5>
- Cho H, Kim M, Tripathi B, Adams J (2017) Changes in soil fungal community structure with increasing disturbance frequency. *Microb Ecol* 74:62–77. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0919-1>
- Dickie IA (2010) Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. *New Phytol* 188:916–918. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03473.x>

- Dickie IA, Martínez-García LB, Koele N, Grelet GA, Tylanakis JM, Peltzer DA, Richardson SJ (2013) Mycorrhizas and mycorrhizal fungal communities throughout ecosystem development. *Plant Soil* 367:11–39. <https://doi.org/10.1007/s11004-013-1609-0>
- Doyle K (2015) DNA quantitation in next-generation sequencing library workflows. In: Promega Corp. Web site. <http://worldwide.promega.com/resources/pubhub/dna-quantitation-in-next-generation-sequencing-library-workflows/>. Accessed 6 Nov 2017
- Dumroese RK, Williams MI, Stanturf JA, Clair JBS (2015) Considerations for restoring temperate forests of tomorrow: forest restoration, assisted migration, and bioengineering. *New For* 46: 947–964. <https://doi.org/10.1007/s11056-015-9504-6>
- Edgar R (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2461–2462
- Espelet AE, Harrison JG, Shapiro AM, Nice CC, Thorne JH, Waetjen DP, Fordyce JA, Forister ML (2016) Understanding a migratory species in a changing world: climatic effects and demographic declines in the western monarch revealed by four decades of intensive monitoring. *Oecologia* 181:819–830. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3600-y>
- Flores-Rentería D, Barradas VL, Álvarez-Sánchez J (2017) Ectomycorrhizal pre-inoculation of *Pinus hartwegii* and *Abies religiosa* is replaced by native fungi in a temperate forest of central Mexico. *Symbiosis* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0498-z>
- Fragoso-López PI, Rodríguez-Laguna R, Otazo-Sánchez EM, González-Ramírez C, Valdéz-Lazalde J, Cortés-Blobaum H, Razo-Zarate R (2017) Carbon sequestration in protected areas: a case study of an *Abies religiosa* (H.B.K.) Schlecht. et Cham Forest. *Forests* 8:1–14. <https://doi.org/10.3390/f8110429>
- Froslev TG, Kjoller R, Bruun HH, Ejmaes R, Brunbjerg AK, Pietroni C, Hansen AJ (2017) Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. *Nat Commun* 8: 1188. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01312-x>
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28: 3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Garay-Serrano E, del Pilar Ortega-Larrocea M, Reverchon F, Suárez-Quijada I (2018) Persistence of ecto- and ectendomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* in experimental microcosms. *Symbiosis* 74:67–78. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0496-1>
- Geml J, Pastor N, Fernandez L, Pacheco S, Semenova TA, Becerra AG, Wicaksono CY, Noulra ER (2014) Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. *Mol Ecol* 23:2452–2472. <https://doi.org/10.1111/mec.12765>
- Gernandt DS, Pérez-De La Rosa JA (2014) Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Rev Mex Biodivers* 85:126–133. <https://doi.org/10.7550/rmb.32195>
- Glassman SI, Wang JJ, Bruns TD (2017) Environmental filtering by pH and soil nutrients drives community assembly in fungi at fine spatial scales. *Mol Ecol* 26:6960–6973. <https://doi.org/10.1111/mec.14414>
- Glenn TC (2011) Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* 11:759–769. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x>
- Grossnickle SC, Ivetić V (2017) Direct seeding in reforestation—a field performance review. *Reforesta* 4:94–142
- He F, Yang B, Wang H, Yan Q, Cao Y, He X (2016) Changes in composition and diversity of fungal communities along *Quercus mongolica* forests developments in Northeast China. *Appl Soil Ecol* 100:162–171. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.12.014>
- Heinonsalo J, Sun H, Santalahti M, Bäcklund K, Hari P, Pumpanen J (2015) Evidences on the ability of mycorrhizal genus *Piloderma* to use organic nitrogen and deliver it to Scots pine. *PLoS One* 10:1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131561>
- Horton TR, Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Mol Ecol* 10:1855–1871. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01333.x>
- Horton TR, Bruns TD, Parker VT (1999) Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. *Can J Bot* 77:93–102. <https://doi.org/10.1139/cjb-77-1-93>
- Jujnovsky J, González-Martínez TM, Cantoral-Uriza EA, Almeida-Lenero L (2012) Assessment of water supply as an ecosystem service in a rural-urban watershed in southwestern Mexico city. *Environ Manag* 49:690–702. <https://doi.org/10.1007/s00267-011-9804-3>
- Kennedy PG, Matheny PB, Ryberg KM et al (2012) Scaling up: examining the macroecology of ectomycorrhizal fungi. *Mol Ecol* 21: 4151–4154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05703.x>
- Köljal U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Pödmann K, Saag L, Saar I, Schöbner A, Scott JA, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiss M, Larsson KH (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol* 22:5271–5277. <https://doi.org/10.1111/mec.12481>
- Kong A, Cifuentes J, Estrada-Torres A, Guzmán-Dávalos L, Garibay-Orijel R, Buyck B (2015) Russulaceae associated with mycoheterotroph *Monotropa uniflora* (Ericaceae) in Tlaxcala, Mexico: a phylogenetic approach. *Cryptogam Mycol* 36:479–512. <https://doi.org/10.7872/crym/v36.iss4.2015.479>
- Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F (2006) World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z* 15:259–263. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>
- Kranabetter JM, Hawkins BJ, Jones MD, Robbins S, Dyer T, Li T (2015a) Species turnover (β -diversity) in ectomycorrhizal fungi linked to NH₄⁺ uptake capacity. *Mol Ecol* 24:5992–6005. <https://doi.org/10.1111/mec.13435>
- Kranabetter JM, Stoeck M, O'Neill GA (2015b) Ectomycorrhizal fungal maladaptation and growth reductions associated with assisted migration of Douglas-fir. *New Phytol* 206:1135–1144. <https://doi.org/10.1111/nph.13287>
- Kyaschenko J, Clemmensen KE, Hagenbo A, Karlton E, Lindahl BD (2017) Shift in fungal communities and associated enzyme activities along an age gradient of managed *Pinus sylvestris* stands. *ISME J* 11:863–874. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.184>
- Manzo-Delgado L, López-García J, Alcántara-Ayala I (2014) Role of forest conservation in lessening land degradation in a temperate region: the Monarch Butterfly Biosphere Reserve, Mexico. *J Environ Manag* 138:55–66. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.017>
- Masella A, Bartram A, Truszkowski J et al (2012) PANDASEQ: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13:31. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-31>
- Mastretta-Yanes A, Moreno-Letelier A, Piñero D, Jorgensen TH, Emerson BC (2015) Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate within the Trans-Mexican Volcanic Belt. *J Biogeogr* 42:1586–1600. <https://doi.org/10.1111/jbi.12546>
- Matheny PB, Aime MC, Bougher NL, Buyck B, Desjardin DE, Horak E, Kropp BR, Lodge DJ, Soyong K, Trappe JM, Hibbett DS (2009) Out of the Palaeotropics? Historical biogeography and diversification of the cosmopolitan ectomycorrhizal mushroom family *Inocybaceae*. *J Biogeogr* 36:577–592. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02055.x>
- Miranda-Aragón L, Treviño-Garza EJ, Jiménez-Pérez J, Aguirre-Calderón OA, González-Tagle MA, Pompa-García M, Aguirre-Salado CA (2012) Modeling susceptibility to deforestation of

- remaining ecosystems in North Central Mexico with logistic regression. *J For Res* 23:345–354. <https://doi.org/10.1007/s11676-012-0230-z>
- Nara K (2015) The role of ectomycorrhizal networks in seedling establishment and primary succession. In: Horton TR (ed) *Mycorrhizal networks*. Springer, pp 117–201
- Nguyen NH, Song Z, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling JS, Kennedy PG (2015a) FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol* 20:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>
- Nguyen NH, Smith D, Peay K, Kennedy P (2015b) Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. *New Phytol* 205:1389–1393. <https://doi.org/10.1111/nph.12923>
- Nguyen NH, Williams LJ, Vincent JB, Stefanski A, Cavender-Bares J, Messier C, Paquette A, Gravel D, Reich PB, Kennedy PG (2016) Ectomycorrhizal fungal diversity and saprotrophic fungal diversity are linked to different tree community attributes in a field-based tree experiment. *Mol Ecol* 25:4032–4046. <https://doi.org/10.1111/mec.13719>
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, et al (2016) *vegan: Community Ecology Package*
- Öpik M, Zobel M, Cantero JJ, Davison J, Facelli JM, Hiiesalu I, Jairus T, Kalwij JM, Koorem K, Leal ME, Liira J, Metsis M, Neshataeva V, Paal J, Phosri C, Põlme S, Reier Ü, Saks Ü, Schimann H, Thiéry O, Vasar M, Moora M (2013) Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23:411–430. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0482-2>
- Ortiz-Bibian MA, Blanco-García A, Lindig-Cisneros RA, Gómez-Romero M, Castellanos-Acuña D, Herrerías-Diego Y, Sánchez-Vargas NM, Sáenz-Romero C (2017) Genetic variation in *Abies religiosa* for quantitative traits and delineation of elevational and climatic zoning for maintaining monarch butterfly overwintering sites in Mexico, considering climatic change. *Silvae Genet* 0:1–10. <https://doi.org/10.1515/sg-2017-0003>
- Pacheco-Cobos L, Rosetti M, Cuatrecasas C, Hudson R (2010) Sex differences in mushroom gathering: men expend more energy to obtain equivalent benefits. *Evol Hum Behav* 31:289–297. <https://doi.org/10.1016/j.evolhumbehav.2009.12.008>
- Peay KG, Bruns TD (2014) Spore dispersal of basidiomycete fungi at the landscape scale is driven by stochastic and deterministic processes and generates variability in plant-fungal interactions. *New Phytol* 204:180–191. <https://doi.org/10.1111/nph.12906>
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD (2008) Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience* 58:799–810. <https://doi.org/10.1641/B580907>
- Peay KG, Baraloto C, PV a F (2013) Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. *ISME J* 7:1852–1861. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.66>
- Pérez-Moreno J, Martínez-Reyes M (2014) Edible ectomycorrhizal mushrooms: biofactories for sustainable development. In: Guevara-Gonzales R, Torres-Pacheco I (eds) *Biosyst. Eng. Biofactories Food Prod. Century XXI*. Springer International Publishing, Switzerland, pp 151–233
- Pievani T (2014) The sixth mass extinction: Anthropocene and the human impact on biodiversity. *Rend Fis Acc Lincei* 25:85–93. <https://doi.org/10.1007/s12210-013-0258-9>
- R Core Team (2014) *R: A language and environment for statistical computing*
- Ramírez MI, Sáenz-Romero C, Rehfeldt GE, Salas-Canela L (2015) Threats to the availability of overwintering habitat in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve. In: Oberhauser KS, Nail KR, Altizer S (eds) *Monarch. a Chang. World Biol. Conserv. an Iconic Butterfly*. Cornell University Press, Ithaca, pp 157–168
- Redonda-Martínez R, Villaseñor-Ríos JL (2011) *Asteraceae Bercht & J. Presl. Flora Val. Tehuacán-Cuicatlán*. pp 1–64
- Reverchon F, del Pilar Ortega-Larrocea M, Bonilla-Rosso G, Pérez-Moreno J (2012a) Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. *FEMS Microbiol Ecol* 80:479–487. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01314.x>
- Reverchon F, Ortega-larrocea M d P, Pérez-Moreno J (2012b) Soil factors influencing ectomycorrhizal sporome distribution in neotropical forests dominated by *Pinus montezumae*, Mexico. *Mycoscience* 53: 203–210. <https://doi.org/10.1007/s10267-011-0136-1>
- Ryberg M (2015) Molecular operational taxonomic units as approximations of species in the light of evolutionary models and empirical data from fungi. *Mol Ecol* 24:5770–5777. <https://doi.org/10.1111/mec.13444>
- Rzedowski J (2006) *Bosque de coníferas*. In: CONABIO (ed) *Veg. México, 1st edn. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*, Ciudad de México, pp 295–327
- Sáenz-Romero C, Rehfeldt GE, Duval P, Lindig-Cisneros RA (2012) *Abies religiosa* habitat prediction in climatic change scenarios and implications for monarch butterfly conservation in Mexico. *For Ecol Manag* 275:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.03.004>
- Sáenz-Romero C, Lindig-Cisneros RA, Joyce DG et al (2016) Assisted migration of forest populations for adapting trees to climate change. *Rev Chapingo Ser Ciencias For y del Ambient* 22:303–323. <https://doi.org/10.5154/r.chscfa.2014.10.052>
- Sánchez-Velázquez LR (2011) Does *Baccharis conferta* shrub act as a nurse plant to the *Abies religiosa* seedling? *Open For Sci J* 4:67–70. <https://doi.org/10.2174/1874398601104010067>
- Schliep KP (2011) phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27:592–593
- Schloss P, Westcott SL, Ryabin T, AIE (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541
- Schmidt PA, Bálint M, Greshake B, Bandow C, Römbke J, Schmitt I (2013) Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biol Biochem* 65:128–132. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.014>
- Smith ME, Henkel TW, Catherine Aime M, Fremier AK, Vilgalys R (2011) Ectomycorrhizal fungal diversity and community structure on three co-occurring leguminous canopy tree species in a Neotropical rainforest. *New Phytol* 192:699–712. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03844.x>
- Soudzilovskaia NA, Douma JC, Akhmetzhanova AA, van Bodegom PM, Cornwell WK, Moens EJ, Treseder KK, Tibbett M, Wang YP, Cornelissen JHC (2015) Global patterns of plant root colonization intensity by mycorrhizal fungi explained by climate and soil chemistry. *Glob Ecol Biogeogr* 24:371–382. <https://doi.org/10.1111/geb.12272>
- Stenoien C, Nail KR, Zalucki JM, Parry H, Oberhauser KS, Zalucki MP (2016) Monarchs in decline: a collateral landscape level effect of modern agriculture. *Insect Sci* 1–14. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12404>
- Suzuki R, Shimodaira H (2015) pvcust: hierarchical clustering with P-values via multiscale bootstrap resampling
- Talbot JM, Bruns TD, Taylor JW, Smith DP, Branco S, Glassman SI, Erlandson S, Vilgalys R, Liao HL, Smith ME, Peay KG (2014) Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:6341–6346. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402584111>
- Tedersoo L (2017) Global biogeography and invasions of ectomycorrhizal plants: past, present and future. In: Tedersoo L (ed) *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Springer International Publishing, Cham, pp 469–531
- Tedersoo L, Nilsson RH, Abarenkov K, Jairus T, Sadam A, Saar I, Bahram M, Bechem E, Chuyong G, Kõljalg U (2010) 454

- Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytol* 188:291–301. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03373.x>
- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S et al (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* (80-) 346:1–10. <https://doi.org/10.1126/science.1256688>
- Tedersoo L, Anslan S, Bahram M, Põlme S, Riit T, Liiv I, Kõljalg U, Kisand V, Nilsson H, Hildebrand F, Bork P, Abarenkov K (2015a) Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys* 10:1–43. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.10.4852>
- Tedersoo L, Bahram M, Cajthaml T, Põlme S, Hiiesalu I, Anslan S, Harend H, Buegger F, Pritsch K, Koricheva J, Abarenkov K (2015b) Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *ISME J* 10:346–362. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.116>
- Thomas E, Jalonen R, Loo J, Boshier D, Gallo L, Cavers S, Bordács S, Smith P, Bozzano M (2014) Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. *For Ecol Manag* 333:66–75. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.07.015>
- Truong C, Mujic AB, Healy R, Kuhar F, Furci G, Torres D, Niskanen T, Sandoval-Leiva PA, Fernández N, Escobar JM, Moretto A, Palfner G, Pfister D, Nouhra E, Swenie R, Sánchez-García M, Matheny PB, Smith ME (2017) How to know the fungi: combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. *New Phytol* 214:913–919. <https://doi.org/10.1111/nph.14509>
- Uehling JK, Henkel TW, Vilgalys R, Smith ME (2012) *Membranomyces* species are common ectomycorrhizal symbionts in Northern Hemisphere forests. *Mycorrhiza* 22:577–581. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0457-8>
- Ważny R (2014) Ectomycorrhizal communities associated with silver fir seedlings (*Abies alba* Mill.) differ largely in mature silver fir stands and in Scots pine forecrops. *Ann For Sci* 71:801–810. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0378-0>

Capítulo III. Las especies vegetales y fúngicas involucradas en la red micorrízica

En este capítulo se determina la estructura de la red de hongos asociados a la rizosfera de plantas potencialmente facilitadoras. En un bosque de *Abies religiosa* localizamos a las plántulas de *Abies religiosa* y de 18 plantas que pueden compartir hongos con estas especies (formando una red micorrízica). A estas plantas, les extrajimos las raíces y secuenciamos la región ITS2 de los organismos de la rizosfera.

Con estos datos construimos una red bipartita y determinamos que *Acaena elongata*, *Baccharis conferta*, *Dryopteris pseudofilix-mas*, *Fuchsia thymifolia*, *Muhlenbergia macroura*, *Muhlenbergia nigra*, *Roldana barba-johannis*, y *Salix paradoxa* son potenciales plantas facilitadoras. Los hongos de las familias Claroideoglomeraceae, Cortinariaceae, Glomeraceae y de los géneros *Clavulina*, *Endogone*, *Genea*, *Geopora*, *Humaria*, *Hydnobolites*, *Hydnotrya*, *Hymenogaster*, *Inocybe*, *Rhodocypha*, *Russula*, *Tomentella* son los principales enlaces que conectan a las plántulas de *Abies religiosa* con las plantas facilitadoras.

La información se presenta el siguiente manuscrito con el formato para la revista *Mycorrhiza*, con título “**El análisis de la red bipartita de *Abies religiosa* y sus simbiosis micorrízicas predicen a los géneros *Baccharis*, *Salix* y *Muhlenbergia* como plantas facilitadoras con varios hongos ectomicorrizógenos como especies conectoras importantes**”

El análisis de la red bipartita de *Abies religiosa* y sus simbiontes micorrízicos predicen a los géneros *Baccharis*, *Salix* y *Muhlenbergia* como plantas facilitadoras con varios hongos ectomicorrizógenos como especies conectoras importantes

Andrés Argüelles-Moyao^{a,b}, Roberto Garibay-Orijel^{a,*}

(a) Laboratorio de Sistemática, Ecología y Aprovechamiento de Hongos Ectomicorrízicos, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán. C.P. 04510, CDMX, México.

(b) Posgrado en Ciencias Biológicas, Edificio B, 1º Piso, Unidad de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán. C.P. 04510, CDMX, México.

Andrés Argüelles-Moyao

E-mail: evoandres@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-7483-5703>

*Roberto Garibay-Orijel (Corresponding author)

E-mail: rgaribay@ib.unam.mx

<https://orcid.org/0000-0002-6977-7550>

Resumen

Abies religiosa es una especie en riesgo debido a los escenarios de cambio climático y cambios de uso de suelo, por lo que se ha propuesto la migración asistida a altitudes progresivas como herramienta de conservación. También, se conoce que el establecimiento de las plantas se mejora con el uso de plantas facilitadoras y hongos micorrizógenos. No obstante, sólo están documentados dos géneros plantas facilitadoras para *Abies religiosa* y se desconoce su estatus micorrízico. El objetivo de este estudio fue determinar las plantas facilitadoras potenciales y los hongos micorrizógenos que conectan a las plántulas de *Abies religiosa* a la red micorrízica. Muestreamos la rizosfera de 18 especies de plantas en campo, y secuenciamos el ITS2 de los hongos para construir una red bipartita del bosque de *Abies religiosa*. Los nodos con la mayor grado y el menor “camino más corto promedio” fueron *Salix paradoxa* y Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU, *Genea* sp._24 SH191238.07FU, *Rhodoscypha* sp._466 SH208437.07FU, *Russula firmula*_2 KX812987, y *Tomentella* sp._215 SH002650.07FU. Estos hongos potencialmente conectan a las plántulas de *Abies religiosa* con las plantas facilitadoras. También, encontramos una fuerte arquitectura modular en la red, y un alto grado en los nodos. Esto refleja alta capacidad de resistencia a las perturbaciones aleatorias. Nuestros resultados dan información sobre los hongos involucrados en el establecimiento de las plantas, y puede ser usada para la toma de decisiones ambientales que involucren a la migración asistida de *Abies religiosa* respecto al uso de plantas nodrizas e inóculo micorrizógeno.

Palabras clave

Decisiones ambientales; ecología de hongos; ecología forestal

Introducción

Abies religiosa es una planta endémica del centro de México cuyas poblaciones están amenazadas por los escenarios de cambio climático y cambio de uso de suelo. Esta planta tiene una reducción severa en su hábitat, debido a las actividades humanas, y se modela una reducción de su hábitat de un 70% para el año 2030 (Sáenz-Romero et al 2012; Ramirez et al 2015; Sáenz-Romero et al 2016; Ortiz-Bibian et al 2017). En particular, una estrategia de conservación es la migración asistida, que involucra la reintroducción de esta planta en sitios con altitudes mayores a su actual área de distribución, para realinear la población actual con el hábitat predicho (Sáenz-Romero et al 2016). No obstante, existen problemáticas forestales inherentes al establecimiento en campo, que deben ser tomadas en cuenta para ayudar en la reintroducción de esta planta.

Abies religiosa es una planta con una tasa de crecimiento lenta y su movimiento predicho de 350 m montaña arriba conlleva un riesgo de daño por heladas. Para evitar lo anterior, se recomienda el uso de plantas facilitadoras que mejoren la supervivencia en campo (Ortiz-Bibian et al 2017). Los géneros *Baccharis* y *Lupinus* se han reportado como plantas facilitadoras de *Abies religiosa* (Lara-González et al 2009; Sánchez-Velásquez et al 2011; Ortiz-Bibian et al 2017; Rivas-Rivas et al 2017); sin embargo, no se tiene documentado otras plantas con este potencial. Dado que México es *hotspot* de diversidad de plantas, como Pinaceae y Asteraceae (Redonda-Martínez y Villaseñor-Ríos 2011; Gernandt y Pérez-De La Rosa 2014), la evaluación del potencial de cada una de las plantas es imposible. Por lo tanto, la selección de plantas para evaluar su capacidad nodriza debe basarse en un análisis ecológico.

Las raíces de las plantas se asocian en una relación mutualista con el micelio de los hongos de los phyla Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota, donde desarrollan una compleja red de interacción (Smith y Read 2008; Nara 2015a; van der Heijden et al 2015). Esta simbiosis es fundamental para los ecosistemas terrestres, porque regulan el ciclo biogeoquímico de nutrientes e involucran *ca.* 250,000 plantas hospederas y 50,000 especies micorrizógenas (van der Heijden et al 2015) en ecosistemas tropicales y templados (Tedersoo 2017; Brundrett y Tedersoo 2018). Además, esta interacción mejora la sobrevivencia de las plántulas y su establecimiento en campo (Nara 2015a; van der Heijden et al 2015; Pickles y Simard 2016). Por lo tanto, el uso de plantas facilitadoras con capacidad de albergar hongos

micorrizógenos debe ayudar en el establecimiento y sobrevivencia de plántulas de *Abies religiosa*.

Las asociaciones entre plantas y hongos son modeladas usando teoría de redes. Las especies se representan como nodos y las interacciones como enlaces (Montesinos-Navarro et al 2012). Los nodos son una abstracción matemática que representa unidades (genes, proteínas, especies, etc.), y los enlaces son el efecto o la relación entre estos objetos. Las redes pueden ser unipartitas, es decir, que involucran a un tipo de nodos, o bipartitas, es decir, que los nodos están en diferentes categorías. Asimismo, la arquitectura de las redes implica conocer el grado de los nodos, la distribución de grado, el coeficiente de agrupamiento, la modularidad, etc. Un mayor detalle de los términos se encuentra en Beiler et al (2010) y en tabla suplementaria 9. En este trabajo nos referimos a las plantas como los nodos y a los hongos como los enlaces. Asimismo, las redes biológicas pueden seguir tres grandes patrones: regulares, aleatorias o libres de escala. Los enlaces en las redes regulares o aleatorias están equitativamente distribuidos entre los nodos. No obstante, en las redes libres de escala algunos nodos están altamente conectados, lo que da origen a una distribución de grado con una cola de distribución larga. Esta propiedad le confiere resistencia a perturbaciones aleatorias pero son sensibles a la remoción selectiva de árboles muy conectados (Beiler et al 2010).

En este momento carecemos del conocimiento ecológico de las plantas facilitadoras y de los hongos micorrizógenos que conectan a las plántulas de *Abies religiosa* a la red micorrízica. Esta información es fundamental para usarla en programas de manejo para mejorar la sobrevivencia en campo de esa especie. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es construir una red bipartita entre las plántulas de *Abies religiosa* y sus posibles plantas facilitadoras a través de los hongos más importantes. Esta información es de vital importancia para la elección de plantas facilitadoras y de inóculo micorrízico en los experimentos de reintroducción arbórea.

Materiales y Métodos

Sitio de estudio

El sitio de estudio fue un bosque monodominante de *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham en la Sierra de la Cruces (Ocoyoacac, Estado de México. Latitud: 19.292603; longitud:

-99.352598; intervalo de altitud: 3120 a 3180 msnm). El bosque se desarrolla en Andosoles de textura media (Andosol húmico y ócrico con valores de pH de 5.84 ± 0.22), y tiene una temperatura media anual de 10.2 °C con una precipitación promedio anual de 1,242 mm (Argüelles-Moyao et al 2017). Este bosque es un ecosistema diverso en plantas del sotobosque (Almeida-Lenero et al 2005; Guerrero-Hernández et al 2014) en el que también están presentes otros hospederos aunque en baja abundancia como *Alnus jorullensis*, *Salix paradoxa*, *Comarostaphyllis discolor*, *Quercus laurifolia*, y *Arbutus xalapensis*. En este sitio recolectamos las raíces del 3 de noviembre al 1 de diciembre de 2016.

Muestreo de las rizosfera de plantas

En el bosque localizamos seis puntos de muestreo donde se desarrollan árboles jóvenes de *Abies religiosa* (mayores a 50 cm de altitud). Estos renuevos estaban en condiciones de borde para representar las condiciones de regeneración natural. Posteriormente, con un rastrillo de jardinería rastreamos la rizosfera de dos o más plantas, hasta obtener más de un gramo de raíces frescas. Asimismo, con la misma metodología obtuvimos la rizosfera de otras plantas adultas, asociadas por su proximidad a las plantas jóvenes de *Abies religiosa* (Tabla 1). Excluimos a las plantas de baja abundancia y a las micoheterotróficas por sus asociaciones fúngicas muy especializadas (Kong et al 2015; Taudiere et al 2015). Las raíces con su rizosfera fueron almacenadas en bolsas plásticas individuales, y depositadas en una hielera con bolsas de gel congeladas. Al final del muestreo, las bolsas fueron almacenadas en un refrigerador de laboratorio a 4°C.

Biología molecular

Un día después de la recolecta de la rizosfera, extrajimos el DNA con el kit PowerMAX Soil DNA Isolation (MO Bio, California, USA). Para esto, añadimos 1 g de raíz fresca por muestra a cada tubo del kit y seguimos las instrucciones del fabricante. El DNA extraído fue almacenado a -20°C hasta su uso. Posteriormente, amplificamos la región ITS2 (*internal transcribed spacer 2*) por medio de PCR usando el kit Platinum Multiplex PCR Master Mix (Life Technologies Corporation, California, USA). En cada PCR añadimos cinco ITS3 *forward primers* (universal de hongos, Chytridiomycota, Sebaciales *p.parte*, Glomeromycota, Sordariales *p.parte*), y un ITS4 *reverse primer* universal (Tedersoo et al

2014). La PCR tuvo el siguiente programa: 95°C 2 min, 35 ciclos de: 95 °C por 30 s, 60 °C por 90 s, 72 °C por 60 s; después 72°C por 10 min. Para terminar a 4 °C. Las tres réplicas técnicas resultantes fueron mezcladas, y finalmente los productos de PCR fueron purificados y secuenciados con la plataforma Illumina con tecnología Nextera en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN, Ciudad de México).

Procesamiento bioinformático

La tabla final de MOTU's (*Molecular Operational Taxonomic Unit*) se obtuvo usando el pipeline reportado en Bahram et al (2016). El archivo de secuencias en formato *fastq* fue descomprimido y filtrado por calidad (*maxambig* = 0, *qwindowaverage* = 30, *qwindowsize* = 15) con Mothur (Schloss et al 2009). Posteriormente, las recomprimimos con un script en Python y las ensamblamos usando PandaSeq (Masella et al 2012). Las secuencias fueron agrupadas usando Mothur de nuevo. Además, filtramos las secuencias quiméricas con USEARCH (Edgar 2010). Después agrupamos las secuencias con CD-HIT (Fu et al 2012) al 97% de similitud, como un estándar aceptado de variación intra-específica (Peay et al 2008) y como se ha usado en otros trabajos (Jia et al 2017). Cada MOTU fue comparado con el algoritmo BLAST (Altschul et al 1997) contra la base de datos de UNITE y INSDC (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*) (Abarenkov et al 2010; Kõljalg et al 2013). Adicionalmente, determinamos la frecuencia y abundancia absolutas de cada MOTU en cada planta, al sumar los valores dentro de cada sitio. También, calculamos el valor de importancia ecológica (Horton y Bruns 2001; Argüelles-Moyao et al 2017). Finalmente, la tabla de especies tuvo un criterio estricto de filtrado en el cual eliminamos los taxa con menos de 10 secuencias en la suma de secuencias de la tabla final (Dickie 2010; Hart et al 2015; Nguyen et al 2015a).

Análisis de redes

Para el análisis de redes, determinamos los enlaces entre plantas como la presencia del mismo hongo micorrizógeno en ellas (Toju et al 2015). Con el software FUNGuild v.1 (Nguyen et al 2015b) asignamos el gremio funciona a la tabla de especies. Este software asigna el gremio con un script de Python a partir de una base de datos anotada y pública. Posteriormente, construimos una matriz usando la lista de plantas y la presencia de los hongos

micorrizógenos en dos o más plantas. Esta matriz es la representación de red bipartita (en teoría de grafos es un grafo con vértices en dos conjuntos disjuntos). La red bipartita fue construida para todos los sitios de la comunidad y, para cada uno de los sitios de muestreo.

En cada red de interacción calculamos los índices de las redes (Montesinos-Navarro et al 2012; Bahram et al 2014; Toju et al 2015). Con R v. 3.2.5 (R Core Team 2014) usando el paquete *bipartite* (Dormann et al 2009) calculamos la conectancia de la red, el NODF2 (*nestedness metric based on overlap and decreasing fill*), y el WNODF (*weighted nestedness metric based on overlap and decreasing fill*). Con el paquete *netcarto* (Doulcier y Stouffer 2015) calculamos el número de módulos, el tipo de módulos, el número de conectores, y la conectividad. Con el paquete *fitdistrplus* (Delignette-Muller y Dutang 2015) verificamos el ajuste a una distribución de potencias y su probabilidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Adicionalmente, con Cytoscape (Shannon et al 2003; Rebollar et al 2017) calculamos el grado, y el “camino más corto promedio” (*average shortest path*). También, para comparar obtuvimos los datos de Taudiere et al (2015) y Jia et al 2017) porque son ecosistemas en los que se ha reconstruido una red bipartita y que tienen una asociación con *Abies veitchii* y *Abies alba*. A esta información también le calculamos los índices de las redes mencionados anteriormente. Las definiciones y la forma de calcularlos se encuentran en la tabla suplementaria 9.

Resultados

Contexto ecológico de los hongos

Encontramos 2,812 especies de hongos en 1,318,294 secuencias de ITS2. La rizosfera las plantas adultas de *Abies religiosa* en el sitio de muestreo ZMX5 tuvieron la mayor cantidad de secuencias (55,357) y la rizosfera de *Comarostaphylis discolor* en ZMX2 tuvieron el menor número de secuencias (1,934). Por otro lado, *Roldana barba-johannis* en ZMX6 fue la especie de planta con el mayor número de especies asociadas (667), mientras que *Comarostaphylis discolor* en ZMX2 tuvo el menor número de especies (240). Para toda el área de muestreo, las plántulas de *Abies religiosa* fueron el hospedero con el mayor número de especies (1,659), mientras que *Pinus* sp. fue el que menos especies albergó (338). Asimismo, las plantas adultas de *Abies religiosa* tuvieron el mayor número de secuencias (236,823), mientras que *Symphoricarpos microphyllus* tuvo el menor número de secuencias

(15,5669). Los hongos más frecuentes y abundantes fueron *Mortierella* sp._14 SH180110.07FU, *Ilyonectria destructans*_5160 (mejor hit de Genbank: MF688901) y *Penicillium glaucoalbidum*_1799 SH201404.07FU (Tabla suplementaria 2 y 3).

En toda la comunidad, 464 especies de hongos son simbiotróficas con una abundancia en conjunto de 478,179 secuencias de ITS2. De estas especies, 85 hongos desarrollan micorriza arbuscular (AM), 365 ectomicorriza (ECM) y 14 micorriza orquideoide (OM). Las especies de AM más abundantes fueron Glomeraceae sp._1165 SH191192.07FU, Acaulosporaceae sp._208 SH194642.07FU y *Claroideoglomus etunicatum*_457 (mejor hit de Genbank: MF599225). Los hongos de ECM más abundantes fueron *Clavulina reae*_51 SH220214.07FU, *Hymenogaster subalpinus*_633 SH218860.07FU, y *Hebeloma cavipes*_321 SH215995.07FU. Los hongos de OM más abundantes fueron *Serendipitia* sp._1105 SH180002.07FU, *Serendipitia* sp._1004 SH201952.07FU, y *Serendipitia* sp._1011 SH003903.07FU. En comparación, los hongos de AM más frecuentes fueron *Claroideoglomeraceae* sp._44 SH206039.07FU, *Claroideoglomeraceae* sp._766 (major hit de Genbank: KX115998), y Glomeraceae sp._1319 SH199967.07FU. Los hongos de ECM más frecuentes fueron *Tomentella* sp._215 SH002650.07FU, Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU, y *Genea* sp._24 SH191238.07FU. Finalmente, los hongos de OM más frecuentes fueron *Serendipita* sp._1004 SH201952.07FU, *Serendipita* sp._2872 SH003893.07FU, y *Serendipita* sp._1011 SH003903.07FU. Los hongos simbioses con mayor valor de importancia ecológica fueron *Clavulina reae*_51 SH220214.07FU (0.117140275), *Hymenogaster subalpinus*_633 SH218860.07FU (0.10740656), y *Hebeloma cavipes*_321 SH215995.07FU (0.087496348) (Tabla suplementaria 4).

Analizando sólo las plántulas de *Abies religiosa*, estas albergaron en sus raíces 198,393 secuencias de hongos, de las cuales 92,423 secuencias (~5%) fueron de hongos simbiotróficos agrupadas en 242 especies. A detalle, 33 especies fueron AM con 220 secuencias, 204 especies fueron ECM con 91,659 secuencias y 5 especies fueron OM con 544 secuencias. Los hongos más abundantes fueron *Clavulina* sp._51 SH220214.07FU, *Inocybe* sp._332 SH008214.07FU, e *Inocybe geophylla*_1030 SH176304.07FU.

247 **Tabla 1. Lista de especies de plantas en los sitios de muestreo**

Sitio de muestreo	ZMX1	ZMX2	ZMX3	ZMX4	ZMX5	ZMX6
Latitud	19.291861°	19.290553°	19.287090°	19.284680°	19.281805°	19.277414°
Longitud	-99.358810°	-99.359897°	-99.366167°	-99.367631°	-99.367233°	-99.361743°
Altitud (msnm)	3161	3151	3119	3115	3113	3179
Especies de planta	<i>Abies religiosa</i> adulto	<i>A. religiosa</i> adulto	<i>Dryopteris</i> <i>pseudofilix-mas</i>	<i>Pinus</i> sp.	<i>Baccharis</i> <i>conferta</i>	<i>A. religiosa</i> plántula
	<i>Salix paradoxa</i>	<i>Salix paradoxa</i>	<i>Fuchsia thymifolia</i>	Angiosperma no determinada (ND)	<i>Muhlenbergia</i> <i>macroura</i>	<i>Dryopteris</i> <i>pseudofilix-mas</i>
	<i>A. religiosa</i> plántula	<i>A. religiosa</i> plántula	<i>Cestrum</i> <i>thyrsoideum</i>	<i>A. religiosa</i> plántula	<i>A. religiosa</i> plántula	<i>Solanum</i> <i>pubigerum</i>
	<i>Buddleja cordata</i>	<i>Muhlenbergia</i> <i>nigra</i>	<i>Acaena elongata</i>	<i>A. religiosa</i> adulto	<i>A. religiosa</i> adulto	<i>Roldana barba-</i> <i>johannis</i>
	<i>Acaena elongata</i>	<i>Roldana barba-</i> <i>johannis</i>	<i>Roldana</i> <i>angulifolia</i>	<i>Fuchsia thymifolia</i>	<i>Roldana barba-</i> <i>johannis</i>	<i>Salix paradoxa</i>
		<i>Comarostaphylis</i> <i>discolor</i>	<i>A. religiosa</i> plántula	<i>Acaena elongata</i>	<i>Roldana</i> <i>angulifolia</i>	<i>Sambucus nigra</i>
		<i>Cestrum</i> <i>thyrsoideum</i>	<i>A. religiosa</i> adulto	<i>Cestrum thyrsoideum</i>	<i>Buddleja cordata</i>	<i>Fuchsia</i> <i>thymifolia</i>
			<i>Salix paradoxa</i>	<i>Symphoricarpos</i> <i>microphyllus</i>	<i>Comarostaphylis</i> <i>discolor</i>	<i>Acaena elongata</i>
				<i>Roldana angulifolia</i>	<i>Solanum</i> <i>pubigerum</i>	<i>A. religiosa</i> adulto

248

249

250

251 **Tabla 2. Índices de las redes de todos los sitios en conjunto y de cada sitio**

Parámetro	Todos los sitios	ZMX1	ZMX2	ZMX3	ZMX4	ZMX5	ZMX6
Hospederos vegetales	19	5	7	8	9	9	9
Especies de hongos	464	230	281	245	185	133	212
Número de nodos	483	235	288	253	194	142	221
Número de enlaces	3654	670	1126	898	786	478	730
“Camino más corto promedio” (<i>Average shortest path length</i>)	2.715±0.436	3.110±0.359	3.063±0.373	3.212±0.367	2.994±0.427	3.278±0.358	3.259±0.394
<i>Betweenness centrality</i>	0.0031±0.020	0.009±0.048	0.0072±0.036	0.008±0.037	0.010±0.041	0.016±0.051	0.010±0.041
<i>Closeness centrality</i>	0.377±0.056	0.326±0.044	0.332±0.046	0.315±0.041	0.341±0.050	0.308±0.036	0.311±0.040
<i>Network density</i>	0.016	0.024	0.014	0.014	0.021	0.015	0.014
<i>Network heterogeneity</i>	2.932	2.006	3.198	2.823	2.485	2.67	2.823
<i>Network centralization</i>	0.488	0.321	0.351	0.298	0.45	0.347	0.298
Grado máximo	242	90	104	78	90	48	79
Estadístico KS (ajuste de distribución de potencias)	0.057	0.095	0.095	0.058	0.121	0.075	0.059
Valor de p del estadístico	0.458	0.471	0.148	0.816	0.246	0.850	0.873

KS							
Conectividad	0.207	0.291	0.286	0.229	0.236	0.200	0.191
Coefficiente de agrupamiento	0.200	0.343	0.292	0.245	0.232	0.203	0.217
<i>interaction specialization</i> (H^2),	0.665	0.885	0.762	0.851	0.666	0.801	0.781
<i>weighted NODF</i>	18.732	12.745	17.047	13.860	15.779	11.234	11.162
<i>NODF2</i>	39.736	26.801	31.355	25.067	32.770	21.806	23.834
<i>C-score</i>	0.482	0.568	0.471	0.589	0.522	0.660	0.675
<i>Checker-score</i>	3287.830	2484.300	3001.238	1765.679	869.333	451.944	1003.111
Número de módulos	22	6	8	9	10	11	14
Número de nodos en el módulo más grande	462	230	281	245	185	130	208
Número de nodos con conectividad mayor a 2.5	10	8	7	9	3	3	6
Especies con mayor valor de conectividad	Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU	<i>Endogone</i> sp._144 SH213348.07FU	<i>Humaria</i> sp._904 SH179622.07FU	Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU	<i>Genea</i> sp._24 SH191238.07FU	Glomeraceae sp._1319 SH199967.07FU	<i>Russula firmula_2</i> KX812987
Planta con el mayor valor de grado	<i>A. religiosa</i> plántula	<i>A. religiosa</i> adulto	<i>Salix paradoxa</i>	<i>D. pseudofilix-mas</i>	<i>A. religiosa</i> adulto	<i>Muhlenbergia macroura</i>	<i>A. religiosa</i> plántula

Hongo con el mayor valor de grado	<i>Tomentella</i> sp._215 SH002650.07FU	<i>Endogone</i> sp._144 SH213348.07FU	<i>Humaria</i> sp._904	Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU	<i>Tomentella</i> sp._215 SH002650.07FU	<i>Geopora</i> <i>cooperi</i> _1718 SH194828.07FU	<i>Inocybe</i> <i>argenteolutea</i> _1129
Grado del hongo con mayor valor de grado	15	5	7	7	8	5	6

* Calculado de datos de incidencia

Propiedades de las redes de *Abies religiosa*

La red micorrízica bipartita se construyó, usando a 19 plantas vasculares y a las 464 especies de hongos simbiótrophas. La cuenta final de nodos fue de 483, con 3654 enlaces para todo el bosque. En cada sitio el número de nodos está en el intervalo de 142–288 con 478–1126 enlaces. En toda la comunidad de *Abies religiosa* calculamos un valor de NODF2 de 39.73 y de WNODF de 18.73, y en las redes de cada sitio de muestreo los valores de NODF2 oscilaron en el intervalo de 21.80–32.76 y de WNODF están en el intervalo de 11.16–17.04. Además, con *netcarto* calculamos 22 módulos en toda la comunidad mientras que en cada sitio de muestreo entre 6–14 módulos. Asimismo, 10 nodos tienen los valores de conectividad más altos (mayor a 2.5) para toda la comunidad. En estos datos, encontramos 19 nodos *kinless* y 10 *Peripheral-Hub*. Todas las redes se ajustan a una distribución de potencias con valores de probabilidad mayores a 0.05. La comparación completa de nuestros datos está en la Tabla 2.

Los nodos fúngicos y vegetales importantes para *Abies religiosa*

En la red de todos los sitios, Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU tuvo el valor más alto de conectividad (3.14). Asimismo, el modulo más grande está compuesto por 462 nodos (todos hongos). No obstante, las plántulas de *Abies religiosa* fueron el nodo con mayor grado (242) y menor “camino más corto promedio” en toda la comunidad (1.95). Sin embargo, *Salix paradoxa* fue el otro hospedero diferente de *Abies religiosa* con mayor grado (171) y menor “camino más corto promedio” (2.25). Del mismo modo, los hongos simbiotrophicos con la mayor conectividad, mayor grado y menor “camino más corto promedio” fueron Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU, *Genea* sp._24 SH191238.07FU, *Rhodoscypa* sp._466 SH208437.07FU, *Russula firmula_2* KX812987, y *Tomentella* sp._215 SH002650.07FU.

En particular, en la red de cada sitio, las plantas con el grado más grande y el menor “camino más corto promedio” fueron las plantas adultas de *Abies religiosa*, *Acaena elongata*, *Baccharis conferta*, *Dryopteris pseudofilix-mas*, *Fuchsia thymifolia*, *Muhlenbergia macroura*, *Muhlenbergia nigra*, *Roldana barba-johannis*, y *Salix paradoxa*. Asimismo, los hongos con el mayor grado y el menor “camino más corto promedio” fueron Claroideoglomeraceae sp._766 KX115998, *Clavulina reae_51* SH220214.07FU, *Cortinariaceae* sp._965

SH033131.07FU, *Endogone* sp._144 SH213348.07FU, *Endogone* sp._152 SH213348.07FU, *Genea* sp._24 SH191238.07FU, *Geopora cooperi*_1718 SH194828.07FU, *Glomeraceae* sp._1319 SH199967.07FU, *Humaria* sp._904 KF041357, *Hydnobolites* sp._1217 SH022820.07FU, *Hydnotrya cerebriiformis*_1151 SH210478.07FU, *Hymenogaster parksii*_2432 SH218860.07FU, *Inocybe argenteolutea*_1129 SH191103.07FU, *Rhodoscypa* sp._466 SH208437.07FU, *Russula firmula*_2 KX812987 y *Tomentella* sp._215 SH002650.07FU (Tablas suplementarias 7 y 8).

Discusión

Diversidad de hongos micorrizógenos

En nuestro estudio encontramos un gran número de especies de hongos en el bosque de *Abies religiosa* (2,812 especies en 1,318,294 secuencias de ITS2). A detalle, en nuestro estudio tuvimos un criterio estricto de eliminación de secuencias únicas, cuando lo comparamos con otros estudios; esto ya ha sido reportado previamente para los bosques de coníferas de México. No obstante, nuestro esfuerzo de muestreo y secuenciación fue mayor que lo previamente reportado (Argüelles-Moyao y Garibay-Orijel, en prensa), pero aun así obtenemos menos especies de hongos que otros bosques similares en latitudes más norteñas (Tedersoo et al 2015; Glassman et al 2017). Sin embargo, ellos utilizan un criterio más laxo para la construcción de la tabla de especies en la cual solo eliminan a los taxa con una secuencia.

El *meta-barcoding* con secuenciación masiva es un procedimiento con una proporción alta de costo/beneficio (Truong et al 2017). Sin embargo, el número de especies recuperadas depende de la construcción de la tabla de especies. A detalle, la descripción de la diversidad de los hongos de suelo depende del valor de agrupamiento usado y de la eliminación de los especies únicas (Dickie 2010; Hart et al 2015; Nguyen et al 2015a). Con nuestro criterio estricto de eliminación de especies únicas, elegimos la pérdida de taxa raros en favor de una mejor credibilidad en las especies comunes.

En este trabajo, describimos la mayor cantidad de hongos ectomicorrizógenos reportados (365) para algún bosque de *Abies religiosa*. En estudios anteriores, la comunidad de hongos ectomicorrizógenos va de 81–305 especies (Argüelles-Moyao et al 2017; Argüelles-Moyao y Garibay-Orijel, en prensa). También, secuenciamos un mayor número (85) de especies de

hongos arbusculares que lo previamente reportado para México con *meta-barcoding* (Tedersoo et al 2014; Argüelles-Moyao y Garibay-Orijel, en prensa). Esta observación contradice la tendencia de un bajo número de especies AM en los bosques comparado con los pastizales o las selvas altas (Davison et al 2015; Pärtel et al 2016). La alta diversidad de hongos se debe probablemente por la alta diversidad de hospederos arbusculares del sotobosque (Almeida-Lenero et al 2005; Guerrero-Hernández et al 2014). Adicionalmente, los hongos formadores de micorrizas orquideoide nunca habían sido reportados para un bosque maduro de *Abies religiosa*. Por lo tanto, las técnicas de secuenciación masiva con un gran esfuerzo de muestreo y una gran seguridad en la tabla de especies dan una visión amplia de la diversidad potencial de especies en un área.

Los patrones ecológicos de los hongos de la rizósfera no se reflejan en las redes planta-hongo

Con nuestros resultados encontramos que las especies más frecuentes y más abundantes en la rizosfera no son los nodos principales que conectan a las especies de plantas. Sin embargo, los hongos con los valores más altos de frecuencia fueron los hongos con los mayores valores de grado, conectividad y con los menores valores de “camino más corto promedio”. Por lo tanto, los hongos más frecuentes a nivel de rizosfera son los nodos importantes conectando las plantas (Tabla Suplementaria 4 y 7).

Asimismo, observamos el modelo jerárquico del establecimiento de la simbiosis micorrízica en cada uno de los sitios de muestreo, porque presentaron una diferente comunidad de especies fúngicas, y los hongos con mayor grado y menor “camino más corto promedio” también fueron diferentes en cada sitio. Los factores principales que afectan el establecimiento de la relación simbiótica entre las plantas y los hongos son el banco de propágulos, las especies presentes y su interacción (Koide et al 2011; Dickie et al 2013). Específicamente, este modelo jerárquico predice que los propágulos fúngicos tienen que encontrar un hospedero compatible, y posteriormente esta comunidad tiene que sobrevivir a las variables abióticas del sitio. Las especies resultantes tienen que sobrevivir a las interacciones competitivas fuertes (que producen pérdida de taxa) o débiles (que producen co-existencia de taxa) (McHugh y Gehring 2006; Koide et al 2011; Becklin et al 2012; Toju et al 2014; Mello et al 2015). Además, la edad del ecosistema y el desarrollo del suelo generan un

diferente ensamble de comunidades (Fernandez et al 2017), y son dominados por los procesos estocásticos y deterministas característicos de cada comunidad (Peay y Bruns 2014).

En ecología fúngica, la aproximación de análisis de redes es una herramienta que representa la biología de los sistemas micorrízicos naturales. Con nuestro análisis de modularidad determinamos que *Cenococcum*, *Clavulina*, *Cortinarius*, *Genea*, *Hebeloma*, *Helvella*, *Inocybe*, *Rhodoscypha*, *Russula*, *Tomentella*, *Tricholoma*, y *Xerocomus* son nodos importantes en nuestros sitios y en otros ecosistemas influenciados con *Abies* (Taudiere et al 2015; Jia et al 2017), por tener una alta conectividad (Tabla suplementaria 5). Encontramos una fuerte estructura modular y una distribución de potencias en las redes que reconstruimos con los datos de Taudiere et al (2015) y Jia et al (2017). También, determinamos los hongos y plantas importantes en las redes de estos dos estudios (Tabla suplementaria 6). Por lo tanto, con la aproximación de redes logramos identificar a los hongos ectomicorrizógenos más importantes que deben ser incluidos en futuros estudios ecológicos, o de reintroducción de especies vegetales (Beiler et al 2010; Simard 2012; Filotas et al 2014).

En nuestra red obtuvimos una fuerte estructura modular, y evidencia de una arquitectura de red libre de escala. Esta configuración provee de capacidades de sobrevivencia frente a disturbios aleatorios (Bascompte et al 2006; Mitchell 2009), como el fuego o vientos fuertes. Los ecosistemas con ensambles de redes aleatorios carecen de estas capacidades porque la perturbación aleatoria puede afectar un nodo y fragmentar la red (Barabási y Bonabeau 2003; Mitchell 2009). En consecuencia, la configuración de red libre de escala refleja las propiedades ecológicas de resistencia y resiliencia (Bascompte y Jordano 2007; Fontaine et al 2011) que son característicos de un bosque saludable.

La estabilidad o insensibilidad de un ecosistema frente al disturbio se llama resistencia, y la tasa de recuperación después de la perturbación al equilibrio dinámico se llama resiliencia (Shade et al 2012). Ambas propiedades reflejan la capacidad de respuesta de un ecosistema (Olesen et al 2007; Rebollar et al 2017). En particular, una alta capacidad de resiliencia depende del tamaño de la comunidad biológica, la fuerza de la interacción (Okuyama y Holland 2008), y la diversidad de la comunidad (Mougi y Kondoh 2012). También se ha observado que el número de simbioses es una buena aproximación de la fuerza de la asociación, en la que un alto grado favorece la sobrevivencia de las plántulas (Taudiere et al 2015). Nosotros encontramos un alto grado en los nodos, y un alto número de especies y

secuencias. Por lo tanto, inferimos una alta capacidad de resistencia y resiliencia ante eventos aleatorios en este bosque. Así, nuestro análisis de las redes mejora nuestro entendimiento indirecto de la resiliencia de los bosques (Beiler et al 2015), porque en nuestros sitios encontramos una comunidad de hongos grande y diversa. También como las plantas adultas de *Abies religiosa* son un nodo con alto grado, la eliminación selectiva de estos árboles generará una gran pérdida de diversidad de hongos simbios, porque se estarían eliminando nodos *hub*.

Los nodos más importantes en la interacción planta-hongo del bosque de *Abies religiosa*

La planta con mayor grado y menor “camino más corto promedio” en todos los sitios fue *Salix paradoxa*. Esta género ha sido documentado como simbiote de hongos ectomicorrizógenos y es una planta pionera que favorece el establecimiento en campo de otras plantas ectomicorrízicas (Nara y Hogetsu 2004; Nara 2006a; Nara 2006b; Nara 2008; Fujiyoshi et al 2011; Nara 2015b). El mecanismo propuesto es la conexión física entre las plantas a través del micelio fúngico para formar una red micorrízica que redistribuye nutrientes limitantes (Nara 2015b). También, proponemos que *Cortinariaceae* sp._965 SH033131.07FU, *Genea* sp._24 SH191238.07FU, *Rhodocypha* sp._466 SH208437.07FU, *Russula firmula*_2 KX812987, y *Tomentella* sp._215 SH002650.07FU son los enlaces más probables entre las plántulas de *Abies religiosa* y las plantas facilitadoras potenciales porque estas especies tienen el menor “camino más corto promedio” y un gran valor en el grado y conectividad (Tabla 2 y Tabla suplementarias 7 y 8).

A detalle, *Cortinariaceae* sp._965 SH033131.07FU es una especie de hongo con afinidad a pH más alcalinos como los encontrados en las parcelas ZMX1 y ZMX2 con plantas adultas de *Abies religiosa* que tienen un pH de 6.04 (Argüelles-Moyao 2013), lo que explica su alta abundancia en estos dos sitios. Del mismo modo, ya existen reportes de *Cortinarius* o *Democybe* asociados a coníferas (Simard 2012). Asimismo, las especies de *Genea* son simbios, comunes de *Quercus* y otras latifoliadas (Smith et al 2006; Eros-Honti et al 2008; Moser et al 2009) y se ha reportado que potencialmente pueden enlazar orquídeas (Ouanphanivanh et al 2008). También, son colonizadores habituales de plántulas de *Pinus monticola* y las colonizan por esporas (Southworth et al 2009). De manera similar, las

especies del género *Rhodocypha* habitan comúnmente los bosque boreales y templados del hemisferio norte (Tedersoo y Smith 2013) con una preferencia hacia plantas no briofilas (Perry et al 2007). Esta género ha sido reportado en baja frecuencia en *Dryas octopetala* y *Bistorta vivipara* (Mundra et al 2015). Igualmente, *Russula firmula* ha sido reportada en *Quercus suber* (Lancellotti y Franceschini 2013), *Abies religiosa* (Argüelles-Moyao et al 2017) y como colonizadora de *Pinus koraiensis* en parcelas de 10 años después de un incendio (Malysheva et al 2016). Asimismo, las especies de *Tomentella* son habitantes comunes de los bosques de coníferas y latifoliadas (Simard 2012) en ecosistemas tropicales, templados fríos y templados cálidos (Toju et al 2018). Estas especies colonizan plántulas (Hoeksema 2015) en sitios con cantidades medias o altas de nitrógeno (Kranabetter et al 2015; Liu et al 2018). Finalmente, todos los hongos mencionados anteriormente establecen asociaciones ectomicorrizógenas o ecto-endomicorrizógenas (Peterson et al 2004; Smith and Read 2008) y por consecuencia es muy probable que favorezcan la sobrevivencia en campo de las plantas (Simard et al 2012; Bingham y Simard 2012; Nara 2015a; Pickles y Simard 2016).

En total, encontramos siete especies de plantas potencialmente facilitadoras y 10 especies de hongos que son importantes en los sitios específicos de muestreo (Tabla suplementaria 8). Las especies del género *Muhlenbergia* son plantas comunes en el sotobosque en el centro de México y son características de los bosques de coníferas y de alta montaña (Rzedowski 2006; Ruacho-González et al 2013; Vicente Martínez Arévalo 2013; Flores-Rentería et al 2017). Asimismo, estas especies están presentes en los sitios abiertos y favorecen a los hongos arbusculares (Overby et al 2015) y pueden asociarse a las familias Claroideoglomeraceae o Glomeraceae. Por lo tanto *Muhlenbergia* es planta facilitadora potencial, ya que es tolerante de áreas secas y su rizosfera tiene hongos micorrizógenos como *Geopora*, *Helvella*, *Tomentella* y hongos de la familia Glomeraceae. Además, las especies en el género *Baccharis* han sido documentadas como plantas facilitadoras de las plántulas de *Abies religiosa* en claros pequeños al proveerles de sombra durante la estación seca (Lara-González et al 2009; Sánchez-Velásquez et al 2011). En nuestro sitio, *Baccharis* alberga en sus raíces a las especies de *Geopora* y hongos de la familia Glomeraceae que pueden colonizar con micorriza ecto-endo o arbuscular respectivamente a *Abies religiosa* y tal vez sea otro mecanismo de facilitación en conjunto con la sombra. En resumen, *Baccharis* y *Muhlenbergia* son dos

plantas tolerantes a la sequía que colonizan áreas abiertas y suelos compactados y deben ser las primeras candidatas como plantas facilitadoras de plántulas de *Abies religiosa*.

No obstante, otras plantas facilitadoras potenciales (*Dryas*, *Fuchsia*, *Acaena*, *Roldana*) no ha sido evaluadas en esta capacidad pero tiene un alto potencial porque han sido reportadas como hospederos de hongos formadores micorriza arbuscular (Muthukumar et al 2014; Hill et al 2018; Melo et al 2018). La colonización de las raíces de coníferas jóvenes con micorriza arbuscular has sido documentada (Horton et al 1998; Smith et al 1998; Wagg et al 2008) y puede explicar la presencia de los hongos de la familia Claroideoglomeraceae y Glomeraceae conectando a las plántulas de *Abies religiosa* con otros hospederos. Todas las plantas mencionadas deben ser evaluadas experimentalmente para conocer su capacidad de tolerancia al estrés hídrico y su uso como facilitadoras en el establecimiento de las plantas de *Abies religiosa*.

Conclusiones

La red micorrízica del bosque de *Abies religiosa* se caracteriza por tener una gran riqueza de hongos. En particular, los hongos más abundantes no son los principales conectores de *Abies religiosa* con otras plantas pero si los más frecuentes. Los hongos presentes conectan las plantas de diferentes estratos del bosque a través de distintas asociaciones micorrízicas. A detalle, el análisis de redes indica que *Salix paradoxa*, *Dryopteris pseudofilix-mas*, *Muhlenbergia macroura*, *Muhlenbergia nigra*, *Baccharis conferta*, *Fuchsia thymifolia*, *Acaena elongata*, *Roldana barba-johannis* son plantas facilitadoras potenciales de *Abies religiosa*. Los hongos como Claroideoglomeraceae sp._766 KX115998, *Clavulina reae*_51 SH220214.07FU, *Cortinariaceae* sp._965 SH033131.07FU, *Endogone* sp._144 SH213348.07FU, *Endogone* sp._152 SH213348.07FU, *Genea* sp._24 SH191238.07FU, *Geopora cooperi*_1718 SH194828.07FU, Glomeraceae sp._1319 SH199967.07FU, *Humaria* sp._904 KF041357, *Hydnobolites* sp._1217 SH022820.07FU, *Hydnotrya cerebriformis*_1151 SH210478.07FU, *Hymenogaster parksii*_2432 SH218860.07FU, *Inocybe argenteolutea*_1129 SH191103.07FU, *Rhodoscypa* sp._466 SH208437.07FU, *Russula firmula*_2 KX812987, *Tomentella* sp._215 SH002650.07FU son los principales enlaces. Esta datos ayudarán en los programas de micorrización porque informa la toma de decisiones sobre que inóculo micorrizógeno o que planta facilitadora usar. Finalmente, en nuestro sitio de estudio

encontramos una distribución de potencias en las redes, una alta modularidad, y un alto grado, lo que indica una arquitectura de red libre de escala y por lo tanto resistencia y resiliencia ante disturbios aleatorios porque es baja la probabilidad de que se afecte un nodo con alto grado ante este tipo de eventos.

Agradecimientos

AAM agradece la beca 374558 otorgada por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para sus estudios de doctorado. Este proyecto fue financiado a RGO con el apoyo CONACYT-239266. Agradecemos las contribuciones de los revisores anónimos y del editor.

Referencias

- Abarenkov K, Nilsson RH, Larsson KH, et al (2010) The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytol* 186:281–285. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03160.x
- Almeida-Lenero L, Hooghiemstra H, Cleef AM, Van Geel B (2005) Holocene climatic and environmental change from pollen records of lakes Zempoala and Quila, central Mexican highlands. *Rev Palaeobot Palynol* 136:63–92. doi: 10.1016/j.revpalbo.2005.05.001
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al (1997) Gapped BLAST and PS I-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Argüelles-Moyao A (2013) Efecto del suelo del bosque de *Abies religiosa* en la comunidad de hongos ectomicorrízicos en el Zarco, San Pedro Atlapulco, Estado de México. Universidad Nacional Autónoma de México
- Argüelles-Moyao A, Garibay-Orijel R, Márquez-Valdelamar LM, Arellano-Torres E (2017) *Clavulina-Membranomyces* is the most important lineage within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza* 27:53–65. doi: 10.1007/s00572-016-0724-1
- Argüelles-Moyao A, Garibay-Orijel R (2018) Ectomycorrhizal fungal communities in high mountain conifer forests in central Mexico and their potential use in the assisted migration of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza*. doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0841-0>

504 Bahram M, Harend H, Tedersoo L (2014) Network perspectives of ectomycorrhizal
 505 associations. *Fungal Ecol* 7:70–77. doi: 10.1016/j.funeco.2013.10.003
 506 Bahram M, Kohout P, Anslan S, et al (2016) Stochastic distribution of small soil eukaryotes
 507 resulting from high dispersal and drift in a local environment. *ISME J* 10:885–896. doi:
 508 10.1038/ismej.2015.164
 509 Barabási A., Bonabeau E (2003) Scale-Free Networks. *Sci Am* 208:60–69.
 510 Bascompte J, Jordano P (2007) Plant-Animal Mutualistic Networks: The Architecture of
 511 Biodiversity. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 38:567–593. doi:
 512 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095818
 513 Bascompte J, Jordano P, Olesen J. (2006) Asymmetric Coevolutionary Networks Facilitate
 514 Biodiversity Maintenance. *Science* (80-) 312:431–433. doi: 10.1126/science.1123412
 515 Becklin KM, Pallo ML, Galen C (2012) Willows indirectly reduce arbuscular mycorrhizal
 516 fungal colonization in understorey communities. *J Ecol* 100:343–351. doi: 10.1111/j.1365-
 517 2745.2011.01903.x
 518 Beiler KJ, Durall DM, Simard SW, et al (2010) Architecture of the wood-wide web:
 519 *Rhizopogon* spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. *New Phytol* 185:543–553. doi:
 520 10.1111/j.1469-8137.2009.03069.x
 521 Beiler KJ, Simard SW, Durall DM (2015) Topology of tree-mycorrhizal fungus interaction
 522 networks in xeric and mesic Douglas-fir forests. *J Ecol* 103:616–628. doi: 10.1111/1365-
 523 2745.12387
 524 Bingham MA, Simard S (2012) Ectomycorrhizal Networks of *Pseudotsuga menziesii* var.
 525 *glauca* Trees Facilitate Establishment of Conspecific Seedlings Under Drought.
 526 *Ecosystems* 15:188–199. doi: 10.1007/s10021-011-9502-2
 527 Brundrett MC, Tedersoo L (2018) Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global
 528 host plant diversity. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.14976
 529 Davison J, Moora M, Öpik M, et al (2015) Global assessment of arbuscular mycorrhizal
 530 fungus diversity reveals very low endemism. *Science* (80-) 127:970–973. doi:
 531 10.5061/dryad.2m15n
 532 Delignette-Muller ML, y Dutang C (2015) fitdistrplus : An R Package for Fitting
 533 Distributions. *J Stat Softw.* doi: 10.18637/jss.v064.i04
 534 Dickie IA (2010) Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular

535 surveys. *New Phytol* 188:916–918. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03473.x

536 Dickie IA, Martínez-García LB, Koele N, et al (2013) Mycorrhizas and mycorrhizal fungal
 537 communities throughout ecosystem development. *Plant Soil* 367:11–39. doi:
 538 10.1007/s11104-013-1609-0

539 Dormann CF, Fruend J, Bluethgen N, B. G (2009) Indices, graphs and null models: analyzing
 540 bipartite ecological networks. *Open Ecol J* 2:7–24.

541 Doucier G, Stouffer D (2015) Rnetcarto: Fast Network Modularity and Roles Computation
 542 by Simulated Annealing.

543 Edgar R (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*
 544 26:2461–2462.

545 Eros-Honti Z, Kovács GM, Szedlay G, Jakucs E (2008) Morphological and molecular
 546 characterization of *Humaria* and *Genea* ectomycorrhizae from Hungarian deciduous
 547 forests. *Mycorrhiza* 18:133–143. doi: 10.1007/s00572-008-0164-7

548 Fernandez CW, Nguyen NH, Stefanski A, et al (2017) Ectomycorrhizal fungal response to
 549 warming is linked to poor host performance at the boreal-temperate ecotone. *Glob Chang*
 550 *Biol* 23:1598–1609. doi: 10.1111/gcb.13510

551 Filotas E, Parrott L, Burton PJ, et al (2014) Viewing forests through the lens of complex
 552 systems science. *Ecosphere* 5:1–23. doi: 10.1890/ES13-00182.1

553 Flores-Rentería D, Barradas VL, Álvarez-Sánchez J (2017) Ectomycorrhizal pre-inoculation
 554 of *Pinus hartwegii* and *Abies religiosa* is replaced by native fungi in a temperate forest of
 555 central Mexico. *Symbiosis* 1–14. doi: 10.1007/s13199-017-0498-z

556 Fontaine C, Guimarães PR, Kéfi S, et al (2011) The ecological and evolutionary implications
 557 of merging different types of networks. *Ecol Lett* 14:1170–1181. doi: 10.1111/j.1461-
 558 0248.2011.01688.x

559 Fu L, Niu B, Zhu Z, et al (2012) CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation
 560 sequencing data. *Bioinformatics* 28:3150–3152. doi: 10.1093/bioinformatics/bts565

561 Fujiyoshi M, Yoshitake S, Watanabe K, et al (2011) Successional changes in ectomycorrhizal
 562 fungi associated with the polar willow *Salix polaris* in a deglaciated area in the High
 563 Arctic, Svalbard. *Polar Biol* 34:667–673. doi: 10.1007/s00300-010-0922-9

564 Gernandt DS, Pérez-De La Rosa JA (2014) Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en
 565 México. *Rev Mex Biodivers* 85:126–133. doi: 10.7550/rmb.32195

566 Glassman SI, Wang IJ, Bruns TD (2017) Environmental filtering by pH and soil nutrients
567 drives community assembly in fungi at fine spatial scales. *Mol Ecol* 26:6960–6973. doi:
568 10.1111/mec.14414

569 Guerrero-Hernández R, González-Gallegos JG, Castro-Castro A (2014) Análisis Florístico De
570 Un Bosque De Abies Y El Bosque Mesófilo De Montaña Adyacente En Juanacatlán,
571 Mascota, Jalisco, México. *Bot Sci* 92:541–562.

572 Hart MM, Aleklett K, Chagnon P, et al (2015) Navigating the labyrinth : a guide to sequence-
573 based , community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi *Methods Navigating the*
574 *labyrinth : a guide to sequence-based , community ecology of arbuscular mycorrhizal*
575 *fungi. New Phytol* 235–247. doi: 10.1111/nph.13340

576 Hill EM, Robinson LA, Abdul-Sada A, et al (2018) Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant
577 Chemical Defence: Effects of Colonisation on Aboveground and Belowground
578 Metabolomes. 198–208. doi: 10.1007/s10886-017-0921-1

579 Hoeksema JD (2015) Experimentally Testing Effects of Mycorrhizal Networks on Plant-Plant
580 Interactions and Distinguishing Among Mechanisms. En: Horton TR (ed) *Mycorrhizal*
581 *Networks. Springer, Dordrecht*, pp 255–277

582 Horton TR, Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking
583 into the black box. *Mol Ecol* 10:1855–1871. doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01333.x

584 Horton TR, Cázares E, Bruns TD (1998) Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark
585 septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months
586 of growth after wildfire. *Mycorrhiza* 8:11–18. doi: 10.1007/s005720050205

587 Jia S, Nakano T, Hattori M, Nara K (2017) Root-associated fungal communities in three
588 *Pyroleae* species and their mycobiont sharing with surrounding trees in subalpine
589 coniferous forests on Mount Fuji, Japan. *Mycorrhiza* 1–13. doi: 10.1007/s00572-017-0788-
590 6

591 Koide RT, Fernandez C, Petprakob K (2011) General principles in the community ecology of
592 ectomycorrhizal fungi. *Ann For Sci* 68:45–55. doi: 10.1007/s13595-010-0006-6

593 Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al (2013) Towards a unified paradigm for sequence-
594 based identification of fungi. *Mol Ecol* 22:5271–5277. doi: 10.1111/mec.12481

595 Kong A, Cifuentes J, Estrada-Torres A, et al (2015) Russulaceae Associated with
596 Mycoheterotroph *Monotropa uniflora* (Ericaceae) in Tlaxcala, Mexico: A Phylogenetic

597 Approach. *Cryptogam Mycol* 36:479–512. doi: 10.7872/crym/v36.iss4.2015.479

598 Kranabetter JM, Hawkins BJ, Jones MD, et al (2015) Species turnover (β -diversity) in
599 ectomycorrhizal fungi linked to NH₄ + uptake capacity. *Mol Ecol* 24:5992–6005. doi:
600 10.1111/mec.13435

601 Lancellotti E, Franceschini A (2013) Studies on the ectomycorrhizal community in a
602 declining *Quercus suber* L. stand. *Mycorrhiza* 23:533–542. doi: 10.1007/s00572-013-0493-
603 z

604 Lara-González R, Sánchez-Velásquez LR, Corral-Aguirre J (2009) Regeneration of *Abies*
605 religiosa in canopy gaps versus understory, Cofre de Perote national park, Mexico.
606 *Agrociencia* 4.:739–747.

607 Liu Y, Chen H, Mou P (2018) Spatial patterns nitrogen transfer models of ectomycorrhizal
608 networks in a Mongolian scotch pine plantation. *J For Res* 29:339–346. doi:
609 10.1007/s11676-017-0454-z

610 Malysheva EF, Malysheva VF, Kovalenko AE, et al (2016) Below-Ground Ectomycorrhizal
611 Community Structure in the Postfire Successional *Pinus koraiensis* Forests in the Central
612 Sikhote-Alin (the Russian Far East). *Bot Pacifica* 5:19–31. doi: 10.17581/bp.2016.05102

613 Masella A, Bartram A, Truszkowski J, et al (2012) PANDAseq: paired-end assembler for
614 illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13:31. doi: 10.1186/1471-2105-13-31

615 McHugh TA, Gehring CA (2006) Below-ground interactions with arbuscular mycorrhizal
616 shrubs decrease the performance of pinyon pine and the abundance of its ectomycorrhizas.
617 *New Phytol* 171:171–178. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01735.x

618 Mello A, Lumini E, Napoli C, et al (2015) Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in the
619 *Tuber melanosporum* brûlé. *Fungal Biol* 119:518–527. doi: 10.1016/j.funbio.2015.02.003

620 Melo CD, Luna S, Krüger C, et al (2018) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi under
621 *Picconia azorica* in native forests of Azores. *Symbiosis* 74:43–54. doi: 10.1007/s13199-
622 017-0487-2

623 Mitchell M (2009) *Complexity: A Guided Tour*.

624 Montesinos-Navarro A, Segarra-Moragues JG, Valiente-Banuet A, Verdú M (2012) The
625 network structure of plant-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 194:536–547. doi:
626 10.1111/j.1469-8137.2011.04045.x

627 Moser AM, Frank JL, D’Allura JA, Southworth D (2009) Ectomycorrhizal communities of

628 *Quercus garryana* are similar on serpentine and nonserpentine soils. *Plant Soil* 315:185–
 629 194. doi: 10.1007/s11104-008-9743-9
 630 Mougi A, Kondoh M (2012) Diversity of interaction types and ecological community
 631 stability. *Science* (80-) 337:349–351. doi: 10.1126/science.1220529
 632 Mundra S, Bahram M, Tedersoo L, et al (2015) Temporal variation of *Bistorta vivipara*-
 633 associated ectomycorrhizal fungal communities in the High Arctic. *Mol Ecol* 24:6289–
 634 6302. doi: 10.1111/mec.13458
 635 Muthukumar T, Sathiyaraj G, Priyadharsini P, et al (2014) Arbuscular mycorrhizal and dark
 636 septate endophyte fungal associations in ferns and lycophytes of Palni Hills, Western
 637 Ghats, southern India. *Rev Bras Bot* 37:561–581. doi: 10.1007/s40415-014-0085-y
 638 Nara K (2006a) Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary
 639 succession. *New Phytol* 169:169–178.
 640 Nara K (2015a) The Role of Ectomycorrhizal Networks in Seedling Establishment and
 641 Primary Succession. En: Horton TR (ed) *Mycorrhizal networks*. Springer, pp 117–201
 642 Nara K (2006b) Pioneer dwarf willow may facilitate tree succession by providing late
 643 colonizers with compatible ectomycorrhizal fungi in a primary successional volcanic
 644 desert. *New Phytol* 171:187–198. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01744.x
 645 Nara K (2008) Community Developmental Patterns and Ecological Functions of
 646 Ectomycorrhizal Fungi: Implications from Primary Succession. En: Varma A (ed)
 647 *Mycorrhiza State Art, Genet. Mol. Biol. Eco-Function, Biotechnol. Eco-Physiology,*
 648 *Struct. Syst.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 581–599
 649 Nara K (2015b) The Role of Ectomycorrhizal Networks in Seedling Establishment and
 650 Primary Succession. En: Horton TR (ed) *Mycorrhizal Networks*. Springer Netherlands,
 651 Dordrecht, pp 177–201
 652 Nara K, Hogetsu T (2004) Ectomycorrhizal Fungi on Established Shrubs Facilitate
 653 Subsequent Seedling Establishment of Successional Plant Species. *Ecology* 85:1700–1707.
 654 Nguyen NH, Smith D, Peay K, Kennedy P (2015a) Parsing ecological signal from noise in
 655 next generation amplicon sequencing. *New Phytol* 205:1389–1393. doi:
 656 10.1111/nph.12923
 657 Nguyen NH, Song Z, Bates ST, et al (2015b) FUNGuild: An open annotation tool for parsing
 658 fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol* 1–8. doi:

10.1016/j.funeco.2015.06.006

- Okuyama T, Holland JN (2008) Network structural properties mediate the stability of mutualistic communities. *Ecol Lett* 11:208–216. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01137.x
- Olesen JM, Bascompte J, Dupont YL, Jordano P (2007) The modularity of pollination networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19891–19896. doi: 10.1073/pnas.0706375104
- Ortiz-Bibian MA, Blanco-García A, Lindig-Cisneros RA, et al (2017) Genetic Variation in *Abies religiosa* for Quantitative Traits and Delineation of Elevational and Climatic Zoning for Maintaining Monarch Butterfly Overwintering Sites in Mexico, considering Climatic Change. *Silvae Genet* 0:1–10. doi: 10.1515/sg-2017-0003
- Ouanphanivanh N, Merényi Z, Orczán ÁK, et al (2008) Could orchids indicate truffle habitats? Mycorrhizal association between orchids and truffles. *Acta Biol Szeged* 52:229–232.
- Overby ST, Owen SM, Hart SC, et al (2015) Soil microbial community resilience with tree thinning in a 40-year-old experimental ponderosa pine forest. *Appl Soil Ecol* 93:1–10. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.03.012
- Pärtel M, Bennett JA, Zobel M (2016) Macroecology of biodiversity: disentangling local and regional effects. *New Phytol* 211:404–410. doi: 10.1111/nph.13943
- Peay KG, Bruns TD (2014) Spore dispersal of basidiomycete fungi at the landscape scale is driven by stochastic and deterministic processes and generates variability in plant-fungal interactions. *New Phytol* 204:180–191. doi: 10.1111/nph.12906
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD (2008) Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *Bioscience* 58:799. doi: 10.1641/B580907
- Perry BA, Hansen K, Pfister DH (2007) A phylogenetic overview of the family Pyronemataceae (Ascomycota, Pezizales). *Mycol Res* 111:549–571. doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.014
- Pickles BJ, Simard SW (2016) Mycorrhizal Networks and Forest Resilience to Drought. *Mycorrhizal Mediat Soil Fertil Struct Carbon Storage*. doi: 10.1016/B978-0-12-804312-7.00018-8
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing.
- Ramirez MI, Sáenz-Romero C, Rehfeldt GE, Salas-Canela L (2015) Threats to the Availability of Overwintering Habitat in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve. En:

690 Oberhauser KS, Nail KR, Altizer S (eds) *Monarch. a Chang. World Biol. Conserv. an*
 691 *Iconic Butterfly*. Cornell University Press, Ithaca, New York., pp 157–168
 692 Rebollar EA, Sandoval-Castellanos E, Roessler K, et al (2017) Seasonal changes in a maize-
 693 based polyculture of central Mexico reshape the co-occurrence networks of soil bacterial
 694 communities. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2017.02478
 695 Redonda-Martínez R, Villaseñor-Ríos JL (2011) *Asteraceae Bercht & J. Presl. Flora Val.*
 696 *Tehuacán-Cuicatlán*. pp 1–64
 697 Rivas-Rivas M, Ramírez-Marcial N, Perales H, et al (2017) Survival and growth of three
 698 *Quercus* species under contrasting coverage conditions in southern Mexico. *Rev Chapingo*
 699 *Ser Ciencias For Y del Ambient* 23:275–288. doi: 10.5154/r.rchscfa.2017.01.001
 700 Ruacho-González L, González-Elizondo MS, González-Elizondo M, López-González C
 701 (2013) Diversidad florística en cimac de la Sierra Madre Occidental, México, y su relación
 702 con variables ambientales. *Bot Sci* 91:193–205.
 703 Rzedowski J (2006) Bosque de coníferas. En: CONABIO (ed) *Veg. México, 1a edn.*
 704 *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Ciudad de Mexico,*
 705 *pp 295–327*
 706 Sáenz-Romero C, Lindig-Cisneros RA, Joyce DG, et al (2016) Assisted migration of forest
 707 populations for adapting trees to climate change. *Rev Chapingo Ser Ciencias For y del*
 708 *Ambient* 22:303–323. doi: 10.5154/r.rchscfa.2014.10.052
 709 Sáenz-Romero C, Rehfeldt GE, Duval P, Lindig-Cisneros RA (2012) *Abies religiosa* habitat
 710 prediction in climatic change scenarios and implications for monarch butterfly
 711 conservation in Mexico. *For Ecol Manage* 275:98–106. doi: 10.1016/j.foreco.2012.03.004
 712 Sánchez-Velásquez LR, Domínguez-Hernández D, Pineda-López M del R, Lara-González R
 713 (2011) Does *Baccharis conferta* Shrub Act as a Nurse Plant to the *Abies religiosa*
 714 Seedling? *Open For Sci J* 4:67–70. doi: 10.2174/1874398601104010067
 715 Schloss P, Westcott SL, Ryabin T, Al. E (2009) Introducing mothur: Open–source, platform–
 716 independent, community–supported software for describing and comparing microbial
 717 communities. *Appl Env Microbiol* 75:7537–7541.
 718 Shade A, Peter H, Allison SD, et al (2012) Fundamentals of microbial community resistance
 719 and resilience. *Front Microbiol* 3:417. doi: 10.3389/fmicb.2012.00417
 720 Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al (2003) Cytoscape: a software environment for integrated

models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498–504.

Simard SW (2012) Mycorrhizal networks and seedling establishment in douglas-fir forests. En: Southworth D (ed) *Biocomplexity Plant-Fungal Interact.*, 1a edn. John Wiley & Sons, Oxford, UK, pp 85–107

Simard SW, Beiler KJ, Bingham MA, et al (2012) Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biol Rev* 26:39–60. doi: 10.1016/j.fbr.2012.01.001

Smith JE, Johnson KA, Cázares E (1998) Vesicular mycorrhizal colonization of seedlings of Pinaceae and Betulaceae after spore inoculation with *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 7:279–285. doi: 10.1007/s005720050193

Smith ME, Trappe JM, Rizzo DM (2006) *Genea*, *Genabea* and *Gilkeya* gen. nov.: ascomata and ectomycorrhiza formation in a *Quercus* woodland Matthew. *Mycologia* 98:699–716. doi: 10.1080/15572536.2006.11832642

Smith SE, Read D (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3a edn. AP Press, London

Southworth D, Carrington EM, Frank JL, et al (2009) Mycorrhizas on nursery and field seedlings of *Quercus garryana*. *Mycorrhiza* 19:149–158. doi: 10.1007/s00572-008-0222-1

Taudiere A, Munoz F, Lesne A, et al (2015) Beyond ectomycorrhizal bipartite networks: projected networks demonstrate contrasted patterns between early- and late-successional plants in Corsica. *Front Plant Sci* 6:1–14. doi: 10.3389/fpls.2015.00881

Tedersoo L (2017) Global Biogeography and Invasions of Ectomycorrhizal Plants: Past, Present and Future. En: Tedersoo L (ed) *Biogeogr. Mycorrhizal Symbiosis*. Springer International Publishing, Cham, pp 469–531

Tedersoo L, Bahram M, Cajthaml T, et al (2015) Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *ISME J* 10:346–362. doi: 10.1038/ismej.2015.116

Tedersoo L, Bahram M, Pölme S, et al (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* (80-) 346:1–10. doi: 10.1126/science.1256688

Tedersoo L, Smith ME (2013) Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biol Rev* 27:83–99. doi: 10.1016/j.fbr.2013.09.001

Toju H, Guimarães PR, Olesen JM, Thompson JN (2015) Below-ground plant-fungus network topology is not congruent with above-ground plant-animal network topology. *Sci*

752 Adv 1:1–11. doi: 10.1126/sciadv.1500291
 753 Toju H, Sato H, Tanabe AS (2014) Diversity and spatial structure of belowground plant-
 754 fungal symbiosis in a mixed subtropical forest of ectomycorrhizal and arbuscular
 755 mycorrhizal plants. PLoS One 9:24–26. doi: 10.1371/journal.pone.0086566
 756 Toju H, Tanabe AS, Sato H (2018) Network hubs in root-associated fungal metacommunities.
 757 bioRxiv 270371:1–5.
 758 Truong C, Mujic AB, Healy R, et al (2017) How to know the fungi: combining field
 759 inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. New Phytol 214:913–919.
 760 doi: 10.1111/nph.14509
 761 van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and
 762 evolution: The past, the present, and the future. New Phytol 205:1406–1423. doi:
 763 10.1111/nph.13288
 764 Vicente Martínez Arévalo J (2013) Plantas asociadas a los bosques de abies guatemalensis
 765 (Pinaceae) del occidente de guatemala. Rev Biol Trop 61:321–333.
 766 Wagg C, Pautler M, Massicotte HB, Peterson RL (2008) The co-occurrence of
 767 ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal, and dark septate fungi in seedlings of four
 768 members of the Pinaceae. Mycorrhiza 18:103–110. doi: 10.1007/s00572-007-0157-y

769

Tabla suplementaria 1. Lista plantas asociadas con plántulas de *Abies religiosa*.

Nombre científico	Familia	Grupo
<i>Abies religiosa</i> (Kunth) Schltdl. & Cham. (adulto)	Pinaceae	Gymnosperma
<i>Abies religiosa</i> (Kunth) Schltdl. & Cham. (plántula)	Pinaceae	Gymnosperma
<i>Acaena elongata</i> L.	Rosaceae	Angiosperma
<i>Baccharis conferta</i> Kunth	Compositae	Angiosperma
<i>Buddleja cordata</i> Kunth	Scrophulariaceae	Angiosperma
<i>Cestrum thyrsoides</i> Kunth	Solanaceae	Angiosperma
<i>Comarostaphylis discolor</i> (Hook.) Diggs	Ericaceae	Angiosperma
<i>Dryopteris pseudofilix-mas</i> (Fée) Rothm.	Dryopteridaceae	Pteridophytas
<i>Fuchsia thymifolia</i> Kunth	Onagraceae	Angiosperma
<i>Muhlenbergia macroura</i> (Humb., Bonpl. & Kunth) Hitchc.	Poaceae	Angiosperma
<i>Muhlenbergia nigra</i> Hitchc.	Poaceae	Angiosperma
<i>Pinus</i> sp.	Pinaceae	Gymnosperma
<i>Roldana angulifolia</i> (DC.) H. Rob. & Brettell	Compositae	Angiosperma
<i>Roldana barba-johannis</i> H. Rob. & Brettell	Compositae	Angiosperma
<i>Salix paradoxa</i> Kunth	Salicaceae	Angiosperma
<i>Sambucus nigra</i> L.	Adoxaceae	Angiosperma
<i>Solanum pubigerum</i> Dunal	Solanaceae	Angiosperma
<i>Symphoricarpos microphyllus</i> (Humb. & Bonpl. ex Schult.) Kunth	Caprifoliaceae	Angiosperma
No determinada (<i>Garrya laurifolia</i> ?)	/	Angiosperma

770

771

772

773

774

775

776

777 **Tabla suplementaria 2. Matriz de especies de hongos por sitio de muestreo.**

778 Como archivo: Tablas S2-4. xlsx

779

780 **Tabla suplementaria 3. Especies y número de secuencias por hospedero y sitio de muestreo.**

781 Como archivo: Tablas S2-4. xlsx

782

783 **Tabla suplementaria 4. Especies simbiosntes y número de secuencias por hospedero.**

784 Como archivo: Tablas S2-4. xlsx

785

786 **Tabla suplementaria 5. Tipo de conectores importantes en los ecosistemas asociados con *Abies* spp., calculados con *netcarto*.**

	Jia et al 2017				Taudiere et al. 2015			Este trabajo		
	Papel	Especies de planta	Especies de hongo	Identidad	Especies de planta	Especies de hongo	Identidad	Especies de planta	Especies de hongo	Identidad
Tipo de conector	Kinless	3	0	<i>Larix kaempferi</i> , <i>Pyrola incarnata</i> , Others	0	15	<i>Russula persicina</i> , <i>Clavulina coralloides</i> , <i>Thelephora terrestris</i> , <i>Amanita vaginata</i> f. <i>alba</i> , <i>Clavulina cinerea</i> , <i>Humaria hemisphaerica</i> , <i>Inocybe geophylla</i> , <i>Tricholoma scalpturatum</i> , <i>Inocybe mixtilis</i> , <i>Amanita rubescens</i> , <i>Cantharellus pallens</i> , <i>Xerocomus communis</i> , <i>Amanita citrina</i> , <i>Boletus</i>	19	0	<i>Abies religiosa adults</i> <i>Abies religiosa saplings</i> <i>Acaena elongata</i> <i>Baccharis conferta</i> <i>Buddleja cordata</i> <i>Cestrum thyrsoides</i> <i>Comarostaphylis discolor</i> <i>Dryopteris pseudofilix-mas</i> <i>Fuchsia thymifolia</i> <i>Muhlenbergia macroura</i> <i>Muhlenbergia</i>

							<i>edulis</i> , <i>Craterellus tubaeformis</i> , <i>Laccaria amethystina</i>			<i>nigra</i> <i>Pinus sp.</i> <i>Roldana angulifolia</i> <i>Roldana barba-johannis</i> <i>Salix paradoxa</i> <i>Sambucus nigra</i> <i>Solanum pubigerum</i> <i>Symphoricarpos microphyllus</i> <i>No determinada</i> (<i>Garrya laurifolia</i> ?)
	<i>Kinless hub</i>	0	0		0	0		0	0	
	<i>Connector</i>	4	0	<i>Abies veitchii</i> , <i>Pyrola alpina</i> , <i>Betula ermanii</i> , <i>Orthilia secunda</i>	0	1	<i>Alnus alnobetula</i>	0	0	
	<i>Connector Hub</i>	0	0		0	8	<i>Xerocomus subtomentosus</i> _410 <i>Zelleromyces josserandii</i> _411 <i>Xerocomus rubellus</i> _409 <i>Xerocomus communis</i> _403 <i>Xerocomus ichnusanus</i> _405 <i>Xerocomus pruinatus</i> _406 <i>Xerocomus ripariellus</i> _407 <i>Xerocomus</i>	0	0	

							<i>badius_401</i>			
	<i>Peripheral</i>	0	0		0	76		0	0	
	<i>Peripheral Hub</i>	0	7	<i>Hebeloma</i> sp. 1, <i>Russula</i> sp. 1, <i>Cenococcum</i> sp. 1, <i>Cortinarius</i> sp. 1, <i>Cortinarius</i> sp. 2, <i>Cortinarius</i> sp. 3, <i>Thelephoraceae</i> sp. 1	0	9	<i>Xerocomus chrysenteron_402</i> , <i>Tricholoma ustale_396</i> , <i>Xerocomus armeniacus_400</i> , <i>Tricholoma resplendens_389</i> , <i>Tricholoma saponaceum_390</i> , <i>Tricholoma sciodes_392</i> , <i>Tricholoma sejunctum_393</i> , <i>Tricholoma sulphureum_394</i> , <i>Tricholoma terreum_395</i>	0	10	<i>Cortinariaceae</i> sp. 965 SH033131.07FU, <i>Rhodoscypa</i> sp. 466 SH208437.07FU, <i>Russula firmula_2</i> KX812987, <i>Genea</i> sp. 24 SH191238.07FU, <i>Inocybe</i> sp. 926 SH006731.07FU, <i>Inocybe geophylla_1030</i> SH176304.07FU, <i>Tomentella</i> sp. 616 SH179214.07FU, <i>Helvella</i> sp. 2500 SH179585.07FU, <i>Clavulina</i> sp. 51 SH220214.07FU, <i>Cortinarius</i> sp. 972 SH222334.07FU
	<i>Ultra peripheral</i>	0	173		15	302	<i>Castanea sativa</i> , <i>Abies alba</i> , <i>Pinus nigra subsp. laricio</i> , <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Quercus suber</i> , <i>Quercus ilex</i> , <i>Halimium halimifolium</i> , <i>Alnus</i>	0	454	

							<i>cordata, Salix sp., Cistus sp., Alnus glutinosa, Populus alba, Corylus avellana, Betula pendula</i>			
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

787 **Tabla suplementaria 6. Índices de red todos los sitios comparado con los datos de Jia et al. (2017) y Taudiere et al. (2015)**

Parámetro	Todos los sitios	Jia et al. 2017	Taudiere et al. 2015
Hospederos vegetales	19	7	16
Especies de hongos	464	180	411
Número de nodos	483	187	427
Número de enlaces	3654	710	1986
“Camino más corto promedio” (<i>Average shortest path length</i>)	2.715±0.436	2.959±0.423	3.204±0.461
<i>Betweenness centrality</i>	0.0031±0.020	0.0105±0.044	0.005±0.027
<i>Closeness centrality</i>	0.377±0.056	0.345±0.054	0.319±0.049
<i>Network density</i>	0.016	0.02	0.011
<i>Network heterogeneity</i>	2.932	2.668	3.272
<i>Network centralization</i>	0.488	0.387	0.454
Grado máximo	242	75	197
Estadístico KS (ajuste de distribución de potencias)	0.057	0.052	0.052
Valor de probabilidad del estadístico KS	0.458	0.948	0.505
Conectancia	0.207	0.282	0.151

Coefficiente de agrupamiento	0.200	0.244	0.091
<i>interaction specialization</i> (H^2),	0.665	0.360	0.000
<i>weighted NODF</i>	18.732	12.961	0*
<i>NODF2</i>	39.736	34.986	28.654
<i>C-score</i>	0.482	0.490	0.583
<i>Checker-score</i>	3287.830	1075.524	1536.775
Número de módulos	22	8	18
Número de nodos en el módulo más grande	462	180	351
Conectividad (>2.5)	10	7	17
Especies con mayor valor de conectividad	Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU	<i>Cenococcum</i> sp._1	<i>Xerocomus subtomentosus</i> _410
Planta con el mayor valor de grado	<i>A. religiosa</i> plántula	<i>Pyrola incarnata</i>	<i>Quercus ilex</i>

Hongo con el mayor valor de grado	<i>Tomentella</i> sp._215 SH002650.07FU	<i>Cenococcum</i> sp._1	<i>Xerocomus roseoalbidus</i> , <i>Xerocomus rubellus</i> , <i>Xerocomus sibtomentosus</i> , <i>Zelleromyces josserand</i>
Grado del hongo con mayor valor de grado	15	6	12

***Los datos originales son de incidencia por lo que no se puede calcular el valor**

788
789
790
791
792
793
794

795 **Tabla suplementaria 7. Índices de red para todos los sitios.**

Todos los sitios									
Mayor conectividad (hongo)	valor	Mayor grado (hongo)	valor	Mayor conectividad (planta)	valor	“Camino más corto promedio” (hongo)	valor	Camino más corto promedio (planta)	valor
Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU	3.146	<i>Tomentella</i> sp._215 SH002650.07FU	15	<i>Abies religiosa</i> plántula	242.000	<i>Rhodoscypa</i> sp._466 SH208437.07FU	2.031	<i>Abies religiosa</i> plántula	1.959
<i>Rhodoscypa</i> sp._466 SH208437.07FU	3.067	Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU	15	<i>Abies religiosa</i> adulto	236.000	<i>Genea</i> sp._24 SH191238.07FU	2.039	<i>Abies religiosa</i> adulto	1.983
<i>Russula firmula</i> _2 KX812987	3.025	<i>Genea</i> sp._24 SH191238.07FU	15	<i>Salix paradoxa</i>	171.000	Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU	2.048	<i>Salix paradoxa</i>	2.253

796

797 **Tabla suplementaria 8. Índices de red para cada sitio de muestreo.**

Cada sitio												
	ZMX1		ZMX2		ZMX3		ZMX4		ZMX5		ZMX6	
	Especie	Valor	Especie	Valor	Especie	Valor	Especie	Valor	Especie	Valor	Especie	Valor
Mayor grado (planta)	<i>Abies religiosa</i> adulto	90	<i>Salix paradoxa</i>	104	<i>Dryopteris pseudofilix-mas</i>	78	<i>Abies religiosa</i> adult	90	<i>Muhlenbergia macroura</i>	48	<i>Abies religiosa</i> sapling	79
	<i>Abies religiosa</i> plántula	82	<i>Muhlenbergia nigra</i>	93	<i>Abies religiosa</i> plántula	71	<i>Abies religiosa</i> plántula	66	<i>Baccharis conferta</i>	37	<i>Fuchsia thymifolia</i>	58
	<i>Salix paradoxa</i>	79	<i>Abies religiosa</i> plántula	93	<i>Fuchsia thymifolia</i>	70	<i>Acaena elongata</i>	48	<i>Roldana barba-johannis</i>	30	<i>Abies religiosa</i> adulto	53
Menor “camino más corto	<i>Abies religiosa</i> adulto	2.21	<i>Salix paradoxa</i>	2.25	<i>Dryopteris pseudofilix-mas</i>	2.35	<i>Abies religiosa</i> adulto	2.03	<i>Muhlenbergia macroura</i>	2.38	<i>Abies religiosa</i> plántula	2.29

promedio” (planta)	<i>Abies religiosa</i> plántula	2.28	<i>Muhlenbergia</i> <i>nigra</i>	2.33	<i>Abies religiosa</i> plántula	2.41	<i>Abies religiosa</i> plántula	2.27	<i>Baccharis conferta</i>	2.42	<i>Fuchsia thymifolia</i>	2.44
	<i>Salix paradoxa</i>	2.31	<i>Abies religiosa</i> plántula	2.33	<i>Fuchsia thymifolia</i>	2.42	<i>Acaena elongata</i>	2.46	<i>Abies religiosa</i> plántula	2.53	<i>Roldana barba-johannis</i>	2.53
Mayor grado (hongo)	<i>Endogone</i> sp._144 SH213348.07 FU	5	<i>Humaria</i> sp._904 SH179622.07F U	7	Cortinariace ae sp._965 SH033131.0 7FU	7	<i>Tomentella</i> sp._215 SH002650.0 7FU	8	<i>Geopora cooperi</i> _1718 SH194828.07 FU	5	<i>Inocybe argenteolutea</i> _1129 SH191103.07F U	6
	<i>Endogone</i> sp._152 SH213348.07 FU	5	<i>Rhodocypha</i> sp._466 SH208437.07F U	7	<i>Genea</i> sp._24 SH191238.0 7FU	6	<i>Genea</i> sp._24 SH191238.0 7FU	8	<i>Genea</i> sp._24 SH191238.07 FU	5	Claroideoglom eraceae sp._766 KX115998	6
	<i>Genea</i> sp._24 SH191238.07 FU	4	<i>Russula firmula</i> _2 KX812987	7	<i>Rhodocypha</i> a sp._466 SH208437.0 7FU	6	<i>Clavulina</i> sp._51 SH220214.0 7FU	7	<i>Hydnobolites</i> sp._1217 SH022820.07 FU	5	<i>Russula firmula</i> _2 KX812987	5
									Hymenogaster parksii_2432 SH218860.07 FU	5		
									Glomeraceae sp._1319 SH199967.07 FU	5		

									Hydnotrya cerebriformis _1151 SH210478.07 FU	5		
Menor “camino más corto promedio (hongo)	<i>Endogone</i> sp. 144 SH213348.07 FU	1.979	<i>Humaria</i> sp. 904 SH179622.07F U	1.976	<i>Rhodoscyp</i> <i>a</i> sp. 466 SH208437.0 7FU	2.143	<i>Genea</i> sp. 24 SH191238.0 7FU	1.964	<i>Geopora</i> <i>cooperi</i> 1718 SH194828.07 FU	2.348	<i>Russula</i> <i>firmula</i> 2 KX812987	2.268
	<i>Endogone</i> sp. 152 SH213348.07 FU	1.979	<i>Russula</i> <i>firmula</i> 2 KX812987	1.976	Cortinariace ae sp. 965 SH033131.0 7FU	2.183	<i>Tomentella</i> sp. 215 SH002650.0 7FU	1.964	Glomeraceae sp. 1319 SH199967.07 FU	2.447	<i>Genea</i> sp. 24 SH191238.07F U	2.386
	<i>Genea</i> sp. 24 SH191238.07 FU	2.064	<i>Rhodoscyp</i> <i>ha</i> sp. 466 SH208437.07F U	1.976	<i>Genea</i> sp. 24 SH191238.0 7FU	2.325	<i>Hydnobolite</i> <i>s</i> sp. 1217 SH022820.0 7FU	2.192	<i>Hymenogaster</i> sp. 1563 SH204370.07 FU	2.645	<i>Endogone</i> sp. 144 SH213348.07F U	2.423
Mayor conectivida d	<i>Endogone</i> sp. 144 SH213348.07 FU	3.948	<i>Humaria</i> sp. 904 KF041357	3.593	Cortinariace ae sp. 965 SH033131.0 7FU	3.848	<i>Genea</i> sp. 24 SH191238.0 7FU	3.554	Glomeraceae sp. 1319 SH199967.07 FU	3.024	<i>Russula</i> <i>firmula</i> 2 KX812987	3.664
	<i>Endogone</i> sp. 152 SH213348.07 FU	3.948	<i>Rhodoscyp</i> <i>ha</i> sp. 466 SH208437.07F U	3.593	<i>Rhodoscyp</i> <i>h</i> <i>a</i> sp. 466 SH208437.0 7FU	3.502	<i>Tomentella</i> sp. 215 SH002650.0 7FU	3.554	<i>Geopora</i> <i>cooperi</i> 1718 SH194828.07 FU	2.855	<i>Genea</i> sp. 24 SH191238.07F U	2.800

	<i>Genea</i> sp._24 SH191238.07 FU	3.487	<i>Russula_firmul</i> a_2 KX812987	3.593	<i>Genea</i> sp._24 SH191238.0 7FU	3.115	<i>Clavulina</i> sp._51 SH220214.0 7FU	2.814	<i>Hymenogaster</i> <i>parksii</i> _2432 SH218860.07 FU	2.753	<i>Endogone</i> sp._144 SH213348.07F U	2.762
--	--	-------	---------------------------------------	-------	---	-------	---	-------	--	-------	---	-------

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816 Tabla suplementaria 9. Glosario de términos relativos a las métricas de las redes.

Concepto	Traducción aproximada	Descripción	Referencia
<i>Average shortest path</i>	Camino más corto promedio	El número promedio de pasos a lo largo del camino más corto entre todos los posibles pares de nodo (Característico de las redes de mundo pequeño)	Albert R, Barabási A-L (2002) Statistical mechanics of complex networks. Rev Mod Phys 74:47–97. doi: 10.1103/RevModPhys.74.47
<i>Betweenness centrality</i>		El grado de un nodo, relativo a la distribución de grado de toda la red; describe la contribución de nodos a la conectividad de la red con respecto a su posición topológica en la red	Beiler KJ, Durall DM, Simard SW, et al (2010) Architecture of the wood-wide web: Rhizopogon spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. New Phytol 185:543–553. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03069.x
<i>Checker</i>		Patrón de tablero de ajedrez. Es una medida de anidamiento no normalizada (Comparar con la versión normalizada ó C-score	

<i>Closeness centrality</i>		La distancia promedio de un nodo a otro nodo	Newman MEJ (2010) Chapter 7. Measures and Metrics. Networks: an Introduction. Oxford University Press. New York.
<i>Cluster coefficient</i>	Coefficiente de agrupamiento	El promedio de la fracción de los enlaces posibles sobre todos los vértices de sus vecinos cercanos.	Williams RJ, Berlow EL, Dunne JA, et al (2002) Two degrees of separation in complex food webs. Proc Natl Acad Sci U S A 99:12913–6. doi: 10.1073/pnas.192448799
<i>Connectance</i>	Conectancia	Fracción de todos los posibles enlaces que se llevan a cabo (enlaces/nodos ²)	Williams RJ, Berlow EL, Dunne JA, et al (2002) Two degrees of separation in complex food webs. Proc Natl Acad Sci U S A 99:12913–6. doi: 10.1073/pnas.192448799
<i>Connectivity</i>	Conectividad	Mide que tan bien está conectado (el número de enlaces) un nodo a otros nodos en un módulo, y hacia nodos afuera del propio modulo. Los modulos tendrán nodos con valores similares de enlaces dentro del modulo que con otro diferente	Guimera R, Amaral LAN (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. Nature 433:895–900. doi: 10.1038/nature03286.1.

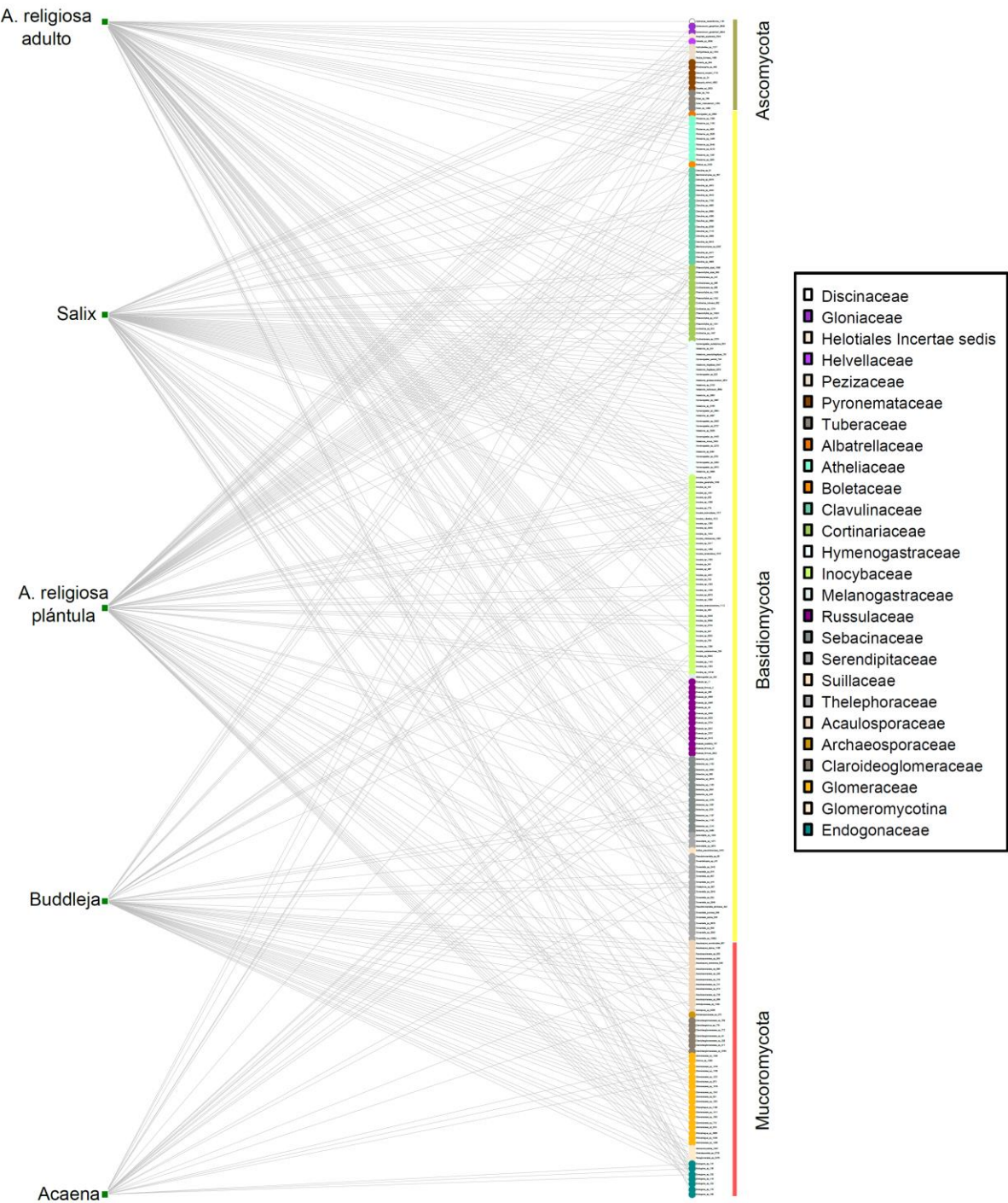
<i>Connector hubs</i>		nodos concentradores con muchos enlaces a la mayoría de otros módulos	Guimera R, Amaral LAN (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. Nature 433:895–900. doi: 10.1038/nature03286.1.
<i>C-score (checkerboard score)</i>		Patrón de tablero de ajedrez. Es una medida de anidamiento (Mean (normalised) number of checkerboard)	Stone L, Roberts A (1990) The checkerboard score and species distributions. Oecologia 85:74–79. doi: 10.1007/BF00317345
<i>Degree</i>	Grado	Número de enlaces de un nodo a otro	Beiler KJ, Durall DM, Simard SW, et al (2010) Architecture of the wood-wide web: Rhizopogon spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. New Phytol 185:543–553. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03069.x
<i>Degree distribution</i>	Distribución de grado	Distribución de probabilidad del grado sobre toda la red	Albert R, Barabási A-L (2002) Statistical mechanics of complex networks. Rev Mod Phys 74:47–97. doi: 10.1103/RevModPhys.74.47
H^2 (interaction specialization)		Es una medida del nivel de especialización de los elementos de toda la red	Blüthgen N, Menzel F, Blüthgen N (2006) Measuring specialization in species interaction networks. BMC Ecol. 6:
<i>Hub</i>	Concentrador	Un nodo con un alto grado de conectividad relativa la distribución de grado promedio	Beiler KJ, Durall DM, Simard SW, et al (2010) Architecture of the wood-wide web: Rhizopogon spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. New Phytol 185:543–553. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03069.x

<i>Kinless hubs</i>		Nodos concentradores con enlaces homogeneamente distribuidos entre todos los modulos	Guimera R, Amaral LAN (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. Nature 433:895–900. doi: 10.1038/nature03286.1.
<i>Link</i>	Enlace	Conexión entre dos nodos (vértices)	Beiler KJ, Durall DM, Simard SW, et al (2010) Architecture of the wood-wide web: Rhizopogon spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. New Phytol 185:543–553. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03069.x
<i>Modularity</i>	Modularidad	Comunidades de nodos que interactuan más entre si que con otras comunidades	Guimera R, Amaral LAN (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. Nature 433:895–900. doi: 10.1038/nature03286.1.
<i>Nestedness</i>	Anidamiento	Una matriz está anidada si los especialistas interactúan con un subconjunto del conjunto de especies con el que las generalistas interactúan	Almeida-Neto M, Ulrich W (2011) A straightforward computational approach for measuring nestedness using quantitative matrices. Environ Model Softw 26:173–178. doi: 10.1016/j.envsoft.2010.08.003 Atmar W, Patterson BD (1993) The measure of order and disorder in the distribution of species in fragmental habitat. Oecologia 96:373–382. doi: 10.1007/BF00317508

<i>Node</i>	Nodo	Un vértice en una grafo	Beiler KJ, Durall DM, Simard SW, et al (2010) Architecture of the wood-wide web: Rhizopogon spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. New Phytol 185:543–553. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03069.x Atmar W, Patterson BD (1993) The measure of order and disorder in the distribution of species in fragmental habitat. Oecologia 96:373–382. doi: 10.1007/BF00317508
<i>NODF2 (nestedness metric based on overlap and decreasing fill)</i>		Calcula el anidamiento por pares de filas y columnas. El anidamiento promedio es calculado para ambos. Finalmente, se calcula el anidamiento total por la suma de todas las combinaciones de pares de filas y columnas divididos por el total de números de pares	Almeida-Neto M, Guimarães PR, Guimarães PRJ, et al (2008) A consistent metric for nestedness analysis in ecological systems: reconciling concept and measurement. Oikos 117:13. doi: 10.1111/j.2008.0030-1299.16644.x
<i>non-hub connector nodes</i>		Nodos con muchos enlaces a otros módulos	Guimera R, Amaral LAN (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. Nature 433:895–900. doi: 10.1038/nature03286.1.
<i>Non-hub kinless nodes</i>		nodos con enlaces homogéneamente distribuidos entre todos los módulos	Guimera R, Amaral LAN (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. Nature 433:895–900. doi: 10.1038/nature03286.1.

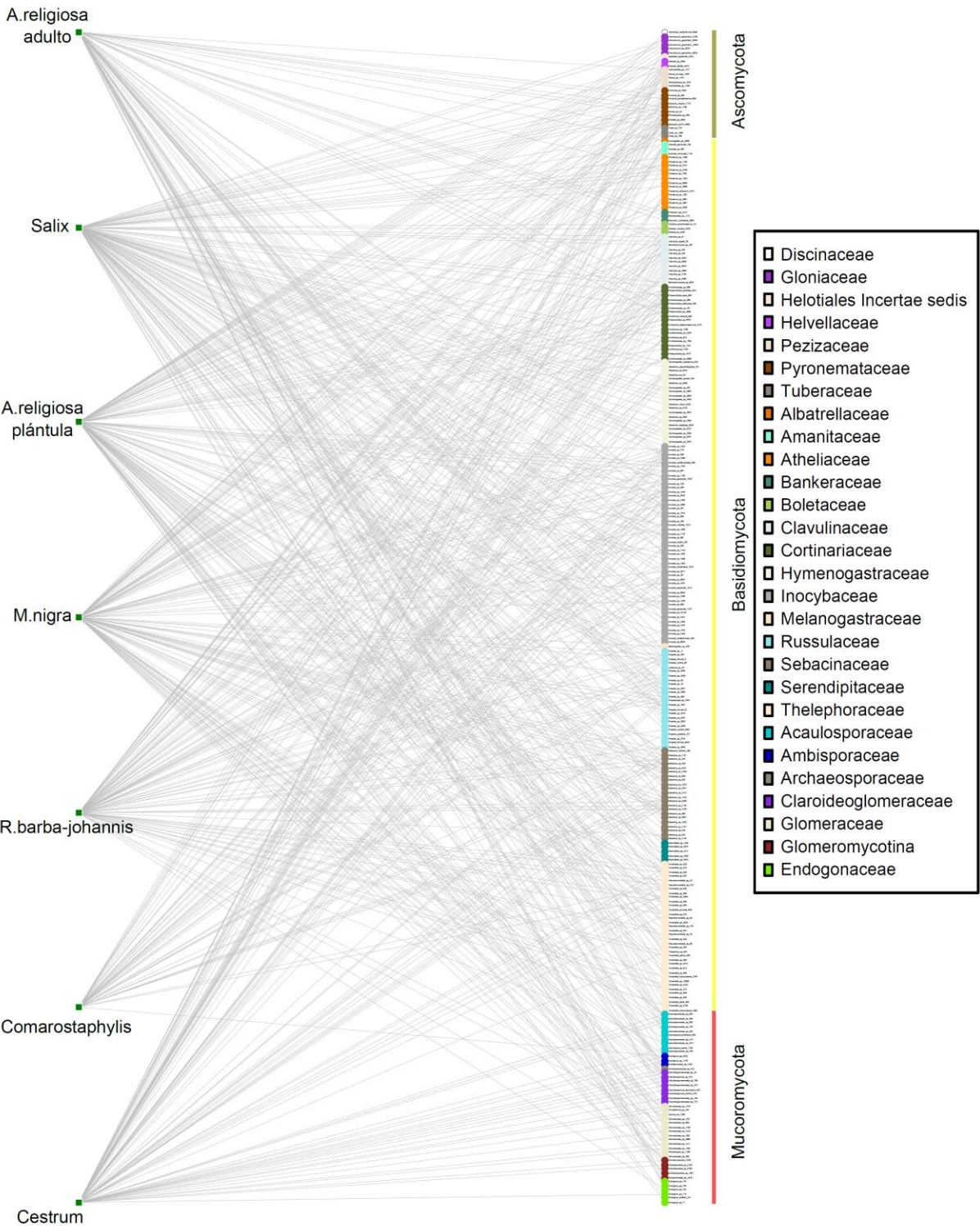
<i>Peripheral nodes</i>		Nodos con la mayoría de sus enlaces dentro del modulo	Guimera R, Amaral LAN (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. Nature 433:895–900. doi: 10.1038/nature03286.1.
<i>Power of law distribution</i>	Distribución de potencias	La probabilidad de que un nodo k esté conectado a otro es proporcional a $K^{-\gamma}$ (es decir, pocos elementos están muy conectados y la enorme mayoría tienen pocas conexiones).	Barabási A-L, Albert R (1999) Emergence of Scaling in Random Networks. Science (80-) 286:509 LP-512.
<i>Provincial hubs</i>		nodos concentradores con la vasta mayoría de enlaces dentro de su modulo	Guimera R, Amaral LAN (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. Nature 433:895–900. doi: 10.1038/nature03286.1.
<i>Ultra-peripheral node</i>		Nodos con todos sus enlaces dentro del modulo	Guimera R, Amaral LAN (2005) Functional cartography of complex metabolic networks. Nature 433:895–900. doi: 10.1038/nature03286.1.
WNODE (<i>Weighted nestedness metric based on overlap and decreasing fill</i>)		Calcula el anidamiento por pares de filas y columnas. El anidamiento promedio es calculado para ambos. Finalmente, se calcula el anidamiento total por la suma de todas las combinaciones de pares de filas y columnas divididos por el total de números de pares. Este es usado para datos de <u>abundancia</u>	Almeida-Neto M, Ulrich W (2011) A straightforward computational approach for measuring nestedness using quantitative matrices. Environ Model Softw 26:173–178. doi: 10.1016/j.envsoft.2010.08.003

817 **Figura suplementaria 1. Red bipartita del sitio ZMX1**



818
819
820

821 **Figura suplementaria 2. Red bipartita del sitio ZMX2**

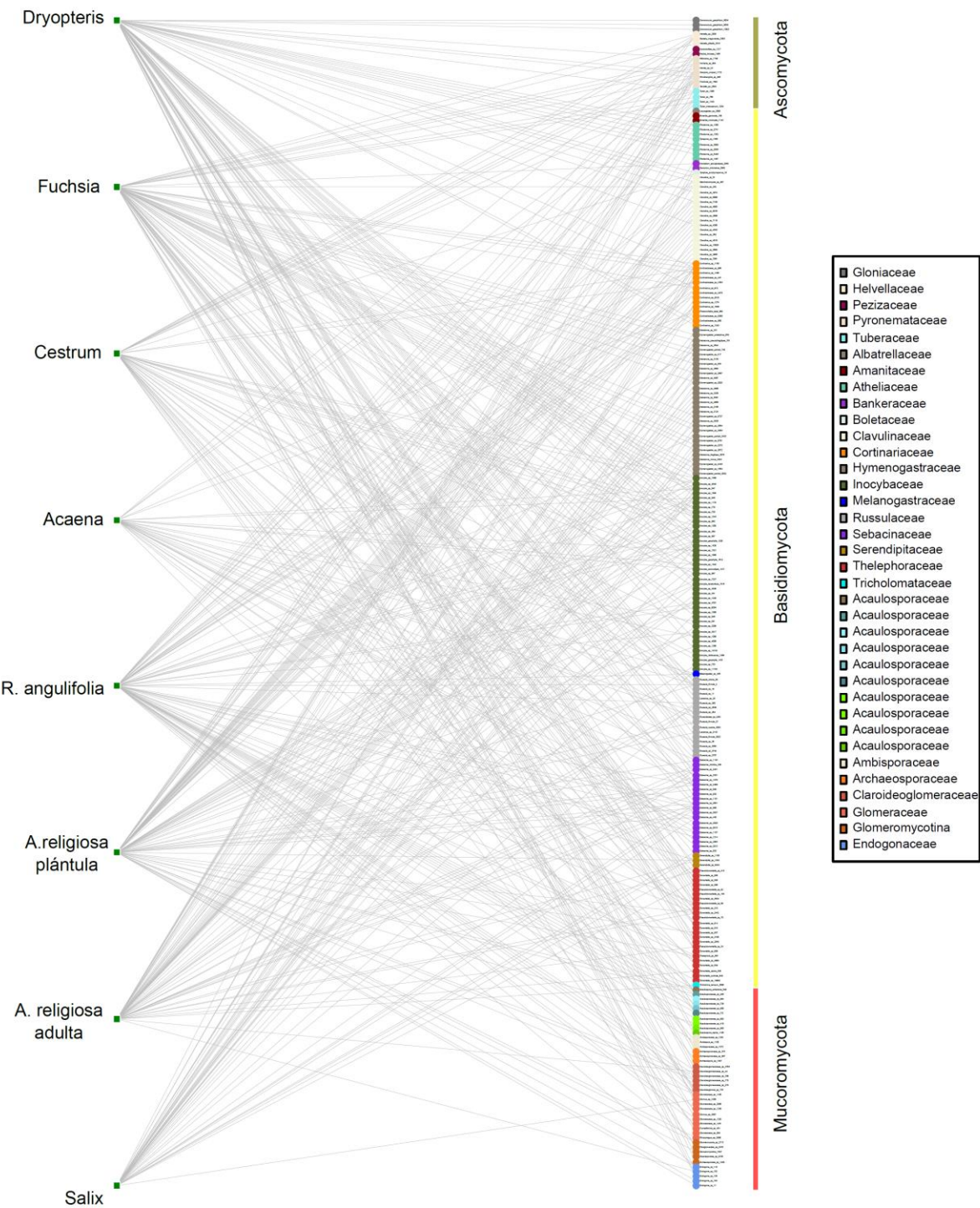


822

823

824

825 **Figura suplementaria 3. Red bipartita del sitio ZMX3**

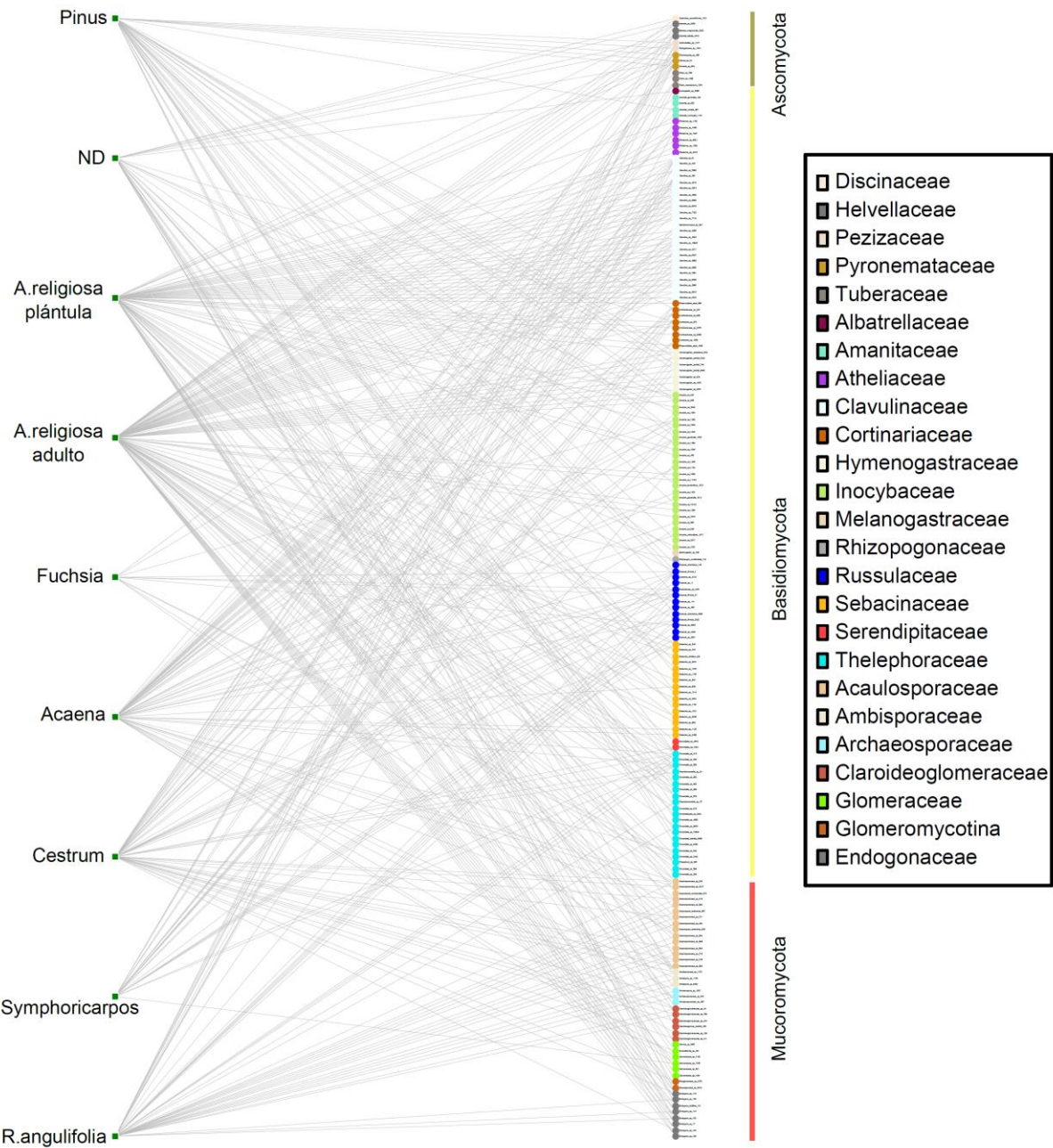


826

827

828

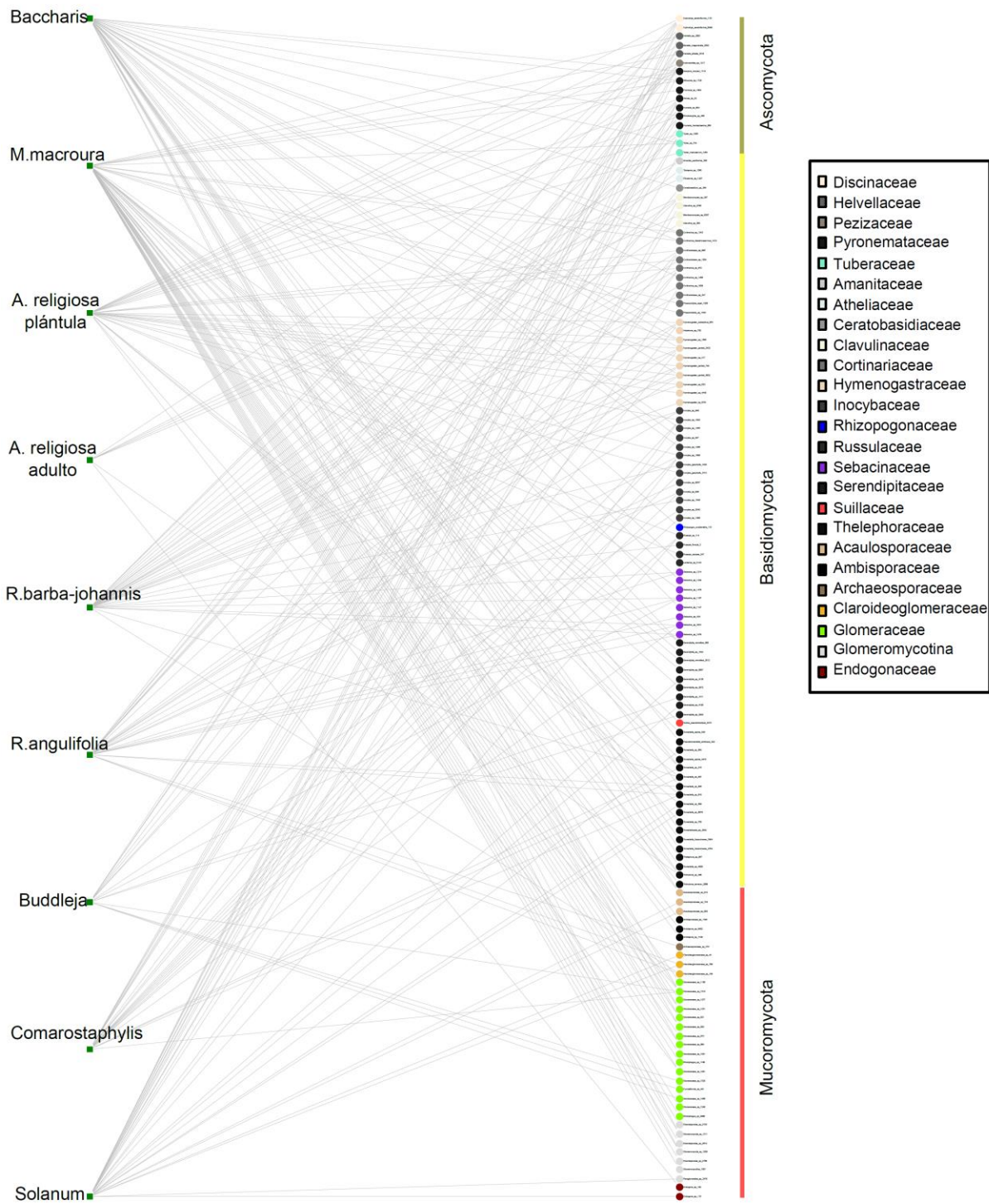
829 **Figura suplementaria 4. Red bipartita del sitio ZMX4**



830

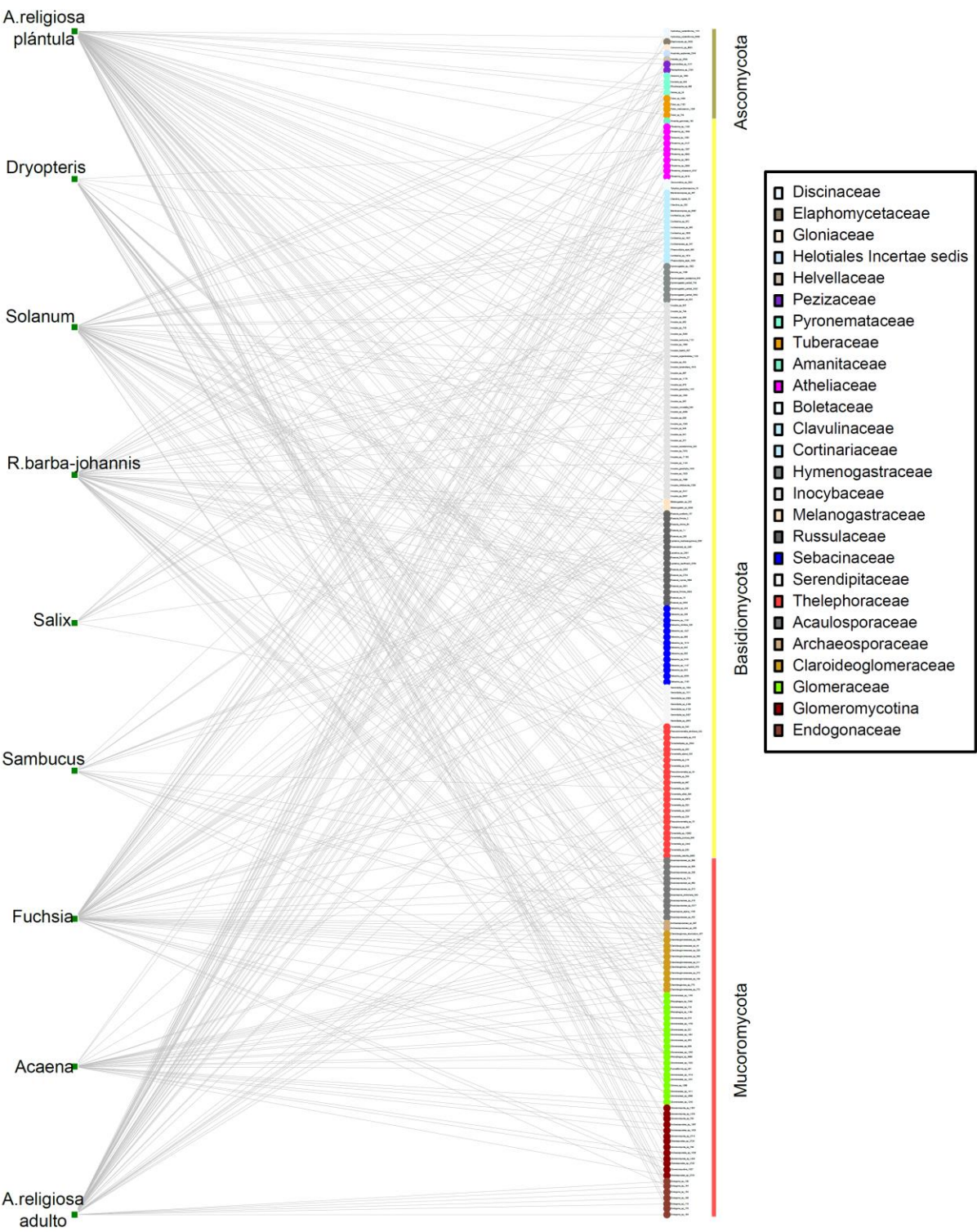
831

Figura suplementaria 5. Red bipartita del sitio ZMX5



836

837 **Figura suplementaria 6. Red bipartita del sitio ZMX6**



838

Discusión general

Cuando los bosques tienen un disturbio antropogénico como la tala, la compactación o la erosión del suelo, los sitios muy perturbados no logran mantener las comunidades de hongos necesarias para el establecimiento de nuevas plántulas, y por consecuencia no se regenera el bosque (Grossnickle y Ivetić 2017). El conocimiento de la diversidad fúngica presente en el suelo es importante, porque permite documentar a los hongos ectomicorrizógenos asociados con las plantas en condiciones normales (Beiler et al 2010; Toju et al 2013; Bahram et al 2013; Taudiere et al 2015). Asimismo, debido a que las comunidades de hongos ectomicorrizógenos de los bosques saludables y los declinantes, tienen una composición diferente (Horton et al 2013) es necesario tener el inventario de la diversidad de hongos para el éxito de cualquier proyecto de reforestación. Esto se debe a que las plantas pueden no establecerse en un sitio nuevo porque no están los hongos ectomicorrizógenos compatibles, y estos deben ser añadidos con la planta para mejorar el establecimiento (Gómez-Romero et al 2013; Castillo-Argüero et al 2014). No obstante, el hongo añadido puede ser desplazado por los hongos nativos (Flores-Rentería et al 2017), siendo la micorrización en vivero un desperdicio de recursos. Por lo tanto, el inventario de los hongos específicos y los generalistas de *Abies religiosa*, es de vital importancia para los proyectos de reintroducción o migración asistida de esta especie, porque permite conocer en que sitio se encuentran en mayor abundancia, y puede aumentar la probabilidad de establecimiento de la especie o ser añadidos directamente en el vivero.

En el capítulo I, demostramos que *Clavulina reae* SH300397.07FU ($\equiv$ *Clavulina cinerea* var. *gracillis*) reportada en este capítulo como *Clavulina* cf. *cinerea* (No. Genbank: KP645350) es el hongo más frecuente y abundante que coloniza las raíces de *Abies religiosa*. Este hongo coloniza también *Alnus acuminata* (Kennedy et al 2011), *Pinus montezumae* (Reverchon et al 2012), y es un hongo dominante a nivel de ectomicorrizas en un ambiente perturbado de *Abies religiosa* y *Pinus* sp. (Pérez-Pazos 2017). *Clavulina reae* SH300397.07FU está en el gradiente saprotrofia–biotrofia, por lo que es un hongo ectomicorrizógeno con capacidad de descomponer la materia orgánica, probablemente por las glucósido-hidrolasa 1 (GH5), glucósido-hidrolasa 5 (GH5) y las moléculas de unión a la celulosa (CBM1) (Pérez-Pazos 2017). Sin embargo, *Clavulina* sp. SH220226.07FU (aff. *rugosa*) localizada por el marcador ITS2 en el capítulo II, fue la especie de *Clavulina* más frecuente y abundante en los suelos de coníferas, y está presente en sitios con el potencial

facilitador *Pinus montezumae*. Esta es una especie no descrita tiene a sus parientes más cercanos (>98 de similitud en ITS2) en China (con *Pinus massoniana*) y Tailandia (hospedero no descrito). Aunque *Clavulina reae* SH300397.07FU sea dominante en bosques puros de *Abies religiosa*, en programas de reintroducción o migración asistida debe compararse su desempeño contra *Clavulina* sp. SH220226.07FU (*aff. rugosa*), debido a que esta especie es generalista de coníferas, y puede facilitar el establecimiento de *Abies religiosa* teniendo un mejor éxito para no ser desplazada por los otros hongos nativos ya que es de amplia distribución.

Asimismo, encontramos que la similitud de especies ectomicorrizógenas en el bosque de *Abies religiosa* del Zarco es mayor con bosques templados de Estados Unidos y Canadá (capítulo I). Este patrón era esperado por la afinidad holártica del género *Abies* (Rzedowski 2006; Vicente Martínez Arévalo 2013), por su patrón biogeográfico (Aguirre-Planter et al 2012; Wang and Ran 2014; Xiang et al 2015; Tedersoo 2017) y por los procesos de migración de otros hongos ectomicorrizógenos de Estados Unidos hacia México, Centro y Sudamérica (Halling et al 2008; Matheny et al 2009; Kennedy et al 2011; Wilson et al 2017). Adicionalmente, es importante resaltar que las especies de *Clavulina* están presentes en los ecosistemas con influencia de *Abies* a nivel mundial (Ishida et al 2007; Ważny 2014; Taudiere et al 2015; Jia et al 2017), siendo más dominantes en zonas más cercanas al ecuador (Smith et al 2011; Argüelles-Moyao et al 2017).

Los suelos donde se desarrolla *Abies religiosa* tienen una gran cantidad de propágulos sexuales y asexuales. De estos propágulos, con la secuenciación IlluminaMiSeq (capítulo II) logramos detectar una alta diversidad de hongos en el suelo de los cuales aproximadamente el 41% (445 especies) son ectomicorrizógenos. Este porcentaje es mayor en comparación la proporción conocida a nivel mundial, pero era esperado para los ecosistemas templados de coníferas y latifoliadas (Tedersoo et al 2014; Brundrett and Tedersoo 2018). El ~17% (298) de las especies del suelo fueron compartidas entre todos los sitios de muestreo, de las cuales el ~37% (75) son especies ectomicorrizógenas, agrupadas en las familias Russulaceae, Clavulinaceae, Inocybaceae y Atheliaceae. Los hongos en estas familias son asociados comunes de *Pinus* y *Abies* a nivel mundial (Obase et al 2011; Uehling et al 2012; Buscardo et al 2014; Ważny 2014; Benucci et al 2016; Argüelles-Moyao et al 2017; Ważny and Kowalski 2017). También se encuentran colonizando a las plantas juveniles de *Pinus montezumae* (Reverchon et al 2012) o asociados con los bosques maduros (Kyaschenko et al 2017; Ważny

and Kowalski 2017). Por lo tanto, estos hongos generalistas se sugieren para los programas de micorrización en vivero de *Abies religiosa* porque tienen menor probabilidad de ser desplazados por los hongos nativos.

La comunidad de hongos fue más similar entre los dos sitios de *Abies religiosa* separados 107 km; en contraste, la comunidad de hongos fue menos similar entre el bosque de *Pinus hartwegii* y el de bosque de coníferas mixto separados por 50 km, por lo que el hospedero tiene un efecto directo en la composición de la comunidad de hongos del suelo. Asimismo, los bosques de *Abies religiosa* analizados son más similares con el bosque de *Pinus montezumae*, que con los de *Pinus hartwegii*. Por lo tanto, en función de nuestros datos, inferimos que los sitios con esta especie son los más adecuados para la reintroducción o migración asistida de *Abies religiosa*, porque en estos sitios pueden establecer la simbiosis con los hongos ectomicorrizógenos generalistas. Los hongos generalistas son los que potencialmente forman las conexiones en la red ectomicorrízica entre las plantas presentes en cada bosque.

En el capítulo III concluimos que los hongos más comunes a nivel de propágulos de rizósfera no son los principales enlaces de la red. En particular, *Cortinariaceae* sp._965 SH033131.07FU, *Genea* sp._24 SH191238.07FU, *Rhodocypha* sp._466 SH208437.07FU, *Russula* formula_2 KX812987, y *Tomentella* sp._215 SH002650.07FU son los hongos con la mayor distribución de grado (*degree*) y el menor camino más corto promedio (*average shortest path*); los cuales, inferimos, conectan a las plantas jóvenes de *Abies religiosa* con los demás hospederos. Asimismo, los hongos conectores varían dependiendo del sitio y de la presencia de otras plantas.

En particular, *Acaena elongata*, *Baccharis conferta*, *Dryopteris pseudofilix-mas*, *Fuchsia thymifolia*, *Salix paradoxa*, *Muhlenbergia macroura*, *Muhlenbergia nigra*, *Roldana barba-johannis*, son potenciales plantas facilitadoras del establecimiento de *Abies religiosa* porque comparten hongos micorrízicos con ella. Estos hongos son: *Claroideoglomeraceae* sp._766 KX115998, *Clavulina reae*_51 SH220214.07FU, *Cortinariaceae* sp._965 SH033131.07FU, *Endogone* sp._144 SH213348.07FU, *Endogone* sp._152 SH213348.07FU, *Genea* sp._24 SH191238.07FU, *Geopora cooperi*_1718 SH194828.07FU, *Glomeraceae* sp._1319 SH199967.07FU, *Humaria* sp._904 KF041357, *Hydnobolites* sp._1217 SH022820.07FU, *Hydnotrya cerebriformis*_1151 SH210478.07FU, *Hymenogaster parksii*_2432 SH218860.07FU, *Inocybe argenteolutea*_1129 SH191103.07FU, *Rhodocypha* sp._466

SH208437.07FU, *Russula firmula*_2 KX812987, *Tomentella* sp._215 SH002650.07FU, y los describimos como los principales enlaces conectando a las plantas en nuestra red bipartita.

Las plantas facilitadoras permiten el establecimiento de otras plantas. Este efecto se debe a que la planta nodriza provee de un microambiente menos agresivo (menor radiación, mayor humedad) que si no está presente. También, existe facilitación por elementos del micro-relieve que proveen de protección física contra la depredación (Munguía-Rosas y Sosa 2008). No obstante, la facilitación por nodricismo es un efecto planta a planta, pero se desconoce el nivel de facilitación por hongos micorrizógenos. Existen trabajos que integran estas ideas, en los cuales el efecto benéfico en las plántulas por las plantas facilitadoras se debe a que aminoran el estrés hídrico (una hipótesis es la redistribución hidráulica), o por la translocación y redistribución de nutrientes a través de los hongos (Simard et al 2012; Bingham y Simard 2012; Pickles y Simard 2016). Si los hongos fueran los principales componentes de este fenómeno, sería conveniente modificar la definición, ya no en función de mejorar el microambiente, sino de regenerar una interacción simbiótica mutualista.

Las plantas facilitadoras idealmente deben ser más tolerantes a condiciones estresantes como poco suelo, poca humedad, alta irradiación solar y compartir hongos micorrizógenos con la planta de interés. *Muhlenbergia macroura*, *Muhlenbergia nigra*, y *Baccharis conferta* son especies que cumplen con estos requisitos y además, albergan hongos micorrizógenos arbusculares o ecto-endo micorrizógenos que formarían una red micorrízica con las plántulas de *Abies religiosa*.

También, encontramos que las predicciones del capítulo II son correctas a nivel de la frecuencia y abundancia de los hongos de la rizosfera, pero estos hongos no son los principales nodos en las redes. La diferencia es atribuible al modelo jerárquico del establecimiento de las simbiosis micorrízica. El establecimiento de la simbiosis mutualista entre un hongo micorrizógeno y su hospedero vegetal, dependen de la disponibilidad de propágulos, las especies compatibles y la interacción entre ellas (Koide et al 2011; Dickie et al 2013). El modelo jerárquico de la estructura de las comunidades de hongos micorrizógenos predice que los de hongos del suelo de la reserva de propágulos, tienen que pasar el filtro del hospedero compatible; posteriormente, esta comunidad de propágulos debe sobrevivir al filtro abiótico y a continuación, a las interacciones competitivas entre especies; estas interacciones pueden ser fuertes, y generar pérdida de taxa, o débiles, permitiendo la co-existencia de taxa (McHugh and Gehring 2006; Koide et al 2011; Becklin et al 2012; Toju et al 2014; Mello et

al 2015). Asimismo, la edad del ecosistema (Dickie et al 2013), el desarrollo del suelo (Lambers et al 2008), las diferentes condiciones ambientales, y el mismo banco de propágulos producen un diferente ensamble de comunidades (Fernandez et al 2017). Por lo tanto, el conjunto de especies hospederas, hábitat e interacciones entre especies es lo que determina las comunidades presentes en cada sitio. Por tal razón, no es posible predecir las especies que nos vamos a encontrar establecidas en las redes micorrízicas en un sitio específico, pero si es posible predecirlas a nivel ecosistémico. Integrando toda la información de los inventarios y la aproximación de redes, detectamos especies importantes que se sugieren en futuras investigaciones como plantas facilitadoras ya que tienen potencial en estrategias de reintroducción.

En un escenario de restauración de *Abies religiosa*, se recomienda rehabilitar el suelo mediante la reintroducción de plantas facilitadoras tolerantes al estrés. Esto se debe a dos razones, la primera es que las plantas tolerantes al estrés se establecen más fácilmente, y la segunda, porque albergan en sus raíces hongos micorrizógenos. Estos hongos establecerán simbiosis con las plántulas de *Abies religiosa* permitiendo su establecimiento en campo. El esquema involucra introducir a las plantas facilitadoras pioneras y tolerantes de estrés (*Muhlenbergia macroura*, *M. nigra*. y *Baccharis conferta*), porque forman simbiosis con hongos arbusculares o ecto-endomicorrizógenos, y estos son compartidos con las plántulas jóvenes de Oyamel. Por otra parte, en sitios sin tanta compactación del suelo o problemas hídricos, *Salix paradoxa* es una planta candidata para facilitar a estas plantas por ser un nodo importante en las redes y sobre todo porque comparte hongos ectomicorrizógenos con *Abies religiosa*. Asimismo, suponemos que la reintroducción en sitios con *Pinus montezumae* es más viable que en sitios con *Pinus hartwegii* por lo que una reintroducción con plantas facilitadoras (*Muhlenbergia*, *Baccharis* o *Salix*) en este hábitat aumenta la probabilidades de sobrevivencia de las plántulas por el efecto de la facilitación. Por último, a todas las plantas facilitadoras se les puede inocular los hongos micorrizógenos compatibles desde el vivero que mejoren su establecimiento y además puedan mejorar el de las plántulas de *Abies religiosa*.

Conclusiones

- 1) *Clavulina reae* SH300397.07FU es un hongo ectomicorrizógeno que debería ser investigado en su habilidad para formar simbiosis mutualista a nivel de vivero y como promotor del establecimiento de *Abies religiosa* en los sitios reintroducción arbórea, porque es el hongos más frecuente asociado con plantas adultas de *Abies religiosa*. También debe ser comparado su desempeño contra *Clavulina* sp. SH220226.07FU (*aff. rugosa*), que fue un hongo abundante y frecuente descrito en el capítulo II.
- 2) Los bosques de *Abies religiosa* son más similares entre ellos en su composición de propágulos fúngicos de suelo, después comparten más especies con los bosques de *Pinus montezumae*, y luego con los bosques de *Pinus hartwegii*. Los hongos ectomicorrizógenos de las familias Russulaceae, Clavulinaceae, Inocybaceae y Atheliaceae son los más frecuentes y abundantes.
- 3) *Salix paradoxa* es una posible facilitadora del establecimiento de *Abies religiosa*, y Cortinariaceae sp._965 SH033131.07FU es el hongo ectomicorrizógeno con mayor distribución de grado que conecta a las plantas jóvenes de *Abies religiosa* con los demás hospederos. Además existen otras plantas potencialmente facilitadoras como *Muhlenbergia macroura*, *Muhlenbergia nigra*, y *Baccharis conferta*, que tienen hongos micorrizógenos arbusculares o ecto-endomicorrizógenos asociados y pueden formar una red micorrizica con las plántulas de *Abies religiosa*.
- 4) Proponemos evaluar la reintroducción estratificada de *Abies religiosa* después de establecer plantas pioneras como *Muhlenbergia macroura*, *M. nigra* y *Baccharis conferta*, que son plantas formadoras de suelo y en nuestros análisis cada planta es un módulo diferente conectadas a otras plantas por hongos arbusculares o ecto-endomicorrizógenos. Estos hongos pueden servir de conectores a estas plantas facilitadoras y permiten la rehabilitación de la red micorrízica por lo que mejorarán las probabilidades de sobrevivencia de las plantas jóvenes de *Abies religiosa*. También, *Salix paradoxa* es una planta candidata para facilitar a estas plantas por compartir hongos ectomicorrizógenos con *Abies religiosa*. Por último, la reintroducción de *Abies religiosa* también es recomendable en sitios donde *Pinus montezumae* esté presente porque tiene más similitud de especies que con *Pinus hartwegii*. En esta reintroducción, se pueden usar los hongos de generalistas reportados inoculándolos desde el vivero. Suponemos que por ser generalistas tienen menor probabilidad de ser desplazados por los hongos nativos.

Referencias

- Aguirre-Planter, E., Jaramillo-Correa, J. P., Gómez-Acevedo, S., Khasa, D. P., Bousquet, J., & Eguiarte, L. E. (2012). Phylogeny, diversification rates and species boundaries of Mesoamerican firs (*Abies*, Pinaceae) in a genus-wide context. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 263–274. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.021>
- Argüelles-Moyao, A., Garibay-Orijel, R., Márquez-Valdelamar, L. M., & Arellano-Torres, E. (2017). *Clavulina-Membranomyces* is the most important lineage within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza*, 27, 53–65. <http://doi.org/10.1007/s00572-016-0724-1>
- Bahram, M., Kõljalg, U., Courty, P. E., Diédhiou, A. G., Kjølner, R., Põlme, S., ... Tedersoo, L. (2013). The distance decay of similarity in communities of ectomycorrhizal fungi in different ecosystems and scales. *Journal of Ecology*, 101(5), 1335–1344. <http://doi.org/10.1111/1365-2745.12120>
- Becklin, K. M., Pallo, M. L., & Galen, C. (2012). Willows indirectly reduce arbuscular mycorrhizal fungal colonization in understory communities. *Journal of Ecology*, 100(2), 343–351. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01903.x>
- Beiler, K. J., Durall, D. M., Simard, S. W., Maxwell, S. A., & Kretzer, A. M. (2010). Architecture of the wood-wide web: *Rhizopogon* spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. *New Phytologist*, 185(2), 543–553. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03069.x>
- Benucci, G. M. N., Lefevre, C., & Bonito, G. (2016). Characterizing root-associated fungal communities and soils of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) stands that naturally produce Oregon white truffles (*Tuber oregonense* and *Tuber gibbosum*). *Mycorrhiza*, 1–10. <http://doi.org/10.1007/s00572-015-0677-9>
- Bingham, M. A., & Simard, S. (2012). Ectomycorrhizal networks of *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* trees facilitate establishment of conspecific seedlings under drought. *Ecosystems*, 15(2), 188–199. <http://doi.org/10.1007/s10021-011-9502-2>
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, (January). <http://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Buscardo, E., Rodríguez-Echeverría, S., Freitas, H., De Angelis, P., Pereira, J. S., & Muller, L. A. H. (2014). Contrasting soil fungal communities in Mediterranean pine forests

- subjected to different wildfire frequencies. *Fungal Diversity*, 70(1), 85–99. <http://doi.org/10.1007/s13225-014-0294-5>
- Castillo-Argüero, S., Martínez-Orea, Y., & Barajas-Guzmán, G. (2014). Establecimiento de tres especies arbóreas en la cuenca del río Magdalena, México. *Botanical Sciences*, 92(2), 309–317.
- de Queiroz K (1998) The general lineage concept of species, species criteria and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. En: Howard DJ, Berlocher SH (eds) *Endless Forms Species Speciat.* Oxford Univeristy Press, New York, pp 57–75
- de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* 56:879–886. doi: 10.1080/10635150701701083
- Dickie, I. A., Martínez-García, L. B., Koele, N., Grelet, G. A., Tylianakis, J. M., Peltzer, D. A., & Richardson, S. J. (2013). Mycorrhizas and mycorrhizal fungal communities throughout ecosystem development. *Plant and Soil*, 367(1–2), 11–39. <http://doi.org/10.1007/s11104-013-1609-0>
- Fernandez, C. W., Nguyen, N. H., Stefanski, A., Han, Y., Hobbie, S. E., Montgomery, R. A., ... Kennedy, P. G. (2017). Ectomycorrhizal fungal response to warming is linked to poor host performance at the boreal-temperate ecotone. *Global Change Biology*, 23(4), 1598–1609. <http://doi.org/10.1111/gcb.13510>
- Flores-Rentería, D., Barradas, V. L., & Álvarez-Sánchez, J. (2017). Ectomycorrhizal pre-inoculation of *Pinus hartwegii* and *Abies religiosa* is replaced by native fungi in a temperate forest of central Mexico. *Symbiosis*, 1–14. <http://doi.org/10.1007/s13199-017-0498-z>
- Gómez-Romero, M., Villegas, J., & Lindig-cisneros, C. S. R. (2013). Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera y Bosques*, 19(3), 51–63.
- Grossnickle, S. C., & Ivetić, V. (2017). Direct Seeding in Reforestation – A Field Performance Review. *Reforesta*, 4, 94–142.
- Halling, R. E., Osmundson, T. W., & Neves, M. A. (2008). Pacific boletes: Implications for biogeographic relationships. *Mycological Research*, 112(4), 437–447. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.11.021>

- Hughes KW, Petersen RH, Lickey EB (2009) Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytol* 182:795–798. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02856.x
- Horton, B. M., Glen, M., Davidson, N. J., Ratkowsky, D., Close, D. C., Wardlaw, T. J., & Mohammed, C. (2013). Temperate eucalypt forest decline is linked to altered ectomycorrhizal communities mediated by soil chemistry. *Forest Ecology and Management*, 302, 329–337. <http://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.04.006>
- 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*, 174(2), 430–440. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02016.x>
- Jia, S., Nakano, T., Hattori, M., & Nara, K. (2017). Root-associated fungal communities in three *Pyroleae* species and their mycobiont sharing with surrounding trees in subalpine coniferous forests on Mount Fuji, Japan. *Mycorrhiza*, 1–13. <http://doi.org/10.1007/s00572-017-0788-6>
- Kennedy, P. G., Garibay-Orijel, R., Higgins, L. M., & Angeles-Arguiz, R. (2011). Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza*, 21(6), 559–568. <http://doi.org/10.1007/s00572-011-0366-2>
- Koide, R. T., Fernandez, C., & Petprakob, K. (2011). General principles in the community ecology of ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science*, 68(1), 45–55. <http://doi.org/10.1007/s13595-010-0006-6>
- Kyaschenko, J., Clemmensen, K. E., Hagenbo, A., Karlton, E., & Lindahl, B. D. (2017). Shift in fungal communities and associated enzyme activities along an age gradient of managed *Pinus sylvestris* stands. *The ISME Journal*, 863–874. <http://doi.org/10.1038/ismej.2016.184>
- Lambers, H., Raven, J. A., Shaver, G. R., & Smith, S. E. (2008). Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology and Evolution*, 23(2), 95–103. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2007.10.008>
- Lara-González, R., Sánchez-Velásquez, L. R., & Corral-Aguirre, J. (2009). Regeneration of *Abies religiosa* in canopy gaps versus understory, Cofre de Perote national park, Mexico. *Agrociencia*, 4., 739–747.

- Lindner DL, Carlsen T, Henrik Nilsson R, et al (2013) Employing 454 amplicon pyrosequencing to reveal intragenomic divergence in the internal transcribed spacer rDNA region in fungi. *Ecol Evol* 3:1751–1764. doi: 10.1002/ece3.586
- Matheny, P. B., Aime, M. C., Bougher, N. L., Buyck, B., Desjardin, D. E., Horak, E., ... Hibbett, D. S. (2009). Out of the Palaeotropics? Historical biogeography and diversification of the cosmopolitan ectomycorrhizal mushroom family Inocybaceae. *Journal of Biogeography*, 36(4), 577–592. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02055.x>
- McHugh, T. A., & Gehring, C. A. (2006). Below-ground interactions with arbuscular mycorrhizal shrubs decrease the performance of pinyon pine and the abundance of its ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 171(1), 171–178. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01735.x>
- Mello, A., Lumini, E., Napoli, C., Bianciotto, V., & Bonfante, P. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in the *Tuber melanosporum* brulé. *Fungal Biology*, 119(6), 518–527. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.02.003>
- Munguía-Rosas, M. A., & Sosa, V. J. (2008). Nurse plants vs. nurse objects: Effects of woody plants and rocky cavities on the recruitment of the *Pilosocereus leucocephalus* columnar cactus. *Annals of Botany*, 101(1), 175–185. <http://doi.org/10.1093/aob/mcm302>
- Obase, K., Lee, J. K., Lee, S. Y., & Chun, K. W. (2011). Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in *Pinus thunbergii* coastal forests in the eastern region of Korea. *Mycoscience*, 52(6), 383–391. <http://doi.org/10.1007/s10267-011-0123-6>
- Pérez-Pazos, F. E. (2017). Diversidad, ecología y huella isotópica de *Clavulina* en bosques de *Abies* del suroeste de la cuenca de México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pickles, B. J., & Simard, S. W. (2016). Mycorrhizal networks and Forest resilience to drought. En N. Johnson, C. Gehring, & J. Jansa (Eds.), *Mycorrhizal mediation of soil: Fertility, structure, and Carbon storage* (1a ed., pp. 319–339). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-804312-7.00018-8>
- Reverchon, F., del Pilar Ortega-Larrocea, M., 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*, 80(2), 479–487. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01314.x>
- Rivas-Rivas, M., Ramírez-Marcial, N., Perales, H., Levy-Tacher, S., & Bonfil, C. (2017). Survival and growth of three *Quercus* species under contrasting coverage conditions in

- southern Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales Y del Ambiente*, 23(Apa 6), 275–288. <http://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.01.001>
- Ryberg M (2015) Molecular operational taxonomic units as approximations of species in the light of evolutionary models and empirical data from Fungi. *Mol Ecol* 24:5770–5777. doi: 10.1111/mec.13444
- Rzedowski, J. (2006). Bosque de coníferas. En CONABIO (Ed.), *Vegetación de México* (1a ed., pp. 295–327). Ciudad de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sánchez-Velásquez, L. R., Domínguez-Hernández, D., Pineda-López, M. del R., & Lara-González, R. (2011). Does *Baccharis conferta* shrub act as a nurse plant to the *Abies religiosa* Seedling? *The Open Forest Science Journal*, 4(1), 67–70. <http://doi.org/10.2174/1874398601104010067>
- Simard, S. W., Beiler, K. J., Bingham, M. A., Deslippe, J. R., Philip, L. J., & Teste, F. P. (2012). Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews*, 26(1), 39–60. <http://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.01.001>
- Smith, M. E., Henkel, T. W., Catherine Aime, M., Fremier, A. K., & Vilgalys, R. (2011). Ectomycorrhizal fungal diversity and community structure on three co-occurring leguminous canopy tree species in a Neotropical rainforest. *New Phytologist*, 192(3), 699–712. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03844.x>
- Schoch CL, Seifert K a., Huhndorf S, et al (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1–6. doi: 10.1073/pnas.1117018109
- Taudiere, A., Munoz, F., Lesne, A., Monnet, A.C., Bellanger, J.M., Selosse, M.A., ... Richard, F. (2015). Beyond ectomycorrhizal bipartite networks: projected networks demonstrate contrasted patterns between early- and late-successional plants in Corsica. *Frontiers in Plant Science*, 6(10), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00881>
- Tedersoo, L. (2017). Global Biogeography and Invasions of Ectomycorrhizal Plants: Past, Present and Future. En L. Tedersoo (Ed.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (pp. 469–531). Cham: Springer International Publishing. http://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_20
- Tedersoo L, Bahram M, Puusepp R, et al (2017) Novel soil-inhabiting clades fill gaps in the fungal tree of life. *Microbiome* 5:1–10. doi: 10.1186/s40168-017-0259-5

- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., ... Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213), 1–10. <http://doi.org/10.1126/science.1256688>
- Toju, H., Sato, H., & Tanabe, A. S. (2014). Diversity and spatial structure of belowground plant-fungal symbiosis in a mixed subtropical forest of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal plants. *PLoS ONE*, 9(1), 24–26. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0086566>
- Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., Tanabe, A. S., Gilbert, G. S., & Kadowaki, K. (2013). Community composition of root-associated fungi in a *Quercus*-dominated temperate forest: “codominance” of mycorrhizal and root-endophytic fungi. *Ecology and Evolution*, 3(5), 1281–1293. <http://doi.org/10.1002/ece3.546>
- Uehling, J. K., Henkel, T. W., Vilgalys, R., & Smith, M. E. (2012). *Membranomyces* species are common ectomycorrhizal symbionts in Northern Hemisphere forests. *Mycorrhiza*, 22(7), 577–581. <http://doi.org/10.1007/s00572-012-0457-8>
- Vicente Martínez Arévalo, J. (2013). Plantas asociadas a los bosques de *Abies guatemalensis* (Pinaceae) del occidente de Guatemala. *Revista de Biología Tropical*, 61(1), 321–333.
- Wang, X. Q., & Ran, J. H. (2014). Evolution and biogeography of gymnosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75(1), 24–40. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.02.005>
- Ważny, R. (2014). Ectomycorrhizal communities associated with silver fir seedlings (*Abies alba* Mill.) differ largely in mature silver fir stands and in Scots pine forecrops. *Annals of Forest Science*, 71(7), 801–810. <http://doi.org/10.1007/s13595-014-0378-0>
- Ważny, R., & Kowalski, S. (2017). Ectomycorrhizal fungal communities of silver-fir seedlings regenerating in fir stands and larch forecrops. *Trees*, 0(0), 0. <http://doi.org/10.1007/s00468-016-1518-y>
- Wilson, A. W., May, T. W., & Mueller, G. M. (2017). Biogeography of the ectomycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. En *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (pp. 273–297). Springer.
- Xiang, Q. P., Wei, R., Shao, Y. Z., Yang, Z. Y., Wang, X. Q., & Zhang, X. C. (2015). Phylogenetic relationships, possible ancient hybridization, and biogeographic history of *Abies* (Pinaceae) based on data from nuclear, plastid, and mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82(PA), 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.10.008>

(Plate VII.)

