



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Instituto de Biología
Biología Experimental

**GENÓMICA COMPARATIVA DE *Laccaria trichodermophora* COMO
HERRAMIENTA PARA ENTENDER SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

RODOLFO ENRIQUE ÁNGELES ARGÁIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. JORGE NIETO SOTELO

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., Octubre, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

OFICIO CPCB/932/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **21 de junio de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **ÁNGELES ARGÁIZ RODOLFO ENRIQUE** con número de cuenta **513023819** con la tesis titulada "**Genómica comparativa de *Laccaria trichodermophora* como herramienta para entender su potencial biotecnológico**", realizada bajo la dirección del DR. **ROBERTO GARIBAY ORIJEL**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JESÚS PÉREZ MORENO
Vocal: DRA. LAILA PAMELA PARTIDA MARTÍNEZ
Vocal: DR. LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
Secretario: DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 28 de septiembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

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 291047, con registro de becario 289835, número de beca 428868 y número de CVU 439184, así como al programa PAEP por las becas recibidas.

A los proyectos PAPIIT-UNAM IN-210217, IT-200719, IN-212521 por financiar mi investigación.

A mi Tutor Principal, el Dr. Roberto Garibay Orijel y a los miembros de mi Comité Tutor, el Dr. Mauricio Trujillo Roldán y el Dr. Jorge Nieto Sotelo.

Agradecimientos a título personal

Agradesco a mucho a Diana y a Diego por acompañarme e impulsarme para seguir haciendo lo que me gusta, a mis padres por su apoyo constante, a mi profesor Roberto por mostrarme el camino y abrirme tantas puertas, a mis compañeros del laboratorio, en los que encontré buenos amigos, y a la comunidad del IB, del IIB, de la FC, del CCG, del IBT y del Posgrado por tantos buenos momentos.

Índice

Índice.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Introducción general.....	9
Capítulo I- La evolución de la simbiosis ectomicorrízica desde la perspectiva genómica ...	15
Capítulo II- From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom <i>Laccaria trichodermophora</i>	31
Capítulo III- Long-read sequencing do not collapse <i>Laccaria trichodermophora</i> (CA15-11, CA15-75, CA15-F10 and EF-36) strains genome assemblies and reveal its intraspecific genome diversity	61
Capítulo IV- El contenido de enzimas CAZy y péptidos efectores en los genomas accesorios de <i>Laccaria trichodermophora</i> confiere a las cepas capacidades simbióticas diferenciales...	118
Discusión general y conclusiones	177
Referencias Bibliográficas.....	191
Anexos	202

Resumen

La deforestación y la pérdida de suelo son causa y consecuencia del cambio climático global, y tienen un fuerte impacto social, principalmente en comunidades rurales. Desafortunadamente, en México la atención que se le da a este problema es poco exitosa. Para aumentar las tasas de supervivencia de las plántulas producidas en invernadero destinadas a los programas de restauración y conservación, es necesaria su micorrización exitosa. Para reforestar ecosistemas forestales, los árboles deben inocularse con hongos ectomicorrízicos. En este trabajo se seleccionó al hongo ectomicorrízico *Laccaria trichodermophora* debido a sus características ecológicas y a la posibilidad de cultivar su micelio en condiciones axénicas. Sin embargo, el conocimiento profundo sobre los mecanismos celulares y moleculares que dan a estos hongos su potencial de aprovechamiento biotecnológico está en camino de desarrollo, mientras que las tecnologías para la masificación de la producción de inóculo vegetativo han sido pobremente exploradas. En esta tesis, después de desarrollar la producción, a escala piloto, de inóculo miceliar de *L. trichodermophora* (Capítulo I), y de secuenciar y analizar cuatro genomas de la especie (Capítulos III y IV), identificamos parámetros de cultivo y genes relacionados con el crecimiento y las capacidades de colonización simbiótica. La producción de micelio vivo alcanzó rendimientos de hasta $Y_{X/S} = 0.54 \pm 0.09 \text{ g}_{\text{Biomasa}}/\text{g}_{\text{Glucosa}}$ con producciones de biomasa de casi $6 \text{ g}_{\text{Biomasa}}/\text{L}_{\text{Medio de cultivo}}$, cantidad suficiente para miles de pinos de vivero con cultivos en medio líquido de 4 semanas, iniciando desde la reactivación de la cepa refrigerada. Los genomas de las distintas cepas variaron en tamaño entre 59.1 y 111.9 Mpb, estas diferencias se centran principalmente en el tamaño de las familias génicas, el genoma *core* de la especie representa del 54% al 76% de las familias de genes homólogos. La ausencia de genes simbióticos, como los codificantes para la poligalacturonasas (GH28) y la endoglucanasa (GH5_5) con módulo de unión a carbohidrato (CBM1), así como el número de péptidos efectores se co-relacionan con la pérdida de la capacidad simbiótica en algunas de las cepas analizadas. Además, desde la perspectiva de la genómica evolutiva comparada, se analizan otros aspectos genómicos que empujan el entendimiento de la evolución genómica de la simbiosis y de su ecología.

Abstract

Deforestation and soil loss are the cause and product of the global climatic change and have a strong social impact, mainly in rural communities. Unfortunately, in Mexico the attention given to this problem is not very successful. To increase the survival rates of greenhouse grown seedlings for restoration and conservation programs, their successful mycorrhization is necessary. To reforest forest ecosystems, trees must be inoculated with ectomycorrhizal fungi. In this thesis, the Mexican ectomycorrhizal fungus *Laccaria trichodermophora* was selected, due to its ecological characteristics and the possibility of cultivating its mycelium under axenic conditions. However, in-depth knowledge of the cellular and molecular mechanisms that give these fungi its biotechnological potential use is under-developed, while technologies for mass production of vegetative inoculum have been poorly explored. In this thesis, after developing production at a pilot scale of mycelial inoculum of *L. trichodermophora* (Chapter 1), and sequencing and analyzing four genomes of the species (Chapters 2 and 3), we identified culture parameters and genes related to the micelial growth or symbiotic colonization capabilities. Live mycelium production reached yields of up to $Y_{X/S} = 0.54 \pm 0.09 \text{ g}_{\text{Biomass}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ with biomass production of about $6 \text{ g}_{\text{Biomass}}/\text{L}_{\text{Culture media}}$, sufficient quantity for thousands of nursery pines with cultures in liquid medium of 4 weeks, starting since the reactivation of the chilled strain. The genomes of the different strains varied in size between 59.1 and 111.9 Mbp, most of these differences are due the size of the gene families, while the core-genome of the species represents 54% to 76% of the homologous gene families. The absence of symbiotic genes, such as those coding for polygalacturonase (GH28) and endoglucanase (GH5_5) with carbohydrate binding module (CBM1), as well as the number of effector peptides are co-related to the loss of symbiotic capability in some of the analyzed strains. In addition, from the perspective of comparative evolutionary genomics, other genomic aspects that push the understanding of the genomic evolution of symbiosis and its ecology are analyzed.

Introducción general

Los hongos ectomicorrízicos (HEM) forman una íntima asociación entre su micelio y las raíces de varios árboles importantes y otras plantas (Pérez-Moreno y Read 2004; Smith y Read 2010). Para el funcionamiento de esta asociación se requiere una estrecha comunicación a nivel celular, la cual está mediada por una compleja red de señalización entre simbioses (Plett y Martin 2015). La gran cantidad de taxa de HEM (más de 20 mil especies, Comandini *et al.* 2012; Tedersoo y Smith 2017), la naturaleza polifilética de esta simbiosis (82 linajes fúngicos, Tedersoo y Smith 2017), y el grado de especificidad por su hospedero, generan un complejo mosaico fisiológico y ecológico (Plett y Martin 2011). Además, la alta riqueza de las comunidades ectomicorrízicas, la exclusión competitiva y la redundancia ecológica han moldeado los genomas de los HEM.

Laccaria trichodermophora Muell. 1984 es un HEM que se distribuye en México y Estados Unidos de América (Mueller 1992). En los volcanes del centro de México, en el Eje Neovolcánico Transversal Mexicano (ENTM), *L. trichodermophora* se asocia principalmente a *Pinus montezumae* Lamb. 1832 en los bosques de alrededor de 3,000 msnm y a *P. hartwegii* Lindl. 1839 en los límites superiores del bosque abierto, alrededor de 4,000 msnm, donde es uno de los hongos de mayor producción de esporomas (Mueller 1992; Pérez *et al.* 2012; Reverchón *et al.* 2012; Galindo-Flores *et al.* 2015; Franco-Mass *et al.* 2016; López-García *et al.* 2017; Kong *et al.* 2018; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019; Ángeles-Argáiz *et al.* 2020; Quintero-Corrales *et al.* 2020; ver Mueller y Strack 1992; Ramos *et al.* 2017 para salto de hospedero en condiciones de introducción) (Figura 1 y 2). La posibilidad de cultivar el micelio de esta especie de manera axénica, considerando además algunas de sus características ecológicas, como su preferencia por hospedero y hábitat, otorgan a *L. trichodermophora* un gran potencial para su aprovechamiento biotecnológico en la industria forestal y en la conservación de los bosques de altura (Pérez-Moreno *et al.* 2010, Carrasco-Hernández *et al.* 2018). Sin embargo, tanto las técnicas para la producción de su micelio, como el trasfondo genético que otorga a esta especie sus capacidades fisiológicas y ecológicas se desconocían. En contraste, desde el punto de

vista de la simbiosis (fisiología, ontogenia y expresión génica), uno de los hongos ectomicorrízicos más estudiados es *L. bicolor* (Maire) P.D. Orton 1960 (Martin *et al.* 2008). Está estrechamente emparentado con *L. trichodermophora*, con alrededor de seis millones de años de divergencia evolutiva (Wilson *et al.* 2017), por lo que sus similitudes y contrastes genómicos nos permiten hacer extrapolaciones sobre *L. trichodermophora*.

Figura 1. Distribución de *Laccaria trichodermophora* (círculos morados), *Pinus montezumae* (triángulos verde claro) y *Pinus hartwegii* (triángulos invertidos verde oscuro) en México. Los datos fueron tomados de GBIF (doi.org/10.15468/dl.u25dnc, 10.15468/dl.945x6w y 10.15468/dl.6bfz2r) y el mapa se hizo en R con el script en el anexo 1).

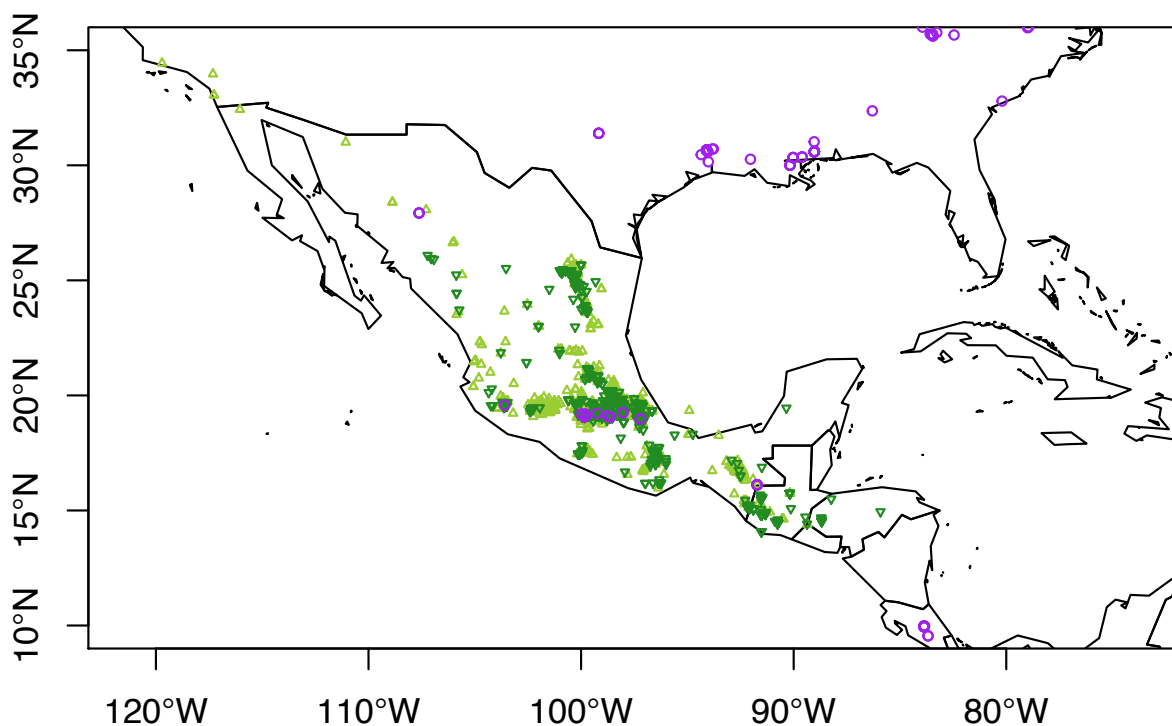


Figura 2. Basidiomas de *Laccaria trichodermophora* en su ambiente natural.



En nuestro grupo de investigación se han desarrollado proyectos (PAPIIT-UNAM: IN-210217 y IT-200719) para estudiar la efectividad de *Laccaria* como inoculante y simbionte ectomicorrízico para *Pinus* (Flores-Almaráz, 2020; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019); la estructura genética de sus poblaciones (Quintero-Corrales *et al.* 2020) y de sus comunidades (Garibay-Orijel *et al.* 2009; Pérez-Pazos, 2018; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2020; Ramírez-Miguel *et al.* 2021) y el cultivo de su micelio a diferentes escalas (Ángeles-Argáiz 2015; Ángeles-Argáiz *et al.* 2020; Carmona-Reyes en prep., Campos-López en prep.). Las investigaciones de Quintero-Corrales *et al.* (2020) respecto a la genética de las poblaciones de *L. trichodermophora* en el centro del país, mostraron que la estructura simpátrica de sus poblaciones en el Eje Neovolcánico Transversal está dada por el aislamiento por distancia y no por la identidad del hospedero/elevación en la montaña. Además, nos permitieron seleccionar algunas de las cepas más divergentes, genéticamente, para su análisis genómico. Posteriormente, al comparar el

desempeño de distintas cepas bajo las mismas condiciones de cultivo en medio líquido, permitieron ver al alta variabilidad en acumulación de biomasa y consumo de sustrato (resultados incluidos en el Capítulo I de esta tesis, Ángeles-Argáiz *et al.* 2020). Para obtener cepas viables con capacidades infectivas ectomicorrízicas se realizaron los aislamientos a partir del contexto de esporomas silvestres, pues el contexto además de ser relativamente abundante y limpio, está compuesto por micelio secundario, justo el tipo de micelio con el que los basidiomycetes ectomicorrízicos colonizan las raíces de sus hospederos (Smith y Read, 2010). Por otro lado, el contenido nuclear diploide, y en muchos casos heterocariótico, del micelio secundario, puede complicar su estudio genómico.

Durante el desarrollo de la presente tesis, la investigación de Flores-Almaraz (2020) demostró que antes de un emprendimiento biotecnológico, las capacidades simbióticas de las cepas deben comprobarse mediante bioensayos. Ella evaluó tres factores al bioinoculante desarrollado con la cepa EF-36: Viabilidad, infectividad y efectividad. Detectó que con ninguna de las formulaciones probadas se consiguió micorrizar las plantas. Procedió entonces a comparar distintas cepas con un solo método de inoculación, detectó que el factor determinante en el grado de infectividad fue justo la identidad de la cepa, haciendo evidente que el genotipo de la cepa seleccionada influye directamente sobre el fenotipo; en este caso, expresado tanto en el crecimiento miceliar asimbiótico como en la interacción simbiótica. Particularmente, la cepa CA15-F10 fue la única capaz de desarrollar abundante y pronta colonización de la raíz (Flores-Almaraz, 2020) pero un pobre crecimiento miceliar en medio líquido (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020). Por estos motivos, las investigaciones de Campos-López (Tesis de doctorado en proceso), enfocadas a determinar el efecto de la formulación de los medios de cultivo sobre las capacidades simbióticas de *L. trichodermophora*, usan a la cepa CA15-F10.

En esta tesis se pretende profundizar en el entendimiento de la biología de la interacción de *L. trichodermophora* con su hospedero y su ambiente desde la perspectiva genómica, así como avanzar en el desarrollo tecnológico hacia la producción de inóculo vegetativo (micelio activo) a escala piloto. La tesis está dividida en seis secciones. La primera es esta breve introducción general. La segunda sección

es un Capítulo introductorio (Capítulo I) con marco teórico sobre la genómica de la simbiosis ectomicorrízica, en forma de un artículo de revisión publicado. Los siguientes tres Capítulos (Capítulos del II - IV) son artículos de investigación, cada uno enfocado en cada uno de los objetivos particulares. En el segundo Capítulo se estudió la propagación del micelio de *L. trichodermophora*, partiendo desde la recolecta en campo y el aislamiento de la cepa, hasta el escalamiento del cultivo en biorreactor de columna de burbujeo. Este Capítulo ya está publicado. En el tercer Capítulo se identificaron las implicaciones metodológicas de la secuenciación y ensamble genómico, sobre las inferencias funcionales, usando como modelo cuatro cepas de *L. trichodermophora*. Mientras que el cuarto Capítulo está enfocado en identificar genes involucrados en las capacidades simbióticas de diferentes cepas. Finalmente la tesis concluye con una sección en la que se discuten aspectos adicionales como la selección de cepas, la propagación clonal, algunas dinámicas de expansión genómica y funciones genómicas potencialmente relacionadas con la preferencia por hospedero y se integran conceptos y descubrimientos genómicos con su aplicación biotecnológica hacia la conservación de los bosques templados mediante la inoculación ectomicorrízica.

Justificación

Una de las maneras de mitigar los efectos del cambio climático es la reforestación. Si los programas de reforestación son apoyados por el desarrollo y la aplicación de bioinoculantes, sus beneficios son mayores. En México, y particularmente para sus bosques de altura, hongos ectomicorrízicos como *Laccaria trichodermophora* presentan un gran potencial para su aprovechamiento biotecnológico en la conservación, la industria forestal y la propagación de hongos comestibles silvestres. Sin embargo, tanto las técnicas para la producción de su micelio, como la comprensión del trasfondo genético que otorga a esta especie sus capacidades fisiológicas y ecológicas, están en desarrollo incipiente.

Pregunta de investigación

¿Cómo producir un bioinoculante vegetativo ectomicorrízico tomando en cuenta la ingeniería de bioprocesos y la genómica funcional?

Objetivo general

Identificar parámetros de cultivo y características genómicas relevantes en el aprovechamiento biotecnológico de *Laccaria trichodermophora*.

Objetivos particulares

- 1.- Identificar los parámetros de cultivo que generan alta producción de biomasa micelial de *L. trichodermophora* en medio líquido y escalar estos cultivos a biorreactor.
- 2.- Identificar el efecto de la longitud de las lecturas de secuenciación sobre la calidad del ensamble genómico *de novo* de *Laccaria trichodermophora*, y a su vez, el efecto de la calidad del ensamble en las inferencias genómico-funcionales.
- 3.- Identificar genes potencialmente involucrados en la fisio-ecología simbiótica de las distintas cepas de *Laccaria trichodermophora*.

La evolución de la simbiosis ectomicorrízica desde la perspectiva genómica

The evolution of ectomycorrhizal symbiosis from the genomic perspective

Rodolfo Ángeles-Argáiz, Roberto Garibay-Orijel

Laboratorio de Sistemática, Ecología y Aprovechamiento de Hongos Ectomicorrízicos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

RESUMEN

Antecedentes: En los genomas de hongos ectomicorrízicos, están las huellas de las interacciones biológicas que los han transformado y les confirieron sus características fisiológicas y ecológicas.

Objetivos: Analizar los principales patrones relativos a la evolución y genómica funcional de los hongos ectomicorrízicos.

Métodos: Se revisó la bibliografía sobre historia evolutiva, diversificación, genómica funcional y genómica comparativa de hongos ectomicorrízicos.

Resultados y conclusiones: Los hongos ectomicorrízicos evolucionaron independientemente a partir de diversos ancestros saprobios con dos picos de diversificación, uno en la transición del Jurásico-Cretácico y el segundo a partir del Paleoceno. La condición ectomicorrízica generó diversificación de especies en muchos géneros que lo adoptaron. La pérdida múltiple e independiente de enzimas degradadoras de pared celular vegetal es una característica común entre estos linajes; mientras que la reinención de la comunicación con la planta a través de nuevos genes huérfanos es característica de algunos linajes. El tamaño de ciertas familias génicas ha aumentado guiado por la actividad de transposones. Diversos estudios evidencian un mosaico evolutivo y funcional desarrollado independientemente en estos hongos. La masificación de la genómica y transcriptómica es necesaria para entender las relaciones entre las presiones ambientales o biológicas y la evolución y función de los hongos.

Palabras clave: origen evolutivo, patrones de diversificación, genómica funcional

ABSTRACT

Background: In the ectomycorrhizal fungal genomes we can find the fingerprints of the biological interactions that have transformed them and conferred their physiological and ecological traits.

Objectives: To analyze the main functional genomic and evolutionary patterns related to the ectomycorrhizal lifestyle.

Methods: We reviewed bibliography on ectomycorrhizal fungi evolutionary history, diversification, functional genomics and comparative genomics.

Results and conclusions: Ectomycorrhizal fungi evolved independently from diverse saprotrophic ancestors with two diversification peaks, one in the Jurassic-Cretaceous transition and the second since the Paleocene. The ectomycorrhizal lifestyle generated diversification in many species of the genera that adopted it. The multiple and independent loss of plant cell wall degrading enzymes seems to be the only common evolutionary pattern among these lineages. In contrast, the reinvention of communication with the plant host, through the development of new orphan genes is a trait present just in some lineages. Some gene families have increased in size through transposons activity. Several studies show an evolutionary and functional mosaic developed independently in these fungi-dependent evolution. The widespread of genomic and transcriptomic is necessary to understand the effect environmental and biological pressures on fungal evolution and function.

Keywords: evolutionary origin, diversification patterns, functional genomics

ARTICLE HISTORY

Received 09 February 2019 / Accepted 12 December 2019

Published on line: 31 december 2019

CORRESPONDING AUTHOR

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

ORCID: 0000-0002-6977-6550

INTRODUCCIÓN

Una de las simbiosis biológicas más relevantes y ampliamente distribuidas en los ecosistemas terrestres es la simbiosis ectomicorrízica. Ésta se presenta entre las hifas y las raíces de un amplio número de linajes fúngicos y vegetales y ha aparecido en más de 80 ocasiones a lo largo de la historia de la vida terrestre (Tedersoo y Smith, 2017). A continuación se hace una revisión de los principales patrones históricos y evolutivos que han moldeado la diversidad genómica actual de los hongos ectomicorrízicos (HEM), y se identifican las características genómicas que les otorgan sus particularidades ecológicas y fisiológicas. Es así como identificamos que la simbiosis ectomicorrízica es un complejo mosaico de diversidad taxonómica y funcional sobre el cual actúan fuerzas genómicas de manera diferencial en linajes fúngicos diversos.

DIVERSIDAD DE PLANTAS Y HONGOS ECTOMICORRÍZICOS

Aproximadamente 2-3 % de las plantas vasculares terrestres actuales presentan simbiosis ectomicorrízica (Brundrett, 2009; Smith y Read, 2008). Tedersoo y Brundrett (2017) estimaron 6,000-7,000 especies de plantas ectomicorrízicas, en 250-300 géneros, que representan 30 linajes botánicos independientes. La mayor parte son eudicotiledóneas, excepto Pinales, Gnetaceae (coníferas) y Kobresia (Liliopsida). Las plantas ectomicorrízicas derivan de ancestros que presentaron una asociación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en Glomeromycotina (Brundrett, 2009). La micorriza arbuscular es una característica ancestral de las plantas vasculares terrestres. No obstante, se reconoce que al menos cinco linajes (*Coccoloba*, *Persicaria vivipara*, *Gymnopodium* y *Pisonea* en Caryophyllales y *Kobresia* en Poales) evolucionaron de ancestros facultativos o no-micorrízicos (Tedersoo y Brundrett, 2017). Aunque algunos autores consideran que las plantas no vasculares (e.g. hepáticas) con HEM en sus talos adoptaron la simbiosis recientemente (Tedersoo y Brundrett, 2017), se ha propuesto que la asociación entre HEM en Mucoromycotina pudo ser tan antigua e importante como la de Glomeromycotina y las primeras plantas vasculares (Chang et al., 2019). La familia Pinaceae es el grupo de plantas ectomicorrízicas más antiguo que se conoce a la fecha, ésta di-

vergió hace 320-340 Ma y sus géneros más antiguos con representantes actuales aparecieron hace 175-198 Ma (Tedersoo y Brundrett, 2017). Las pináceas se asocian con la mayoría de los linajes de HEM, ya que suelen ser los principales elementos botánicos de los ecosistemas templados y boreales. En Ericaceae, Fagales y Fabales se desarrollaron ectomicorrizas, micorrizas ericoides, arbutoides, simbiosis actinorrízica y rizobia (Brundrett, 2002; Tedersoo y Brundrett, 2017; Peterson et al., 2004). La mayoría de los linajes restantes de plantas ectomicorrízicas se distribuyen en zonas tropicales o australes, con excepción de la familia Salicaceae (Tedersoo y Brundrett, 2017).

En las familias Pinaceae, Fagaceae y Betulaceae se encuentran árboles particularmente importantes que cubren grandes extensiones forestales del hemisferio norte, mientras que las plantas ectomicorrízicas de las familias Nothofagaceae, Myrtaceae, Dipterocarpaceae y Fabales son dominantes en bosques del hemisferio sur y/o en ecosistemas tropicales. No obstante, sigue aumentando la información sobre nuevas plantas ectomicorrízicas en los trópicos húmedos y secos (Álvarez-Manjarrez et al., 2018), lo que ayuda a comprender la historia evolutiva de la simbiosis ectomicorrízica.

Tedersoo y Smith (2017) reconocen 284 géneros de HEM. De manera conservadora, la riqueza de HEM es de 7,950 especies documentadas y 20,000 estimadas, pertenecientes a los Phyla Ascomycota y Basidiomycota, y al sub-Phylum Mucoromycotina (Comandini et al., 2012).

Con el uso del criterio "duro" (la presencia del órgano ectomicorriza anatómicamente completo) aunado a los criterios "secundarios" (posicionamiento filogenético y perfil de isótopos estables), el conteo de linajes fúngicos ha pasado de 66 (Tedersoo et al., 2010) a 78 (Tedersoo y Smith, 2013) y posteriormente a 86 (Tedersoo y Smith, 2017), esto en menos de 10 años.

En algunos casos una especie, género o familia botánica completa mantienen su estatus trófico; sin embargo, en muchas otras situaciones la cuantificación de géneros o familias no es equiparable al número de ocasiones en que la simbiosis ectomicorrízica evolucionó (Tedersoo et al., 2010). Por ejemplo, mientras Rinaldi et al. (2008) consideraron un sólo origen de la simbiosis ectomicorrízica en Thelephorales, Tedersoo et al. (2010) detectaron cinco orígenes independientes dentro de este grupo. Por estos motivos se usa el término "linaje" como entidad taxonómica discreta (aunque informal).

La simbiosis ectomicorrízica apareció en 34 linajes en Ascomycota, en las Clases Dothideomycetes (1), Eurotiomycetes (1), Leotiomycetes (9), Sordariomycetes (2) y principalmente en Pezizomycetes (21); mientras que en Basidiomycota surgió en 48 linajes: Phragmobasidiomycetes (3), Sebaciales (1), Cantharellales (6), Histerangiales (2), Gomphales (2), Hymenochaetales (1), Agaricales (11), Tricholomatales (3), Russulales (2), Thelephorales (6), Poliporales (6) y Boletales (5). Así mismo, la simbiosis ectomicorrízica evolucionó en 4 ocasiones independientes en Mucoromycotina (Tedersoo y Smith, 2017). Además, es importante destacar que algunos linajes presentan muy alta diversidad, por ejemplo, en *Cortinarius* está representado por más de 2,000 especies y en *Russula* y *Lactarius* con más de 2,500. En contraste, linajes raros como *Meliniomyces* (Leotiales) sólo está representado por 4 especies (Tedersoo et al., 2010).

EL ORIGEN DE LA SIMBIOSIS ECTOMICORRÍZICA

Los HEM forman un grupo polifilético integrado por 86 linajes fúngicos independientes en Basidiomycota, Ascomycota y Mucoromycota (Tedersoo y Smith, 2017). Este grupo fue denominado así por el órgano de intercambio y comunicación formado por tejido fúngico y vegetal, la ectomicorriza. Este órgano ha sido desarrollado de manera convergente en 30 linajes botánicos (Tedersoo y Brundrett, 2017).

Históricamente se han planteado tres hipótesis sobre el origen evolutivo de la simbiosis ectomicorrízica: 1) Múltiples orígenes filogenéticos con varias reversiones hacia la saprotrofia (Hibbett et al., 2000; James et al., 2006). En este escenario, focalizado en los Homobasidiomycetes, se reconstruye al último ancestro común (UAC) de los Agaricales y Boletales como un HEM. 2) El último ancestro común de los Agaricomycetes fue un HEM, posteriormente hubo cambios hacia la saprotrofia de manera convergente en múltiples linajes (Weiss et al., 2004). Esta hipótesis se basa en el hecho de que uno de los grupos basales de Homobasidiomycetes, los Sebaciales, presentan prácticamente todos los tipos de asociaciones biotróficas, tanto benéficas como perjudiciales, por lo que se postula al UAC de Homobasidiomycetes como biotrófico, con múltiples saltos hacia la saprotrofia mediante el desarrollo de la maquinaria enzimática para la pudrición blanca y marrón. Esta hipótesis encuentra

respaldo en similitudes entre el genoma del endófito *Piriformospora indica* (Sebaciales) y los genomas de HEM, como la reducción de metabolismos secundarios y presencia de péptidos efectores, pero también con los genomas de hongos saprobios, ya que cuenta con expansiones en las enzimas degradadoras de pared celular vegetal (PCWDEs), metaloproteasas y dominios de unión a pared celular (Zuccaro et al., 2011). Se ha postulado que algunos linajes de HEM pasaron por un estado endofítico intermedio durante la transición de saprotrofos a biotrofos (Selosse et al., 2009; van der Heijden et al., 2015). 3) Los UACs fueron saprobios, con múltiples cambios hacia la simbiosis pero sin reversiones al estado anterior. En este escenario se consideran tanto a Basidiomycetes como Ascomycetes y Endogonales (Mucoromycota), proponiendo 86 saltos convergentes hacia la simbiosis ectomicorrízica (Tedersoo et al., 2010; Wolfe et al., 2012).

Tomando en cuenta los eventos de diversificación y el tiempo geológico, las filogenias datadas son una herramienta útil para hacer estimaciones confiables acerca de la historia evolutiva de los grupos biológicos para los que no se cuenta con evidencia fósil, o cuando ésta es muy pobre. Con base en relojes moleculares del marcador ribosomal SSU calibrados con fósiles de ectomicorrizas suilloides (LePage et al., 1997), Bruns et al. (1998) propusieron que la simbiosis ectomicorrízica pudo haber diversificado simultáneamente durante el Eoceno-Oligoceno (65-35 Ma). En ese momento geológico, el clima global comenzaba a enfriarse, abriendo paso a la aparición de grandes extensiones de bosques templados dominados por miembros de Pinaceae y Fagales. Por otra parte, Halling (2001) propuso que la simbiosis evolucionó simultáneamente con Pinaceae desde el periodo Jurásico (180 Ma), con una posterior explosión de diversificación durante el Cretácico (125-65 Ma), en conjunto con la diversificación de las Angiospermas en un planeta más cálido. Posteriormente se rechazaron las hipótesis del UAC de Agaricomycetes como HEM y de estos hongos como los primeros socios de Pinaceae (Hibbett y Matheny 2009; Ryberg y Matheny 2011), por la discordancia encontrada en las edades de los clados de HEM del orden Agaricales, los cuales probablemente aparecieron mucho después del Jurásico, durante el Cretácico y el Paleógeno (entre 100 y 40 Ma) (Hibbett y Matheny, 2009). Sin embargo, grupos de HEM más antiguos como Tuberales (Pezizales, Ascomycota),

parecen haber surgido durante el límite Jurásico-Cretácico y diversificado posteriormente durante el Cretácico y el Paleógeno (Bonito *et al.*, 2013; Murat *et al.*, 2018; O'Donnell *et al.*, 2011).

La visión actual, propuesta por Kohler *et al.*, (2015), es la más robusta metodológicamente. Estos autores analizaron 542 genes ortólogos de una copia en los genomas de 49 taxa, donde incluyeron HEM, hongos formadores de micorriza orquidoide, ericoide, endófitos, patógenos de plantas, de animales, hongos saprobios de pudrición blanca, marrón y descomponedores de hojarasca. Los autores detectaron múltiples eventos evolutivos de aparición de la simbiosis ectomicorrízica, la mayoría de los cuales parecen haber ocurrido en el periodo Cenozoico, (incluyendo el antiguo linaje de *Tuber melanosporum*). Sólo un linaje (*Sebacina* spp.) parece haber aparecido antes, a finales del Cretácico. Estos resultados contrastan con los de otros autores que proponen la aparición de la simbiosis ectomicorrízica como un paralelismo a la aparición de las primeras Pinaceae en Laurasia durante el Jurásico medio (Strullu-Derrien *et al.*, 2018).

Kohler *et al.* (2015) proponen, que la clase Agaricomycetes divergió mucho antes, en el Pérmico (300 Ma), por lo que la separación entre Ascomycota y Basidiomycota debió ocurrir antes. Ésto indica que la aparición de ambos grupos es muy antigua y que pasó mucho tiempo hasta el cambio en tipo de nutrición biotrófica (Brundrett y Tedersoo, 2018). En casi todas las hipótesis se propone que el ancestro de cada linaje con simbiosis ectomicorrízica fue saprobio, aunque permanece la discusión sobre un posible evento de reversión en Boletales (Kohler *et al.*, 2015). Esta postura concuerda con la reciente propuesta de "evolución micorrízica en tres olas" (Brundrett y Tedersoo, 2018) donde la segunda y tercera ola de aparición de linajes botánicos ectomicorrízicos pudieron haber ocurrido durante el Cretácico y en el Paleoceno, posiblemente en consecuencia de grandes cambios climáticos globales. Así mismo, la edad de divergencia de Tuberales se ha estimado, recientemente y de manera muy robusta, en el Cretácico temprano (Murat *et al.*, 2018). Kohler *et al.* (2015) no incluyeron datos de Endogonales (Mucoromycota), Heterobasidiomycetes ni de otros linajes en Ascomycota de los que no se contaba con genomas secuenciados. Por otro lado, aunque el origen de Endogonales se ha propuesto tan antiguo como el de Glomeromycotina, durante el Silúrico, el

origen del linaje ectomicorrízico de Endogonaceae se ha fechado en el límite del Pérmico-Triásico. Además, dado que el ancestro de Endogonales ha sido reconstruido como simbiote de plantas criptogámicas (Chang *et al.*, 2019), constituye otro caso en el que el origen de la simbiosis a partir de un ancestro saprobio podría no cumplirse. Investigación similar en Sebaciales deberá aumentar e incluir hongos representantes de distintos estatus tróficos para así modelar el estatus trófico de los ancestros de los HEM en estos linajes. Nuevas investigaciones sobre grupos antiguos podrían resolver el enigma sobre la simbiosis ectomicorrízica en el Triásico y Jurásico por las antiguas Pinaceae y Gnetaceae.

Es así como, con más de diez años de datos genómicos en el estudio de la evolución de la simbiosis ectomicorrízica, no se observa un patrón universal que aplique para todos los linajes. Sin embargo, son pocos los grupos para los que el estado trófico de su ancestro sigue en discusión, mientras que se hacen evidentes dos grandes picos de aparición/diversificación de la simbiosis, en el límite Jurásico-Cretácico y a partir del Paleoceno.

EVIDENCIA FÓSIL

La evidencia más contundente de la existencia de los organismos del pasado son los fósiles. Las esporas de los hongos suelen ser duras y abundantes, sin embargo, otras estructuras fúngicas son blandas, lo que las hace muy escasas en el registro fósil (Taylor *et al.*, 2015).

En la cantera Princeton, en la Columbia Británica canadiense, fueron encontradas las primeras ectomicorrizas fósiles. Se trata de raíces de *Pinus* permineralizadas, con patrones de ramificación que van desde dicotómicos hasta complejos coraloides, sin vellosidades radicales, manto pseudoparenquimatoso, red de Hartig que se extiende hasta la endodermis, y micelio externo de septo simple. Aunque no se encontraron esporomas, esclerocios ni rizomorfos en la cantera, se asume que las ectomicorrizas fósiles pertenecen a algún hongo cercano al linaje *Suillus-Rhizopogon* de hace unos 50 millones Ma de antigüedad (LePage *et al.*, 1997). Posteriormente, en la mina Tadkeshwar, India, se encontraron raíces de un representante de Dipterocarpaceae preservadas en ámbar. Son sistemas micorrízicos cruciformes a monopodial-pinados,

de coloraciones oscuras, abundante micelio externo melanizado y sin fíbulas. A partir de ellas se propuso el registro de una nueva especie, *Eomelanomyces cenococcoides*, un representante anamórfico extinto de Dothidiomycetes (Ascomycota), de hace 52 Ma (Beimforde et al., 2011).

Estas dos evidencias aseguran que los hongos ectomicorrízicos ancestrales formaron ectomicorrizas en las raíces de coníferas y Angiospermas desde hace al menos 52 Ma. Es importante destacar que estas únicas dos ectomicorrizas fosilizadas pertenecen a paleoambientes tropicales o templado-cálidos (Strullu-Derrien et al., 2018).

PATRONES BIOGEOGRÁFICOS DE DIVERSIDAD

En biogeografía microbiana “todas las especies están en todos lados” fue un paradigma imperante durante el siglo pasado. Este paradigma cayó, en gran medida, gracias a la secuenciación masiva de muestras ambientales (e.g. Tedersoo et al., 2014).

El gradiente latitudinal de diversidad que muestra un incremento en la riqueza hacia los trópicos es un patrón aceptado a través de todo el árbol de la vida, incluyendo los hongos (Brown, 2014). No obstante para los HEM en particular, el máximo de diversidad se alcanza en latitudes templadas (Tedersoo y Nara, 2010), lo cual no es sorprendente al considerar que el ecosistema mejor explotado por estos hongos se desarrolla en climas templados y fríos (Soudzilovskaia et al., 2017). En latitudes tropicales los HEM presentes son más antiguos, mientras que en los ecosistemas fríos suelen ser de reciente diversificación (Tedersoo et al., 2014).

Este patrón debe ser explicado, desde la perspectiva macroevolutiva, a través de procesos de diversificación, extinción y dispersión sustentados en análisis filogeográficos. Kennedy et al., (2012) detectaron que un clado particular de *Clavulina*, propio de ecosistemas templados presenta una tasa de diversificación 2.6 veces mayor al resto del género, que es principalmente tropical. Este hallazgo fue posteriormente respaldado por Sánchez-Ramírez et al. (2015a) al poner en evidencia que los clados templados del complejo *Amanita caesarea* diversificaron más rápido que los tropicales. Del mismo modo, se detectó una alta tasa de diversificación en los clados templados de *Russula*, junto con posteriores interacciones de dispersión bi-

direccionales entre ecosistemas tropicales y templados (Looney et al., 2018).

LA CONDICIÓN ECTOMICORRÍZICA COMO MOTOR DE DIVERSIFICACIÓN

La condición ectomicorrízica parece ser una fuente de diversificación para los hongos que la adoptaron. La diversidad de plantas y hongos implicados en este tipo de simbiosis es una de las evidencias más simples. La múltiple e independiente ocurrencia de la simbiosis, a través del tiempo, respalda esta aseveración.

Muchos linajes de HEM son muy diversos, lo cual es aún más evidente al compararlos con clados asimbióticos cercanamente emparentados. En Russulales, la Familia Russulaceae es ectomicorrízica y está integrada por 2,018 especies, en contraste, las familias asimbióticas Auriscalpiaceae (76), Bondarzewiaceae (72), Echinodontiaceae (7), Gloeocystidiellaceae (9) y Stereaceae (290) son menos diversas (Looney et al., 2018). Por otro lado, este patrón no se repite en el otro linaje ectomicorrízico de Russulales, el género *Albatrellus*, con sólo 26 especies. Algo similar ocurre en la Familia Tricholomateaceae (Agaricales), donde el género *Tricholoma* presenta una mayor diversidad que los grupos asimbióticos de la misma familia; sin embargo, *Albomagister* y *Porpoloma*, linajes ectomicorrízicos independientes dentro de Tricholomateaceae, no son tan diversos.

En *Russula*, los saltos de hospedero de coníferas a angiospermas se postulan como importantes motores de la diversificación (Looney et al., 2016). Así mismo, cambios de hospedero de angiospermas a Pinaceae han sido interpretados como fuente de diversificación, como sucede en el complejo *Amanita caesarea* (Sánchez-Ramírez et al., 2015a; 2015b), en Hysterangiales (Hosaka et al., 2008), así como para algunos miembros de Inocybaceae (Matheny et al., 2009), *Laccaria* (Wilson et al., 2017a, 2017b), *Leccinum* (Den Bakker et al., 2004) y Tuberaceae (Bonito et al., 2013).

Wilson et al. (2011) estudiaron los efectos de la gasteromicetización sobre las tasas de diversificación de algunos HEM en Boletales. Encontraron que los clados de HEM gasteroides tienen una tasa de diversificación mayor en comparación con sus parientes agaricoides. Aunque hasta el momento la hipótesis de la simbiosis ectomicorrízica como clave en la diversificación de los hongos no está totalmente sostenida y sigue en

discusión (Looney *et al.*, 2018; Sánchez-García y Matheny, 2017), se continúa acumulando evidencia que da mayor soporte a esta teoría. La investigación sobre los efectos que la especificidad y los cambios de hospedero tienen sobre la diversificación de los HEM ofrece la oportunidad de clarificar el panorama de la historia evolutiva de los mismos. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha secuenciado genomas del HEM *Laccaria trichodermophora*, una especie joven de hace unos 6 Ma de divergencia y con una fuerte preferencia por hospederos del género *Pinus*, aunque existen reportes de cambio de hospedero a *Fagus* (Ramos *et al.*, 2017) y *Quercus* (Mueller y Strack, 1992). Ante esta situación ha surgido preguntas como ¿Cuál es o fue el hospedero ancestral de *L. trichodermophora*? ¿Es el genoma de *L. trichodermophora* el de un HEM especialista? y ¿Existen en el genoma de *L. trichodermophora* genes involucrados en la selección de hospedero? Para responder estas preguntas se pueden utilizar aproximaciones de la genómica comparativa y la filogeografía.

CO-EVOLUCIÓN Y LA HIPÓTESIS DE LA PLANTA PUENTE

Como se ha revisado, hongos y plantas ectomicorrízicas han compartido su historia evolutiva por decenas de millones de años. Procesos co-evolutivos similares se han atribuido a los HMA desde los inicios de la vida vegetal en los ambientes terrestres (450 Ma), con influencia en la alternancia desde gametofitos de talo rastrero hacia esporofitos con raíces. Los esporofitos evolucionaron como un ambiente favorable para estos hongos y el desarrollo de sus funciones (Brundrett, 2002).

La especificidad en la simbiosis es requisito para la co-evolución, y en muchos grupos biológicos que la presentan, ha generado diversificación. Los HEM, al compararlos con los HMA pueden parecer específicos, atendiendo al número de especies botánicas involucradas. Sin embargo, los pocos ejemplos de especificidad que se conocen en la simbiosis ectomicorrízica apenas alcanzan el nivel de género.

Un sólo hospedero ectomicorrízico puede asociarse simultáneamente a un elevado número de especies de HEM, e.g. *Quercus* posee entre 50 a 200 especies de hongos asociados según el continente (García-Guzmán *et al.*, 2017). La excepción la presenta el género *Alnus*, con comunidades de HEM en sus raíces

de entre 15 y 25 especies. Kennedy *et al.* (2011) compararon las comunidades de HEM de *Alnus* en México con las de otras partes de Norteamérica. Detectaron que a pesar de que la composición de especies fue distinta, la composición de linajes fue similar. Con ello, además de respaldar la hipótesis de co-migración, se sugiere algún tipo de co-evolución difusa. Además, la comunidad restringida de HEM en las raíces de *Alnus* puede estar relacionada con el desarrollo de la simbiosis actinorrízica (Kennedy *et al.*, 2015).

En Ericales, diversos miembros desarrollaron nuevos tipos de micorriza (arbutoide y monotropoide) en asociación con HEM. Estas asociaciones son más específicas que las que se encuentran en la simbiosis ectomicorrízica. *Pterospora* y *Sarcodes* (Ericaceae) únicamente se asocian con algunas especies de *Rhizopogon* (Agaricomycetes, Brundrett, 2002), *Monotropia* se asocia con algunas especies de *Russula* y *Lactarius* (Agaricomycetes, Kong *et al.*, 2016). En estos casos la especialización es sólo por parte de la planta, ya que los HEM deben formar parte de la red micorrízica común para poder mantener a estas plantas aclorofílicas. Es así que son pocos los ejemplos de HEM para los que sí se reconoce cierto grado de especificidad, como *Lactarius* (Geml *et al.*, 2009; Looney *et al.*, 2016) y *Suillus-Rhizopogon* (Nguyen *et al.*, 2016).

Cada vez hay mayor evidencia de que la estructura y composición de las comunidades de HEM están fuertemente segregadas por factores ambientales (tipo de suelo, pH, disponibilidad de P, N, etc.) y no por la identidad taxonómica de los hospederos (e.g. Corrales *et al.*, 2016; Geml *et al.*, 2009; Looney *et al.*, 2016; Truong *et al.*, 2017; Vasco-Palacios *et al.*, 2019). Es así como los HEM colonizan por dispersión ambientes similares en asociación con plantas ectomicorrízicas distintas, como se ha detectado en especies HEM invasivas, según Vellinga *et al.*, (2009). Bajo este esquema, siguiendo la hipótesis de la planta-puente (Looney *et al.*, 2018), un HEM puede saltar desde un hospedero con poblaciones en reducción hacia otro con tamaños poblacionales crecientes. De este modo, HEM asociados a angiospermas tropicales adoptaron a las plantas ectomicorrízicas templadas que avanzaban en terreno y diversidad durante los periodos de enfriamiento ocurridos desde el Paleógeno, lo que podría explicar las explosiones de diversidad de HEM de esa época.

LA PÉRDIDA CONVERGENTE DEL PODER DEGRADADOR DE LA PARED CELULAR VEGETAL

La limitada capacidad de asimilar compuestos carbonados complejos es una de las características conocidas de los HEM desde la microbiología clásica (Frank, 2005; Hutchison, 1991); sin embargo, no fue hasta la introducción de las herramientas genómicas que se pusieron en evidencia los genes relacionados con estas funciones.

La evolución polifilética en muchos hongos ectomicorrízicos y el cambio en el modo nutricional, de saprobio a biotrófico, se caracteriza por las pérdidas convergentes de genes codificantes para enzimas degradadoras de la pared celular (PCWDEs) y peroxidases ligninoxidativas de clase II (PC2). Las pérdidas son más pronunciadas en genes que codifican PC2, esenciales para la oxidación de lignina, y en exocelulasas que degradan celulosa cristalina. De hecho, la ausencia, casi total, de genes que codifican las celobiohidrolasas GH6 y GH7 en los genomas de Agaricales y Boletales es sobresaliente (Kohler *et al.*, 2015; Kohler y Martin, 2017; Martin *et al.*, 2016).

En Ascomycota, *Tuber melanosporum* tampoco presenta estos genes, aunque *Cenococcum geophilum* los ha retenido (Martin *et al.*, 2010, 2016; Murat *et al.*, 2018; Peter *et al.*, 2016). Reducciones similares se detectaron para los genes codificadores de enzimas degradadoras de hemicelulosa o de pectina (Martin y Selosse, 2008). Todos los HEM analizados retienen al menos un gen para monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs), las cuales cumplen funciones ligno-celulolíticas, aunque en los HEM las LPMOs están más bien involucradas en el crecimiento celular y el desarrollo de pseudotejidos mediante la oxidación de la quitina (principal componente de la pared celular fúngica).

Según Hess *et al.* (2014, 2018) *Amanita* evolucionó a partir de un grupo de Agaricales descomponedores de hojarasca. Estos Agaricales no desarrollaron PC2, por lo que ni el genoma de *A. muscaria* ni el de *A. thiersii* (= *Saproamanita thiersii*) presentan PC2. En contraste, algunos HEM como *Hebeloma cylindrosporum*, descendiente de un grupo de pudrición blanca en el que se desarrollaron PC2 (y muchas otras PCWDEs), retuvieron algunas peroxidases (Dore *et al.*, 2015). En *H. cylindrosporum* las PC2 son producto de duplicaciones recientes y las sobreexpresa en la ectomicorriza, lo que sugiere que tienen algún valor

adaptativo relacionado con la colonización de la raíz y el desarrollo de la ectomicorriza (Dore *et al.*, 2015; Kohler y Martin, 2017; Martin *et al.*, 2016). Caso similar ocurrió independientemente en *Cortinarius glaucopus*, el cual presenta un número alto de PC2, comparable con el de hongos de pudrición blanca y expresados en el suelo (Bödeker *et al.*, 2014). En ambos casos, las PC2 son manganeso-peroxidases u otras formas atípicas (carecen de triptófanos expuestos y tienen modificaciones en los módulos de unión a Mn) que no presentan actividad versátil o ligninolítica. *Laccaria bicolor* también tiene 12 PC2, pero estas no se expresan en la ectomicorriza (Pellitier y Zak, 2018).

Los perfiles transcripcionales en simbiosis han mostrado evidencia de que en los grupos analizados se expresa un "núcleo de genes" conservados con los ancestros saprobios. Dichos genes son transportadores de membrana, enzimas asimilativas y oxidoreductasas (Kohler *et al.*, 2015; Kohler y Martin, 2017). En estos genes la evolución parece haber actuado sobre la regulación de su expresión, aunque también podrían haber adquirido nuevas funciones.

En los genomas de HEM se conservaron genes que codifican lacasas y peroxidases decolorantes. Estos mecanismos no son utilizados en la degradación de la pared celular, pero están relacionados con la descomposición de materia orgánica del suelo (MOS, e.g. compuestos húmicos).

El conteo y expresión de PCWDEs de los HEM pone en evidencia que estos hongos son dependientes de la planta para la obtención de carbono, pero al mismo tiempo respetan la integridad de la pared celular de la raíz, evitando así ser repelidos y mantener el suministro de nutrientes (Plett y Martin, 2015, 2018).

BÚSQUEDA Y TRANSPORTE DE NITRÓGENO

Los HEM se desarrollan generalmente en suelos pobres en N (como los bosques templados) y sus poblaciones son sensibles a la fertilización con N. En el suelo, el 95% del N es acumulado y secuestrado por la MOS. El micelio exploratorio de algunos HEM es hidrofóbico, y aunque prolifera en residuos orgánicos puede acceder a compuestos insolubles. Además, los HEM presentan la capacidad de asimilar compuestos orgánicos como urea, poliamidas, aminoácidos y péptidos pequeños (Näsholm *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2016; Read y Pérez-Moreno, 2003).

A pesar de la pérdida paralela de PCWDEs por los HEM en general, varias especies (e.g. *C. glaucopus*, *H. cylindrosporum*, *L. bicolor* y *Piloderma croceum*) conservan algunas PC2, y por tanto conservan la capacidad de oxidar lignina o residuos polifenólicos de la MOS, lo que les da acceso al N secuestrado en los complejos recalcitrantes de difícil acceso. *Paxillus involutus* y otros HEM, son capaces de modificar los biopolímeros de la MOS durante la asimilación de N mediante la excreción de radicales hidroxilo con la reacción Fenton (Rineau *et al.*, 2013). La reacción Fenton es típica de los hongos de pudrición marrón, que no cuentan con la capacidad de descomponer la lignina, cualidad propia de los hongos de pudrición blanca. La vía Fenton es costosa energéticamente y dependiente de glucosa. Otras alternativas para la obtención de N del suelo son las LPMOs que oxidan polisacáridos y otras enzimas como las peroxigenasas aromáticas, hemo-peroxidasas, lacasas y tirosinasas, que oxidan fenoles y peptidasas que actúan sobre proteínas y péptidos (Martin *et al.*, 2016).

Los HEM también presentan transportadores de membrana, selectivos para aminoácidos ricos en N, y transportadores de nitrato; también pueden importar amonio por dos vías enzimáticas distintas. Toda la absorción del N es mediante transportadores activos dependientes de ATP o NADP (Read y Pérez-Moreno, 2003; Talbot *et al.*, 2010). Se ha detectado que distintos HEM presentan preferencia por fuentes de N distintas, así como diferencias en sus capacidades de acceso y asimilación. Esto fue respaldado por la presencia de juegos genéticos distintos en genomas de HEM secuenciados (Näsholm *et al.*, 2019; Pellitier y Zak, 2018).

Los HEM no tienen una actividad muy fuerte en sustratos ricos en carbono, como la lignina de la madera. Esta actividad recae principalmente en hongos saprobios. Sin embargo, los HEM participan en la transformación de estos sustratos para la movilización del N, promoviendo la actividad microbiana al descargar energía fotosintética y depositarla en el suelo ("priming effect" como lo han llamado Lindahl y Tunlid, 2015). Pellitier y Zak (2018) revisaron la literatura referente a este tema y argumentan que todos los estudios presentan evidencia parcial y fragmentada. Para comprobar verazmente la liberación, obtención y transporte de N hacia la planta, un HEM deberá tener genes codificantes para las enzimas (secretadas) y transportadores, además de expresarlos en alguno de

sus tejidos. Estas enzimas/transportadores deberán demostrar su actividad sobre los sustratos y el N del MOS deberá ser transportado hasta la planta. Además, algunos estudios de expresión de transcritos en micelio están realizados con cultivos axénicos *in vitro*, por lo que no se cuenta con el flujo de glucosa de la planta (Pellitier y Zak, 2018).

EL POTENCIAL SAPROBIO DE LOS HONGOS ECTOMICORRÍZICOS

Desde los inicios del estudio de la simbiosis ectomicorrízica, Frank (1894) sugirió que los HEM participaban en la descomposición de la MOS con el fin de encontrar los nutrientes para la planta. Esta hipótesis fue olvidada durante mucho tiempo y vuelta a retomar en la década de 1980 (Koide *et al.*, 2008). El impacto de los HEM en el ciclo del carbono, a diferentes escalas, es muy claro (Ekblad *et al.*, 2013). Sin embargo, el potencial saprobio de los HEM es un tema aún en discusión (Kohler y Martin, 2017; Lindahl y Tunlid, 2015).

Ya se ha dicho que los HEM derivaron de ancestros saprobios y que perdieron la mayoría de los genes que sintetizan PCWDEs. Los hongos saprobios, han sido funcionalmente clasificados como hongos de pudrición blanca (degradan lignina) o de pudrición marrón (no degradan lignina). La reconstrucción del UAC de Basidiomycota lo describe como un hongo saprobio no ligninolítico, con 4 copias de LPMOs, mientras el de Agaricomycetes como un hongo de pudrición blanca con 27 copias de LPMOs. Se asume que la pudrición café aparece posteriormente de manera polifilética dentro de Agaricomycetes mediante la pérdida de genes celulolíticos y desarrollo de genes de la vía Fenton. Además, los hongos descomponedores del mantillo (sin actividad ligninolítica pero con actividad de otras enzimas sobre compuestos carbonados) parecen haber surgido a partir de ancestros de pudrición blanca (Kohler *et al.*, 2015; Kohler y Martin, 2017). Es decir, los HEM heredarían su remanente de PCWDEs de manera diferencial, atendiendo al estilo de saprotrofia que sus ancestros practicaron.

La mayoría de los HEM con genoma secuenciado parecen utilizar la glucosa vegetal para "financiar" la oxidación de la MOS, aunque no utilizan mucho los productos de esta degradación para cubrir su propia demanda de C. Incluso, se asume que el costo energético de la oxidación de MOS es más elevado que su

ganancia, lo que sugiere que los HEM pueden efectivamente descomponer MOS sin actuar como verdaderos saprótrofos (Lindahl y Tunlid, 2015).

Paxillus involutus, cuyo linaje derivó de hongos de pudrición marrón, codifica algunos genes de PCWDEs de la vía Fenton y su efecto sobre los sustratos es típico de un ataque radical hidroxilo. Sin embargo, no codifica para glicosil-hidrolasas como los hongos de pudrición marrón que usan esta vía. Como ya se ha mencionado, HEM como *A. muscaria* o *H. cylindrosporum* retienen muy pocos genes para la degradación de pared celular pero los utilizan principalmente en la organogénesis de la ectomicorriza. Así mismo, los pocos genes de PCWDEs de *L. bicolor*, expresados en el micelio, están relacionados con la obtención de N (Martin *et al.*, 2016).

Cantharellales y Sebaciniales son linajes de Agaricomycetes de temprana divergencia. En los genomas de *Sebacina vermifera* y *Tulasnella calospora*, en contraste con Agaricales y Boletales, se conservan genes de glioxil oxidasas, así como una batería genética que les permite la degradación y asimilación de compuestos carbonados complejos; sin embargo, la asociación simbiótica mutualista que generan es la micorriza orquideoide. Los hongos formadores de micorriza orquideoide efectivamente exploran los sustratos, toman carbohidratos de la celulosa cristalina y los entregan a la planta. En los genomas de *Oidiodendron*, *Melinomyces* y *Rhizoscyphus* (Helotiales, Ascomycota), hongos de condición trófica dual (biótrofo/saprotrofo) y formadores de micorriza ericoide, no solo retienen un repertorio genético que le da altas capacidades saprotróficas si no que han expandido algunas familias, mismas que sólo son expresadas en el micelio y no en el tejido simbiótico (Kohler *et al.*, 2015; Marino *et al.*, 2018; Perotto *et al.*, 2018). Caso similar es el del endófito *Piriformospora indica*. Aunque se cuenta con una mayor cantidad de genomas de HEM, estos patrones genéticos no se han detectado en ellos (Grelet *et al.*, 2017; Kohler *et al.*, 2015).

Por otro lado, *Phlebotopus portentosus* forma sintéticamente ectomicorrizas anatómicamente completas con *Pinus* y *Acacia*. Sin embargo, esta especie ha demostrado su capacidad de obtener el total de sus necesidades nutrimentales y cumplir su ciclo de vida en ausencia de una planta ectomicorrizica (Kumla *et al.*, 2016). Tedersoo y Smith (2017) desconocen a *P. portentosus* como un HEM, aunque lo consideran bio-

trófico. Ellos argumentan que sus ectomicorrizas no se desarrollan de manera natural, que la micorrización sintética fuerza la asociación y que en la planta no se detectan efectos benéficos atribuibles al hongo (Tedersoo y Smith, 2017).

Considerando la evidencia genómica y experimental, las definiciones de HEM y/o de hongo saprobio deben flexibilizarse. El continuo evolutivo y fisio-ecológico que los hongos representan a lo largo de un gradiente de biotrofia/saprotrofia impide su clasificación estricta. La constante transformación de los hongos saprobios en HEM está ocurriendo desde hace por lo menos 60 Ma, y no se detiene. El estudio de los genomas de los hongos podría ayudar a resolver preguntas tales como ¿Cuáles son las características genómicas que predisponen a los hongos saprobios a saltar hacia la biotrofia y formar estructuras tipo ectomicorriza en las distintas plantas? o ¿Son las plantas las que contienen la predisposición de adoptar hongos en sus raíces?

BIOLOGÍA EFECTORA

Las plantas que colonizaron los suelos primitivos convivieron con microorganismos simbióticos mutualistas al mismo tiempo que con patógenos y saprobios. Las plantas son capaces de percibir a los microorganismos del suelo y reaccionar diferencialmente según el caso (Plett y Martin, 2018). Cuando la planta detecta la presencia de un microorganismo frente a su pared celular reacciona entrando en un "estado hipertenso" que se caracteriza por suprimir el transporte de toxinas, acumular especies reactivas de oxígeno y empaquetar la energía para su transporte. Además, la planta en estado hipertenso, prepara mecanismos de defensa como la vía del jasmonato (JA), del etileno (ET) o del ácido salicílico (AS). Si la planta detecta daño a su pared (como el causado por un microorganismo patógeno) desencadena estos metabolismos de defensa (Plett y Martin, 2018). Los mecanismos de manipulación de la respuesta inmune son muy conocidos en los microorganismos patógenos (Toruño *et al.*, 2016). Los HEM, al carecer de PCWDEs, respetan la integridad de la pared, pero al mismo tiempo inhiben la respuesta inmune, bloqueando molecularmente puntos claves en la señalización, a lo que se le llama "biología efectora" (Toruño *et al.*, 2016).

En la célula de la raíz, la conjugación de jasmonato con isoleucina (JA-Ile) forma una hormona que induce la expresión de genes de defensa de la planta. A bajas con-

centraciones de JA-Ile, el factor de transcripción MYC2 está bloqueado por el complejo JAZ6. El factor MYC2 está asociado al sitio de reconocimiento de los genes de defensa relacionados con JA. Altas concentraciones de JA-Ile (inducidas por la detección de microorganismos) son detectadas por el complejo F-box por lo que COI1 se asocia a JAZ6. COI1 es parte del complejo ubiquitín ligasa SCF^{COI1}, por lo que JAZ6 es marcado para degradación por el proteosoma 26S. Esta reacción libera a MYC2, e impide el crecimiento micelial mediante la expresión los genes relacionados a JA.

No obstante, en el escenario de la colonización de la raíz por *Laccaria bicolor*, una vez que se formó la red de Hartig entre las células de las raíces de *Populus trichocarpa*, el HEM percibe flavonoides de la planta, por lo que secreta el péptido efector MiSSP7 (proteína pequeña secretada inducida en micorriza de 7 kDa). MiSSP7 es transportada al núcleo de la célula vegetal, donde interactúa con JAZ6. MiSSP7 se asocia a JAZ6 y evita su reconocimiento por COI1, por lo que no es degradada, el factor MYC2 no se libera y los genes relacionados con JA no se activan (Martin et al., 2016; Plett y Martin, 2012; Plett et al., 2011; 2014; Veneault-Fourrey et al., 2014).

Cuando *L. bicolor* entra en simbiosis con algún hospedero ectomicorrízico expresa una "batería genética núcleo" de regulación, pero también expresa genes específicos atendiendo a la identidad taxonómica del hospedero. Esto ha sido evidenciado en la interacción de *L. bicolor* con *Populus trichocarpa* y *P. deltoides* (Salicaceae, Magnoliophyta) en el estudio de Tschapinski et al. (2014); así como con *Pseudotsuga menziensis* (Pinaceae), según Plett et al. (2015).

Los péptidos efectores, como MiSSP7, son proteínas pequeñas secretadas (SSPs) que actúan sobre otras moléculas activando o reprimiendo su función. Son conocidos en bacterias, hongos, ácaros y nemátodos. *Populus trichocarpa* también secreta SSPs en la ectomicorriza (Plett et al., 2017). Algunas de estas SSPs vegetales entran a la célula fúngica y se ha propuesto que podrían interferir en la regulación del crecimiento y la morfología hifal (Plett et al., 2017).

Un ejemplo distinto es MiSSP8, un péptido de *L. bicolor*, que a pesar de ser expresado durante la asociación, no se considera efector ya que no interactúa con el genoma del simbionte. Se expresa en el esporoma y en las primeras etapas de la formación de la ectomicorriza. El silenciamiento de MiSSP8 con

RNAi, impide el desarrollo del manto y red de Hartig. Además, MiSSP8 comparte dominios conservados con SSPs de hongos saprobios, por lo que se propone que MiSSP8 es un péptido retenido del ancestro saprobio involucrado en el desarrollo tisular (Pellegrin et al., 2019).

El genoma de *Laccaria bicolor* codifica cerca de 200 SSPs con funciones desconocidas (Martin et al., 2008), lo que resulta alto si se compara con el 1 al 2% de los genes de *Amanita muscaria*, *Piloderma croceum*, *Hebeloma cylindrosporum* y *Suillus luteus* que codifican SSPs (Plett y Martin, 2015). Del total de genes expresados en la ectomicorriza, entre 7 y 38 % son genes específicos de una especie de HEM. Incluso dentro de los linajes mejor muestreados (Boletales 6 genomas, *Amanita* 7 genomas) las especies comparten muy pocos genes de SSPs. Por ejemplo, solo un tercio de los genes huérfanos de *L. bicolor* tienen homólogos en su especie hermana *L. amethystina*, la cual divergió del linaje de *L. bicolor* hace alrededor de 20 Ma (Kohler et al., 2015; Wilson et al., 2015a).

En el genoma de *L. bicolor* se han estudiado factores transcripcionales codificados. Entre otras cosas, Daguerre y colaboradores (2017) detectaron una nueva familia de factores transcripcionales con señal de secreción. Ellos propusieron que estos factores transcripcionales secretados podrían asociarse al DNA nuclear en la planta y participar como efectores en la regulación a favor de la simbiosis (Daguerre et al., 2017). Otro mecanismo de regulación y represión de la expresión genética del simbionte es el siRNA. A diferencia de hongos patógenos y plantas, en los HEM aún no se han detectado siRNA secretado en la célula del hospedero (Plett y Martin, 2018).

Aunque Kohler et al. (2015) encontraron como común denominador el gran número de SSPs en los genomas de Basidiomycota, Hess et al. (2018) no encontraron dicho patrón en diferentes especies de *Amanita*. Estos autores identificaron que en las especies ectomicorrízicas de *Amanita* con genomas grandes (*A. brunnescens* y *A. muscaria*) las SSPs presentan expansiones considerables, sin embargo, esta cualidad se presenta también en la especie asimbiótica *A. thiersii* la cual está relacionada con *Volvariella volvacea* y presenta un número aún mayor de SSPs. También detectaron, en concordancia con lo propuesto por Kohler et al. (2015), que la mayor proporción de SSPs representa genes de linaje-específicos; lo que pone en evidencia

una dinámica evolutiva acelerada posterior a la adopción del estilo trófico ectomicorrízico.

La evidencia genómica sugiere que la biología efectora juega un papel determinante en el establecimiento o mantenimiento de la simbiosis y que cada linaje de HEM ha logrado comunicarse con su hospedero mediante nuevos genes, muchos de ellos codificantes para SSPs. Sin embargo, de manera general, los HEM de Basidiomycota presentan un elevado contenido de SSPs, mientras que Ascomycetes y Endogonales presentan una cantidad mucho menor y relativamente equiparable entre ellos (Chang *et al.*, 2019).

ACTIVIDAD DE TRANSPOSONES

Los transposones o elementos transponibles (ETs), son fragmentos del DNA que se caracterizan por multiplicarse y moverse “al azar” al interior de un genoma. Mediante el análisis de estos elementos en 1,746 genomas de hongos, Muszewska *et al.* (2017) detectaron patrones relacionados con el estilo de vida de esos hongos y el tamaño de su genoma. Los genomas secuenciados de los HEM son de los más grandes entre los hongos, aunque algunos fitopatógenos también presentan genomas grandes (e.g. saprobios: *Saccharomyces cerevisiae* 12 Mb, *Aspergillus niger* 35 Mb, *Neurospora crassa* 40 Mb, *Agaricus bisporus* 31 Mb; patógenos *Ustilago maydis* 20 Mb, *Puccinia graminis* 116 Mb; HEM: *Laccaria bicolor* 65 Mb, *Amanita muscaria* 54 Mb, *Hebeloma cylindrosporium* 38 Mb, *Tuber melanosporum* 125 Mb y *Cenococcum geophilum* 178 Mb, según NCBI, 17 de marzo del 2018). Los HEM pudieron tener reducciones en el contenido genético codificante para PCWDEs y para procesos metabólicos secundarios, sin embargo, aunque los ETs pueden incrementar el tamaño de las familias génicas, su genoma creció en cuanto a su DNA no codificante (Muszewska *et al.*, 2017).

El contenido de elementos móviles en el genoma es regido por dos fuerzas opuestas: la propia capacidad proliferativa de los ETs y la capacidad de defensa del genoma hospedero para mantener su estabilidad e integridad. Los ETs son eliminados constantemente por recombinación ectópica y por deleciones, aunque los mecanismos para eliminar ETs no están muy estudiados en hongos (Muszewska *et al.*, 2017). Muchos mecanismos para reprimir la proliferación de ETs ocurren en la meiosis, por lo que hongos con reproduc-

ción clonal presentan genomas altamente poblados por ETs. Este podría ser el caso del ectomicorrízico *Cenococcum geophilum* (Ascomycota, Mytilindales, para el cual no se conoce fase sexual), con el genoma fúngico más grande conocido para el momento de su publicación (178 Mb, Peter *et al.*, 2016). Sin embargo, los genes MAT 1-1-1 y otros involucrados en la reproducción sexual están presentes en su genoma. La diversidad genética en esta especie presenta huellas de recombinación, por lo que Peter *et al.* (2016) han propuesto que sí se reproduce sexualmente en la naturaleza. El HMA *Rhizophagus irregularis* se destaca entre todos los hongos por su diversidad y abundancia de ETs en su gran genoma (101 Mpb con más de 80,000 ETs en 16 de las 19 súper familias de ETs analizadas, Muszewska *et al.*, 2017; Tisserant *et al.*, 2013).

Los hongos asociados a plantas presentan la tendencia a acumular TEs lo que propicia incremento en tamaño genómico. Esto es más evidente en hongos biotróficos que patógenos. En contraste, los patógenos de animales poseen genomas compactos y pequeños. Algunos de los ETs encontrados en hongos simbiotes de plantas multiplican RNAi que podrían actuar como mecanismos efectores en la comunicación con la planta hospedera (Hess y Pringle, 2014; Muszewska *et al.*, 2017; Plett y Martin, 2018).

Hess *et al.* (2014) analizaron el contenido de ETs en los genomas de varias especies de *Amanita*, ectomicorrízicas y saprobias encontrando que de manera general las especies de HEM presentan un mayor contenido de ETs (aunque el saprobio *Amanita thiersii* no se ajusta al patrón).

Eventos demográficos como “cuellos de botella” pueden reducir los tamaños poblacionales, disminuyendo la tasa de pérdida de ETs, lo que a su vez propicia que estos elementos se fijen en los genomas. A diferencia de los hongos saprobios, que suelen tener distribuciones muy amplias y transcontinentales, las especies de HEM presentan distribuciones más restringidas. Además, su historia evolutiva relacionada con expansiones y contracciones de los bosques templados, podría contribuir a la acumulación de ETs.

LA VÍA METABÓLICA SIMBIÓTICA COMÚN

La más antigua de las interacciones simbióticas mutualistas de la rizósfera, la micorriza arbuscular, desarrolló en conjunto con la planta los mecanismos moleculares

de comunicación, mismos que han sido heredados a linajes botánicos actuales. Las plantas liberan estrigolactonas para comunicarse con los hongos y bacterias del suelo. En los HMA, las estrigolactonas desencadenan la germinación de esporas, ramificación hifal, metabolismo mitocondrial, reprogramación traduccional y secreción de lipoquitos-oligosacáridos y quito-oligosacáridos. La planta, percibe éstos y otros "patrones moleculares asociados a microorganismos" mediante varios receptores LysM tipo cinasa. A partir de ahí, se desencadena la traducción de señales proteicas, como los receptores cinasa DMI2 y DMI3, los canales iónicos nucleares CASTOR y POLLUX, y el factor de transcripción IPD3, requeridos para la activación del programa simbiótico de la planta. Después, RAM1, un factor de transcripción GRAS (involucrado en el desarrollo) y RAM2 una glicerol-3-fosfato acil transferasa, permiten el establecimiento de la micorriza arbuscular (Venkateshwaran et al., 2013). A esta cascada de señalización y maquinaria molecular vegetal se le conoce como "la vía metabólica simbiótica común". Estos genes son altamente conservados entre angiospermas y gimnospermas. La pérdida de estos genes en varios linajes se correlaciona con la pérdida de la simbiosis micorrízica-arbuscular (Delaux et al., 2014). Gracias a esta maquinaria genética, algunas plantas desarrollaron la simbiosis con las bacterias fijadoras de N (Parniske, 2008).

Los genomas de los HEM codifican los distintos mecanismos que evolucionaron de manera convergente para formar estructuras y funciones similares (Plett y Martin, 2017). No hay evidencia de que los HEM secreten lipoquitos-oligosacáridos ni quito-oligosacáridos, aunque constantemente liberan derivados de la quitina en su ambiente, así como auxinas, etileno y sesquiterpenos. Las Pinaceae carecen de la mayoría de los genes antes mencionados (excepto RAM2), lo que refuerza la idea de que los HEM en Pinaceae no utilizan la llamada "vía metabólica simbiótica común" (García et al., 2015).

Otras sustancias químicas, hormonales o efectoras secretadas por los HEM podrían estar actuando sobre alguno los genes de la vía metabólica simbiótica común, aunque aún no hay evidencia de esto.

CONSIDERACIONES FINALES

El nivel de investigación actual ha permitido conocer algunos procesos de la evolución de los HEM, de sus

propiedades genómicas y patrones de diversificación, sin embargo, la mayor parte de la teoría sobre la genómica funcional y sus implicaciones fisiológicas está constituida por una colección de observaciones particulares realizadas en distintos modelos lejanamente emparentados. El continuo saprotrofia-biotrofia en el estatus trófico de una especie, el grado de especificidad hacia hospedero, la co-evolución y la hipótesis de la planta puente como motor de diversificación, son algunos de los temas que siguen en discusión y están siendo investigados mediante genómica funcional y comparativa.

El análisis genómico de organismos no modelo ofrece la oportunidad de comprender a mayor profundidad las generalidades, y particularidades de la simbiosis. Así mismo, la genómica comparativa intraespecífica es aún un campo apenas explorado, pero con un gran potencial, dado que la microbiología clásica demostró la importancia de la identidad de la cepa (variación genética intraespecífica) en muchos aspectos fisiológicos y ecológicos de la interacción micorrízica (Di Battista et al., 1996).

LITERATURA CITADA

- Álvarez-Manjarrez, J., R. Garibay-Orijel, M.E. Smith, 2018. Caryophyllales are the main hosts of a unique set of ectomycorrhizal fungi in a Neotropical dry forest. *Mycorrhiza* 28: 103-115.
- Beimforde, C., N. Schäfer, H. Dörfelt, P.C. Nascimbene, H. Singh, J. Heinrichs, et al., 2011. Ectomycorrhizas from a Lower Eocene angiosperm forest. *New Phytologist* 192: 988-996.
- Bonito, G., M.E. Smith, M. Nowak, R.A. Healy, G. Guevara, E. Cázares, et al., 2013. Historical biogeography and diversification of truffles in the Tuberaceae and their newly identified southern hemisphere sister lineage. *PloS one* 8: e52765.
- Bödeker, I., K.E. Clemmensen, W. Boer, F. Martin, A. Olson, B.D. Lindahl, 2014. Ectomycorrhizal *Cortinarius* species participate in enzymatic oxidation of humus in northern forest ecosystems. *New Phytologist* 203: 245-256.
- Brown, J.H., 2014. Why are there so many species in the tropics? *Journal of Biogeography* 41: 8-22.
- Brundrett, M.C., 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304.
- Brundrett, M.C., 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320: 37-77.
- Brundrett, M.C., L. Tedersoo, 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220: 1108-1115.
- Bruns, T.D., T.M. Szaro, M. Gardes, K.W. Cullings, J. J. Pan, D. L. Taylor, et al., 1998. A sequence database for the identification of

- ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology* 7: 257-272.
- Chang, Y., A. Desirò, H. Na, L. Sandor, A. Lipzen, A. Clum, et al., 2019. Phylogenomics of Endogonaceae and evolution of mycorrhizas within Mucoromycota. *New Phytologist* doi: 10.1111/nph.15613.
- Comandini, O., A.C. Rinaldi, T.W. Kuyper, 2012. Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: a continuous challenge. In: M. Pagano (ed.), *Mycorrhiza: occurrence in natural and restored environments*. Nova Science Publishers, Nueva York. Pp. 165-200.
- Corrales, A., A.E. Arnold, A. Ferrer, B.L. Turner, J.W. Dalling, 2016. Variation in ectomycorrhizal fungal communities associated with *Oreomunnea mexicana* (Juglandaceae) in a Neotropical montane forest. *Mycorrhiza* 26: 1-17.
- Daguere, Y., E. Levati, J. Ruytinx, E. Tisserant, E. Morin, A. Kohler, et al., 2017. Regulatory networks underlying mycorrhizal development delineated by genome-wide expression profiling and functional analysis of the transcription factor repertoire of the plant symbiotic fungus *Laccaria bicolor*. *BMC Genomics* 18: 737.
- Delaux, P.M., K. Varala, P.P. Edger, G.M. Coruzzi, J.C. Pires, J.M. Ané, 2014. Comparative phylogenomics uncovers the impact of symbiotic associations on host genome evolution. *PLoS Genetics* 10: e1004487.
- Den Bakker, H.C., G.C. Zuccarello, T.H. Kuyper, M.E. Noordeloos, 2004. Evolution and host specificity in the ectomycorrhizal genus *Leccinum*. *New Phytologist* 163: 201-215.
- Di Battista, C., M.A. Selosse, D. Bouchard, E. Stenström, F. Le Tacon, 1996. Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycological Research* 100: 1315-1324.
- Dore, J., M. Perraud, C. Dieryckx, A. Kohler, E. Morin, B. Henrissat, et al., 2015. Comparative genomics, proteomics and transcriptomics give new insight into the exoproteome of the basidiomycete *Hebeloma cylindrosporium* and its involvement in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 208: 1169-1187.
- Eklblad, A., H. Wallander, D.L. Godbold, C. Cruz, D. Johnson, P. Baldrian, et al., 2013. The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils: role in carbon cycling. *Plant and Soil* 366: 1-27.
- Frank, B., 1894. Die bedeutung der mykorrhizapilze für die gemeine Kiefer. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 16: 185-190.
- Frank, B., 2005. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of AB Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15: 267-275.
- Garcia, K., P.M. Delaux, K.R. Cope, J.M. Ané, 2015. Molecular signals required for the establishment and maintenance of ectomycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 208: 79-87.
- García-Guzmán, O.M., R. Garibay-Orijel, E. Hernández, E. Arellano-Torres, K. Oyama, 2017. Word-wide meta-analysis of *Quercus* forests ectomycorrhizal fungal diversity reveals southwestern Mexico as a hotspot. *Mycorrhiza* 27: 811-822.
- Geml, J., G.A. Laursen, I. Timling, J.M. McFarland, G. Booth, N. Lennon, et al., 2009. Molecular phylogenetic biodiversity assessment of arctic and boreal ectomycorrhizal *Lactarius* Pers. (Russulales; Basidiomycota) in Alaska, based on soil and sporocarp DNA. *Molecular Ecology* 18: 2213-2227.
- Grelet, G., E. Martino, I.A. Dickie, R. Tajuddin, R. Artz, 2017. Ecology of ericoid mycorrhizal fungi: what insight have we gained with molecular tools and what's missing. In: Martin, F. (ed.), *Molecular mycorrhizal symbiosis*. Wiley, Hoboken. Pp. 405-419.
- Halling, R.E., 2001. Ectomycorrhizae: co-evolution, significance, and biogeography. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 5-13.
- Hess, J., A. Pringle, 2014. The natural histories of species and their genomes: asymbiotic and ectomycorrhizal *Amanita* fungi. In: Martin, F. (ed.), *Advances in botanical research* Vol. 70. Academic Press, London. Pp. 235-257.
- Hess, J., I. Skrede, M. Chaib De Mares, M. Hainaut, B. Henrissat, A. Pringle, 2018. Rapid divergence of genome architectures following the origin of an ectomycorrhizal symbiosis in the genus *Amanita*. *Molecular Biology and Evolution* 35: 2786-2804.
- Hess, J., I. Skrede, B.E. Wolfe, K. LaButti, R.A. Ohm, I.V. Grigoriev, A. Pringle, 2014. Transposable element dynamics among asymbiotic and ectomycorrhizal *Amanita* fungi. *Genome Biology and Evolution* 6: 1564-1578.
- Hibbett, D.S., L.B. Gilbert, M.J. Donoghue, 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407: 506-508.
- Hibbett, D.S., P.B. Matheny, 2009. The relative ages of ectomycorrhizal mushrooms and their plant hosts estimated using Bayesian relaxed molecular clock analyses. *BMC Biology* 7: 1-13.
- Hosaka, K., M.A. Castellano, J.W. Spatafora, 2008. Biogeography of Hysterangiales (Phallomycetidae, Basidiomycota). *Mycological Research* 112: 448-462.
- Hutchison, L.J., 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42: 387-504.
- James, T.Y., F. Kauff, C.L. Schoch, P.B. Matheny, V. Hofstetter, C.J. Cox, et al., 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Kennedy, P.G., R. Garibay-Orijel, L.M. Higgins, R. Ángeles-Argáiz, 2011. Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza* 21: 559-568.
- Kennedy, P.G., P.B. Matheny, K.M. Ryberg, T.W. Henkel, J.K. Uehling, M.E. Smith, 2012. Scaling up: examining the macroecology of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21: 4151-4154.
- Kennedy, P.G., J.K. Walker, L.M. Bogar, 2015. Interspecific mycorrhizal networks and non-networking hosts: exploring the ecology of the host genus *Alnus*. In: Horton, T.R. (ed.), *Mycorrhizal networks*. Springer, Dordrecht. Pp. 227-254.
- Kohler, A., A. Kuo, L.G. Nagy, E. Morin, K.W. Barry, F. Buscot, et al., 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics* 47: 410-415.
- Kohler, A., F. Martin, 2017. The evolution of the mycorrhizal lifestyles—a genomic perspective. In: Martin, F. (ed.), *Molecular mycorrhizal symbiosis*. Wiley, Hoboken. Pp. 89-107.
- Koide, R.T., J.N. Sharda, J.R. Herr, G.M. Malcolm, 2008. Ectomycorrhizal fungi and the biotrophy-saprotrophy continuum. *New Phytologist* 178: 230-233.

- Kong, A., J. Cifuentes, A. Estrada-Torres, L. Guzmán-Dávalos, R. Garibay-Orijel, B. Buyck, 2016. Russulaceae associated with myco-heterotroph *Monotropa uniflora* (Ericaceae) in Tlaxcala, Mexico: a phylogenetic approach. *Cryptogamie Mycologie* 36: 479-513.
- Kumla, J., E.A. Hobbie, N. Suwannarach, S. Lumyong, 2016. The ectomycorrhizal status of a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, assessed using mycorrhizal synthesis and isotopic analysis. *Mycorrhiza* 26: 333-343.
- LePage, B., R. Currah, R. Stockey, G. Rothwell, 1997. Fossil ectomycorrhizae from the Middle Eocene. *American Journal of Botany* 84: 410-410.
- Lindahl, B.D., A. Tunlid, 2015. Ectomycorrhizal fungi-potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist* 205: 1443-1447.
- Looney, B.P., P. Meidl, M.J. Piatek, O. Miettinen, F. Martin, P.B. Matheny, J.L. Labbé, 2018. Russulaceae: a new genomic dataset to study ecosystem function and evolutionary diversification of ectomycorrhizal fungi with their tree associates. *New Phytologist* 218: 54-65.
- Looney, B.P., M. Ryberg, F. Hampe, M. Sánchez-García, P.B. Matheny, 2016. Into and out of the tropics: global diversification patterns in a hyperdiverse clade of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 25: 630-647.
- Martin, F., A. Aerts, D. Ahrén, A. Brun, E.G.J. Danchin, F. Duchaussoy, et al., 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452: 88-92.
- Martin, F., A. Kohler, C. Murat, R. Balestrini, P.M. Coutinho, O. Jaillon, et al., 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464: 1033-1038.
- Martin, F., A. Kohler, C. Murat, C. Veneault-Fourrey, D.S. Hibbett, 2016. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 14: 760-773.
- Martin, F., M.A. Selosse, 2008. The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytologist* 180: 296-310.
- Perotto, S.D., E.A. Martino, 2018. Ericoid mycorrhizal fungi and their genomes: another side to the mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist* 220: 1141-1147.
- Martino, E., E. Morin, G.A. Grelet, A. Kuo, A. Kohler, S. Daghino, S., et al., 2018. Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist* 217: 1213-1229.
- Matheny, P.B., M.C. Aime, N.L. Bougher, B. Buyck, D.E. Desjardin, E. Horak, et al., 2009. Out of the Palaeotropics? Historical biogeography and diversification of the cosmopolitan ectomycorrhizal mushroom family Inocybaceae. *Journal of Biogeography* 36: 577-592.
- Mueller, G.M., B.A. Strack, 1992. Evidence for a mycorrhizal host shift during migration of *Laccaria trichodermophora* and other agarics into neotropical oak forests. *Mycotaxon* 45: 249-256.
- Murat, C., T. Payen, B. Noel, A. Kuo, E. Morin, J. Chen, et al., 2018. Pezizomycetes genomes reveal the molecular basis of ectomycorrhizal truffle lifestyle. *Nature Ecology and Evolution* 2: 1956-1965.
- Muszewska, A., K. Steczkiewicz, M. Stepniewska-Dziubinska, K. Ginalska, 2017. Cut-and-paste transposons in fungi with diverse lifestyles. *Genome Biology and Evolution* 9: 3463-3477.
- Näsholm, T., K. Kielland, U. Ganeteg, 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182: 31-48.
- Nguyen, N.H., L.J. Williams, J.B. Vincent, A. Stefanski, J. Cavelander-Bares, C. Messier, et al., 2016. Ectomycorrhizal fungal diversity and saprotrophic fungal diversity are linked to different tree community attributes in a field-based tree experiment. *Molecular Ecology* 25: 4032-4046.
- O'Donnell, K., A.P. Rooney, G.L. Mills, M. Kuo, N.S. Weber, S.A. Rehner, 2011. Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincialism in the Holarctic. *Fungal Genetics and Biology* 48: 252-265.
- Parniske, M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6: 763-775.
- Pellegrin, C., Y. Daguerre, J. Ruytinx, F. Guinet, M. Kemppainen, M.B. Plourde, et al., 2019. *Laccaria bicolor* MiSSP8 is a small-secreted protein decisive for the establishment of the ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental Microbiology* 21: 3765-3779.
- Pellitier, P.T., D.R. Zak, 2018. Ectomycorrhizal fungi and the enzymatic liberation of nitrogen from soil organic matter: why evolutionary history matters. *New Phytologist* 217: 68-73.
- Pena, R., 2016. Nitrogen acquisition in ectomycorrhizal symbiosis. In: Martin, F. (ed.), *Molecular mycorrhizal symbiosis*. Wiley, Hoboken. Pp. 179-196.
- Peter, M., A. Kohler, R.A. Ohm, A. Kuo, J. Krützmann, E. Morin, et al., 2016. Ectomycorrhizal ecology is imprinted in the genome of the dominant symbiotic fungus *Cenococcum geophilum*. *Nature Communications* 7: 12662.
- Peterson, R.L., H.B. Massicotte, L.H. Melville, 2004. *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press. FALTA CIUDAD.
- Plett, J.M., Y. Daguerre, S. Wittulsky, A. Vayssières, A. Deveau, S. J. Melton, et al., 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 8299-8304.
- Plett, J.M., M. Kemppainen, S.D. Kale, A. Kohler, V. Legué, A. Brun, et al., 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* 21: 1197-1203.
- Plett, J.M., F. Martin, 2011. Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics* 27: 14-22.
- Plett, J.M., F. Martin, 2012. Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor*. *Plant Signaling and Behavior* 7: 12-15.
- Plett, J.M., F. Martin, 2015. Reconsidering mutualistic plant-fungal interactions through the lens of effector biology. *Current Opinion in Plant Biology* 26: 45-50.
- Plett, J.M., F. Martin, 2018. Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *The Plant Journal* 93: 729-746.
- Plett, J.M., E. Tisserant, A. Brun, E. Morin, I.V. Grigoriev, A. Kuo, et al., 2015. The mutualist *Laccaria bicolor* expresses a core gene regulon during the colonization of diverse host plants and a variable regulon to counteract host-specific defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28: 261-273.

- Plett, J.M., H. Yin, R. Mewalal, R. Hu, T. Li, P. Ranjan, et al., 2017. *Populus trichocarpa* encodes small, effector-like secreted proteins that are highly induced during mutualistic symbiosis. *Scientific Reports* 7: 382.
- Ramos, A., V.M. Bandala, L. Montoya, 2017. A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relict forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycKeys* 27: 77-94.
- Read, D.J., J. Perez-Moreno, 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? *New Phytologist* 157: 475-492.
- Rinaldi, A.C., O. Comandini, T.W. Kuyper, 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33: 1-45.
- Rineau, F., F. Shah, M.M. Smits, P. Persson, T. Johansson, R. Carleer, et al., 2013. Carbon availability triggers the decomposition of plant litter and assimilation of nitrogen by an ectomycorrhizal fungus. *The ISME Journal* 7: 2010-2022.
- Ryberg, M., P.B. Matheny, 2011. Asynchronous origins of ectomycorrhizal clades of Agaricales. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 279: 2003-2011.
- Sánchez-García, M., P.B. Matheny, 2017. Is the switch to an ectomycorrhizal state an evolutionary key innovation in mushroom-forming fungi? A case study in the Tricholomatineae (Agaricales). *Evolution* 71: 51-65.
- Sánchez-Ramírez, S., R.S. Etienne, J.M. Moncalvo, 2015 a. High speciation rate at temperate latitudes explains unusual diversity gradients in a clade of ectomycorrhizal fungi. *Evolution* 69: 2196-2209.
- Sánchez-Ramírez, S., R.E. Tulloss, M. Amalfi, J.M. Moncalvo, 2015 b. Palaeotropical origins, boreotropical distribution and increased rates of diversification in a clade of edible ectomycorrhizal mushrooms (*Amanita* section *Caesareae*). *Journal of Biogeography* 42: 351-363.
- Selosse, M.A., M.P. Dubois, N. Alvarez, 2009. Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research* 113: 1062-1069.
- Smith, S.E., D.J. Read, 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd. Academic Press, New York.
- Soudzilovskaia, N.A., S. Vaessen, M. van't Zelfde, N. Raes, 2017. Global patterns of mycorrhizal distribution and their environmental drivers. In: Tedersoo, L. (ed.), *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Springer, Cham. Pp. 223-235.
- Strullu-Derrien, C., M.A. Selosse, P. Kenrick, F. Martin, 2018. The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist* 220: 1012-1030.
- Talbot, J.M., K.K. Treseder, 2010. Controls over mycorrhizal uptake of organic nitrogen. *Pedobiologia* 53: 169-179.
- Tschaplinski, T.J., J. Plett, N.L. Engle, A. Deveau, K.C. Cushman, M.Z. Martin, et al., 2014. *Populus trichocarpa* and *Populus deltoides* exhibit different metabolomic responses to colonization by the symbiotic fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 546-556.
- Taylor, T.N., M. Krings, E.L. Taylor, 2015. Fungal diversity in the fossil record. In: McLaughlin D., J. Spatafora (eds.), *systematics and evolution*. The Mycota (a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research), vol 7B. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp. 259-278.
- Tedersoo, L., M. Bahram, S. Pölme, U. Kõljalg, N.S. Yorou, R. Wijesundera, et al., 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346: 1256688.
- Tedersoo, L., M.C. Brundrett, 2017. Evolution of ectomycorrhizal symbiosis in plants. In: Tedersoo, L. (ed.), *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Springer, Cham. Pp. 407-467.
- Tedersoo, L., K. Nara, 2010. General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 185: 351-354.
- Tedersoo, L., M. Smith, 2013. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews* 27: 83-99.
- Tedersoo, L., M.E. Smith, 2017. Ectomycorrhizal fungal lineages: detection of four new groups and notes on consistent recognition of ectomycorrhizal taxa in high-throughput sequencing studies. In: Tedersoo, L. (ed.), *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Springer, Cham. Pp. 125-142.
- Tedersoo, L., T.W. May, M.E. Smith, 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217-263.
- Tisserant, E., M. Malbreil, A. Kuo, A. Kohler, A. Symeonidi, R. Balestrini, et al., 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 20117-20122.
- Toruño, T.Y., I. Stergiopoulos, G. Coaker, 2016. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology* 54: 419-441.
- Truong, C., S. Sánchez-Ramírez, F. Kuhar, Z. Kaplan, M.E. Smith, 2017. The Gondwanan connection—Southern temperate *Amanita* lineages and the description of the first sequestrate species from the Americas. *Fungal Biology* 121: 638-651.
- van der Heijden, M.G., F.M. Martin, M.A. Selosse, I.R. Sanders, 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205: 1406-1423.
- Vasco-Palacios, A.M., M. Bahram, T. Boekhout, L. Tedersoo, 2019. Carbon content and pH as important drivers of fungal community structure in three Amazon forests. *Plant and Soil* 1-21.
- Vellinga, E. C., B. E. Wolfe, A. Pringle, 2009. Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist* 181: 960-973.
- Veneault-Fourrey, C., J.M. Plett, F. Martin, 2014. Who is controlling whom within the ectomycorrhizal symbiosis: insights from genomic and functional analyses. In: Bruijn, F.J. (ed.), *Molecular microbial ecology of the rhizosphere: Volume 1 & 2*, Wiley, Hoboken. Pp. 501-512.
- Venkateshwaran, M., J.D. Volkening, M.R. Sussman, J.M. Ané, 2013. Symbiosis and the social network of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 118-127.
- Weiss, M., M.A. Selosse, K.H. Rexer, A. Urban, F. Oberwinkler, 2004. Sebaciales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research* 108: 1003-1010.
- Wilson, A.W., M. Binder, D.S. Hibbett, 2011. Effects of gasteroid fruiting body morphology on diversification rates in three indepen-



From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*

Rodolfo E. Ángeles-Argáiz^{a, b, c}, Ilse A. Carmona-Reyes^c,
Christian Armando Quintero-Corrales^{a, b}, Francisco J. Medina-Macías^c,
Abel Blancas-Cabrera^c, Norma A. Valdez-Cruz^c, Miguel Ulloa^b,
Mauricio A. Trujillo-Roldán^c, Roberto Garibay-Orijel^{b, *}

^a Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-153, Ciudad de México, C.P. 04510, Mexico

^b Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-233, Ciudad de México, C.P. 04510, Mexico

^c Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70-228, Ciudad de México, C.P. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2019

Received in revised form

5 February 2020

Accepted 7 February 2020

Available online 21 February 2020

Corresponding Editor: Nicholas P Money

Keywords:

Ectomycorrhizal vegetative inoculum
Large scale production
Submerged culture
Volumetric oxygen transfer coefficient

ABSTRACT

In order to increase survival rates of greenhouse seedlings destined for restoration and conservation programs, successful mycorrhization of the seedlings is necessary. To reforest forest ecosystems, host trees must be inoculated with ectomycorrhizal fungi and, in order to guarantee a sufficient supply of ectomycorrhizal inoculum, it is necessary to develop technologies for the mass production of ectomycorrhizal fungi mycelia. We selected the ectomycorrhizal fungus *Laccaria trichodermophora*, due to its ecological traits and feasible mycelia production in asymbiotic conditions. Here, we report the field sampling of genetic resources, as well as the highly productive nutritional media and cultivation parameters in solid cultures. Furthermore, in order to achieve high mycelial production, we used strain screening and evaluated pH, carbon source concentration, and culture conditions of submerged cultures in normal and baffled shake flasks. The higher productivity culture conditions in shake flasks were selected for evaluation in a pneumatic bioreactor, using modified BAF media with a 10 g/L glucose, pH 5.5, 25 °C, and a volumetric oxygen transfer coefficient ($K_L a$) of 36 h⁻¹. Under those conditions less biomass (12–37 %) was produced in the pneumatic bioreactor compared with the baffled shake flasks. This approach shows that *L. trichodermophora* can generate a large biomass concentration and constitute the biotechnological foundation of its mycelia mass production.

© 2020 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The survival of nursery-produced plants in the field is the main indicator of reforestation programs success, but is usually their weakest point (Vadell et al., 2016), mainly in developing countries (Le et al., 2014). Plant survival has been reported above 50 % in two-year experimental pine plantations in Mexico (López-Gutiérrez et al., 2018), while in governmental reforestation programs, plant survival averages 50–60 % in the first year (Burney et al., 2015;

Ramírez-Soto et al., 2018), but usually falls down to 5 % in following years (Ricker et al., 2010). To address this problem, nursery plants must be inoculated with their natural symbionts; in the case of pines, ectomycorrhizal fungi (EM) are required (Castellano and Molina, 1989; Rossi et al., 2007).

In 2017 the world demand for wood was around 5500 million cubic meters (FAOSTAT, 2018). Assuming a production of 400 m³/ha (Rossi et al., 2007), it would be necessary to inoculate 22,000 million plants to recover deforested areas and maintain the worldwide supply. One of the main limitations for large-scale plant inoculation is the availability of enough ectomycorrhizal inoculum (Rossi et al., 2007). Spores in suspension or ground pileus applied in irrigation water have demonstrated good results, mainly when the EM species are chosen from a particular forest region (Barragán-Soriano et al., 2018; López-Gutiérrez et al., 2018) or are sympatric

* Corresponding author. Laboratorio de Sistemática, Ecología y Aprovechamiento de Hongos Ectomicorrízicos, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-233, Ciudad de México, CP. 04510, Mexico.

E-mail address: rgaribay@ib.unam.mx (R. Garibay-Orijel).

Abbreviations			
BCB	bubble column bioreactor	q _S	specific substrate consumption rate (g _{glucose} /g _{biomass} *day)
BF	baffled Erlenmeyer shake flask	S	substrate, glucose as carbon source (g/L)
C _L	bulk dissolved oxygen concentration (mmol O ₂ /L)	S _i	initial substrate concentration (g/L)
C _L *	saturation dissolved oxygen concentration (mmol O ₂ /L)	S _f	final substrate concentration (g/L)
D _C	diameter of the pneumatic bioreactor (m)	s.l.	sensu lato
D _D	diffuser diameter of the pneumatic bioreactor (m)	t	culture time (days)
DOT	dissolved oxygen tension (air saturation %)	T°	temperature (°C)
EM	ectomycorrhizal mushroom	X	biomass dry weight (g/L)
H _C	height of the pneumatic bioreactor (m)	X _i	biomass dry weight at inoculation (g/L)
H _L	liquid height of the pneumatic bioreactor (m)	X _f	final biomass dry weight (g/L)
K _L a	volumetric oxygen transfer coefficient (h ⁻¹)	X _{MAX}	maximum biomass dry weight achieved in a culture (g/L)
m.a.s.l.	meters above sea level (m)	Y _{X/S}	biomass/substrate yield (g _{biomass} /g _{glucose})
NF	normal conventional Erlenmeyer shake flask	<i>Greek symbols</i>	
OUR	oxygen uptake rate (mmol O ₂ /L h)	μ	specific growth rate during the exponential growth phase (d ⁻¹)
OTR	oxygen transfer rate (mmol O ₂ /L h)		
P _X	volumetric productivity (g _{biomass} /L*day)		

with the target tree species (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019). This method is dependent on the supply of spores, which are obtained from few commercial species such as *Pisolithus tinctorius* or *Scleroderma* spp. (Rossi et al., 2007; Repáč, 2011). The production of mycorrhizal inocula is limited by the fungi seasonal life cycle in natural environments or farms and is mainly restricted to exotic species with high spore production (Repáč, 2011). Additionally, the effects of the introduction of exotic EM are not very well understood (Dickie et al., 2016) and could potentially impact soil aggregation, nutrient cycling, primary production, carbon storage, and plant and microbial community structure (Pringle et al., 2009). Therefore, native EM may eventually be displaced by alien EM (Murat et al., 2008), which could facilitate plant invasion (Vellinga et al., 2009).

Vegetative inoculum based on active mycelia has been proposed as an alternative to spore-based inoculum (Rossi et al., 2007). However, vegetative inoculum is made from an axenic single genetic clone, so lacks the genetic intraspecific diversity and the microbiota that are associated with spore-based inoculum that sustain complex and resilient biological interactions in nature. Moreover, ectomycorrhizal fungi cultivation at an industrial scale is not well understood, and each species has its own optimal culture conditions. Among the main reasons for this lack of knowledge are the difficulty of cultivating EM in controlled and reproducible conditions and their slow growth (Hutchison, 1991; Rossi et al., 2007; Repáč, 2011), the second of which is mainly due to the reduced battery of active enzymes on the plant cell wall compounds and the lack of complex sugar membrane transporters (Hutchison, 1991; Kohler et al., 2015; Nehls et al., 2016; Ogawa et al., 2019; Pellitier and Zak, 2018, Smith and Read, 2010). These are also the causes hindering the development and industrial production of vegetative ectomycorrhizal inoculum (Rossi et al., 2016).

In order to guarantee a sufficient supply of ectomycorrhizal inoculum, technologies must be developed for the mass production of ectomycorrhizal fungi mycelia. Submerged mycelial culture of the *Lactarius* (Chávez et al., 2015), *Pisolithus* (Pradella et al., 1991; Rossi et al., 2002), *Rhizopogon* (Oliveira et al., 2006; Rossi et al., 2016, 2017), and *Tricholoma* (Kawagoe et al., 1999; Kim et al., 2010) species has been experimentally performed in stirred and/or pneumatic tank bioreactors.

Pneumatic bioreactors are the best strategy for the mass production of EM (Rossi et al., 2007), due to the low generation of shear stress and because they enable thorough mixing by the hydrodynamics of air injection (De Jesus et al., 2017; Garcia-Ochoa and Gomez, 2009; Rossi et al., 2017). Pneumatic bioreactors reach the oxygen demand of EM cultures by mass transference via small, homogeneous air bubbles. At the same time, they prevent the effects of deformation caused by mechanical agitation in a stirred tank over growing mycelial pellets.

We selected the ectomycorrhizal fungus *Laccaria trichoderma* (Mueller, 1984) as our study model. It belongs to the *Laccaria* genus, which includes several edible and marketable species (Montoya et al., 2014; Zambonelli and Bonito, 2013), fruiting profusely in young forests (Frankland, 1998; Garibay-Orijel et al., 2009; Reverchon et al., 2010). However, these pioneer species tend to be even more abundant in plantations in areas without forest vocation (Savoie and Largeteau, 2011). *Laccaria* spores have been used as ectomycorrhizal inocula and their prevalence has been detected after field transplantation in the roots of inoculated plants, both in damaged sites after forest fires (Franco et al., 2014), and in natural areas in competition with other native EM (Villeneuve et al., 1991). Among other functions, *Laccaria* improves the growth of pine seedlings by promoting the assimilation of K and Mg (Christophe et al., 2010).

In particular, *L. trichoderma* is an edible wild mushroom commonly sold in markets in central Mexico ("Xocoyulli" in the Mexican pre-Hispanic language Nahuatl) and usually fruits throughout the rainy season (Montoya et al., 2014). It is closely related to *Laccaria bicolor*, sharing macromorphological characteristics of their fruit bodies, but can be microscopically distinguished by its spore size and pileus surface (Mueller, 1984). It associates with several white pines (Carrasco-Hernández et al., 2010; Perea-Estrada et al., 2009; Reverchon et al., 2012; Mueller, 1984), and produces abundant fruit bodies in young forests (Reverchon et al., 2010, 2012) and disturbed areas. This species can be found fruiting from mature soils within the forest bulk to sandy young volcanic soils at the forest edge (Mueller, 1984; Reverchon et al., 2010). Due to its host preference towards young pines, physiological adaptations to poor soil, and added value as an edible mushroom, *L. trichoderma* is an ideal candidate to be used as bioinoculant in pine reforestation programs.

Most studies of *Laccaria mycelia* production have focused on the plant–fungus interaction, mycorrhization percentages, and plant growth (Carrasco-Hernández et al., 2010; Castellano and Molina, 1989; Pera and Parladé, 2005; Vaario and Suzuk, 2004; Xu et al., 2016; Zhang et al., 2019). However, there are few studies on the biotechnological aspects of the axenic cultivation of *Laccaria mycelia* (Kuek, 1996; Santiago-Martínez et al., 2003; Vázquez-García et al., 2002).

To obtain the vegetative EM inoculum and understand its production in a pneumatic bioreactor, we isolated strains from wild basidiomata. Highly productive culture parameters (initial pH and temperature) and culture media were identified in solid culture experiments. Subsequently, the best liquid culture conditions for glucose concentration, initial pH and the volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}) were identified in submerged cultures in shake flasks (normal conventional and baffled). Finally, highly productive culture conditions were implemented into a pneumatic bioreactor (5 L bubble column), in order to optimize the biomass production.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and specific assignment

For the field sampling of genetic resources, we visited pine forests on four volcanoes located on the Transmexican Volcanic Belt in central Mexico (Table 1) and chose young, well-developed *L. trichodermophora* basidiomata. Basidiomata of EM are inhabited by a full microbiota (Bahram et al., 2018; Bertaux et al., 2003; Garbaye et al., 1990); therefore, for isolation media we used MMN-RBC, which is designed to avoid contamination. Base medium MMN was added with rose bengal (RB) and chloramphenicol (C) (Table 2). The first acts as fungicide that prevents the extensive growth of fast-growing saprotrophic fungal contamination, while the second is a broad-spectrum antibiotic to inhibit bacterial growth. Strains were isolated from the dikaryotic inner section of the base of the pileus and serial cultures were made in PDA to obtain pure cultures (Table 2). Vouchers with enough material left were deposited in the National Herbarium of Mexico (MEXU) (Table 1). The working strain bank was maintained at 4 °C in PDA and fresh medium was inoculated every 4–6 m before use. Strains were deposited in the INECOL Strain Collection in Xalapa, Mexico under records IE6003 - IE 6013.

The specific assignment of voucher collections was made by morphological characterization (Mueller, 1992) and phylogenetic

Table 2

Culture media composition for *Laccaria trichodermophora* solid cultures.

Reagent	MMN	BAF	DRBC	PDA
Dextrose	10 g	^a 30 g	10 g	20 g
Peptone	ni	2 g	5 g	ni
Malt extract	3 g	ni	ni	ni
Yeast extract	ni	0.2 g	ni	ni
Potato infusion	ni	ni	ni	^b
CaCl ₂	0.05 g	100 mg	ni	ni
NaCl	0.025 g	ni	ni	ni
KH ₂ PO ₄	0.05 g	0.5 g	1 g	ni
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.025 g	ni	ni	ni
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.15 g	0.5 g	ni	ni
FeCl ₃ (1 %)	0.012 mg	10 mg	ni	ni
ZnSO ₄	Ni	1 mg	ni	ni
MnSO ₄	Ni	5 mg	ni	ni
Thiamin HCL	100 µg	100 µg	ni	ni
Biotin	Ni	1 µg	ni	ni
Folic acid	Ni	100 µg	ni	ni
Inositol	Ni	50 µg	ni	ni
Rose Bengal	Ni	ni	25 mg	ni
Dicloran	Ni	ni	2 mg	ni
Chloramphenicol	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Bacto Agar ^c	15 g	15 g	15 g	15 g
Water	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL

MMN = Melin Norkrans Modified, BAF = Biotin folic acid (www.dsmz.de), DRBC = Dicloran, Rose of Bengal, chloramphenicol (www.dsmz.de), PDA = Potato dextrose, agar, ni = not included.

^a In some cultures 10 g/L of glucose was used.

^b 200 g/L of potato were used and the obtained liquid was adjusted to 1 L.

^c Agar was only added for solid cultures.

analysis, using the nuclear marker ITS (internal transcribed spacer). The identity of most strains has been previously reported (Quintero-Corrales, 2019); for the remaining strains, the ITS region of the rDNA was obtained following our previously reported protocol (Ángeles-Argáiz et al., 2016) and the ITS sequences are available in GenBank (Table 1). We made sequence alignments with ClustalW2 (Larkin et al., 2007). We used the GTR nucleotide substitution model, as suggested by JModelTest (Posada, 2008). The maximum likelihood analysis was performed with the PhyML program (Guindon et al., 2010), with 1000 bootstrap repetitions. The resulting tree was then edited with FigTree (Rambaut and Drummond, 2016). We confirmed the identity of the strains for inocula and produced mycelia of each culture by re-sequencing the ITS region.

Table 1

Accessibility and provenance of *Laccaria trichodermophora* vouchers, strains, and ITS sequences.

Collection number/Strain	Volcano	Altitude (masl)	pH	Host	MEXU	NCBI (ITS)
REAA13-59/EF-36	VP	3094	6.6	<i>P. montezumae</i>	27 575	KT354980
CA15-33	NT	3152	5.6	<i>P. montezumae</i>	–	–
CA15-34	NT	3153	5.6	<i>P. montezumae</i>	–	MN710461
CA15-40	NT	3150	5.6	<i>P. montezumae</i>	–	MN710462
CA15-42	NT	3149	5.6	<i>P. montezumae</i>	–	MN710479
CA15-73	LM	3064	6.4	<i>P. montezumae</i>	29 990	MN710466
CA15-75	LM	3067	6.4	<i>P. montezumae</i>	29 985	MN710467
CA15-Ru4	NT	3050	5.6	<i>P. montezumae</i>	29 994	MN710482
CA15-4	SN	3888	5.5	<i>P. harwegii</i>	29 989	MN710459
CA15-11	SN	3836	5.5	<i>P. harwegii</i>	29 986	MN710460
CA15-77	NT	4033	5.5	<i>P. harwegii</i>	29 991	MN710468
CA15-F8	NT	4037	5.5	<i>P. harwegii</i>	29 992	MN710471
CA15-F10	NT	4028	5.5	<i>P. harwegii</i>	29 987	MN710481
REAA15-138/R38	LM	3950	5.5	<i>P. harwegii</i>	29 988	MN710473
CA15-Ru1	NT	4053	5.5	<i>P. harwegii</i>	29 993	MN710472
CA15-29	NT	3598	5.5	<i>P. harwegii</i>	–	–

VP = Volcán Pelado, SN = Sierra Negra, NT = Nevado de Toluca, LM = La Malinche.

2.2. Highly productive culture conditions in solid media

In order to select the highly productive culture media, we performed a 3×3 multifactorial experiment on solid cultures, evaluating the effect of nutritive media (PDA, MMN, and BAF; Table 1), pH (4.5, 5.5, and 6.5) and temperature (23, 25, and 28 °C) on the biomass production. Twenty-seven experimental treatments, composed of five experimental units, were performed in 10 cm Petri dishes with 25 mL of solid medium. These cultures were inoculated with 50 mm² fragments of 20-day-old colonies. The colony growth kinetics was tracked for 48 d, after which the projected area of the colony and final dry weight were measured. To evaluate colony growth, the lower face of each Petri dish was photographed (Nikon D5000 camera, Japan, captured 30 cm from the target) every 48 h. The projected area was calculated with ImageJ 1.47v software (Abràmoff et al., 2004). In order to evaluate final dry weight, after 48 d of culture, the medium was melted in a water bath (60 °C); still hot, the suspension was filtered on Whatman No. 4 paper (GE Healthcare Life Science, UK) under a vacuum. Subsequently, the mycelia were dried for 24 h (65 °C) in a dry heat oven and were finally weighed at a constant value (Simadzu ATX124 Uni Bioc, Japan) (reported as grams of biomass dry weight per liter of solid medium).

2.3. Strain screening in submerged culture

In order to identify the strains with higher domestication potential, we compared the growth performance of each in submerged cultures (Table 1). The cultures were made in conventional normal Erlenmeyer flasks of 250 mL filled to 20 % capacity (50 mL of BAF culture medium, at 25 ± 2 °C, pH 5.5) and were orbitally shaken (New Brunswick Scientific Classic C25, Orbital shaker, USA) at 100 rpm (Kuek, 1996). Each flask was inoculated with four pieces (0.25 cm²) of a 15-day-old colony growing in solid PDA.

After a 30-day culture, the final dry biomass was determined using gravimetry by filtration (Whatman paper #4, GE Healthcare Life Science, UK) (Trujillo-Roldán et al., 2001) and the final pH of the sample was measured with a potentiometer (Corning 430) from the supernatant. Substrate consumption (glucose concentration) was determined in 1 mL of the supernatant in a Biochemistry Analyzer YSI 2900 (YSI Life Sciences, USA).

2.4. Substrate concentration and oxygen transference in shake flask and pneumatic bioreactor

In order to increase the maximum biomass production, we set up two experiments in shake flasks. The first was designed to evaluate the effect of initial pH (3.5, 4.5, 5.5, 6.5, and 7.5) on biomass production. The second had a two-factor design to determine the effect of the shake flask design (conventional vs. baffled) and the concentration of the carbon source (10 vs. 15 g/L of glucose) on biomass production. Baffled flasks consisted of conventional flasks (Duran®, Erlenmeyer flask, narrow neck, Borosilicate Glass, USA) with three indentations that were 4.5 cm high, 2.0 cm wide, and 2.5 cm deep (Gamboa-Suasnavart et al., 2011). All experiments were inoculated with 1 mL (2 %, approximately 0.09 mg/L of dry biomass) of non-homogenized 16-day-old baffled shake flask culture broth. Every 48 h, the total contents of two flasks were used to measure biomass, morphology, pH, and glucose consumption.

Finally, taking advantage of the results of the previous experiments, we selected the highly productive culture conditions to be implemented in a pneumatic bioreactor. Pneumatic bioreactor cultures were done in a homemade design bubble column

bioreactor (BCB) with a working volume of 5.0 L (BAF culture medium, initial pH 5.5 and 25 ± 0.4 °C) and a nominal volume of 6.6 L, in Pyrex glass with a stainless-steel top and bottom and a column height to diameter ratio of 5.7 (Fig. 1). Unless mentioned, the airflow was maintained at a constant 1.55 L/min (0.31 vvm), sterilized through a vent filter unit (0.2 µm, Merck-Millipore, USA), and diffused in small bubbles by a sintered glass plate of 70 mm diameter (Duran, DWK LIFE SCIENCES GMBH, Germany) with pore sizes between 100 and 160 µm. BCB cultures were instrumented with pH, DOT, and temperature sensors (Mettler Toledo, USA and Applisens, Applikon Biotechnology, Netherlands) with two ADI-1030 and ADI-1010 bio-controllers (Applikon Biotechnology, Netherlands), and data acquisition was followed online (BioXpert® Software, Applikon Biotechnology, Netherlands). The temperature was maintained at 25 ± 0.4 °C by a proportional-integral-derivative (PID) control strategy (Trujillo-Roldán et al., 2001) with a heating jacket.

The BAF medium used for the pneumatic bioreactor cultures (10 g/L of glucose, without vitamins and FeCl₃) was sterilized at 121 °C and 2.2 psig for 40 min. The thermolabile components of the nutrient medium were sterilized by filtration (0.2 µm filter, Merck-Millipore, USA) and added at the time of inoculation. BCB experiments were inoculated with two non-homogenized shake flasks cultures (15 d) via peristaltic pump (Cole-Palmer, USA). Periodic samples of 10 mL were taken every 48 h to measure pH and residual glucose (YSI 2900 biochemical analyzer). Wet biomass was inferred by suspending the air injection for 10 min, after which the percentage of the column height occupied by the compacted biomass at the bottom was measured. At the end of the fermentation (34 d), the accumulated wet biomass was weighed and dried to a constant weight. The final dry weight was correlated to final wet biomass.

2.5. Kinetic and stoichiometric parameters

The kinetic and stoichiometric parameters used to describe the performance of the culture in flasks and pneumatic bioreactors were:

Yield ($Y_{X/S}$), Equation (1).

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (1)$$

Productivity ($P_{X/S}$), Equation (2).

$$P_{X/S} = \frac{Y_{X/S}}{t} \quad (2)$$

Volumetric productivity (P_X), Equation (3).

$$P_X = \frac{X_f}{t} \quad (3)$$

The specific growth rate (μ) was obtained by calculating the slope of the line from the biomass values (in natural logarithm) during the exponential phase. The μ is defined by Equation (4).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4)$$

The specific substrate consumption rate (q_s) was calculated with Equation (5).

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad (5)$$

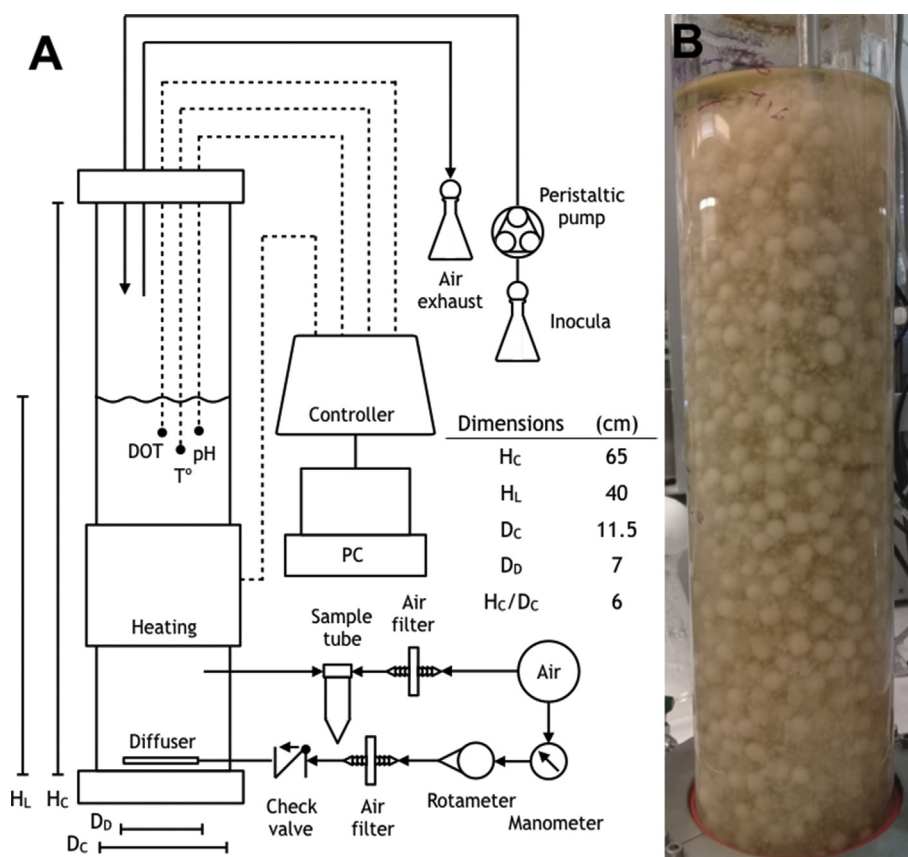


Fig. 1. Pneumatic bioreactor design. (A) schematic representation and dimensions. DOT: dissolved oxygen tension (% of air saturation); T°: temperature (°C); H_c: Column height; H_L: Liquid height; D_c: Column diameter; D_D: Diffuser diameter. (B) Thirty-two-day culture of *L. trichoderma* in BAF medium.

2.6. Volumetric oxygen transfer coefficient (K_La) measurements by the gassing-out method in shake flasks and the pneumatic bioreactor

During any submerged culture, the oxygen availability is dictated by the oxygen transfer and oxygen uptake rates (cellular respiration), as described by Equation (6). The oxygen transfer rate (OTR) is defined as the rate of oxygen transferred through the gas–liquid interphase (liquid surface in shaken flasks or bubbles in the pneumatic bioreactor) into the bulk liquid, as described in Equation (7), as follows:

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR \quad (6)$$

$$OTR = k_L a (C_L^* - C_L) \quad (7)$$

Where $(C_L^* - C_L)$ corresponds to the oxygen concentration gradient between the interfacial saturation and the liquid bulk, and the K_La is the volumetric mass transfer coefficient.

Shake flasks (normal and baffled) were filled (20 %) with BAF medium and oxygen was removed by adding Na_2SO_3 with CoCl_2 as the catalyst to achieve a final concentration under 6×10^{-3} M and 5×10^{-7} M, respectively. The sulphite oxidation reaction was used to displace dissolved oxygen in the liquid phase, and the K_La measurement took place only when the oxidation reaction had ceased (Reynoso-Cereceda et al., 2016). The incubator was started after the medium was oxygen-free, and DOT was recorded online. Measurements of DOT in shake flasks were recorded online with the oxygen optical meter Fibox3, using a Pst3 sensor-spot (PreSens,

Regensburg, Germany). The sensor-spot was attached to the bottom inside of each Erlenmeyer flask, and the probe was placed outside the flask over a coaster (Reynoso-Cereceda et al., 2016).

The K_La measurements in the pneumatic bioreactors were done using nitrogen to displace the oxygen and assure an oxygen-free medium (Trujillo-Roldán et al., 2013). Dissolved oxygen tension (Applisens, Applikon Biotechnology, Netherlands) was recorded by ADI-1030 and ADI-1010 bio-controllers and acquisition was followed online (BioXpert® Software, Applikon Biotechnology, Netherlands). The K_La was obtained as the resulting linear slope by plotting the logarithmic expression against time, as shown in Equation (8), using data between 10 and 60 % DOT. This expression results after integration of Equation (7) (between two different times), considering OTR as described in Equation (8) with $OUR = 0$ (Reynoso-Cereceda et al., 2016).

$$\ln\left(\frac{C_L^* - C_{L2}}{C_L^* - C_{L1}}\right) = -k_L a (t_2 - t_1) \quad (8)$$

2.7. Statistical analysis

To identify the statistical differences between the treatments in solid media cultures, multivariate ANOVA, Tukey's post hoc, and non-parametric multiple correlation tests were performed using STATISTICA software (Weiß, 2007). To analyze the differences between specific growth rate, performance, and productivity in submerged cultures, Fisher's exact and multiple range tests were performed using STATGRAPHICS (Centurion XVI.I).

3. Results

3.1. Specific assignation

The macro- and micro-morphology of the voucher collections matched with *L. trichodermophora* (Mueller, 1984, 1992) (Fig. 2). The Maximum Likelihood analysis showed that the ITS sequences of our samples formed a well-supported clade (Maximum Likelihood Bootstrap value = 93 %) with *L. trichodermophora* sequences including that of the species type material. This clade is sister to the *L. bicolor* s.l. complex, as represented by *L. bicolor* and *Laccaria longipes*. Both the morphological and phylogenetic results confirmed that all strains belonged to *L. trichodermophora* (Fig. 2).

3.2. Culture conditions in solid media and colony morphology

The separate colonies of *L. trichodermophora* strain EF-36 developed several different morphologies under the assayed conditions (Supplementary Material and Figure S1, A-F). The nutritive medium and the culture parameters that generated the highest biomass production were BAF, pH 5.5, 25 °C (Tukey's $P = 0.043$ to 0.000) (0.079 ± 0.015 g/L) (Fig. 3A, Table S1). The colony-projected area growth kinetics showed a constant colony growth in most cases, while in less productive cases (MMN and/or 28 °C) the growth stopped or did not progress until around 14–17 d after inoculation (Figs. S2–S10). The average projected colony area failed to match with or predict average final dry weight (Fig. 3B, Table S2). Kendall and Spearman tests showed significant but low correlations between average projected area and average final dry weights (Tables S1–2).

3.3. Strain selection in submerged culture

Different *L. trichodermophora* strains showed high heterogeneity between their biomass production, substrate consumption, pH change and $Y_{X/S}$. The final biomass production values ranged from 3.95 ± 0.26 to 0.12 ± 0.04 g/L; the glucose consumption ranged between 7.0 ± 0.77 and 0.4 ± 1.48 g/L; and $Y_{X/S}$ values were between 0.24 ± 0.21 and 0.004 ± 0.003 g_{biomass}/g_{glucose} (Table 3). Three strains were grouped together in the high-biomass

homogeneous group by the multiple range test (Fig. 4). These same strains were also the highest glucose consumers. Nevertheless, strains with low growth and glucose consumption attained higher $Y_{X/S}$ values (0.24 ± 0.21 and 0.19 ± 0.30 g_{biomass}/g_{glucose}), but also higher standard deviations. For downstream experimental exploration we selected the EF-36 strain, since it belonged to the high-biomass producing homogeneous group, it is also among the highest glucose consumers, and during reseeded it showed the highest colony recovery and less bacterial contamination.

3.4. Effect of pH, glucose, and shake flask design on *L. trichodermophora* growth in liquid culture

Using just one of the productive strains (EF-36) in submerged shake flask cultures with different pH values as the causal factor, the highest growth yield was observed at pH 7.5 ($r = 9.337$, $P = 0.053$) ($Y_{X/S} = 0.58 \pm 0.08$ g_{biomass}/g_{glucose}), with a maximal biomass of 4.71 ± 0.71 g/L at 16 d of culture (Table 4). However, a decrease in the biomass was observed up to 2.33 ± 0.57 g/L at the end of the culture (Fig. 5A.5). The highest biomass concentration (5.00 ± 0.04 g/L) was obtained at an initial pH of 5.5 after 20 d of culture ($r = 12.033$, $P = 0.017$), with a smaller decrease in biomass at the end of the culture (Fig. 5A.3). Only at pH 4.5 was the formation of large pellets observed in all 24 shake flasks tested.

When comparing flask design and glucose concentration, the 10 g/L in BF ($K_L a$ near 38 h^{-1}) has non-significant ($r = 7.179$, $P = 0.126$), but higher X_{MAX} value (5.93 ± 1.44 g/L) than other treatments. The P_X was similar between both 10 and 15 g/L, regardless of flask design. The glucose consumption of 10 g/L in BF (7.36 ± 2.30 g/L) was comparable with any other treatment. However, although 10 g/L of glucose in BF presented a high q_S ($r = 8.217$, $P = 0.083$) (1.54 ± 0.49 g_{glucose}/g_{biomass} *d) comparable with that of 15 g/L of glucose in NF, the latter never depleted the carbon source, while 10 g/L in BF treatment reached its X_{MAX} at 16 d and depleted the substrate at 20 d after inoculation. The $Y_{X/S}$ (0.54 ± 0.09 g_{biomass}/g_{glucose}) and specific growth rate ($\mu = 0.37 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$) of 10 g/L of glucose in BF were surpassed only by the 15 g/L in BF treatment ($Y_{X/S} 0.73 \pm 0.03$ g_{biomass}/g_{glucose}, $\mu = 0.76 \pm 0.00 \text{ d}^{-1}$). Nevertheless P_X (0.37 ± 0.09 g_{biomass}/L*d) and time to X_{MAX} (16 d) were better in the 10 g/L in BF group. Therefore, 10 g/L of substrate in BF was the

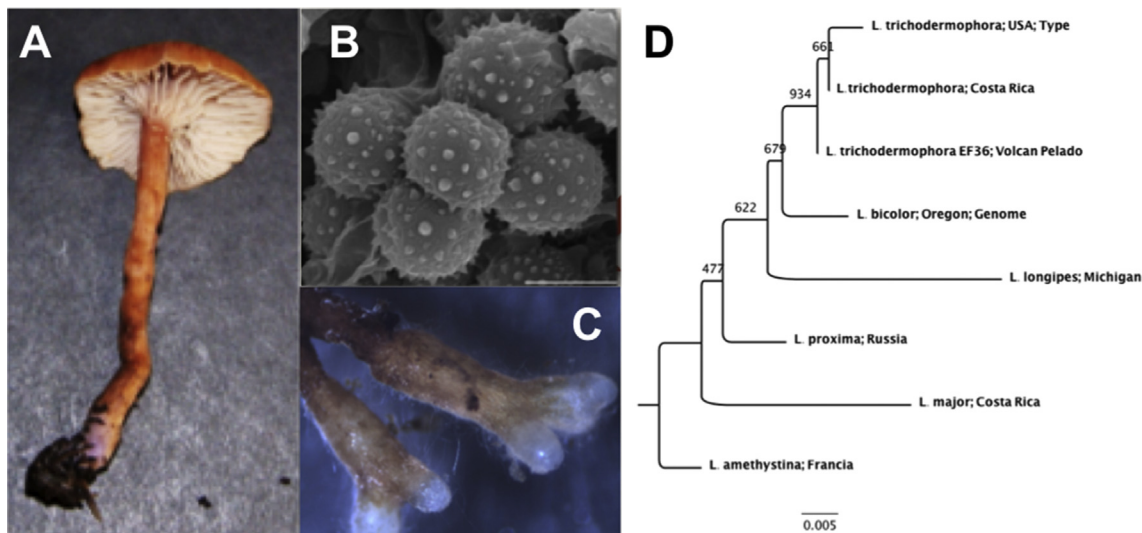


Fig. 2. Morphological characteristics of *Laccaria trichodermophora* and specific assignment. (A) Basidioma from where EF-36 strain was isolated, (B) Basidiospores observed with scanning electron microscopy, (C) Ectomycorrhiza in *Pinus montezumae* roots, (D) ITS phylogram generated with Maximum Likelihood for the *L. bicolor* s.l. complex with, Bootstrap = 1000 and GTR.

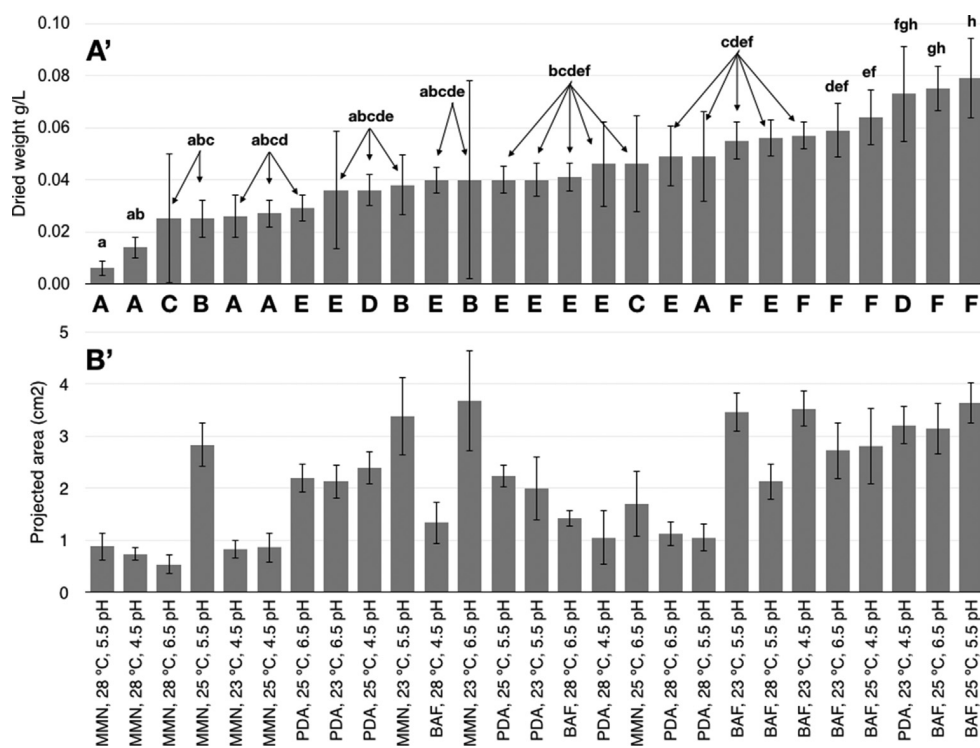


Fig. 3. Solid media cultures. (A') Mean final biomass production (y axis, g/L) comparison in 27 treatments (x axis), upper case corresponds with the colony morphologies (Fig. S1), lower case addresses Tukey's test for homogeneity in groups of the variance analysis, segments represent the standard deviation. (B') Mean final projected area comparison.

Table 3

Growth performance of several *Laccaria trichodermophora* strains in shake flasks.

	X_{MAX} (g/L)	Glucose consumed (g/L)	$Y_{X/S}$ (gbiomass/gglucose)	Final pH	P_X (mg/L*day)
CA15-4	3.95 ± 0.26	7.0 ± 0.77	0.02 ± 0.002	3.3 ± 0.2	3.68 ± 0.06
CA15-11	3.56 ± 0.88	5.4 ± 0.71	0.02 ± 0.004	3.6 ± 0.1	3.14 ± 0.29
EF-36	3.08 ± 0.79	6.6 ± 1.84	0.01 ± 0.001	3.4 ± 0.4	2.75 ± 0.56
CA15-33	2.81 ± 0.77	5.0 ± 0.90	0.02 ± 0.009	4.0 ± 0.0	3.32 ± 0.65
CA15-77	1.99 ± 0.97	4.1 ± 1.34	0.02 ± 0.12	3.7 ± 0.2	1.97 ± 0.88
CA15-R38	1.86 ± 0.42	2.4 ± 0.38	0.03 ± 0.004	3.9 ± 0.1	2.49 ± 0.10
CA15-F10	1.73 ± 0.14	4.0 ± 0.69	0.01 ± 0.003	3.8 ± 0.2	1.79 ± 0.06
CA15-40	1.63 ± 1.27	4.0 ± 2.63	0.03 ± 0.049	4.2 ± 0.2	1.25 ± 1.52
CA15-42	1.61 ± 0.17	2.9 ± 0.60	0.02 ± 0.006	4.3 ± 0.1	2.03 ± 0.31
CA15-34	1.60 ± 0.48	2.8 ± 1.81	0.02 ± 0.021	4.8 ± 0.1	1.64 ± 0.42
CA15-RU1	1.28±-	1.6±-	0.02±-	4.1±-	1.02±-
CA15-F8	1.06 ± 0.03	4.4 ± 0.02	0.01 ± 0.001	3.5 ± 0.2	1.89 ± 0.17
CA15-75	0.63 ± 0.82	0.9 ± 1.34	0.19 ± 0.295	5.3 ± 0.2	0.73 ± 0.09
CA15-29	0.16 ± 0.09	1.6 ± 0.35	0.00 ± 0.003	5.7 ± 0.1	0.21 ± 0.12
CA15-RU4	0.12 ± 0.08	0.8 ± 0.20	0.01 ± 0.005	5.6 ± 0.1	0.14 ± 0.08
CA15-73	0.12 ± 0.04	0.4 ± 1.48	0.24 ± 0.213	5.5 ± 0.0	0.14 ± 0.04

fastest and most productive assay (Table 5, Fig. 6) and its culture parameters were replicated in the bioreactor.

3.5. Bubble column bioreactor cultures

In order to compare the mycelial production between BF and BCB, we used the culture with the highest productivity conditions found in BF (BAF medium with 10 g/L of glucose, pH 5.5 and 25 °C), and adjusted the air injection in BCB to 0.31 vvm to use a similar K_{La} ($38.3 \pm 4.1 \text{ h}^{-1}$) as that of BF (Table 5). Culture in the BCB reached X_{MAX} of $4.03 \pm 0.03 \text{ g/L}$ with an almost total depletion of the carbon source at 36 d of culture (Table 5, Fig. 7). The cultures in BCB were slower than those in shake flasks ($\mu = 0.23 \pm 0.02$ vs. $0.37 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$ respectively) (Table 5). Accordingly, at the long culture time, the specific glucose consumption rate in the BCB (q_S) was almost 2.7

times lower than in BF (Table 5). Moreover, the mycelia productivity (P_X) was almost 3.4 times lower in BCB than in BF (Table 5). However, the pH behaved similarly to those in flasks. There was no limitation by oxygen in the cultures in the BCB; the lower value of dissolved oxygen tension was above 60 % of air saturation (Fig. 7).

4. Discussion

4.1. Specific assignment

The morphological and ITS Maximum Likelihood analyses placed all our samples (vouchers and strains) as *L. trichodermophora* (Fig. 2). The ITS sequence of the EF-36 strain was used as the representative sequence, since all ITS sequences were identical (100 % nucleotide similarity) (Table 1). This species belongs to the

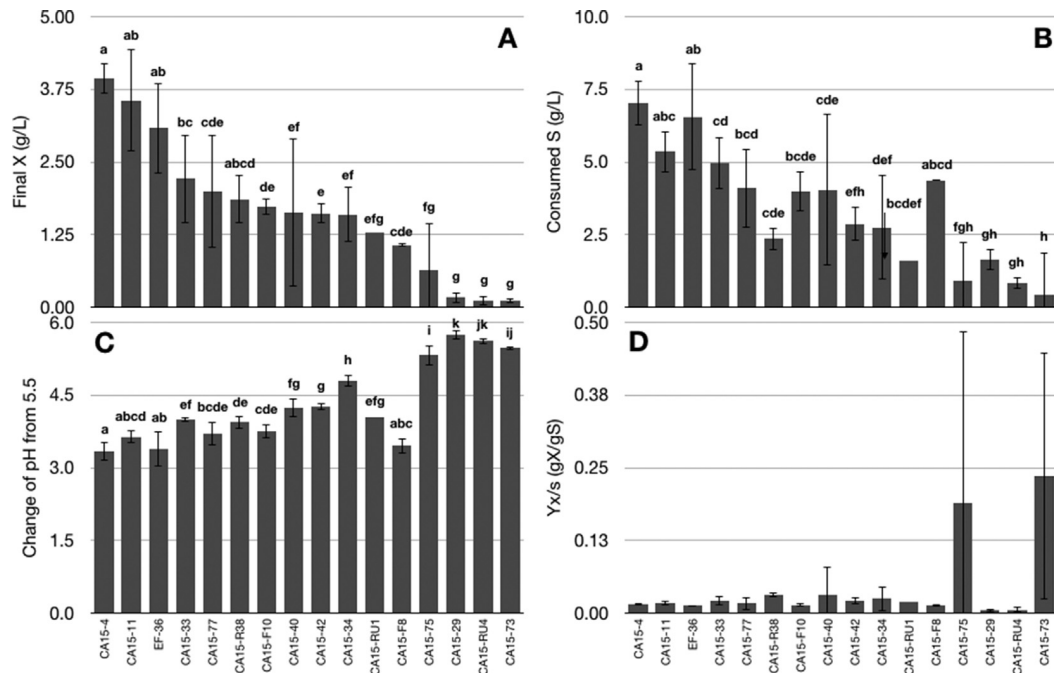


Fig. 4. Comparison the biomass production (A), glucose consumption (B), pH change (C) and biomass/substrate yield (D) of 16 strains of *L. trichodermyces* in cultures in liquid medium carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks filled to 20% capacity (50 mL of BAF culture medium) at 25 ± 2 °C, and orbitally shaken at 100 rpm. Average and standard deviation of at least three independent experiments are shown. Lower case addresses Tukey's test for homogeneity in groups of the variance analysis.

Table 4

Effects of pH on the stoichiometric and kinetic parameters of submerged culture of *Laccaria trichodermyces* in shake flasks.

Parameter/pH	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5
X_{MAX} (g/L)	2.11 ± 0.06^c	1.31 ± 0.31^c	5.00 ± 0.04^a	3.76 ± 0.71^b	4.71 ± 0.71^a
Time to X_{MAX} (days)	20	24	20	24	16
μ (days ⁻¹)	0.31 ± 0.03^a	0.26 ± 0.10^a	0.28 ± 0.02^a	0.32 ± 0.02^a	0.32 ± 0.03^a
^A Glucose consumed (g/L)	6.26 ± 0.37^b	7.57 ± 0.45^b	10.0 ± 0.00^a	9.90 ± 0.09^a	10.0 ± 0.00^a
^B $Y_{X/S}$ (g _{biomass} /g _{glucose})	0.42 ± 0.08^b	0.23 ± 0.03^c	0.55 ± 0.09^{ab}	0.42 ± 0.10^b	0.58 ± 0.08^a
q_s (g _{glucose} /g _{biomass} *day)	0.77 ± 0.16^{ab}	1.12 ± 0.48^a	0.62 ± 0.20^b	0.81 ± 0.20^{ab}	0.57 ± 0.13^b
P_X (g _{biomass} /L*day)	0.73 ± 0.01^d	0.39 ± 0.01^d	0.14 ± 0.01^b	0.12 ± 0.03^c	0.08 ± 0.02^a
pH at the end of culture	2.92 ± 0.03	4.42 ± 0.09	5.63 ± 1.58	6.82 ± 0.37	7.11 ± 0.16

A, Glucose consumed (g/L) corresponds to the initial concentration minus the glucose concentration in culture medium until the time to X_{MAX} (days). B, Biomass/substrate yield (g_{biomass}/g_{glucose}) was calculated using the glucose consumed until the time to X_{MAX} (days). Lowercase superscript near a value indicate homogenous groups in the Multiple Range Tests.

L. bicolor complex; a group populated by American and Asiatic species, of which at least half are not yet described (Wilson et al., 2017).

4.2. Colony morphology and media selection

Our results show that the highest biomass concentration (0.079 ± 0.015 g/L) was reached with BAF, pH 5.5, and 25 °C in solid media (Fig. 3). In general, PDA and BAF treatments at low temperatures were more productive, while MMN high temperatures were less productive (Fig. 3). Similarly to Santiago-Martínez et al. (2003), Mexican strains of *L. bicolor* s.l. showed greater biomass production in BAF and EMA culture media, compared with MMN.

Considering the composition of the media and culture conditions, solid cultures generated different colony morphologies (Figs. S1A–F). Indeed, *Laccaria* colonies are known for their morphological plasticity (Di Battista et al., 1996). Our results are very similar to those previously reported on *L. bicolor* s.l. in BAF, PDA, and MMN (Santiago-Martínez et al., 2003). While the high biomass production treatments produced colonies with uniform

edges; in less productive treatments, the colonies presented two very evident growth fronts (Fig. 3, S1). These second fronts were generated by a thin and submerged exploratory mycelia, involved in the search of distant nutrients and vitamins, and without significant biomass production. The lack of nutrients or vitamins, like thiamine, could also be involved in the absence of colony coloration produced by secondary metabolisms (Georg, 1951; Hutchison, 1991). Dry weight and projected area showed low correlation values (0.56 and 0.40). Consequently, the projected area cannot be used as an appropriate parameter to describe the mycelial growth of *L. trichodermyces*.

4.3. Strain screening and intra-specific variability

Microbial strain identity is an important factor determining several physiological, ecological, and biotechnological characteristics of the bioinoculants. Intraspecific differences in biomass production, nutrient acquisition and respiration have been demonstrated in *in vitro* cultures of EM (e.g. Wilkinson et al., 2010, 2012) including *L. bicolor* s.l. (Nguyen et al., 1992; De la Bastide

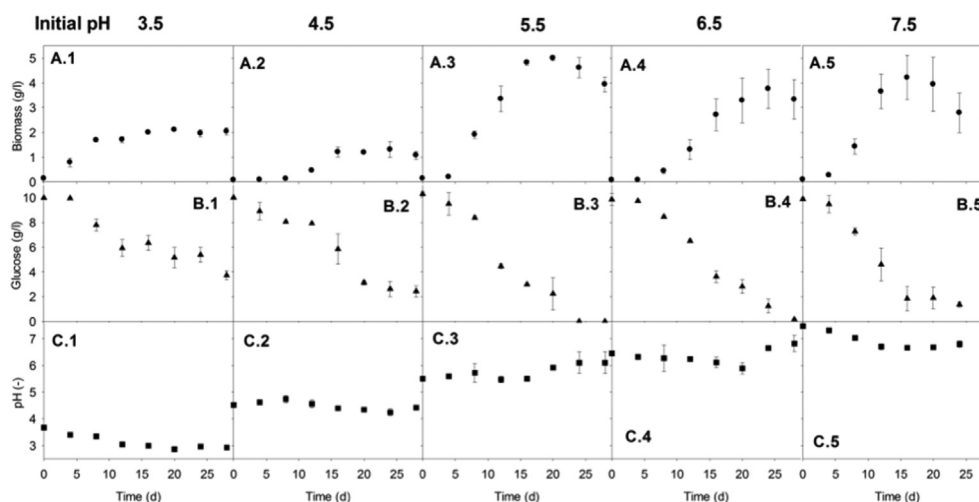


Fig. 5. Initial pH effect (3.5, 4.5, 5.5, 6.5, and 7.5) on the growth of *L. trichodermyces* (A), glucose consumption (B), and evolution of pH (C) in cultures in liquid medium carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks filled to 20 % capacity (50 mL of BAF culture medium) at 25 ± 2 °C, and orbitally shaken at 100 rpm. Average and standard deviation of at least three independent experiments are shown.

Table 5

Stoichiometric and kinetic parameters of submerged culture of *Laccaria trichodermyces* in shake flasks and a 5 L bubble column bioreactor.

Parameter	Normal Flask	Baffled Flask	Bubble Column Bioreactor
Glucose (g/L)	10	15	10
X_{MAX} (g/L)	5.35 ± 0.35^{ab}	5.20 ± 0.70^{ab}	4.03 ± 0.03^a
Time to X_{MAX} (days)	14	30	36
μ (days ⁻¹)	0.52 ± 0.12^b	0.33 ± 0.08^a	0.23 ± 0.02^a
^A Glucose consumed (g/L)	9.08 ± 0.84^b	9.90 ± 2.55^b	9.76 ± 0.30^b
^B $Y_{X/S}$ (g _{biomass} /g _{glucose})	0.47 ± 0.02^{ab}	0.51 ± 0.05^{ab}	0.41 ± 0.02^a
Q_S (g _{glucose} /g _{biomass} *day)	0.93 ± 0.24^{ab}	1.64 ± 0.59^b	0.56 ± 0.07^a
P_X (g/L*day)	0.38 ± 0.02^b	0.17 ± 0.02^a	0.11 ± 0.00^a
K_{1a} (h ⁻¹)	11.6 ± 2.0	13.9 ± 4.0	36.2 ± 2.1

A, Glucose consumed (g/L) corresponds to the initial concentration minus the glucose concentration in culture medium until the time to X_{MAX} (days). B, Biomass/substrate yield (g_{biomass}/g_{glucose}) was calculated using the glucose consumed until the time to X_{MAX} (days). Lowercase superscript near a value indicate homogenous groups in the Multiple Range Tests.

et al., 1995a). Our results matched the detection of high intraspecific variability in biomass production of *L. trichodermyces* strains in shake flask axenic cultures.

Different strains of *L. bicolor* s.l. also vary in pine root colonization (Kropp et al., 1987; Wong et al., 1990; De la Bastide et al., 1995b) and even in plant nutrition (Hazard et al., 2017a, b), affecting CO₂ cycling and soil nutrient retention. The proper strain selection is therefore a critical step during prospection and bioprocess development, particularly if the project aims to extend the use of certain strains to inoculate plants for field transplantation. Additionally, the relation of the biomass production in pure culture to the ectomycorrhizal infectivity and efficacy of plant growth promotion must be tested.

4.4. PH dynamics and the effect on productivity

In submerged culture experiments, which were performed to identify the effect of the initial pH, we compared X_{MAX} , as well as the specific growth rate (μ), growth yield ($Y_{X/S}$), and time to X_{MAX} . The highest specific growth rate (μ) was observed at pH 7.5 (0.32 ± 0.03 d⁻¹) with non-significant differences in all other assays. Simultaneously, treatments at pH 5.5 and 7.5 showed similar yields ($Y_{X/S}$) (0.55 ± 0.09 and 0.58 ± 0.08 g_{biomass}/g_{glucose}, respectively), but the highest biomass production (X_{MAX}) (5.00 ± 0.04 g/L) was obtained at pH 5.5 at 20 d of culture, followed by pH 7.5 (4.71 ± 0.71 g/L), both clustered in the same

homogeneous group (Table 4). Thus, we used pH 5.5 for follow experiments, due to its high volumetric productivity (P_X) (0.14 ± 0.01 g/L*d) and its low X_{MAX} standard deviation.

On the other hand, the pH 4.5 treatment showed the lowest X_{MAX} (1.31 ± 0.31 g/L), $Y_{X/S}$ (0.23 ± 0.03 g_{biomass}/g_{glucose}), and μ (0.26 ± 0.10 d⁻¹) values. Similarly to our results, in a submerged culture of *Tricholoma batschii* a higher biomass production was detected in pH values close to 5.5, and a lower biomass production was seen at pH 4.5, even though lower pH values were being tested (Lazarević et al., 2016). The lowest growth of *L. trichodermyces* cultures at an initial pH of 4.5 was associated with the formation of the highest and irregular biomass aggregates.

In all *L. trichodermyces* cultures, the pH values decreased during the exponential growth phase, but increased when stationary phase appeared. In some treatments, this matched with the carbon source depletion (Figs. 5 and 6). This pattern was also seen in the third experiment; but in cultures with a greater and more rapid production of biomass, the rise in pH was more drastic as the carbon source was more quickly depleted (Fig. 6). The total consumption of glucose promotes increased pH by at least two units in *Laccaria laccata* cultures, possibly by the use of alternative substrates for cellular energy maintenance, which causes the removal of acidic compounds, or by the production of new alkaline compounds (Kuek, 1996). The pH affects membrane function, cell morphology and structure, nutrient consumption, and product synthesis (Hwang et al., 2004), which can cause adverse effects in

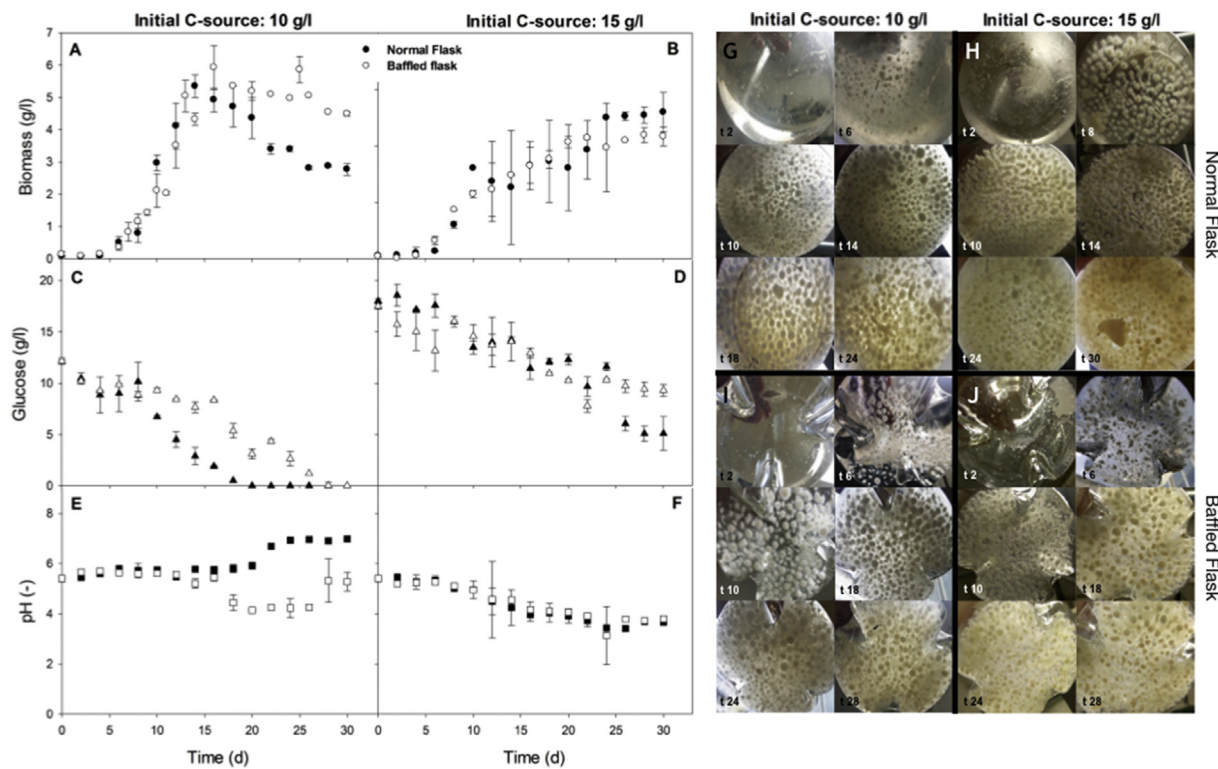


Fig. 6. Carbon source initial concentration (glucose of 10 and 15 g/L) and shake flask design effects on *L. trichodermyces* growth. (A), glucose consumption (B), and evolution of pH (C). All cultures were carried out in normal (closed dots) and baffled (open dots) Erlenmeyer flasks of 250 mL filled to 20% capacity (50 mL of BAF culture medium) at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, and orbitally shaken at 100 rpm. Average and standard deviation of at least three independent experiments are shown. (G–J), illustrate the biomass production over time (t: days of culture) in the four kinetics by bottom flask pictures.

cells, due to the subsequent high pH variability present in the cell cultures. In some of our *L. trichodermyces* cultures, the pH increased when biomass values decreased (Fig. 5: A3, A4, A5, C3, C4, C5). This phenomenon could be associated with cell death and the plasmatic material released in the broth.

The addition of physiologically inert buffer MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid has demonstrated good pH stabilization between pH values of 3 and 7 as well as promotion of *Laccaria* mycelial growth (Yamanaka, 2003) and a reduction in the variability of mycelial biomass accumulation values of *Lactarius* species (Guerin-Laguette et al., 2000). Therefore, the addition of physiologically inert buffers could improve both, biomass production and experimental reproducibility in further ectomycorrhizal vegetative inoculum scaling.

In natural field conditions, *L. trichodermyces* inhabit acidic to neutral forest soils, mainly humic andosols (Table 1). Acidic soil conditions increase P availability and have been related to enzymatic N search by *Laccaria* species (Carrino-Kyker et al., 2016). In contrast, the P in the culture media was supplied by KH_2PO_4 and the N by proteins from the peptone and yeast extract (Table 2).

4.5. Substrate concentration and oxygen transfer rates in shake flask cultures

A depletion of the carbon source (10 g/L) was observed between days 16 and 26 in BF and NF submerged cultures of *L. trichodermyces* EF-36, respectively. In contrast, the substrate never depleted when cultures were carried out at 15 g/L of glucose. Several EMs have shown culture times ranging between 15 and 40 d (Hutchison, 1991; Kuek, 1996; Rossi et al., 2017). However, unlike the 10 g/L treatments, in which cell death was detected in

the last days of the culture, the 15 g/L treatments showed a lower biomass production, even when the microorganism reached its stationary phase (10 d in both flask morphologies) (Fig. 6). In the culture of an Asian strain of *L. laccata* s.l., the biomass production was higher at the lower initial glucose concentration when comparing treatments with 10 and 20 g/L of the carbon source (Kuek, 1996). In addition, the osmotic stress generated by high glucose concentrations was interpreted as the reason for the inhibition of mycelial growth seen in the EM *Tricholoma matsutake* (Kusuda et al., 2007). The maximum concentration of the carbon source in the culture medium in batch cultivation of an EM has been proposed to be around 16 g/L (Rossi et al., 2017).

While the 10 g/L BF cultures generated the highest biomass production (5.93 ± 1.44 g/L) in the shortest time (16 d), a higher yield (0.73 ± 0.03 g_{biomass}/g_{glucose}) was obtained at 15 g/L in BF. Kuek (1996) reports a yield between 0.63 and 0.74 g_{biomass}/g_{glucose}, using the E439 *L. laccata* s.l. strain. Differences between the composition of our media and the media used by Kuek (1996) are mainly in peptone (2 vs. 10 g/L respectively) and yeast extract (0.2 vs. 2 g/L respectively) concentrations. There is no inorganic nitrogen source in BAF medium, so all the nitrogen comes from the peptone and the yeast extract. The concentration of phosphate salts in the medium used in this study was one magnitude order lower than that used by Kuek (1996). However, he reports that the decreased concentration of phosphate in the culture of *L. laccata* E439 generates 10% increase in growth.

The shake flask design determined the differences in oxygen transfer rates, measured as the specific volumetric mass transfer coefficient (K_{1a}), while the agitation rate was equal in all experiments (100 rpm) (Table 4). An elevated oxygen transfer rate allows for a better exchange of oxygen for cellular respiration and CO_2

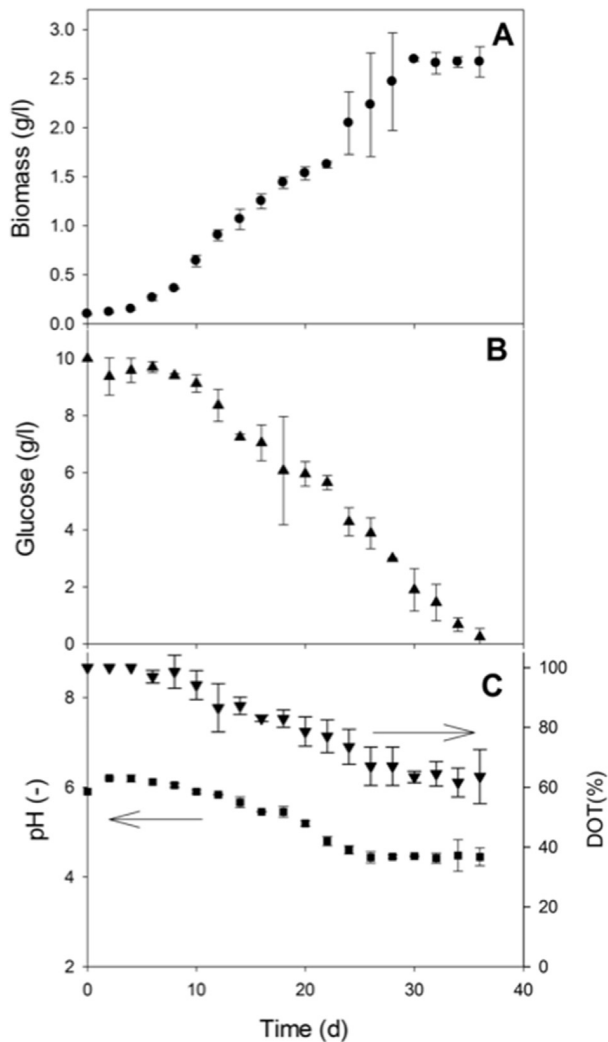


Fig. 7. *L. trichodermyces* growth kinetics in pneumatic bioreactor. (A), glucose consumption (B), and pH evolution and dissolved oxygen tension (C) in bubble column bioreactor cultures. Cultures were carried in a home-made pneumatic bioreactor (Fig. 1) with a working volume of 5.0 L (BAF culture medium, initial pH 5.5, aeration of 1.55 L/min, and 25 ± 0.4 °C). Average and standard error of at least two independent experiments are shown.

elimination from the broth. Moreover, elevated agitation rates (or differential hydrodynamics) generate shear stress that is normally detrimental to the cellular integrity (Rossi et al., 2017), decreasing the size of the mycelial aggregates, as could be the case with baffled shake flasks. Submerged cultures of *Ganoderma lucidum* demonstrated that the initial K_{La} has an effect on the cellular growth rate and ganoderic acid production (Tang and Zhong, 2003). Different K_{La} values were obtained by maintaining a constant agitation of 200 rpm and modifying the air injection between 220 and 3500 mL/min in *G. lucidum* cultures. The highest biomass was obtained when K_{La} was near 78 h^{-1} , while the maximum ganoderic acid productivity was seen when K_{La} was 96 h^{-1} (Tang and Zhong, 2003). Increased K_{La} modifies the cell morphology and increases the formation of mycelial aggregates (Tang and Zhong, 2003). Accordingly, the *L. trichodermyces* cultures with elevated K_{La} values in our study were determined to have increased X_{MAX} values.

In this work, shake flask design produced different pellet morphologies (Fig. 6G–J). The mycelia produced in BF were fragmented

and the pellets were compact with growing hyphae throughout their surface, while in NF, the mycelia formed larger and less filamentary pellets (Fig. 6G–J). Larger pellets have deficiencies in oxygen and nutrient diffusion, which leads low growth (García-Ochoa and Gomez, 2009; Gibbs et al., 2000). Additionally, the coloration of the culture media became dark towards the last days of the kinetics, probably due to the production of secondary metabolites or proteins excreted by the fungus. This darkening of the medium was also reported in *L. laccata* cultures, but the compounds or culture conditions that cause the color change in the medium were not identified (Kuek, 1996).

4.6. Oxygen transference in the bubble column bioreactor

The bubble column bioreactor was operated at similar K_{La} values ($36.2 \pm 2.1 \text{ h}^{-1}$) as in cultures carried out at 10 g/L of glucose in BF ($38.3 \pm 4.1 \text{ h}^{-1}$). The X_{MAX} value was lower (BCB: $4.03 \pm 0.03 \text{ g/L}$, BF: $5.93 \pm 1.44 \text{ g/L}$) but with non-significant differences ($r = 7.179$, $P = 0.126$). This was also true for other kinetic parameters, like $Y_{X/S}$, q_s , and P_x (Table 5), while there were low statistical differences between the μ values ($r = 9.584$, $P = 0.48$). To our knowledge, the only work that has described oxygen transference in EM cultures was done for *Rhizopogon nigrescens* in an airlift bioreactor (Rossi et al., 2017). These experiments operated at K_{La} values near 25 and 56 h^{-1} and obtained final biomass concentrations of 6.4 and 6.6 g/L, respectively (Rossi et al., 2017). The authors argue that, during cultivation, the biomass growth was a function of pellet size. However, they also detected a drop in oxygen consumption associated with increasing pellet size (Rossi et al., 2017). In our study of *L. trichodermyces*, large pellets appeared after 18 d of culture (Figs. 1 and 7). Bigger pellets reduce the relationship between their area and volume and, subsequently, the contact with the culture medium. Therefore, the mass transfer from the broth to the inner hyphae of the pellet decreases (Dynesen and Nielsen, 2003; Veiter et al., 2018). This gradient in the pellet layers was also observed in airlift bioreactor cultures of *R. nigrescens* (Rossi et al., 2017). In our study, the *L. trichodermyces* pellets in BCB cultures were almost twice the size of those in shake baffled flasks and related limitations to the transfer of oxygen to the interior of the compressed, agglomerated hyphae might have led to a metabolic gradient, generating a central necrotic zone and hollow pellets. After 20 d, the pH fell to 4.7 and the broth began to darken, as detected in shake flasks.

In order to avoid lethal or sub-lethal effects in this work, we avoided the use of a microbiological blender for the homogenization of the inoculum and decide to use baffled shake flasks cultures, which guarantee better pellet size homogeneity (Gamboa-Suasnavart et al., 2011). In addition, the homogenization step increased the inoculum contamination risk, which is very relevant in long span cultures. Both the stirred flasks and the BCB were inoculated with 2 % of a previous culture in baffled shake flasks. Cultures in shake flasks were inoculated with 1 mL of liquid culture using a micropipette with cut tip opening of 2 mm^2 . On the other hand, the BCBs were inoculated by a peristaltic pump with the whole broth of two 50 mL shake baffled flask cultures, which allowed the passage of different size pellets. The pellet size in the inoculum might determine the differences in pellet size between flasks and BCBs, affecting the mass transfer and impacting the final biomass (Hotop et al., 1993; Glazebrook et al., 1992; Yang and Liau, 1998).

4.7. Downstream process and inoculum formulation

Vegetative inocula can be applied to the target plants in several ways, including slurries, carried in the substrate or immobilized in

polymer beads (Repáč, 2011). The mycelia produced in our process is pellet shaped, thus homogenization and formulation steps must be performed prior to the greenhouse application. Homogenization in blender shakers increases the number of infective units and allows mixing with substrate or application by irrigation equipment (Repáč, 2011). However, the mechanical damage and the intracellular toxins released affect the viability of the inocula (Lapeyrie and Bruchet, 1985), reducing the shelf life of the final product. Long-term preservation methods, such as lyophilization or cryopreservation are not recommended for EM because sterile mycelia lack resistant propagules as spores or conidia (Lalaymia et al., 2014). Mycelia immobilization in polymeric beads has been demonstrated to conserve infectivity and inocula life span (Kuek et al., 1992; Le Tacon et al., 1985; Mauperin et al., 1987; Mortier et al., 1989). Therefore, calcium alginate should be tested in the final inoculum formulation. However, inocula production should be coordinated with greenhouse production, in order to ensure enough fresh inocula and avoid long term storage.

5. Conclusions

In this paper we described the isolation, domestication, and screening of *L. trichodermophora* strains; the selection of highly productive culture conditions in solid and liquid media; and the mycelia cultivation in bubble column bioreactor at a 5 L scale.

Our results show that the projected area of the colony in solid medium cultures is not a good parameter to estimate the growth of *L. trichodermophora*, since it does not strongly correlate with the final dry weight. We detected high variability in biomass production by sixteen conspecific strains. Among the tested conditions, BAF, 25 °C, and an initial pH of 5.5, yielded the highest biomass production in solid cultures. These conditions were corroborated in submerged cultures, and higher biomass production when using 10 g/L of the carbon source in baffled flasks was also detected. Additionally, we found high variability in biomass production between different conspecific strains in shake flasks. Despite reproducing the volumetric oxygen transference coefficient from a high productive flask culture to bubble column bioreactor, the lower biomass production and yield between the bubble column bioreactor and baffled flasks can be attributed to the differences in pellet size and morphology caused by the bioreactor hydrodynamics. Our results support *L. trichodermophora* as a good ectomycorrhizal model, capable of producing high quantities of mycelial biomass on bioreactors with the potential to be applied as forest bioinoculant. In order to develop a vegetative inoculum with high infectivity, efficacy and long viability, it will be necessary to evaluate the downstream process, the final product formulation and the plant response.

Funding

This work was financed by the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACYT 247473, 220795) and “Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México” (PAPIIT-UNAM IN-210217; IT-200719, IN-208415).

Compliance with ethical standards

All authors disclose no actual or potential conflict of interest involving this publication. The work described has not been published previously.

Declaration of Competing Interest

On behalf of all the authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

REAA is grateful for the support of the Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, and CONACYT, for granting scholarships for the completion of their PhD (LAG CVU. No. 439184). We thank Erandy Villegas Salvador Biol., for the strain screening cultures; María Berenit Mendoza-Garfias M. Sc., head of the Electron Microscopy Laboratory in the Biology Institute at the Universidad Nacional Autónoma de México; Laura Margarita Márquez Valdelamar M.Sc., head of the Biodiversity and Health Sequencing Massive Laboratory of IB-UNAM; Lidia Irene Cabrera Martínez Ph.D., head of the Molecular Biology Laboratory of the Botany Department of IB-UNAM; Samuel Aguilar Ogarrio, Biol., for his support in the work at the Mycology Laboratory of IB-UNAM; Gerardo Montes de Oca Ph.D., head of the strain collection at INECOL; Ramsés I. García Cabrera M. Sc. and Alberto Campos Lopez M. Sc., for their support at the Bioprocess Unit of Biomedical Research Institute (IIB-UNAM); Julieta Álvarez Manjarrez M. Sc. Ulises Salas Martínez Eng., Daniel Tejada Durán Biol., René Sánchez Rivera Biol., Rodrigo Olivera González Biol., Fabiola Gandarilla Aizpuro Biol., Veronica Reyes Pérez M. Sc., Carlos Vencedor Meraz Biol., Alicia Mastretta Yanes Ph. D. for their support in field work; Valeria Flores Almaraz Biol., for her support in strain reseeded; and the anonymous reviewers who evaluated this work for publication. This project was developed under the Institutional Program of the Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM: “La producción de biomoléculas de interés biomédico en bacterias y hongos.”

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.003>.

References

- Abramoff, M.D., Magalhães, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophot. Int.* 11, 36–42.
- Ángeles-Argáiz, R.E., Flores-García, A., Ulloa, M., Garibay-Orijel, R., 2016. Commercial *Sphagnum* peat moss is a vector for exotic ectomycorrhizal mushrooms. *Biol. Invas.* 18, 89–101.
- Bahram, M., Vanderpool, D., Pent, M., Hiltunen, M., Ryberg, M., 2018. The genome and microbiome of a dikaryotic fungus (*Inocybe terrigena*, *Inocybaceae*) revealed by metagenomics. *Environ. Microbiol. Rep.* 10, 155–166.
- Barragán-Soriano, J.L., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J.J., Carcaño-Montiel, M.G., Medrano-Ortiz, K.I., 2018. Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Rev. Chapingo Ser. Cie.* 24, 3–16.
- Bertaux, J., Schmid, M., Prevost-Boure, N.C., Churin, J.L., Hartmann, A., Garbaye, J., Frey-Klett, P., 2003. In situ identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4243–4248.
- Burney, O., Aldrete, A., Alvarez Reyes, R., Prieto Ruiz, J.A., Sánchez Velazquez, J.R., Mexal, J.G., 2015. México-Addressing challenges to reforestation. *J. For.* 113, 404–413.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J.J., Quintero-Lizaola, R., Torres-Aquino, M., 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Rev. Mex. De Cienc. Agric.* 1, 567–577.
- Carrino-Kyker, S.R., Kluber, L.A., Petersen, S.M., Coyle, K.P., Hewins, C.R., DeForest, J.L., Burke, D.J., 2016. Mycorrhizal fungal communities respond to experimental elevation of soil pH and P availability in temperate hardwood forests. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiv024.
- Castellano, M.A., Molina, R., 1989. Mycorrhizae. In: Landis, T.D., Tinus, R.W., McDonald, S.E., Barnett, J.P. (Eds.), *The Biological Components: Nursery Pests and Mycorrhizae. The Container Tree Nursery Manual*. US Department of Agriculture, Forest Service, Washington, pp. 101–167.

- Chávez, D., Hernandez, V., Machuca, A., Palfner, G., Becerra, J., 2015. Secondary metabolites from the culture broth of *Lactarius quieticolor* growing in a bioreactor. *Afr. J. Microbiol. Res.* 9, 581–587.
- Christophe, C., Marie-Pierre, T., Stéphane, U., Elisabeth, L., Antoine, K., Pascale, F.K., 2010. *Laccaria bicolor* S238N improves Scots pine mineral nutrition by increasing root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. *Plant Soil* 328, 145–154.
- De Jesus, S.S., Neto, J.M., Filho, M.R., 2017. Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional airlift, stirred airlift and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: a comparative study. *Biochem. Eng. J.* 118, 70–81.
- De la Bastide, P.Y., Kropp, B.R., Piché, Y., 1995a. Population structure and mycelial phenotypic variability of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *Mycorrhiza* 5, 371–379.
- De la Bastide, P.Y., Kropp, B.R., Piché, Y., 1995b. Vegetative interactions among mycelia of *Laccaria bicolor* in pure culture and in symbiosis with *Pinus banksiana*. *Can. J. Bot.* 73, 1768–1777.
- Di Battista, C., Selosse, M.A., Bouchard, D., Stenström, E., Le Tacon, F., 1996. Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycol. Res.* 100, 1315–1324.
- Dickie, I.A., Nuñez, M.A., Pringle, A., Lebel, T., Tourtellot, S.G., Johnston, P.R., 2016. Towards management of invasive ectomycorrhizal fungi. *Biol. Invasions* 18, 3383–3395.
- Dynesen, J., Nielsen, J., 2003. Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. *Biotechnol. Prog.* 19, 1049–1052.
- FAOSTAT, F., 2018. FAOSTAT Statistical Database. www.fao.org/faostat/. (Accessed 21 June 2019).
- Franco, A.R., Sousa, N.R., Ramos, M.A., Oliveira, R.S., Castro, P.M., 2014. Diversity and persistence of ectomycorrhizal fungi and their effect on nursery-inoculated *Pinus pinaster* in a post-fire plantation in northern Portugal. *Microb. Ecol.* 68, 761–772.
- Frankland, J.C., 1998. Fungal succession-unravelling the unpredictable. *Mycol. Res.* 102, 1–15.
- Gamboa-Suasnavart, R.A., Valdez-Cruz, N.A., Cordova-Dávalos, L.E., Martínez-Sotelo, J.A., Servín-González, L., Espitia, C., Trujillo-Roldán, M.A., 2011. The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 kDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microb. Cell Fact.* 10, 110.
- Garbaye, J., Duponnois, R., Wahl, J.L., 1990. The bacteria associated with *Laccaria laccata* ectomycorrhizas or sporocarps: effect of symbiosis establishment on Douglas fir. *Symb.* 9, 267–273.
- García-Ochoa, F., Gomez, E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol. Adv.* 27, 153–176.
- Garibay-Orijel, R., Martínez-Ramos, M., Cifuentes, J., 2009. Disponibilidad de esporomas de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez. *Oaxaca. Rev. Mex. Biodivers.* 80, 521–534.
- Georg, L.K., 1951. The relation of nutrition to the growth and morphology of *Trichophyton violaceum*. I. The vitamin and amino acid requirements of *T. violaceum*. *Mycologia* 43, 297–309.
- Gibbs, P.A., Seviour, R.J., Schmid, F., 2000. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 20, 17–48.
- Glazebrook, M.A., Vining, L.C., White, R.L., 1992. Growth morphology of *Streptomyces akiyoshiensis* in submerged culture: influence of pH, inoculum, and nutrients. *Can. J. Microbiol.* 38, 98–103.
- Guerin-Laguette, A., Plassard, C., Mousain, D., 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can. J. Microbiol.* 46, 790–799.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., 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.
- Hazard, C., Kruitbos, L., Davidson, H., Mbow, F.T., Taylor, A.F., Johnson, D., 2017a. Strain identity of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* is more important than richness in regulating plant and fungal performance under nutrient rich conditions. *Front. Microbiol.* 8, 1874.
- Hazard, C., Kruitbos, L., Davidson, H., Taylor, F.S., Johnson, D., 2017b. Contrasting effects of intra- and interspecific identity and richness of ectomycorrhizal fungi on host plants, nutrient retention and multifunctionality. *New Phytol.* 213, 852–863.
- Hotop, S., Möller, J., Niehoff, J., Schügerl, K., 1993. Influence of the preculture conditions on the pellet size distribution of *Penicillium chrysogenum* cultivations. *Process Biochem.* 28, 99–104.
- Hutchison, L.J., 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42, 387–504.
- Hwang, H.J., Kim, S.W., Xu, C.P., Choi, J.W., Yun, J.W., 2004. Morphological and rheological properties of three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1296–1305.
- Kawagoe, M., Kawakami, K., Nakamura, Y., Naoe, K., Miki, K., Noda, H., 1999. Submerged culture of *Tricholoma matsutake* mycelium in bubble column fermentors. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 116–118.
- Kim, S.S., Lee, J.S., Cho, J.Y., Kim, Y.E., Hong, E.K., 2010. Effects of C/N ratio and trace elements on mycelial growth and exo-polysaccharide production of *Tricholoma matsutake*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 15, 293–298.
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L.G., Morin, E., Barry, K.W., Buscot, F., Canbäck, B., Choi, C., Cichocki, N., Clum, A., Colpaert, J., Copeland, A., Costa, M.D., Doré, J., Floudas, D., Gay, G., Girlanda, M., Henrissat, B., Herrmann, S., Hess, J., Högberg, N., Johansson, T., Khouja, H.R., La Butti, K., Lahrmann, U., Levasseur, A., Lindquist, E.A., Lipzen, A., Marmeisse, R., Martino, E., Murat, C., Ngan, C.Y., Nehls, U., Plett, J.M., Pringle, A., Ohm, R.A., Perotto, S., Peter, M., Riley, R., Rineau, F., Ruytinx, J., Salamov, A., Shah, F., Sun, H., Tarkka, M., Tritt, A., Venault-Fourrey, C., Zuccaro, A., Mycorrhizal Genomics Initiative Consortium, Tunlid, A., Grigoriev, I.V., Hibbett, D.S., Martin, F., 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat. Genet.* 47, 410.
- Kropp, B.R., McAfee, B.J., Fortin, J.A., 1987. Variable loss of ectomycorrhizal ability in monokaryotic and dikaryotic cultures of *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot.* 65, 500–504.
- Kueck, C., 1996. Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 319–326.
- Kueck, C., Tommerup, I.C., Malajczuk, N., 1992. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. *Mycol. Res.* 96, 273–277.
- Kusuda, M., Ueda, M., Konishi, Y., Yamanaka, K., Terashita, T., Miyatake, K., 2007. Effects of carbohydrate substrate on the vegetative mycelial growth of an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*, isolated from *Quercus*. *Mycoscience* 48, 358–364.
- Lalymia, I., Cranenbrouck, S., Declercq, S., 2014. Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 24, 323–337.
- Lapeyrie, F.F., Bruchet, G., 1985. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. *New Phytol.* 100, 585–593.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Lazarević, J., Stojičić, D., Keča, N., 2016. Effects of temperature, pH and carbon and nitrogen sources on growth of in vitro cultures of ectomycorrhizal isolates from *Pinus heldreichii* forest. *Forest Syst.* 25, 3.
- Le, H.D., Smith, C., Herbohn, J., 2014. What drives the success of reforestation projects in tropical developing countries? The case of the Philippines. *Global Environ. Change* 24, 334–348.
- Le Tacon, F., Jung, G., Mugnier, J., Michelot, P., Mauperin, C., 1985. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermenter and entrapped in polymeric gels. *Can. J. Bot.* 63, 1664–1668.
- López-Gutiérrez, A., Pérez-Moreno, J., Hernández-Santiago, F., Uscanga-Mortera, E., García-Esteve, A., Cetina-Alcalá, V.M., Cardoso-Villanueva, M.R., Xocnostle-Cázares, B., 2018. Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Bot. Sci.* 96, 286–304.
- Mauperin, C., Mortier, F., Garbaye, J., Le Tacon, F., Carr, G., 1987. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. *Can. J. Bot.* 65, 2329–2336.
- Montoya, A., Kong, A., Garibay-Orijel, R., Méndez-Espinoza, C., Tulloss, R.E., Estrada-Torres, A., 2014. Availability of wild edible fungi in La Malinche national park, Mexico. *J. Mycol.* 241806.
- Mortier, F., Le Tacon, F., Garbaye, J., 1989. Effect of dose and formulation of *Laccaria laccata* inoculum on mycorrhizal infection and growth of Douglas fir in a nursery. *Agric. Ecosyst. Environ.* 28, 351–354.
- Mueller, G.M., 1984. New north American species of *Laccaria* (Agaricales). *Mycotaxon* 20, 101–116.
- Mueller, G.M., 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the Continental United States and Canada, with Discussions on Extralimital Taxa and Descriptions of Extant Types. Field Museum of Natural History, Chicago.
- Murat, C., Zampieri, E., Vizzini, A., Bonfante, P., 2008. Is the Perigord black truffle threatened by an invasive species? We dreaded it and it has happened! *New Phytol.* 178, 699–702.
- Nehls, U., Das, A., Neb, D., 2016. Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizal symbiosis. In: Martin, F. (Ed.), *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 161–178.
- Nguyen, C., Yan, W., Le Tacon, F., Lapeyrie, F., 1992. Genetic variation of phosphate solubilising activity by monokaryotic and dikaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant Soil* 143, 193–199.
- Ogawa, W., Endo, N., Takeda, Y., Kodaira, M., Fukuda, M., Yamada, A., 2019. Efficient establishment of pure cultures of yellow chanterelle *Cantharellus anzutake* from ectomycorrhizal root tips, and morphological characteristics of ectomycorrhizae and cultured mycelium. *Mycoscience* 60, 45–53.
- Oliveira, L.P.D., Rossi, M.J., Furigo, J.A., Silva, F.G.N., Oliveira, V.L.D., 2006. Viability and infectivity of an ectomycorrhizal inoculum produced in an airlift bioreactor and immobilized in calcium alginate. *Braz. J. Microbiol.* 37, 251–255.
- Pellitier, P.T., Zak, D.R., 2018. Ectomycorrhizal fungi and the enzymatic liberation of nitrogen from soil organic matter: why evolutionary history matters. *New Phytol.* 217, 68–73.
- Pera, J., Parladé, J., 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Invest. Agrar-Sist. R.* 14, 419–433.
- Perea-Estrada, V.M., Pérez-Moreno, J., Villarreal Ruiz, L., Trinidad-Santos, A., Cetina Alcalá, V.M., Tijerina-Chávez, L., 2009. Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Rev. Fitotec. Mex.* 32, 93–102.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.

- Pradella, J.G.D., Zuccolo, M., Lopez, S.A.R., Oliveira, M.S., 1991. *Pisolithus tinctorius* vegetative mycelia production: effects of nitrogen sources and cultivation in stirred tank fermenter. *Rev. Microbiol.* 22, 7–11.
- Pringle, A., Bever, J.D., Gardes, M., Parrent, J.L., Rillig, M.C., Klironomos, J.N., 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40, 699–715.
- Quintero-Corrales, C.A., 2019. Diversidad y diferenciación genética de especies de *Laccaria* en las altas montañas de la Faja Volcánica Transmexicana (Master's Thesis). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2016. FigTree V1. 4.3. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Ramírez-Soto, A., Villa-Bonilla, B., Lucio-Palacio, C.R., Libreros, L.L., Sánchez-Velásquez, L.R., Inzunza, E.R., 2018. Mexico's official reforestation programs are shrinking and narrowing its vision at a higher financial expense. *For. Pol. Econ.* 94, 32–34.
- Repác, I., 2011. Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. In: Rai, M., Varma, A. (Eds.), *Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 43–63.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Pérez-Moreno, J., Peña-Ramírez, V.M., Siebe, C., 2010. Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, Mexico. *Can. J. For. Res.* 40, 1165–1174.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Pérez-Moreno, J., 2012. Soil factors influencing ectomycorrhizal spore distribution in neotropical forests dominated by *Pinus montezumae*, Mexico. *Mycoscience* 53, 203–210.
- Reynoso-Cereceda, G.I., García-Cabrera, R.I., Valdéz-Cruz, N.A., Trujillo-Roldán, M.A., 2016. Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: mass transfer coefficient $k_L a$ characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochem. Eng. J.* 105, 379–390.
- Ricker, M., Castillo-Santiago, M.A., Mendoza-Márquez, P.E., Nava-Cruz, Y.G., Peña-Ramírez, V.M., 2010. Revision del Programa Pro-Árbol 2008. https://www.researchgate.net/publication/272677871_Revision_del_programa_Pro-Arbol_2008.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., Ortega-Larrocea, M.P., Arellano-Torres, E., 2019. Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Rev. Mex. Biodivers.* 90, e902868.
- Rossi, M., Souza, J., Oliveira, V., 2002. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. *Appl. Microbiol. Biot.* 59, 175–181.
- Rossi, M.J., Furigo, J.A., Oliveira, V.L., 2007. Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. *Food Technol. Biotech.* 45, 277–286.
- Rossi, M.J., Nascimento, F.X., Giachini, A.J., Oliveira, V.L., Furigo, J.A., 2016. Airlift bioreactor fluid-dynamic characterization for the cultivation of shear stress sensitive microorganisms. *J. Adv. Biotechnol.* 5, 640–651.
- Rossi, M.J., Nascimento, F.X., Giachini, A.J., Oliveira, V.L., Furigo, A., 2017. Transfer and consumption of oxygen during the cultivation of the ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon nigrescens* in an airlift bioreactor. *Appl. Microbiol. Biot.* 101, 1013–1024.
- Santiago-Martínez, G., Estrada-Torres, A., Varela, L., Herrera, T., 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis in vitro de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* 37, 575–584.
- Savoie, J.M., Largeteau, M.L., 2011. Production of edible mushrooms in forests: trends in development of a mycosilviculture. *Appl. Microbiol. Biot.* 89, 971–979.
- Smith, S.E., Read, D.J., 2010. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic press, New York.
- Tang, Y.J., Zhong, J.J., 2003. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb. Tech.* 32, 478–484.
- Trujillo-Roldán, M., Peña, C., Ramírez, O.T., Galindo, E., 2001. The effect of oscillating dissolved tension upon the kinetics of growth, alginate production and molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol. Prog.* 17, 1042–1048.
- Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Gonzalez-Monterrubio, C.F., Acevedo-Sánchez, E.V., Martínez-Salinas, C., García-Cabrera, R.I., Gamboa-Suasnavart, R.A., Marín-Palacio, L.D., Villegas, J., Blancas-Cabrera, A., 2013. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9665–9674.
- Vaario, L.M., Suzuk, K., 2004. Ectomycorrhizal synthesis between *Abies firma* roots/callus and *Laccaria bicolor* strain. *Act. Bot Sin.* 46, 63–68.
- Vadell, E., de-Miguel, S., Pemán, J., 2016. Large-scale reforestation and afforestation policy in Spain: a historical review of its underlying ecological, socioeconomic and political dynamics. *Land Use Pol.* 55, 37–48.
- Vázquez-García, A., Santiago Martínez, G., Estrada Torres, A., 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Auton. Mex. Ser. Bot.* 73, 1–15.
- Veiter, L., Rajamanickam, V., Herwig, C., 2018. The filamentous fungal pellet-relationship between morphology and productivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2997–3006.
- Vellinga, E.C., Wolfe, B.E., Pringle, A., 2009. Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytol.* 181, 960–973.
- Villeneuve, N., Le Tacon, F., Bouchard, D., 1991. Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglasfir seedlings. *Plant Soil* 135, 95–107.
- Weiß, C.H., 2007. Statsoft, inc.; Tulsa, ok.; Statistica, Version 8. *ASTA Advances in Statistical Analysis*, vol. 91, pp. 339–341.
- Wilkinson, A., Solan, M., Taylor, A.F., Alexander, I.J., Johnson, D., 2010. Intraspecific diversity regulates fungal productivity and respiration. *PLoS One* 5, e12604.
- Wilkinson, A., Alexander, I., Johnson, D., 2012. Genotype identity determines productivity and CO₂ efflux across a genotype-species gradient of ectomycorrhizal fungi. *Fungal Ecol.* 5, 571–580.
- Wilson, A.W., Hosaka, K., Mueller, G.M., 2017. Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytol.* 213, 1862–1873.
- Wong, K.K.Y., Piché, Y., Fortin, J.A., 1990. Differential development of root colonization among four closely related genotypes of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Mycol. Res.* 94, 876–884.
- Xu, H., Cooke, J.E., Kempainen, M., Pardo, A.G., Zwiazek, J.J., 2016. Hydraulic conductivity and aquaporin transcription in roots of trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings colonized by *Laccaria bicolor*. *Mycorrhiza* 26, 441–451.
- Yamanaka, T., 2003. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*. *Mycologia* 95, 584–589.
- Yang, F.C., Liao, C.B., 1998. Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. *Bioprocess Eng.* 19, 233–236.
- Zambonelli, A., Bonito, G.M., 2013. *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: Current Knowledge and Future Prospects*. Springer Science & Business Media, London.
- Zhang, S., Vaario, L.M., Xia, Y., Matsushita, N., Geng, Q., Tsuruta, M., Kurokouchi, H., Lian, C., 2019. The effects of co-colonising ectomycorrhizal fungi on mycorrhizal colonisation and sporocarp formation in *Laccaria japonica* colonising seedlings of *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza* 1–12.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*

Rodolfo E. Ángeles-Argáiz^{a,b,c}, Ilse A. Carmona-Reyes^c, Christian Armando Quintero-Corrales^{a,b}, Francisco J. Medina-Macías^c, Abel Blancas-Cabrera^c, Norma A. Valdez-Cruz^c, Miguel Ulloa^b, Mauricio A. Trujillo-Roldán^c, Roberto Garibay-Orijel^{b*}

^a Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. A.P 70-153, C.P. 04510, Ciudad de México, México.

^b Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. A.P. 70-233, Ciudad de México, C.P. 04510, México.

^c Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP. 70-228, Ciudad de México, C.P. 04510, México.

***Corresponding author: Dr. Roberto Garibay-Orijel.** Laboratorio de Sistemática, Ecología y Aprovechamiento de Hongos Ectomicorrízicos, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. A.P. 70-233, Ciudad de México, CP. 04510, México. Email: rgaribay@ib.unam.mx. Phone +52 55 56229250 ext. 47836.

Appendix. Colony morphology in Petri dish

Under the culture media, pH and temperatures tested, *L. trichodermophora* showed six different morphologies: A) Dense, velvety white irregular colonies with diffuse margins and slow growing aggregated exploratory mycelia. This morphology was observed in MMN, pH 4.5 in all temperatures assayed; and PDA, pH 5.5, 28 °C (Figure S1A). B) Soft, white regular submerged colonies with diffuse or defined margins and fast growing dispersed exploratory mycelia. This morphology was observed in MMN at 23 °C, 5.5 and pH 6.5 as well as 25 °C, pH 6.5 (Figure S1B). C) Soft, white regular submerged colonies with clearly defined margins and slow growing mycelia. This morphology was observed in MMN, pH 6.5, 25 and 28 °C (Figure S1C). D) Dense, thin, velvety white or lilac irregular colonies with a central light brown zonate irregular margin and dispersed exploratory mycelia. This morphology was observed in PDA, pH 4.5, 23 and 25 °C (Figure S1D). E) Dense, thick, velvety white colonies with a central light brown zonate and regular or irregular margin. This morphology was observed in all PDA, pH 6.5; pH 5.5, 23 and 25 °C; pH 4.5, 28 °C; and BAF, 28 °C at all pH values (Figure S1E). F) Dense, thick, velvety white or lilac irregular colonies with a central dark brown zonate and irregular margin, sometimes with a second growing front of dispersed exploratory mycelia. This morphology was observed in BAF, 23 and 25 °C at all pH values (Figure S1F).

Table S1. Average final projected area and final dry weight of the *Laccaria trichodermophora* solid media culture.

Assay	°C	Media	pH	Xmax (g/L)	Colony area (mm²)
1	23	PDA	4.5	0.073±0.073	2,127±366
2	23	PDA	5.5	0.040±0.006	2,830±613
3	23	PDA	6.5	0.035±0.023	1,053±332
4	23	MMN	4.5	0.026±0.008	886±177
5	23	MMN	5.5	0.038±0.012	3,137±745
6	23	MMN	6.5	0.040±0.038	2,809±969
7	23	BAF	4.5	0.057±0.005	3,675±343
8	23	BAF	5.5	0.055±0.007	3,464±372
9	23	BAF	6.5	0.059±0.010	3,380±553
10	25	PDA	4.5	0.036±0.006	1,052±314
11	25	PDA	5.5	0.040±0.005	1,697±215
12	25	PDA	6.5	0.029±0.005	1,124±273
13	25	MMN	4.5	0.027±0.005	734±287
14	25	MMN	5.5	0.025±0.007	536±426
15	25	MMN	6.5	0.046±0.019	2,234±635
16	25	BAF	4.5	0.064±0.011	823±741
17	25	BAF	5.5	0.079±0.015	3,210±402
18	25	BAF	6.5	0.075±0.009	2,003±498

Assay	°C	Media	pH	Xmax (g/L)	Colony area (mm²)
19	28	PDA	4.5	0.046±0.016	2,194±531
20	28	PDA	5.5	0.049±0.017	2,718±267
21	28	PDA	6.5	0.049±0.012	2,391±236
22	28	MMN	4.5	0.014±0.004	2,125±123
23	28	MMN	5.5	0.006±0.003	1,426±267
24	28	MMN	6.5	0.025±0.025	1,333±183
25	28	BAF	4.5	0.040±0.005	3,642±404
26	28	BAF	5.5	0.056±0.007	3,529±348
27	28	BAF	6.5	0.041±0.006	862±161

Table S2. Spearman correlations and Kendall test between *Laccaria trichodermophora* colony projected area and dry weight. Red fonts correspond to significative correlations.

	Spearman correlation		Kendall test	
	Colony area (mm)	Dry weight (g/L)	Colony area (mm)	Dry weight (g/L)
Colony area (mm)	1.000000	0.560409	1.000000	0.401837
Dry weight (g/L)	0.560409	1.000000	0.401837	1.000000

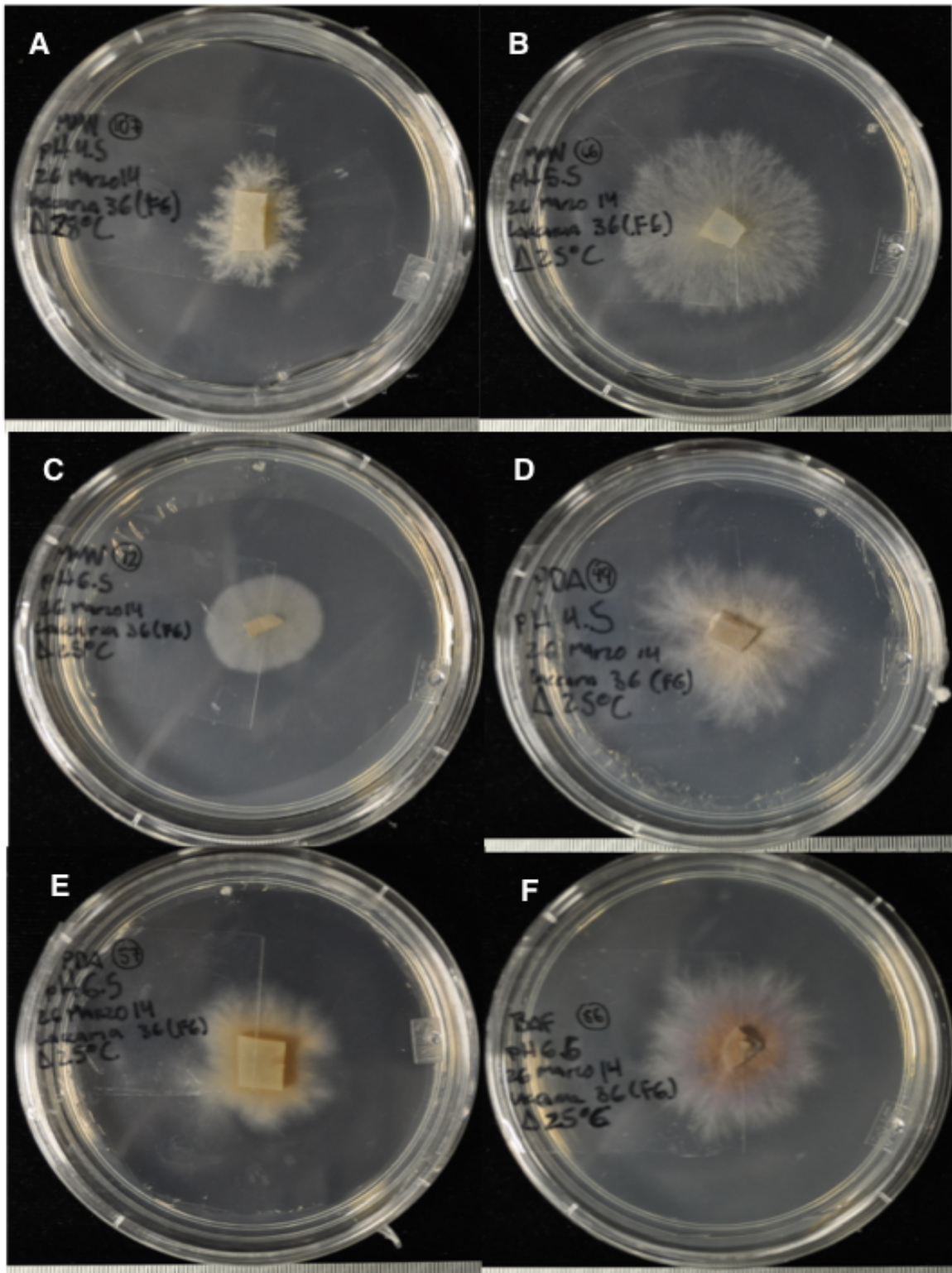


Figure S1. *Laccaria trichodermophora* culture on solid medium. **A-F)** different colony morphologies.

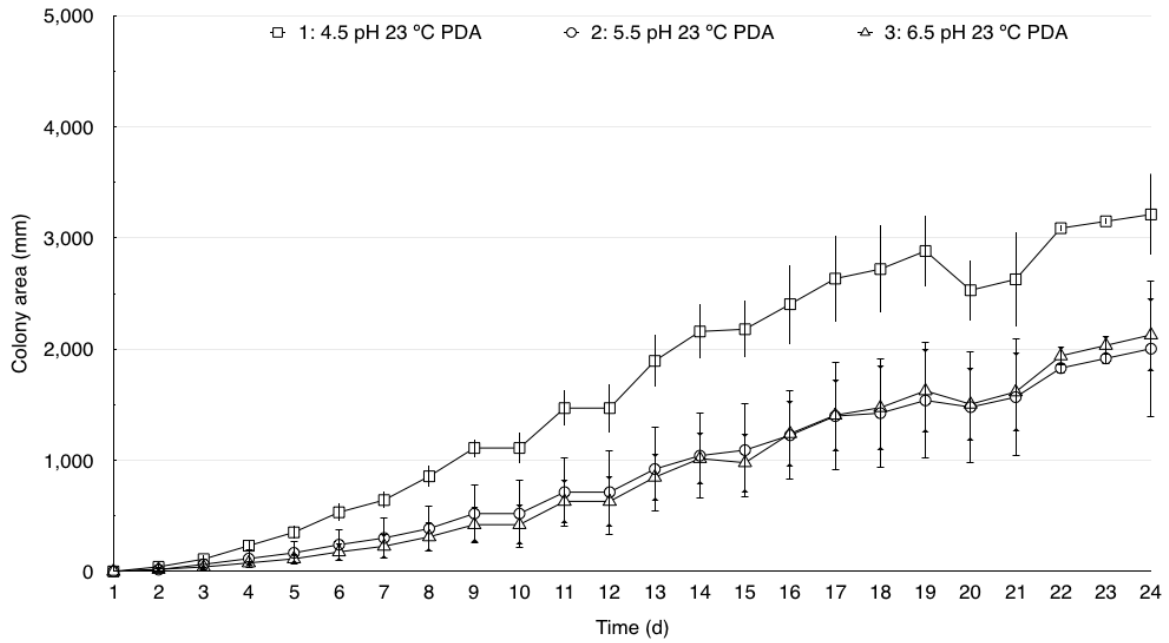


Figure S2. *Laccaria trichodermorphora* colony area growth kinetics in solid PDA at 23 °C with three pH values. Figure shapes correspond to different pH values. Bars correspond to standard deviation.

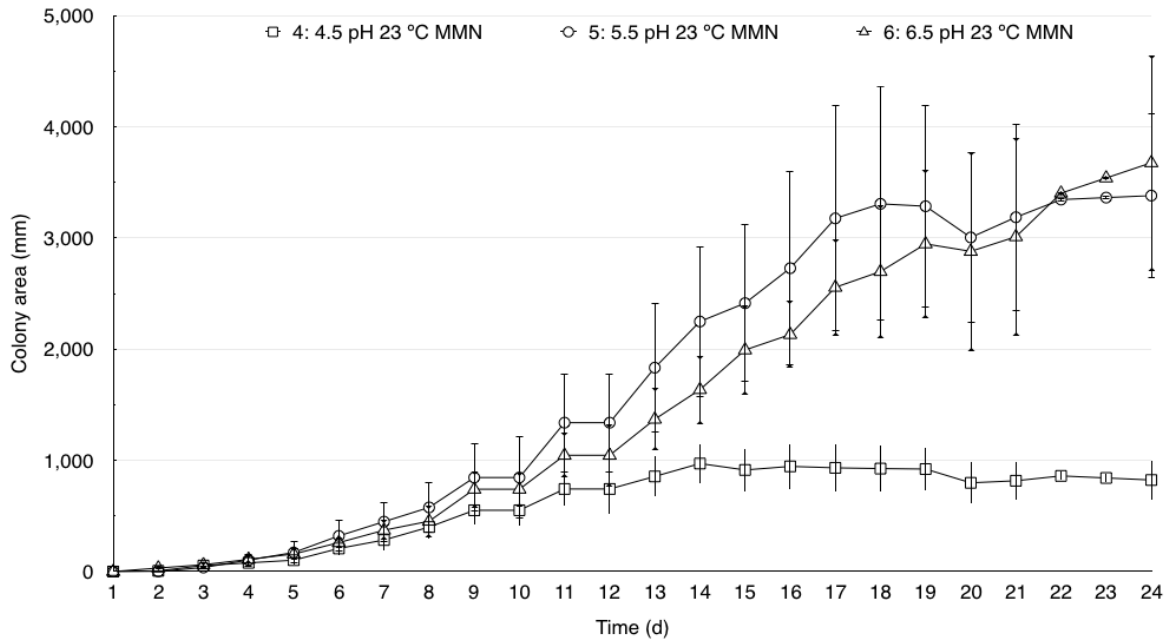


Figure S3. *Laccaria trichodermorphora* colony area growth kinetics in solid MMN at 23 °C with three pH values. Figure shapes correspond to different pH values. Bars correspond to standard deviation.

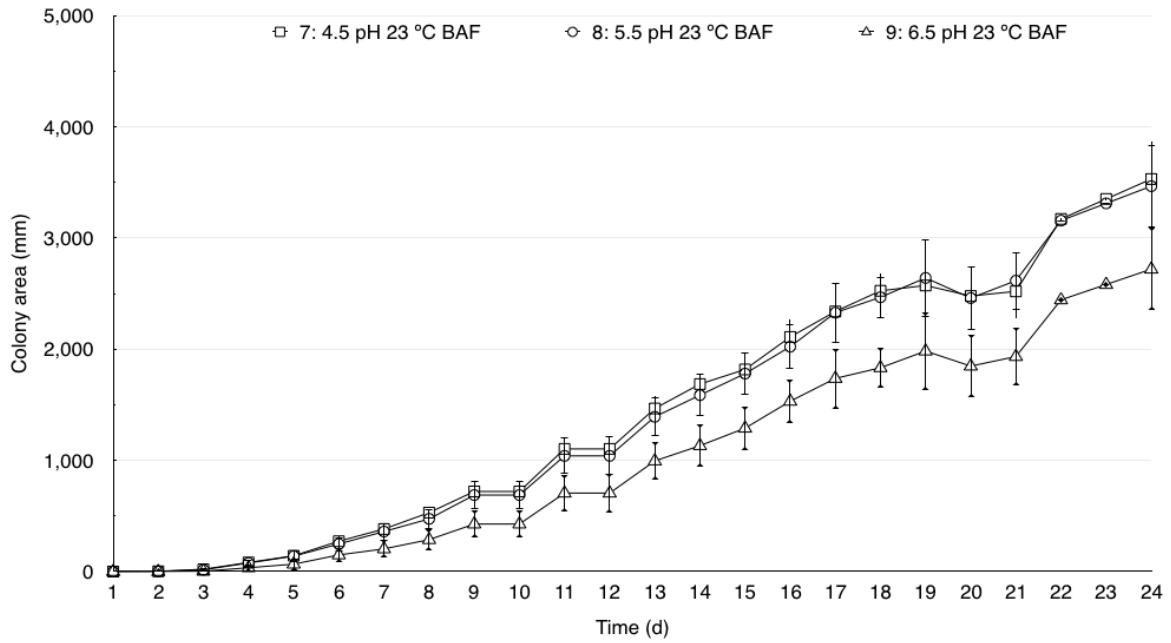


Figure S4. *Laccaria trichodermophora* colony area growth kinetics in solid BAF at 23 °C with three pH values. Figure shapes correspond to different pH values. Bars correspond to standard deviation.

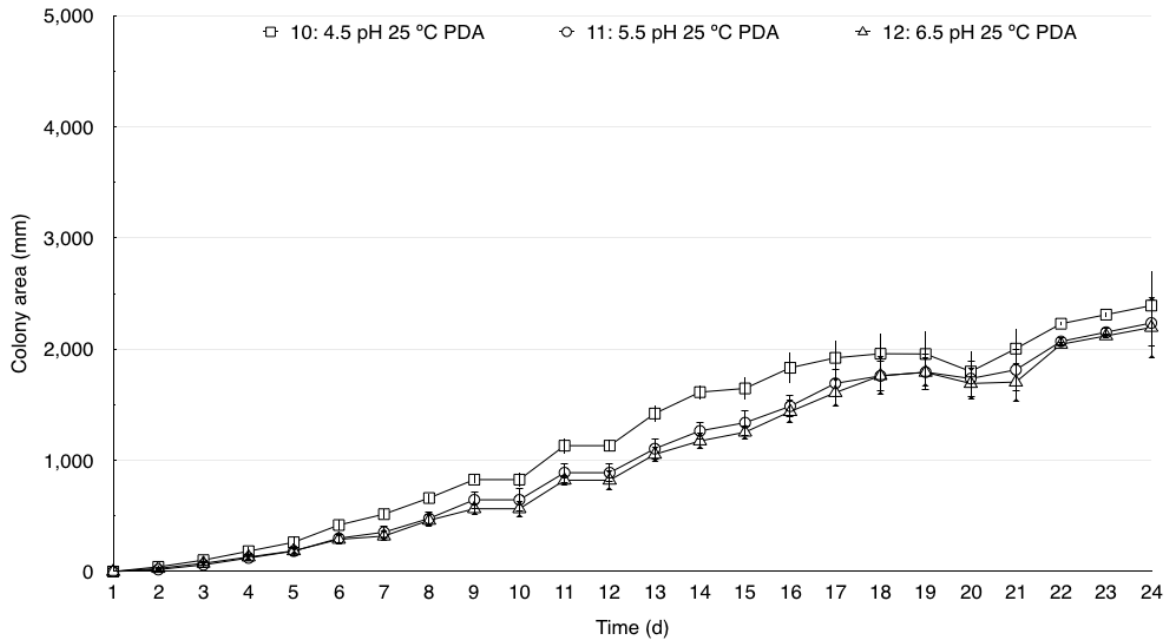


Figure S5. *Laccaria trichodermophora* colony area growth kinetics in solid PDA at 25 °C with three pH values. Figure shapes correspond to different pH values. Bars correspond to standard deviation.

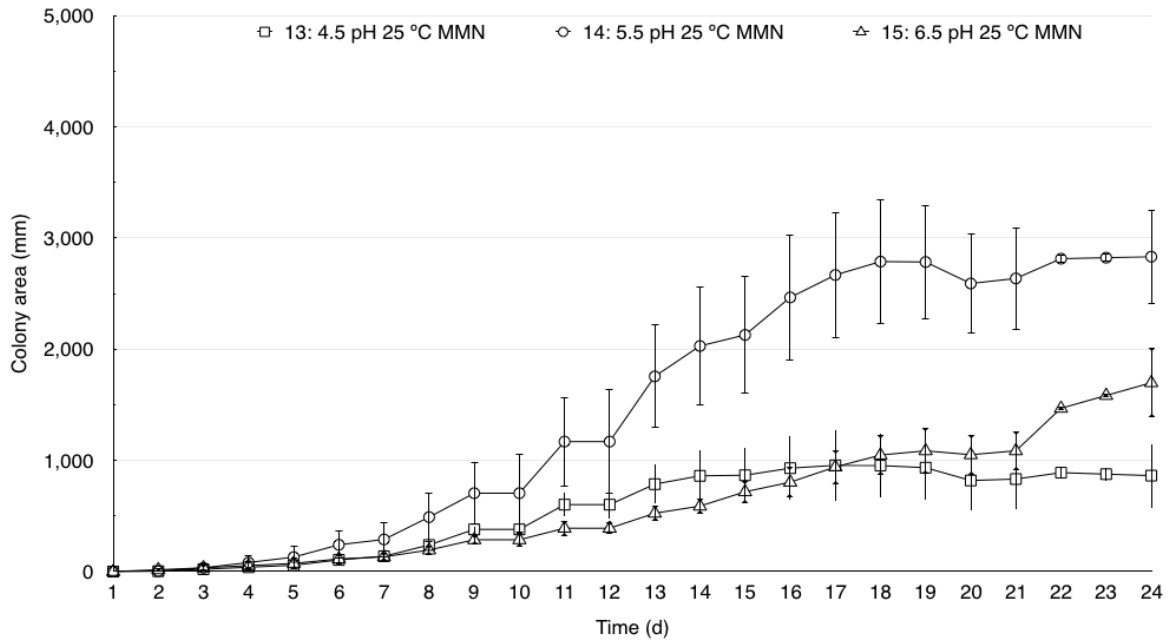


Figure S6. *Laccaria trichodermorphora* colony area growth kinetics in solid MMN at 25 °C with three pH values. Figure shapes correspond to different pH values. Bars correspond to standard deviation.

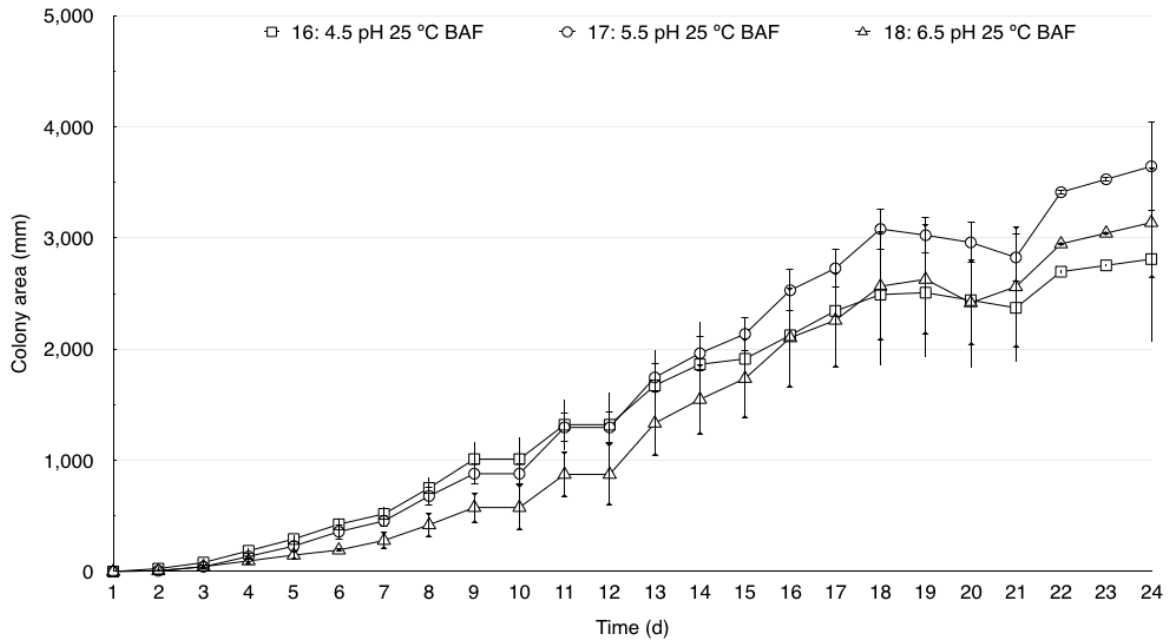


Figure S7. *Laccaria trichodermophora* colony area growth kinetics in solid BAF at 25 °C with three pH values. Figure shapes correspond to different pH values. Bars correspond to standard deviation.

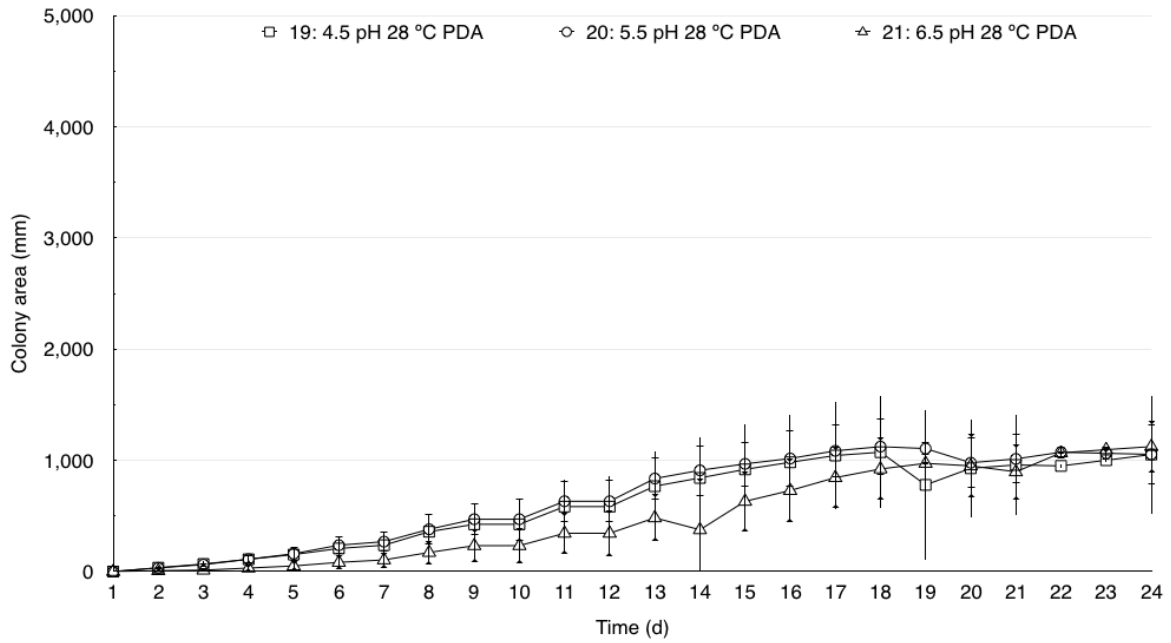


Figure S8. *Laccaria trichodermophora* colony area growth kinetics in solid PDA at 28 °C with three pH values. Figure shapes correspond to different pH values. Bars correspond to standard deviation.

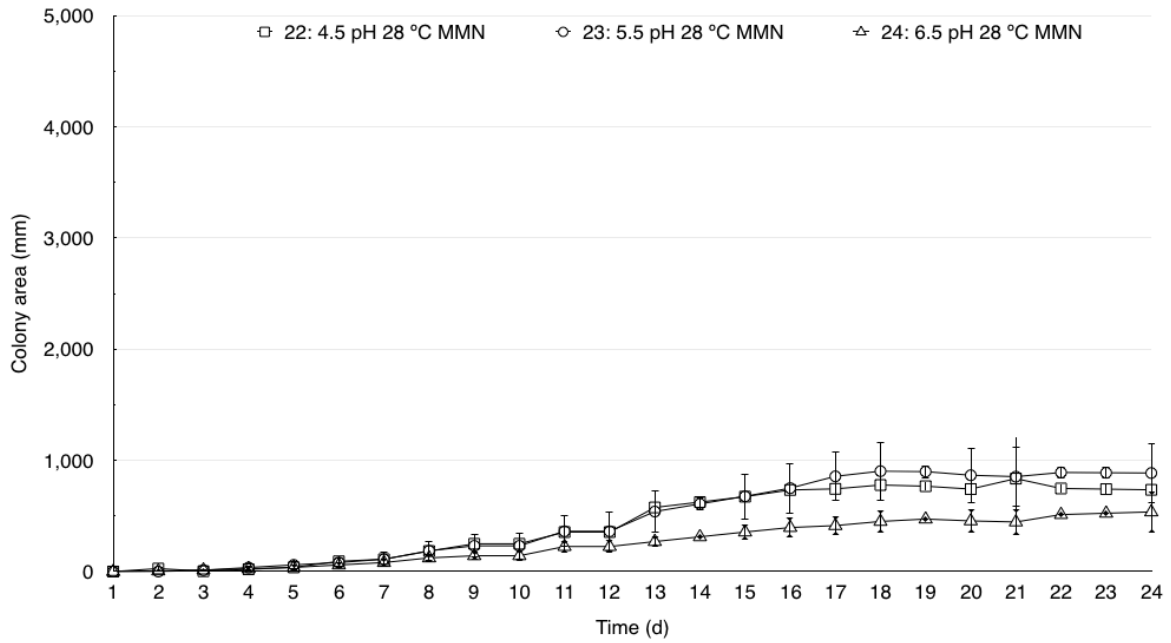


Figure S9. *Laccaria trichodermorphora* colony area growth kinetics in solid MMN at 28 °C with three pH values. Figure shapes correspond to different pH values. Bars correspond to standard deviation.

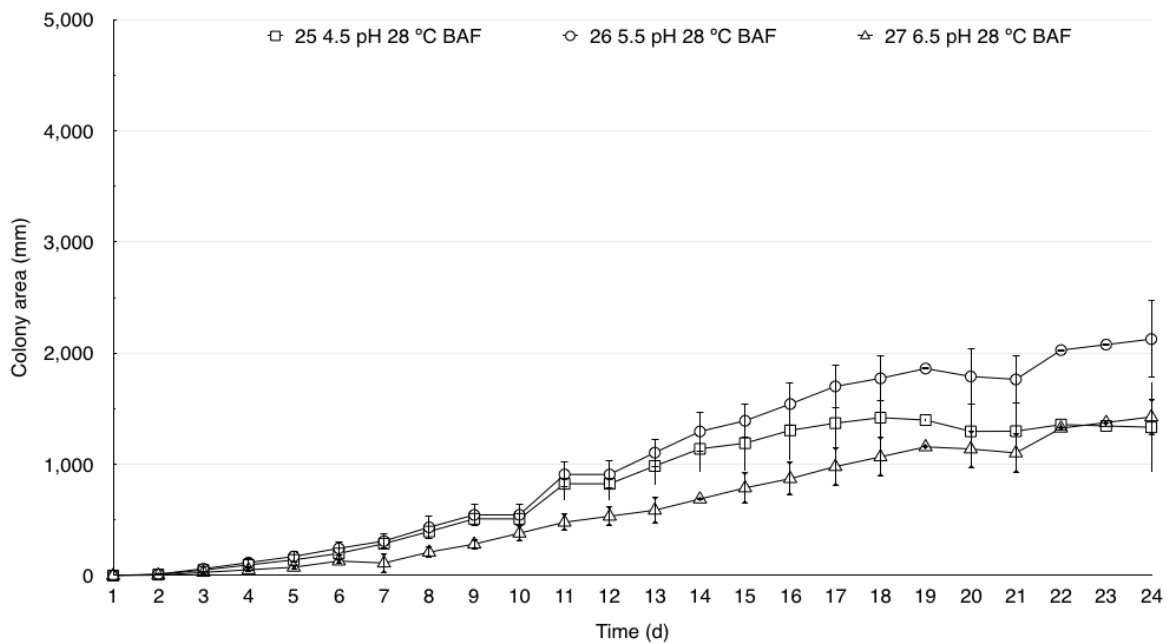


Figure S10. *Laccaria trichodermophora* colony area growth kinetics in solid BAF at 28 °C with three pH values. Figure shapes correspond to different pH values. Bars correspond to standard deviation.

Capítulo III- Long-read sequencing do not collapse *Laccaria trichodermophora* (CA15-11, CA15-75, CA15-F10 and EF-36) strains genome assemblies and reveal its intraspecific genome diversity

En este Capítulo se abordó el segundo objetivo particular de la tesis: Identificar el efecto de la longitud de lectura de secuenciación sobre la calidad del ensamble genómico *de novo* de *Laccaria trichodermophora*; también se estudió el efecto de la calidad del ensamble en las inferencias genómico-funcionales.

Se secuenciaron los genomas de cuatro cepas de *L. trichodermophora* por plataformas de segunda y tercera generación de secuenciación y se ensamblaron *de novo* por diferentes aproximaciones bioinformáticas.

Se hizo evidente que la longitud de la lectura tiene un impacto en la calidad del ensamble genómico, y este a su vez, en las inferencias funcionales. Esto principalmente por el cambio en el número de copias y tamaño de las familias génicas, aunque también, pero en menor grado, funciones enteras fueron detectadas solo mediante el uso de estrategias de secuenciación y ensamble híbridas.

El Capítulo será sometido para su publicación como artículo de investigación en la revista *Genes Genomes and Genetics* (IF: 2.8) con el título “Long-read sequencing do not collapse *Laccaria trichodermophora* (CA15-11, CA15-75, CA15-F10 and EF-36) strains genome assemblies and reveals its intraspecific genome diversity”.



“Long-read sequencing do not collapse *Laccaria trichodermophora* (CA15-11, CA15-75, CA15-F10 and EF-36) strains genome assemblies and reveal its intraspecific genome diversity”

Rodolfo Enrique Ángeles-Argáiz*†, Luis Fernando Lozano Aguirre-Beltrán‡, Christian Armando Quintero-Corrales*†, Mauricio Trujillo-Roldán§, Santiago Castillo-Ramírez‡, Roberto Garibay-Orijelt

* Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito de los Posgrados s/n, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México, C.P. 04510.

† Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, México, C.P. 04510.

‡ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad s/n, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, C.P 62210.

§ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, México, C.P. 04510.

***Laccaria trichodermophora* genome assembly**

Key words

Biotrophic fungal genome, hybrid genome assembly, intraspecific genome variability, sequencing technologies comparison.

Corresponding autor

Roberto Garibay Orijel, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México, +52 56229250 ext. 47836, rgaribay@ib.unam.mx

Abstract

Genome assembly and annotation using short-paired reads is challenging for eukaryotic organisms, mainly due to the high number of repeated transposable elements populating these genomes. However, using single molecule long reads improves the assembly quality but their high error rate brings new assembling challenges. In order to address the effect of the read length on the genome assembly quality, gene prediction and annotation, we performed a comparison among genome assemblers and sequencing technologies with four strains of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*. The effects of the assembly quality on the functional inferences were tested by annotating and comparing the carbohydrate activity enzymatic kit. Libraries were generated using three different sequencing platforms (Illumina Next-Seq 2x76 b, Mi-Seq 2x300 b and PacBio Sequel 1 >10 kb), the genomes

were assembled using single libraries and hybrid strategies. We detected that only long reads assemblers were able to decompress repeated regions and displayed the real number and variation of genes copies. Indeed, the best quality genomes assemblies were also the larger ones. High quality genomes showed larger genomic contents mainly represented by expansion of genes families; in extreme cases, they even allowed to recover full genomic functions missing in the short reads assemblies. Additionally, we found large differences in genome size within *L. trichodermophora* strains corresponding to high genomic interspecific variation rather than methodological artifacts.

1 Introduction

Genome assembly quality and completeness relies on intrinsic genome features, sequencing data and computational assembly approaches (Alkan 2011). Each high throughput sequencing technology has its particular limitations. In 454 pyrosequencing and Ion Torrent libraries, homopolymers were a major concern; the short pair-end reads from Illumina or BGI often yield assemblies with a large number of contigs, while third generation sequencing technologies such as PacBio or NanoPore are often superior in assembly completeness due to the low number of resulting contigs, but their high error frequency is still problematic (Smits 2019; Watson and Warr, 2019). In consequence, several assembly approaches have been developed to deal with sequencing data features as the k -mer sorting, graph construction, aligning and overlapping of short or long reads, scaffolding, filling gaps, correcting misassemblies and polishing results in order to offer an accurate genome assembly hypothesis (Amarasinghe *et al.* 2010; Koren *et al.* 2012; Sedlazeck *et al.* 2018; Koren *et al.* 2019; Wang and Au, 2020).

Eukaryotic genomes contain non-coding regions and transposable elements that hinder the accuracy of genome assembly affecting assembly size (Elliott and Gregory 2015). By means of sequencing coverage, it has been estimated that the genome size of some ectomycorrhizal fungi, particularly species of *Amanita*, could be larger than those proposed by genomic assemblies (Hess *et al.* 2014; 2018). This is maybe due to the complexity of these genomes in terms of the repeated regions. This phenomenon is promoted by particular families of transposable elements (Hess *et al.* 2014; 2018), and could be prominent on large genomes of plant-associated biotrophic fungi (Muszewska *et al.* 2017), especially ectomycorrhizal ones (Miyachi *et al.* 2020).

Recently, assemblies of large and high repetitive eukaryotic genomes have been addressed through the use of third generation sequencing technologies (such as PacBio and NanoPore) and new assembly and quality improving computational tools and pipelines (e.g., Nowoshilow *et al.* 2018; Osipowski *et al.* 2019; Yu *et al.* 2019; Tobias *et al.* 2020).

In order to understand the effects of read length on the quality and completeness of *de novo* assembly of an ectomycorrhizal genome, we selected four conspecific strains of *Laccaria trichodermophora* for wide genome shotgun sequencing and assembling. We generated and compared the genomic assemblies obtained with two short-read (SR) libraries (2x76 b and 2x300 b) and one long-read (LR) library (>10 Kb). Genomes were assembled using i) each library separately, ii) the two SR libraries together, and iii) the three libraries in a hybrid approach. Likewise, we analyzed the effect of the assembly quality on the functional genomic inferences. To highlight differences in functional annotation, we focused on the low plant cell wall degrading capability, one of the genomic fingerprints of the ectomycorrhizal life style (Veneault-Fourrey *et al.* 2014; Kohler *et al.* 2015), mainly coded in carbohydrate activity enzyme (CAZyme) genes.

2 Materials and Methods

2.1 Strains origin and derivation

We selected the ectomycorrhizal fungus *Laccaria trichodermophora* Muell. as model organism. It is a close relative of *L. bicolor* from whom the first mycorrhizal genome was sequenced by cloning in plasmids and fosmids (Martin *et al.* 2008). These two lineages diverged around 6 million years ago (Wilson *et al.* 2015), and share

macromorphological features (Mueller 1984). Within *Laccaria*, the genome assembly of *L. amethystina* (Kohler *et al.* 2015) was obtained based on pair-end second-generation sequencing technology. *Laccaria bicolor* and *L. amethystina* are transcontinental distributed host generalists; in contrast, *L. trichodermophora* has a relative restricted distribution area and has a strong preference for pine hosts (Mueller 1992; Pérez *et al.* 2012; Reverchón *et al.* 2012; Galindo-Flores *et al.* 2015; Franco-Mass *et al.* 2016; López-García *et al.* 2017; Kong *et al.* 2018; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019; Ángeles-Argáiz *et al.* 2020; Quintero-Corrales *et al.* 2020; see Mueller y Strack 1992; Ramos *et al.* 2017 for host shift under particular conditions).

For the strain selection we took advantage of the genetic resources, the genotype, and phenotype data recently generated in previous studies (Table 1, Figure S1). Ángeles-Argáiz *et al.* (2020) compared the growth and substrate consumption in shake flask cultures of these strains and identified wide differences in culture performance of these conspecific samples. Furthermore, Quintero-Corrales *et al.* (2020) found that the genomic structure in *L. trichodermophora* populations across the Transmexican Volcanic Belt is determined neither by the elevation differences on the volcanoes nor by identity of the host (pine species) but by geographic distance. The selection of the four strains used in this study was designed to represent the wide intraspecific (genetic and phenotypic) diversity of the species. The field sampling and strain isolation from dikaryotic basidiomata are detailed in Ángeles-Argáiz *et al.* (2020), and the strain genotyping is presented in Quintero-Corrales *et al.* (2020).

Table 1 Strain derivation and accessibility.

Strain	CA15-11	CA15-75	CA15-F10	EF-36
Voucher	CA15-11	CA15-75	CA15-F10	REAA13-59
MEXU	29986	29985	29987	27575
Origin	SN	LM	NT	VP
Latitude	18.98375	19.28429	19.12212	19.125575
Longitude	-97.29178	-98.04142	-99.77871	-99.21537
Elevation (masl)	3,836	3,067	4,028	3,094
Host	<i>P. hartwegii</i>	<i>P. montezumae</i>	<i>P. hartwegii</i>	<i>P. montezumae</i>
ITS/NCBI	MN710460	MN710467	MN710481	KT354980
BioProject/NCBI	PRJNA642675			

VP = Volcán Pelado, Mexico City; SN = Serra Negra, Puebla; NT = Nevado de Toluca, Mexico Estate; LM = La Malinche, Tlaxcala

2.2 Sequencing methods and library features

DNA extractions were performed from 16-day-old cultured mycelia of the four strains. The mycelial cultures were growth in 250 mL baffled shake Erlenmeyer flasks (100 rpm) filled to 20% (50 mL of modified BAF culture medium, at 25 ± 2 °C, initial pH 5.5). Mycelial cultures were filtered through sterile Waltman #4 filters using a vacuum plump. Filtered mycelia were stored in sterile Falcon tubes at -70 °C until downstream procedures. High quality DNA extractions were achieved using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) protocol with modifications (Supplementary material). DNA concentrations were measured with NanoDrop and Qubit before delivering for genomic sequencing.

For each strain two SR Illumina sequencing libraries were prepared in the "Instituto Nacional de Medicina Genómica" in Mexico City and for two strains we obtained one LR PacBio library from MacroGen in South Korea (Table 2). One of the SR libraries was a

high deep sequencing library using four Illumina Next-Seq flow cells per sample, consisting in pair end 2x76 b with overlap. The second was made with a full Illumina Mi-Seq flow cell per sample and consisted of a pair end 2x300 b with average distance of 100 b between forward and reverse reads. For the LR library one full PacBio Sequel 1 flow cell per sample was used to obtain libraries mainly consisting in >10 Kb read-length (but even >90 Kb length-reads were obtained). For the PacBio sequencing we selected the strain with the great amount of biotechnological data (EF-36) and a geographically distant one (CA15-11).

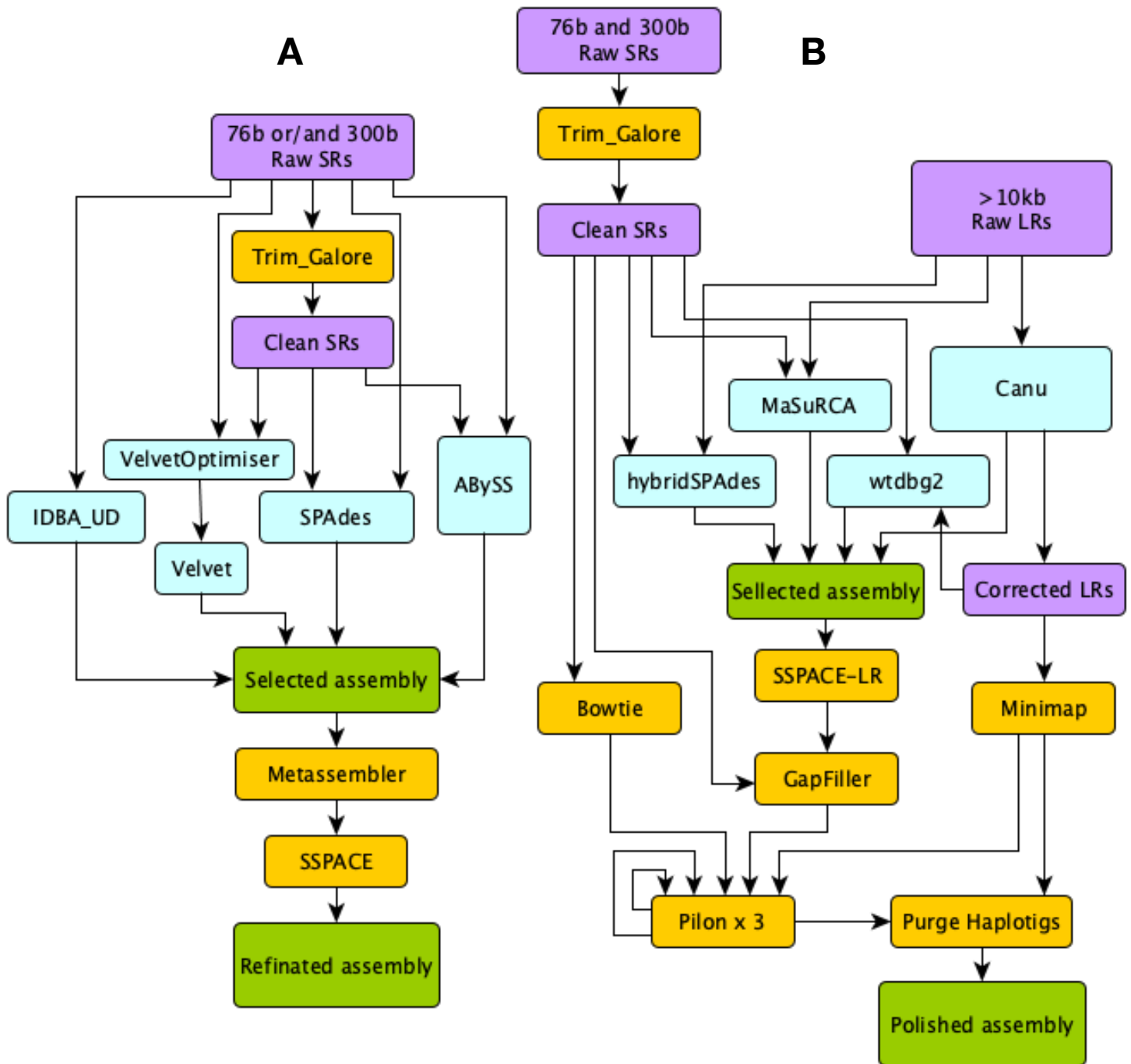
Table 2 Shotgun whole genome sequencing data summary.

Strain	Illumina Next-Seq (2x76 b)(SR)		Illumina Mi-Seq (2x300 b)(SR)		PacBio Sequel 1 (>10 Kb)(LR)		
	Raw read number	Clean read number	Raw read number	Clean read number	Reads	Subreads	Corrected reads
CA15-11	106,996,984	63,107,798	4,066,964	4,022,332	679,396	1,293,905	191,573
CA15-75	106,996,984	103,956,030	6,797,912	6,634,218	-	-	-
CA15-F10	64,249,826	26,371,613	2,040,731	2,019,889	-	-	-
EF-36	128,404,683	124,772,395	7,981,238	7,787,611	709,445	1,038,541	181,727

2.3 Genome assembly

Several *de novo* assembly assays were performed using different assembler algorithms for each of the three libraries together and alone (Figure 1).

Figure 1. *Laccaria trichodermorphora* de novo genomic assemblies general workflow. **A)** Short read assemblies, **B)** Long read and hybrid assemblies. Lilac boxes represent raw sequencing, trimmed or corrected data; light blue boxes represent assemblers; yellow boxes represent complementary software such as cleaner, mapping or polishing tools; green boxes represent resulting assemblies.



Short-read data cleaning was performed with Trimm-Galore (v0.6.4, Krueger 2015) and the quality controls on raw and clean data using FastQC (v0.11.8, Andrews *et al.* 2010) (Figures S2-9). Using only one strain and the 76x2 b clean library, we selected the pair-end assembler. ABySS assembler (v2.0.1, Simpson *et al.* 2009) was tested with 53, 63, 73, 83 and 93 *k*-mer sizes. IDBA (v1.1.3, "IDBA_UD", Peng *et al.* 2012) was used with interleaved reads; the *k*-mer size was ranged between 31 and 121 with 10 b steps. SPAdes (v3.13.1, Bankevich *et al.* 2012) was used with three *k*-mer size combinations: *k*-mer size ranged between 31 to 71 with steps of 10 b, with *k*-mer size ranged between 31 to 75 with steps of 4 and 6 b, and with the default parameters. The *k*-mer size tested with Velvet (v1.2.10, Zerbino y Birney 2008) were 67, 69, 71, 73 and 75, these values were selected because the optimal *k*-mer size proposed by VelvetOptimiser (v2.2.6) was $k = 71$. We did the quality assessment for the genome assemblies with QUILT (v5.0.2, Gurevich *et al.* 2013) and chose the best result of each assembler. The remaining strains were assembled following the parameters that gave the best result for the first one (SPAdes default). Those assemblies were used for scaffolding by SSPACE (v3.0, "SSPACE_Standard", Boetzer *et al.* 2011) and processed with GapFiller (v1-10, Nadalin *et al.* 2012), in order to get a high accurate genome assembly with SR.

LRs assemblies were made with Canu (v2.0, Koren *et al.* 2017) on diploid mode. *De novo* hybrid assembling approaches vary in the use of the input data and could be classified in three groups: 1) Methods that start assembling SRs and then utilize LRs to generate longer contigs; 2) Methods that correct raw LRs using SRs and then build contigs with corrected LR only; 3) Methods that assemble LR first and then use SRs

to polish the resulting assembly. Here, we used hybridSPAdes (v3.13.1, Antipov *et al.* 2016) to assemble SRs and then we used LRAs to extend and join contigs. We used the MaSuRCA method (v3.3.8b, Zimin *et al.* 2017) to correct raw LRAs using SRs and then to build contigs using corrected LRAs. We built contigs with wtdbg2 (v2.5, Ruan and Li 2019) using LRAs and then polished them with the SRs. Also, we tested a method that first assemble self-corrected LRAs (using Canu v2.0 in diploid mode), scaffold contigs with LRAs (using SSPACE-LR v1-1, Boetzer and Pirovano, 2014), then improve the resulting assembly by filling gaps with SRs (using GapFiller v1-10), and finally detect mis-assemblies and indels or block substitution events with three rounds of the polishing tool Pilon (v1.23, Walker *et al.* 2014). Pilon used the SRs and LRAs mapped over the assembly with Bowtie2 (v2.3.5, Langmead and Salzberg, 2012) and Minimap2 (v2.17, Li 2018) respectively. Reads were aligned to the polished previous round assembly for the second and third Pilon polishing rounds. From the polished diploid assemblies, diploid repeated contigs were detected and discarded using the Purge Haplotigs pipeline (v1.1.1, Roach *et al.* 2018), that use the LRAs coverage on the contigs by aligning with Minimap2 (v2.17) and Lastz (v1.04.03, Harris, 2007).

Genomic completeness and duplicate evaluation were made with BUSCO (v4.0.5, Seppey *et al.* 2019) by comparing the genomic assemblies versus the Agaricales database (agaricales_odb10) composed by 3,870 conserved markers. QUAST (v5.0.2) analyses were also used to get general assembly quality features.

Finally, representative assembling results were selected. Single (76 b and 300 b) and both SRs assemblies of the four strains were obtained from SPAdes plus scaffolding and gap filling. Furthermore, the Canu assemblies (only LR) and the Canu plus Pilon

(hybrid assemblies) for the two strains with LRs were selected. These three (CA15-F10 and CA15-75) or five (CA15-11 and EF-36) genome assemblies per strain were used for annotation and consequent analyses (Figure 1).

2.4 Non-targeted organism identification in long-read assemblies

Due to the large differences found between the assemblies generated with short reads and long reads, and in order to identify and dismiss contaminations coming from non-target organisms, we analyzed the genomic assemblies as if they were metagenomes using MaxBin (v2.2.1, Wu *et al.* 2015) and VizBin (v1.0.0 Laczny *et al.* 2015). The MaxBin analysis uses a bacterial gene library (housekeeping and ribosomal) for taxonomic assignment of contigs within the assembly. VizBin generates a two-dimensional map of the contigs using their intrinsic properties such as GC content and tetramers use. From the VizBin result (scatterplot), dots far away from the main dot-cloud are treated as outliers and selected as potential contaminants, on which the online version of BLAST (Johnson *et al.* 2008) was used against the NCBI nr database for taxonomic assignment.

2.5 Genome size calculation by k -mer coverage

In order to estimate the genome size of the samples without underestimation due to repeated regions within the SR assemblies (Hess *et al.* 2014), we used Jellyfish (v2.3.0, Marçais and Kingsford, 2011) on the SR libraries of each sample. K -mer sizes (19, 21, 23, 25 and 27) were large enough to allow them to map uniquely to the genome. The k -mer frequency follows a Poisson distribution around the mean coverage of k -mer counts

(Lander & Waterman ,1988; Simpson, 2014). In consequence a genome size estimate was obtained by dividing the total *k*-mers by the coverage (<https://bioinformatics.uconn.edu/genome-size-estimation-tutorial/>).

2.6 CAZome annotation and comparative analysis

Carbohydrate activity enzymes (CAZymes) are a reduced but important gene set on the ectomycorrhizal symbioses (Kohler *et al.* 2015; Miyauch *et al.* 2020). Thus, in order to identify the effect of the assembly quality on the functional inferences, we focused on the analyses of these enzymes. For each strain, all assemblies were used in the gene model prediction with AUGUSTUS (v3.2.3, Stanke *et al.* 2004), which was trained with the *L. bicolor* cDNA (--species=laccaria_bicolor), in single strand and complete gen model mode, allowing non-alternative transcripts. CAZyme coding genes were annotated with dbCAN2 (v2.0.11, Zhang *et al.* 2018). Only HMMER (Finn *et al.* 2011) outcomes from the CAZy database (Lombard *et al.* 2013) were taken into account for comparative analyses (Stewart *et al.* 2019).

2.7 Data availability

Voucher herbarium specimens where strains belong are deposited in MEXU, strains are deposited in XAL strain collection (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020). Final genome assemblies, ITS sequences and raw shotgun sequencing data are available on NCBI (Table 1). Code, and whole pipeline for the genome assembly assays and CAZyme annotation are available online (<https://github.com/Rodolfo47/LtG.git>).

3 Results and Discussion

3.1 Genome assembly

After comparing the performance of SRs assemblers (Tables S1-5), the SPAdes assemblies were selected for further refinement; LR assemblies were done with Canu; likewise, among hybrid assemblers the Canu plus Pilon assemblies were selected (Table S6). Sixteen *Laccaria trichodermophora* genome assemblies representing the genomes of four strains were subjected to annotation and further comparison (Table 3). All strains have SR data, but just two (CA15-11 and EF-36) have LR data.

Table 3 *Laccaria trichodermophora* genome features and assemblies' comparison.

Assembly	76 b	300 b	SRs	LRs	Hybrid
Strain	CA15-11				
Total length (Mbp)	46.86	68.15	70.78	111.69	111.90
Contigs	14,968	20,119	18,965	1,119	876
Largest contig (Kbp)	55.40	86.95	86.72	917.15	1,052.63
N50 (Kbp)	4.11	4.70	5.49	171.95	241.04
L50	3,172	3,985	3,456	180	133
Gene number	23,114	31,420	31,734	34,575	34,713
Genome completeness (%)	50.8	60.6	61.4	94.2	95.7
Genome duplication (%)	1.7	7.0	8.7	30.5	37.6
Exome length (Mbp)	22.16	30.30	31.76	50.13	51.09
Genetic density (%)	47.30	44.46	44.87	44.89	45.66
CAZymes	243	349	363	525	537
GC (%)	47.47	47.13	47.12	46.65	46.67
# N's per 100 Kbp	144.59	91.10	103.71	0.00	349.37
Strain	CA15-75				
Total length (Mbp)	46.72	66.75	75.35	-	-

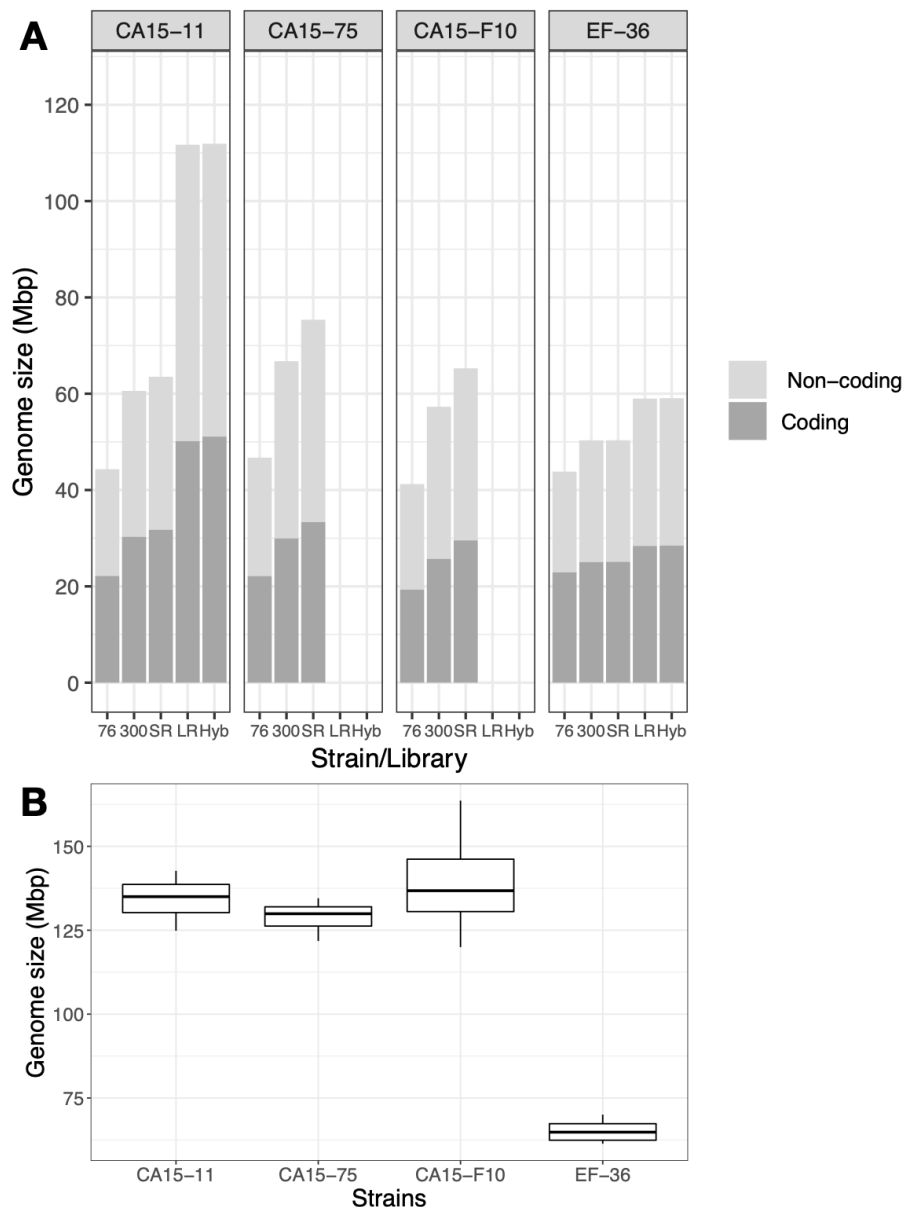
Assembly	76 b	300 b	SRs	LRs	Hybrid
Contigs	13,822	18,038	18,845	-	-
Largest contig (Kbp)	125.60	126.77	127.70	-	-
N50 (Kbp)	4.65	5.55	6.09	-	-
L50	2,820	3,239	3,292	-	-
Gene number	22,384	29,941	31,229	-	-
Genome completeness (%)	48.10	57.80	65.10	-	-
Genome duplication (%)	2.70	9.40	15.20	-	-
Exome length (Mbp)	22.15	29.95	33.35	-	-
Genetic density (%)	47.41	44.87	44.26	-	-
CAZymes	250	358	392	-	-
GC (%)	47.43	47.07	47.04	-	-
# N's per 100 Kbp	184.43	100.82	152.65	-	-
Strain	CA15-F10				
Total length (Mbp)	41.23	57.29	65.27	-	-
Contigs	15,893	19,562	18,694	-	-
Largest contig (Kbp)	83.35	91.45	91.72	-	-
N50 (Kbp)	3.03	3.76	4.94	-	-
L50	3,718	4,196	3,603	-	-
Gene number	21,334	27,242	29,663	-	-
Genome completeness (%)	46.2	65.3	64.7	-	-
Genome duplication (%)	0.5	2.3	6.7	-	-
Exome length (Mbp)	19.32	25.70	29.54	-	-
Genetic density (%)	46.84	44.86	45.27	-	-
CAZymes	221	310	347	-	-
GC (%)	47.60	47.29	47.21	-	-
# N's per 100 Kbp	386.15	168.65	114.08	-	-
Strain	EF-36				
Total length (Mbp)	43.82	50.32	50.33	58.99	59.06
Contigs	3,787	3,434	3,341	94	77

Assembly	76 b	300 b	SRs	LRs	Hybrid
Largest contig (Kbp)	504.87	568.43	576.99	4,959.16	5,316.68
N50 (Kbp)	29.86	43.00	43.96	1,351.60	1,464.17
L50	363	299	283	12	12
Gene number	16,168	17,522	17,579	18,691	18,708
Genome completeness (%)	97.4	97.3	97.5	97.5	97.6
Genome duplication (%)	1.0	1.3	1.2	1.6	1.6
Exome length (Mbp)	22.91	25.03	25.10	28.38	28.47
Genetic density (%)	52.28	49.74	49.87	48.11	48.20
CAZymes	309	318	318	322	320
GC (%)	47.70	47.23	47.24	46.84	46.84
# N's per 100 Kbp	9.40	37.96	26.55	0.00	91.36

By comparing assembly size and genetic content of the three SR assemblies it was evident that read length does have an effect on assembly size. As read length increases the genome assembly length also does (correlation values: tau = 0.61, p = 0.003; rho = 0.73, p = 0.001 Figure S10; Figure 2A). Only considering the contigs bigger than 1 Kbp, assemblies of 76 b read length of strains CA15-F10, CA15-11, EF-36 and CA15-75 proposed genome sizes of ~41, 47, 44 and 47 Mbp respectively. With this read length the EF-36 genome appears to be the best assembled, with 3,787 contigs and N50 of 29.86 Kbp, compared to 13,822 - 15,893 contigs of the other genomes. With 300 b read length, all genomes increased their sizes to ~57, 68, 50 and 67 Mbp. The genome of EF-36 was again the smallest, but still the best assembled, with 3,434 contigs compared to 18,038 - 20,119 contigs of the other strains. It is worth to mention that the genomes of CA15-F10 and EF-36 strains decreased in contig number but increased in genome size, while the rest increased in genome size and also in contig number. Using

both SRs libraries together (76 b/300 b), genome size kept growing (70, 49 and 65 Mbp) (except in EF-36: ~65 Mbp), but the contig number decreased (except in CA15-75). For all strains, as read length increased, the number of predicted genes also increased (Table 3).

Figure 2. Genome sizes of four *L. trichodermophora* strains. **A)** Effect of strain and assembly on *L. trichodermophora* genome size and genetic density. 76 = SPAdes assembly with Next-Seq library of 76 b pair end reads, 300 = SPAdes assembly with Mi-Seq library of 300 b pair end reads, SR = Refined assembly with both short read libraries, LR = Canu assembly with Sequel long read library, Hyb = Hybrid polished Canu + Pilon assembly with LR and both SR libraries. **B)** Genome size of the four strains estimated by five *k*-mer length using two short paired read libraries.



Taking into account the best outcomes for SRs, CA15-75 genome assembly was the largest, reaching 75.35 Mbp and 31,229 predicted genes, while EF-36 the smallest, just 50.32 Mbp in size with 17,579 genes. Simultaneously, the strain with smaller genome (EF-36) was the one with lower fragmentation (near to 3K contigs vs. almost 19K contigs). Also, EF-36 strain showed less variation in genome size and gene count while comparing 76 b, 300 b or SR assemblies (Table 3, Figure 2A); notwithstanding in both cases only LRs were capable to cover particular genomic regions (Figures S11 and S12).

Since the earliest genomes generated by Sanger sequencing (low sequencing depth with long reads) were compared with the first genomes assembled entirely by short paired reads (great sequencing depth but heterogeneously distributed across the genome), it is known that longer read length is better than a high sequencing depth when the genome completeness is the aim (Sims *et al.* 2014). Therefore, hybrid approaches combining high depth SRs libraries with LRs (Sanger, 454, Illumina Mate-Pair and more recently PacBio and NanoPore) have shown better results (e.g., DiGuistini *et al.* 2009; Tobias *et al.* 2020). In our data, when comparing SR vs. LR assemblies, it was evident that LR assemblies were larger than SR assemblies regardless strain identity. Also, regardless the sequencing method, we found differences between strain genome lengths. Long reads increased the quality of genome assemblies (CA15-11 from 18,965 SR contigs to 1,119 LR contigs; EF-36 from 3,341 SR contigs to 94 LR contigs). The increase in the genome size of the strain with the largest and most fragmented assembly (CA15-11) was more prominent than the smallest and well-solved one (EF-36) (~58 vs 17% respectively) (Figure 2A).

Because there were huge differences between SR and LR assemblies we used metagenomic approaches to figure out if genomic DNA contamination in LR libraries was the cause. In MaxBin analyzes no bin was assigned to bacterial taxa (Table S7). The potential outlier contigs obtained with VizBin analyses belonged to sequences matching with genes or hypothetical proteins of sequenced *Laccaria amethystina* and *Laccaria bicolor* NCBI available genomes (Table S8).

Notwithstanding the low fragmentation of the LR assemblies, their reads high error rate is a concern, with potential impact on genetic prediction. Thus, hybrid assembling takes advantage of the accurate base calling and high coverage of the short-paired reads to break misassemblies and improve base assignment (Chakraborty *et al.* 2016). Here, the Canu + Pilon method offered the best result (Table S6). Hybrid assemblies' genome lengths were quite similar to those of LR assemblies but worked better in terms of fragmentation and gene prediction. The revision of the diploid genomes of both strains with Purge Haplotigs had a minor impact on their primary assemblies. Only 10 secondary contigs were reassigned as allelic contigs and dismissed from the primary assembly of CA15-11 strain, totaling less than 281 Kbp (0.25 %), and no contig of EF-36 strain was reassigned. Finally, hybrid assemblies of CA15-11 reached 111.90 Mbp genome length while EF-36 reached 59.06 Mbp, parcel out in 876 and 77 contigs respectively, including nuclear and mitochondrial genome.

Due to the differences in genome size proposed by sequencing and assembling methods, we explored an assembly-independent approximation. Consistent with the general pattern of genome sizes obtained by assembling, the analyses of genomic sizes by *k*-mer coverage estimated most strain genomes round 135 Mbp (CA15-F10 =

139.26, CA15-11 = 134.42, CA15-75 = 129.18 Mbp average), but EF-36 about half (65.1 Mbp) (Figure 2B).

Genomes of ectomycorrhizal fungi in Agaricales such as *Amanita* have been proposed from 8 to more than 600% larger than its genome assemblies, mostly due to the effect of the repeated regions of the genome while assembling with SRs (Hess *et al.* 2014; 2018). Likewise, using LR and SRs together the complete, surprisingly large, and high accurate assemblies of the early divergent Basidiomycete rust *Austropuccinia psidii* were achieved (1,018 Mbp) (Tobias *et al.* 2020). Previous draft assemblies of this fungi estimated genome size between 103 and 145 Mb (Tan *et al.* 2014). The results provided by these hybrid assemblies were supported by the calculation of the genomic size by *k*-mer coverage, and by flow cytometry (Tobias *et al.* 2020). Here, the *L. trichodermophora* genomic assemblies generated with SR were also smaller than estimated by *k*-mer coverage, but genome size obtained with hybrid assemblies remained similar to those estimated by sequencing depth (Figure 2). In concordance to the *Amanita* genomes (Hess *et al.* 2014; 2018), the genome of the strain with larger and most fragmented SR assembly (CA15-11) increased in size more than the genome of the smallest and less fragmented one (EF-36) did. This intraspecific genome variation is not a methodological effect given the consistency of several assembly-dependent calculations with *k*-mer coverage estimation and the minimal effect of the Purge Haplotigs analysis.

Fungal genomes are very dynamic in nature (Mohanta and Bae, 2015), even members of the same genus can show remarkable divergence at the genomic level, in terms of amino acid sequence identity and genome synteny. The size of the genome

assemblies of six *Rhizophagus irregularis* (Glomerales, Mucoromycota) conspecific isolates ranges from 122 to 138 Mb in size, with large numbers of orphan genes and strain-specific gene family expansions (Chen *et al.* 2018).

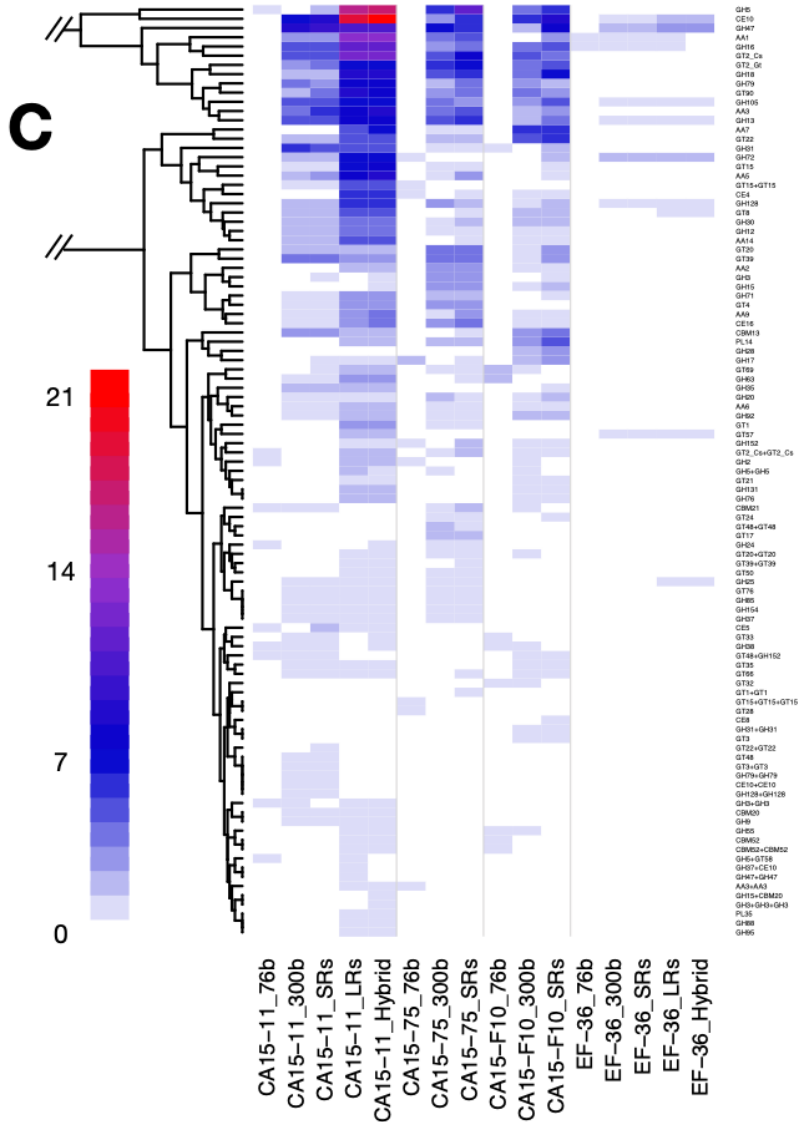
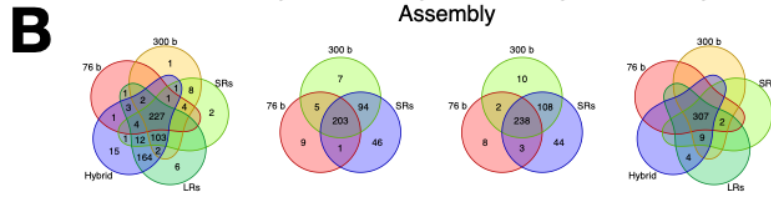
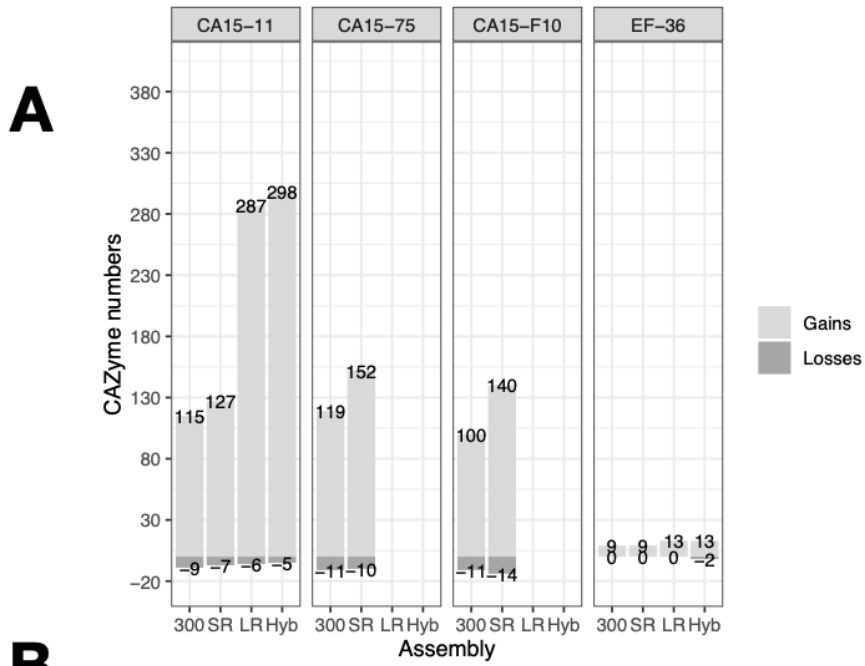
Whole genome duplication and large-scale genomic variation in both overall ploidy and individual chromosomal copy numbers are not rare in clinical yeast isolates (Zhu *et al.* 2016). Although often deleterious, stress-induced chromosomal duplication examples, with beneficial effects have been reported for yeasts belong to the Basidiomycota and Ascomycota with biotrophic and saprotrophic life stiles (Gerstein *et al.* 2015; Linder *et al.* 2017). *Laccaria trichodermophora* EF-36 genome assembled with hybrid approach showed around half-length compared to strain CA15-11 (Figure 2A). Genome sizes of the remaining two strains were predicted (by *k*-mer coverage) similar to the larger one (Figure 2B).

For instance, several mutations have been identified that lead to genome reduction from diploid to haploid in *Saccharomyces cerevisiae* (Todd *et al.* 2017), some of them occur over a relatively short amount of time (~50 generations). Also, drastic losses of heterozygosity have been attributed to laboratory maintenance conditions, but for distant related to *Laccaria*, highly specialized and genetically minimalist animal pathogenic fungi (*Encephalitozoon cuniculi*, Selman *et al.* 2013). Here *L. trichodermophora* strains were serial reseeded during the isolation and maintenance time lapse, which started in 2013 for EF-36 and in 2015 for the remaining strains. Although, mechanistically causes of this size differences remain unclear.

3.2 CAZyme annotation comparative analysis

Read length and assembling methods do have an effect on genomic functional inferences. This phenomenon was clearly reflected on the CAZyme gene set annotation of *L. trichodermophora* (correlation values: tau = 0.61494, p = 0.003045; rho = 0.7291531, p = 0.001351; Figure 3, S14). In general, as the read size increased, the number of CAZymes did (Figure S11). However, it is important to identify that there were not only additions; we found also losses of CAZymes, although in a much smaller proportion (Figure 3). Figure 3A shows the amount of CAZymes gained or lost by the different assemblies with respect to the 76 b assembly. Figure 3B shows the CAZymes common to the 3 or 5 assemblies of each strain, as well as the CAZymes exclusive to each assembly or shared by only some of them. To facilitate the visualization of the differences, the gene copies found at the intersection of all circles in figure 3B were not plotted in figure 3C.

Figure 3. Comparison of predicted CAZyme content of four strains of *Laccaria trichodermophora* genomes assembled by three or five methods/libraries. **A)** CAZyme genes gain and loss in four different strains/assemblies. **B)** Venn diagram grouping the CAZy enzymes common or exclusive for the different assemblies for each strain. **C)** Heatmap comparing the predicted CAZy gene content. Only differences are plotted, genes common for all assemblies were not included in the graphic (for the full CAZy set see supplementary figure 13). White color corresponds to differences in number of genes; blue, purple and red indicate the copy number additions as indicated in the color key. Row dendrogram cluster together enzymes with similar copy number means.



When comparing the CAZyme contents of the three assemblies generated with SRs, all strains increased in their gene numbers by almost a third using 300b respect to 76 b; however, in the small genome of EF-36, the differences were just 10%. Using both SR libraries together few additional CAZymes were detected in three strains, but no one in EF-36 (Table 3, Figure 3). Taking into account all assemblies, in the shortest and well-solved genome (EF-36), CAZyme number showed minimum variation (309, 318, 318, 322 and 320) regarding read length increase. In contrast, in the largest and more complex genome (CA15-11), CAZymes almost duplicated their number (243, 349, 363, 525 and 537). In most cases, the variation in the size of each CAZY families ranged between 1 and 7 copies (blue colors in figure 3C); there were outstanding cases, such as CE10 or GH5, where the variation was more than 15 copies (purple and red colors in figure 3C). Within the CE10 family, there were arylesterases and lipases involved in the metabolism of fatty acids and vitamins. The CE10 of *L. trichodermophora* were not assigned to specific subfamilies by dbCAN, because of how rare these enzymes are. Enzymes in GH5 have activity in cellulose and hemicellulose. The GH5 enzymes annotated in the *L. trichodermophora* genomes accounted for at least seven sub-families (Figure S12), among them, GH5_9 was the most affected by the assembling manner. This means that when assembling with SRs, the glucanase, xylanase, glucosidase and mannosidase capacities were underestimated. This pattern was more prominent for the CA15-11 strain, while there was no variation for the EF-36 strain.

Enzymes such as GT8 and GH25 in the EF-36 strain could only be detected when assembling with LRs, while in the CA15-11 strain this phenomenon was detected for more than 20 enzymes, in addition to several enzymes forming homomeric or

heteromeric dimers that were only assembled as such by LR. In extreme cases, such as AA7 or CE4, the use of LR detected a number of copies, while the SRs did not detect any one (Figure 3, S12). In consequence, several oxidating activities on glycosyl residues of oligosaccharides and several chitooligosaccharide acetylase activities would have passed unnoticed in SRs assemblies.

All together, our results suggest that read length impact not only on the fragmentation rate or genomic size estimation, but in the functional inferences, as were illustrated in the CAZy gene set. These underestimations could have serious effects in the repeated genes causing misinterpretations of the diversity and strength of particular functions, which could be prominent in complex genomes of heterokariotic fungi. Furthermore, when gathering the evidence generated with different sequencing libraries, different assembly methods for different conspecific strains, the high intraspecific genomic diversity in *L. trichodermophora* became evident.

4 Acknowledgements

REAA is grateful for the support of the "Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas", UNAM, and CONACYT, for granting PhD scholarships (LAG CVU. No. 439184). We thank the "Unidad de Apoyo Técnico Informático", CCG-UNAM for their support with hardware and software; to Lidia Irene Cabrera Martínez the technician of the "Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Botánica", IB-UNAM; and to Alberto Campos and Valeria Flores Almaraz for strain maintenance. This work was funded by PAPIIT-UNAM IN-210217 to RGO.

5 Literature Cited

- Alkan, C., Sajjadian, S., & Eichler, E. E. (2011). Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nature methods*, 8(1), 61.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Amarasinghe, S. L., Su, S., Dong, X., Zappia, L., Ritchie, M. E., & Gouil, Q. (2020). Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome biology*, 21(1), 1-16.
- Andrews, S. (2010) FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data. [http:// www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Accedido en octubre de 2017.
- Ángeles-Argáiz, R. E., Carmona-Reyes, I. A., Quintero-Corrales, C. A., Medina-Macías, F. J., Blancas-Cabrera, A., Valdez-Cruz, N. A., ... & Garibay-Orijel, R. (2020). From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*. *Fungal biology*, 124(3-4), 205-218.
- Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J. S., & Pevzner, P. A. (2016). HybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics*, 32(7), 1009-1015.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... & Pyshkin, A. V. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477.

- Boetzer, M., Henkel, C. V., Jansen, H. J., Butler, D., & Pirovano, W. (2011). Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*, 27: 578–579.
- Boetzer, M., & Pirovano, W. (2014). SSPACE-LongRead: scaffolding bacterial draft genomes using long read sequence information. *BMC bioinformatics*, 15(1), 211.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M. A., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics*, 21(16), 3422-3423.
- Chakraborty, M., Baldwin-Brown, J. G., Long, A. D., & Emerson, J. J. (2016). Contiguous and accurate de novo assembly of metazoan genomes with modest long read coverage. *Nucleic acids research*, 44(19), e147-e147.
- Chen, E. C., Morin, E., Beaudet, D., Noel, J., Yildirim, G., Ndikumana, S., ... & Marton, T. (2018). High intraspecific genome diversity in the model arbuscular mycorrhizal symbiont *Rhizophagus irregularis*. *New Phytologist*, 220(4), 1161-1171.
- DiGuistini, S., Liao, N. Y., Platt, D., Robertson, G., Seidel, M., Chan, S. K., ... & Mardis, E. (2009). De novo genome sequence assembly of a filamentous fungus using Sanger, 454 and Illumina sequence data. *Genome biology*, 10(9), R94.
- Ellinghaus, D., Kurtz, S., & Willhoeft, U. (2008). LTRharvest, an efficient and flexible software for de novo detection of LTR retrotransposons. *BMC bioinformatics*, 9(1), 18.
- Elliott, T. A., & Gregory, T. R. (2015). What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1678), 20140331.

- Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W29-W37.
- Franco-Maass, S., Burrola-Aguilar, C., Arana-Gabriel, Y., & García-Almaraz, L. A. (2016). A local knowledge-based approach to predict anthropic harvesting pressure zones of wild edible mushrooms as a tool for forest conservation in Central Mexico. *Forest policy and economics*, 73, 239-250.
- Galagan, J. E., Henn, M. R., Ma, L. J., Cuomo, C. A., & Birren, B. (2005). Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome research*, 15(12), 1620-1631.
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A., & Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*, 93(4), 855-863.
- Gerstein, A. C., Fu, M. S., Mukaremera, L., Li, Z., Ormerod, K. L., Fraser, J. A., ... & Nielsen, K. (2015). Polyploid titan cells produce haploid and aneuploid progeny to promote stress adaptation. *MBio*, 6(5), e01340-15.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
- Harris, R. S. (2007). Improved pairwise Alignment of genomic DNA.
- Hernández-Wences, A., & Schatz, M. C. (2015). Metassembler: merging and optimizing de novo genome assemblies. *Genome biology*, 16(1), 207.
- Hess, J., Skrede, I., Wolfe, B. E., LaButti, K., Ohm, R. A., Grigoriev, I. V., & Pringle, A. (2014). Transposable element dynamics among asymbiotic and ectomycorrhizal *Amanita* fungi. *Genome Biology and Evolution*, 6(7), 1564-1578.

- Hess, J., Skrede, I., Chaib De Mares, M., Hainaut, M., Henrissat, B., & Pringle, A. (2018). Rapid divergence of genome architectures following the origin of an ectomycorrhizal symbiosis in the genus *Amanita*. *Molecular biology and evolution*, 35(11), 2786-2804.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, 36(suppl_2), W5-W9.
- Kent, W. J. (2002). BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome research*, 12(4), 656-664.
- Kong, A., Montoya, A., García-de Jesús, S., Ramírez-Terrazo, A., Andrade, R., Ruan-Soto, F., ... & Estrada-Torres, A. (2018). Hongos ectomicorrizógenos del Parque Nacional Lagunas de Montebello, Chiapas. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(3), 741-756.
- Koren, S., Schatz, M. C., Walenz, B. P., Martin, J., Howard, J. T., Ganapathy, G., ... & Phillippy, A. M. (2012). Hybrid error correction and de novo assembly of single-molecule sequencing reads. *Nature biotechnology*, 30(7), 693.
- Koren, S., Phillippy, A. M., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Loose, M. (2019). Reply to 'Errors in long-read assemblies can critically affect protein prediction'. *Nature biotechnology*, 37(2), 127-128.
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome research*, 27(5), 722-736.

- Krueger, F. (2015). Trim Galore!: A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files. www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/.
- Laczny, C. C., Sternal, T., Plugaru, V., Gawron, P., Atashpendar, A., Margossian, H. H., ... & Wilmes, P. (2015). VizBin-an application for reference-independent visualization and human-augmented binning of metagenomic data. *Microbiome*, 3(1), 1.
- Lander, E. S., & Waterman, M. S. (1988). Genomic mapping by fingerprinting random clones: a mathematical analysis. *Genomics*, 2(3), 231-239.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357.
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), 3094-3100.
- Linder, R. A., Greco, J. P., Seidl, F., Matsui, T., & Ehrenreich, I. M. (2017). The stress-inducible peroxidase TSA2 underlies a conditionally beneficial chromosomal duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(9), 3177-3184.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495.
- López-García, A., Jiménez-Ruiz, M., & Pérez-Moreno, J. (2017). Vocablos relacionados con el recurso micológico en el idioma de la cultura chinanteca de la Sierra Norte del estado de Oaxaca, México. *Revista mexicana de micología*, 46, 9-18.

- López-Gutiérrez, A., Pérez-Moreno, J., Hernández-Santiago, F., Uscanga-Mortera, E., García-Esteva, A., Cetina-Alcalá, V. M., ... & Xoconostle-Cázares, B. (2018). Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Botanical Sciences*, 96(2), 286-304.
- Marçais, G., & Kingsford, C. (2011). A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinformatics*, 27(6), 764-770.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., ... & Salamov, A. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452(7183), 88.
- Miyauchi, S., Kiss, E., Kuo, A., Drula, E., Kohler, A., Sánchez-García, M., ... & Buée, M. (2020). Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. *Nature Communications*, 11(1), 1-17.
- Muszewska, A., Steczkiewicz, K., Stepniewska-Dziubinska, M., & Ginalski, K. (2017). Cut-and-paste transposons in fungi with diverse lifestyles. *Genome biology and evolution*, 9(12), 3463-3477.
- Mueller MG. 1984. New Northamerican species of *Laccaria* (Agaricales). *Mycotaxon* 20:101-116.
- Mueller, G. M. (1992). Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. Chicago: Field Museum of Natural History.
- Mueller, G. M., & Strack, B. A. (1992). Evidence for a mycorrhizal host shift during migration of *Laccaria trichodermophora* and other agarics into neotropical oak forests. *Mycotaxon.*, 45, 249-256.

- Nadalín, F., Vezzi, F., & Policriti, A. (2012). GapFiller: a de novo assembly approach to fill the gap within paired reads. *BMC bioinformatics*, 13(S14), S8.
- Nowoshilow, S., Schloissnig, S., Fei, J. F., Dahl, A., Pang, A. W., Pippel, M., ... & Falcon, F. (2018). The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*, 554(7690), 50.
- Osipowski, P., Pawełkiewicz, M., Wojcieszek, M., Skarzyńska, A., Przybecki, Z., & Płader, W. (2019). A high-quality cucumber genome assembly enhances computational comparative genomics. *Molecular Genetics and Genomics*, 1-17.
- Peng, Y., Leung, H. C., Yiu, S. M., & Chin, F. Y. (2012). IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, 28(11), 1420-1428.
- Pérez, F., Castillo-Guevara, C., Galindo-Flores, G., Cuautle, M., & Estrada-Torres, A. (2012). Effect of gut passage by two highland rodents on spore activity and mycorrhiza formation of two species of ectomycorrhizal fungi (*Laccaria trichodermophora* and *Suillus tomentosus*). *Botany*, 90(11), 1084-1092.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785.
- Quintero-Corrales, C., Ángeles-Argáiz, R., Jaramillo-Correa, J. P., Piñero, D., Garibay-Orijel, R., & Mastretta-Yanes, A. (2020). Allopatric instead of parapatric divergence in an ectomycorrhizal fungus (*Laccaria trichodermophora*) in tropical sky-islands. *Fungal Ecology*, 47, 100966.

- Ramos, A., Bandala, V. M., & Montoya, L. (2017). A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relict forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycKeys*, (27), 77.
- Reverchon, F., del Pilar Ortega-Larrocea, M., & Pérez-Moreno, J. (2012). Soil factors influencing ectomycorrhizal sporome distribution in neotropical forests dominated by *Pinus montezumae*, Mexico. *Mycoscience*, 53(3), 203-210.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M. D. P., Pérez-Moreno, J., Peña-Ramírez, V. M., & Siebe, C. (2010). Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, Mexico. *Canadian journal of forest research*, 40(6), 1165-1174.
- Roach, M. J., Schmidt, S. A., & Borneman, A. R. (2018). Purge Haplotigs: allelic contig reassignment for third-gen diploid genome assemblies. *BMC bioinformatics*, 19(1), 460.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., del Pilar Ortega-Larrocea, M., & Arellano-Torres, E. (2019). Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90.
- Sedlazeck, F. J., Lee, H., Darby, C. A., & Schatz, M. C. (2018). Piercing the dark matter: bioinformatics of long-range sequencing and mapping. *Nature Reviews Genetics*, 19(6), 329-346.
- Selman, M., Sak, B., Kváč, M., Farinelli, L., Weiss, L. M., & Corradi, N. (2013). Extremely reduced levels of heterozygosity in the vertebrate pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Eukaryotic cell*, 12(4), 496-502.

- Seppy M., Manni M., Zdobnov E.M. (2019) BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. In: Kollmar M. (eds) Gene Prediction. Methods in Molecular Biology, vol 1962. Humana, New York, NY. 2019 doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14. PMID:31020564.
- Simpson, J. T. (2014). Exploring genome characteristics and sequence quality without a reference. *Bioinformatics*, 30(9), 1228-1235.
- Simpson, J. T., Wong, K., Jackman, S. D., Schein, J. E., Jones, S. J., & Birol, I. (2009). ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome research*, 19(6), 1117-1123.
- Sims, D., Sudbery, I., Iltott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 121-132.
- Smits, T. H. (2019). The importance of genome sequence quality to microbial comparative genomics. *BMC genomics*, 20(1), 662.
- Stewart, R. D., Auffret, M. D., Warr, A., Walker, A. W., Roehe, R., & Watson, M. (2019). Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery. *Nature biotechnology*, 37(8), 953.
- Tan, M. K., Collins, D., Chen, Z., Englezou, A., & Wilkins, M. R. (2014). A brief overview of the size and composition of the myrtle rust genome and its taxonomic status. *Mycology*, 5(2), 52-63.
- Tobias, P. A., Schwessinger, B., Deng, C. H., Wu, C., Dong, C. M., Sperschneider, J., ... & Park, R. (2020). Long read assembly of the pandemic strain of *Austropuccinia*

psidii (myrtle rust) reveals an unusually large (gigabase sized) and repetitive fungal genome. BioRxiv.

Veneault-Fourrey, C., Kohler, A., Morin, E., Balestrini, R., Plett, J., Danchin, E., ... & Martin, F. (2014). Genomic and transcriptomic analysis of *Laccaria bicolor* CAZome reveals insights into polysaccharides remodelling during symbiosis establishment. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 168-181.

Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., ... & Earl, A. M. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS one*, 9(11).

Wang, A., & Au, K. F. (2020). Performance difference of graph-based and alignment-based hybrid error correction methods for error-prone long reads. *Genome biology*, 21(1), 14.

Watson, M., & Warr, A. (2019). Errors in long-read assemblies can critically affect protein prediction. *Nature biotechnology*, 37(2), 124-126.

Wilson, A. W., Hosaka, K., & Mueller, G. M. (2017). Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist*, 213(4), 1862-1873.

Wu, Y. W., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2015). MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 32(4), 605-607.

Yu, F., Song, J., Liang, J., Wang, S., & Lu, J. (2020). Whole genome sequencing and genome annotation of the wild edible mushroom, *Russula griseocarnosa*. *Genomics*, 112(1), 603-614.

- Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., ... & Yin, Y. (2018). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic acids research*, 46(W1), W95-W101.
- Zimin, A. V., Puiu, D., Luo, M. C., Zhu, T., Koren, S., Marçais, G., ... & Salzberg, S. L. (2017). Hybrid assembly of the large and highly repetitive genome of *Aegilops tauschii*, a progenitor of bread wheat, with the MaSuRCA mega-reads algorithm. *Genome research*, 27(5), 787-792.

Supplementary material of:

Long-read sequencing decompresses *Laccaria trichodermophora* (CA15-11, CA15-75, CA15-F10 and EF-36) strains genome assemblies and reveal its intraspecific genome diversity

Rodolfo Enrique Ángeles-Argáiz*†, Luis Fernando Lozano Aguirre-Beltrán‡, Christian Armando Quintero-Corrales*†, Mauricio Alberto Trujillo-Roldán§, Santiago Castillo-Ramírez‡, Roberto Garibay-Orijel†

Material and Methods

Modifications to the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) fabricant suggestions were:

Double amount of fresh filtered micelial biomass per reaction; Addition of a mechanic cell lysis with liquid nitrogen as initial step; Increasing the incubation time in the lysis buffer five times; Starting the protocols with five reactions for each sample, to finally join the five reactions through a single DNA affinity column; Incubating the elution reaction in the DNA affinity column for 5 min before centrifuging and repeating this twice. These modifications were necessary to reach at less 1µg of high integrity DNA as required by sequencing service providers.

Figure S1. *Laccaria trichodermophora* strain selection representing de genotype and phenotype diversity of the central Mexico populations. **A)** Position of three strains in the Transmexican Volcanic Belt population genetic STRUCTURE analysis and SNPs ML phylogram, **B)** PCA clustering using SNPs, **C)** biomass production and **D)** glucose consumption of four strains in shake flask culture. (Figures taken and modified from Quintero-Corrales *et al.* 2020 and Ángeles-Argáiz *et al.* 2020 with authors permission).

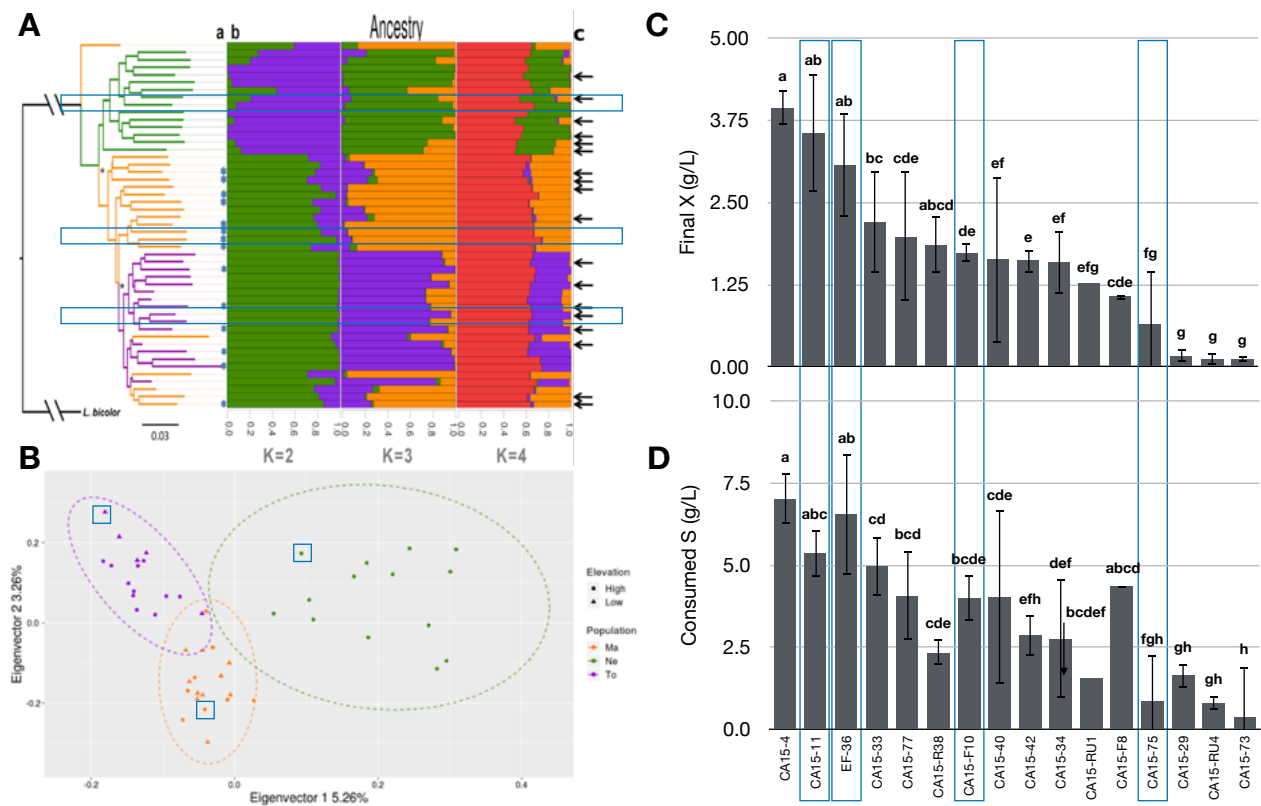


Figure S2. Quality control of raw and clean Next-Seq (76b) pair end reads of CA15-11 strain.



Figure S3. Quality control of raw and clean Mi-Seq (300b) pair end reads of CA15-11 strain.

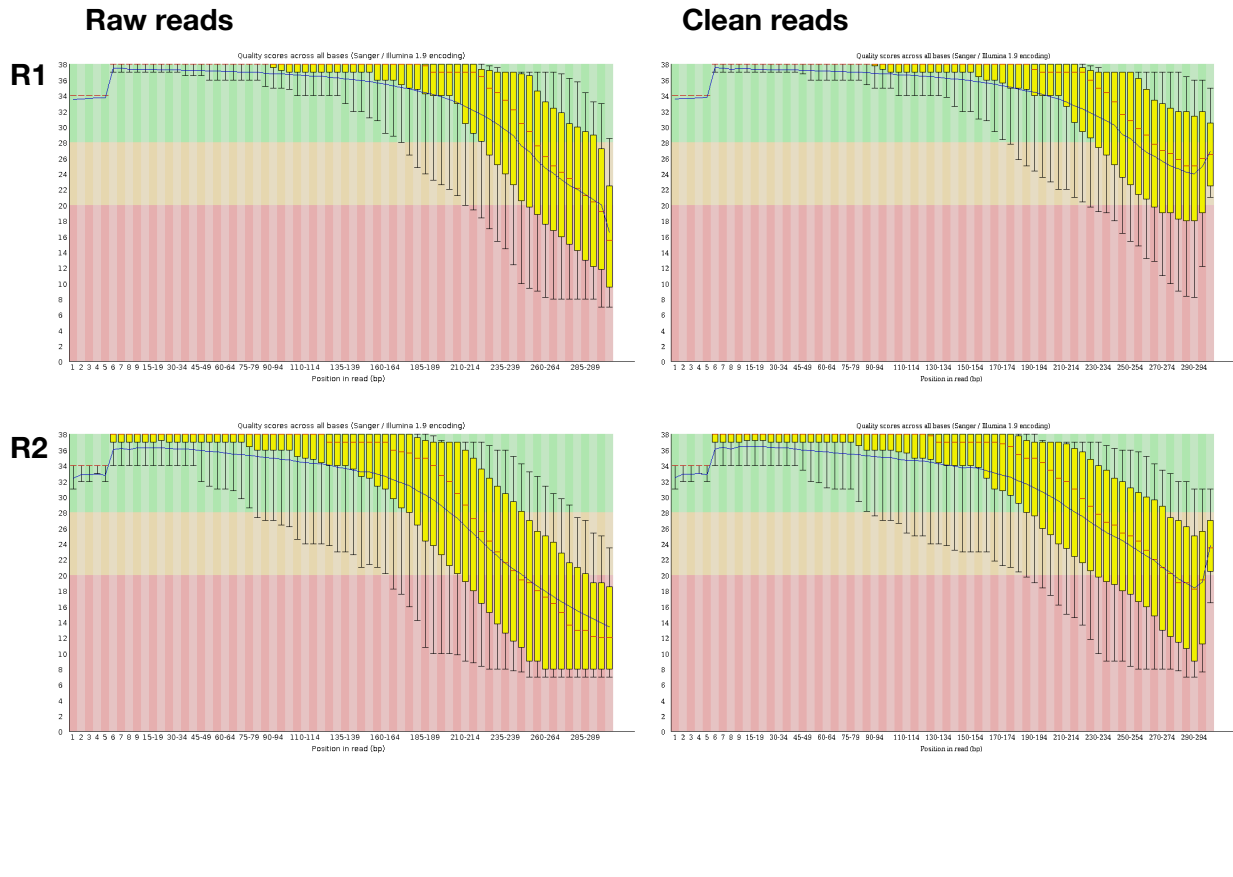


Figure S4. Quality control of raw and clean Next-Seq (76b) pair end reads of CA15-75 strain.



Figure S5. Quality control of raw and clean Mi-Seq (300b) pair end reads of CA15-75 strain.

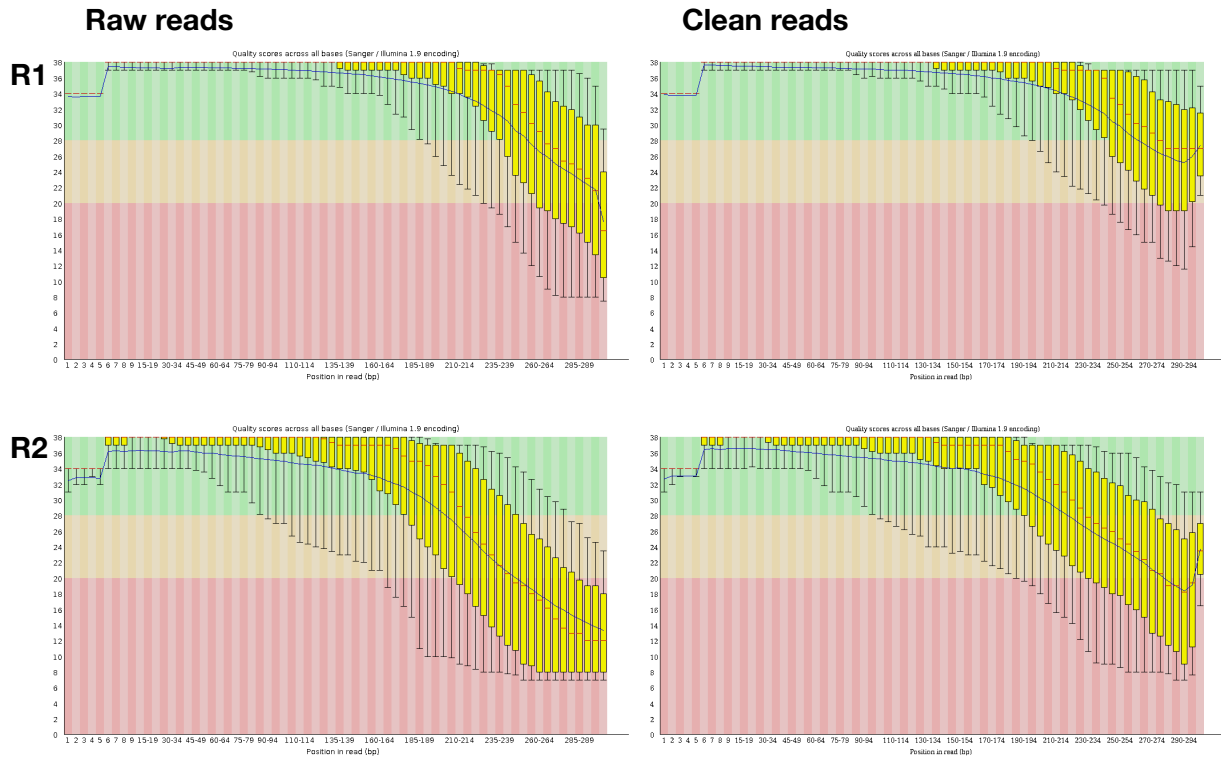


Figure S6. Quality control of raw and clean Next-Seq (76b) pair end reads of CA15-F10 strain.



Figure S7. Quality control of raw and clean Mi-Seq (300b) pair end reads of CA15-F10 strain.

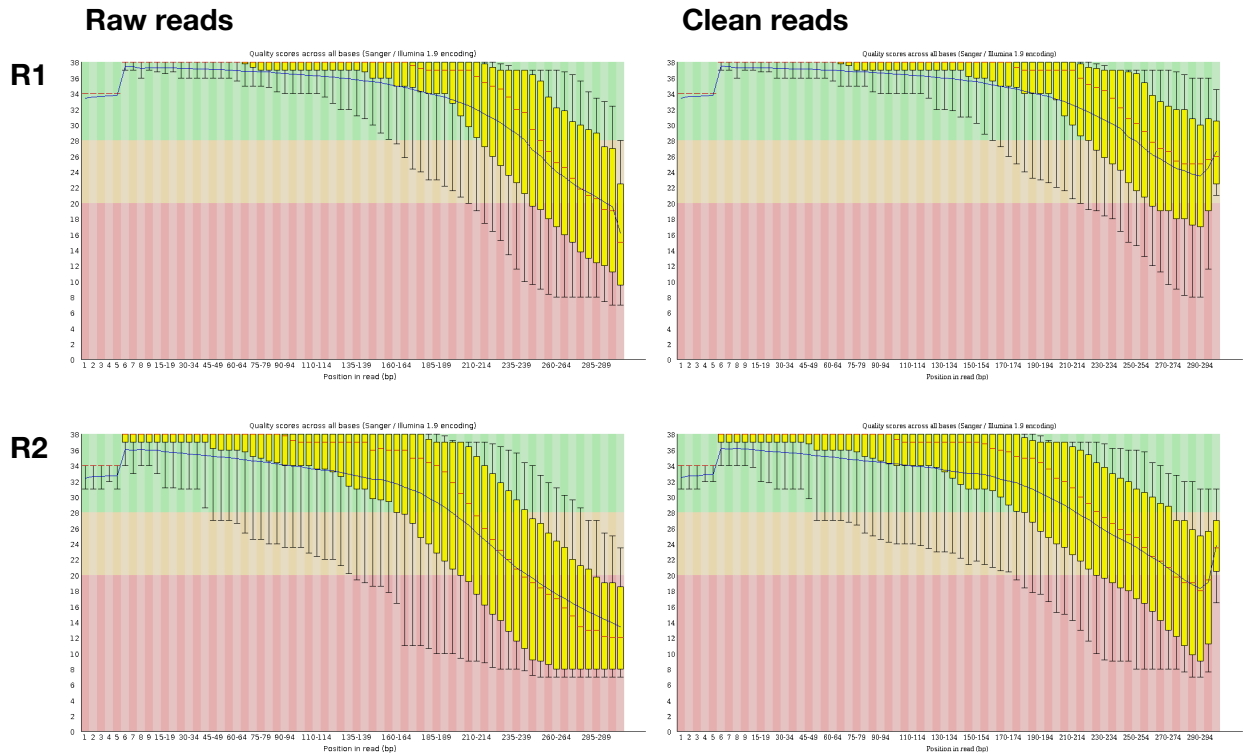


Figure S8. Quality control of raw and clean Next-Seq (76b) pair end reads of EF-36 strain.



Figure S9. Quality control of raw and clean Mi-Seq (300b) pair end reads of EF-36 strain.

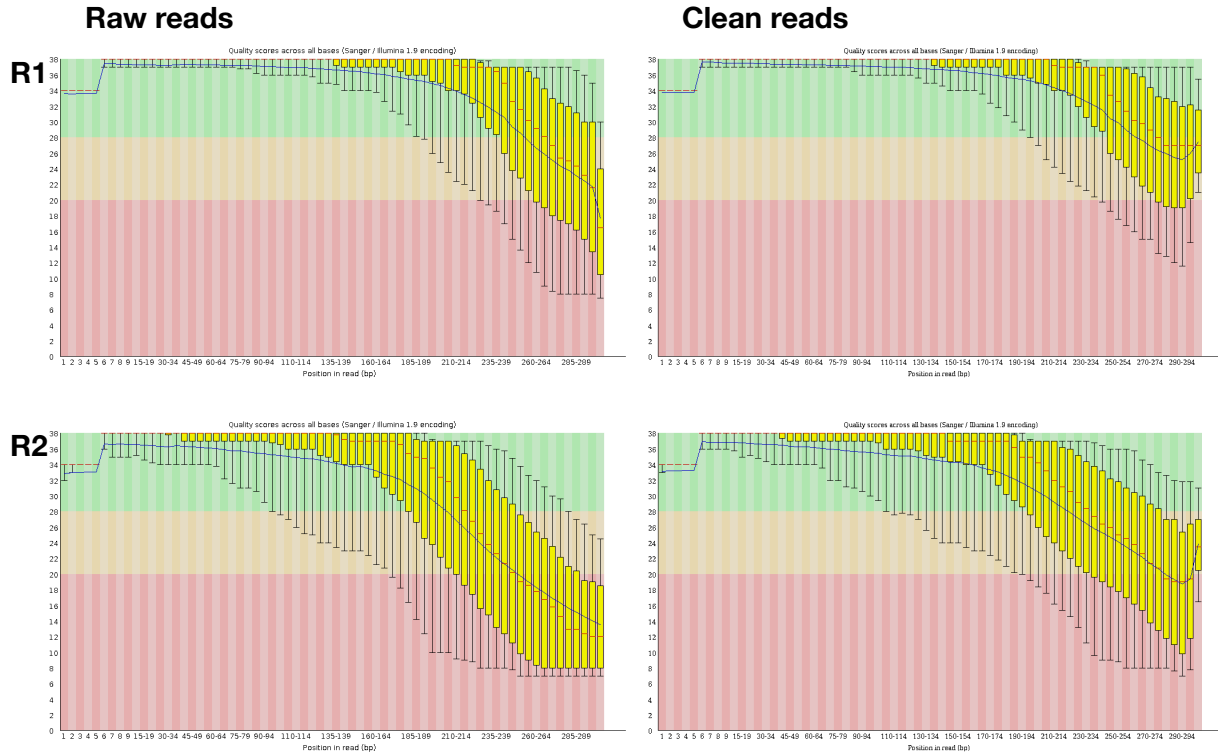


Figure S10. Icarus alignment viewer of *L. trichodermophora* CA15-11 assemblies generated with Quast using the CA15-11 hybrid (Canu + Pilon) assembly as reference.

A) Display a fragment of the alignment in **B**. **B)** display first 177 scaffolds.

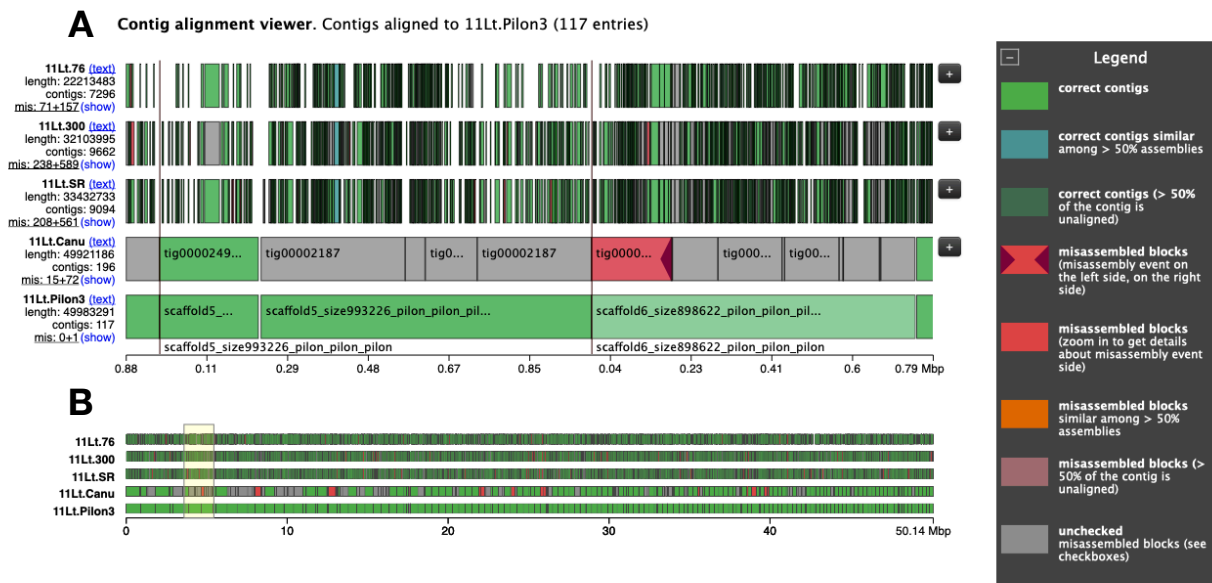


Figure S11. Icarus alignment viewer of *L. trichodermophora* EF-36 assemblies generated with Quast using the CA15-11 hybrid (Canu + Pilon) assembly as reference.

A) Display a fragment of the alignment in **B.** **B)** display first 31 scaffolds.

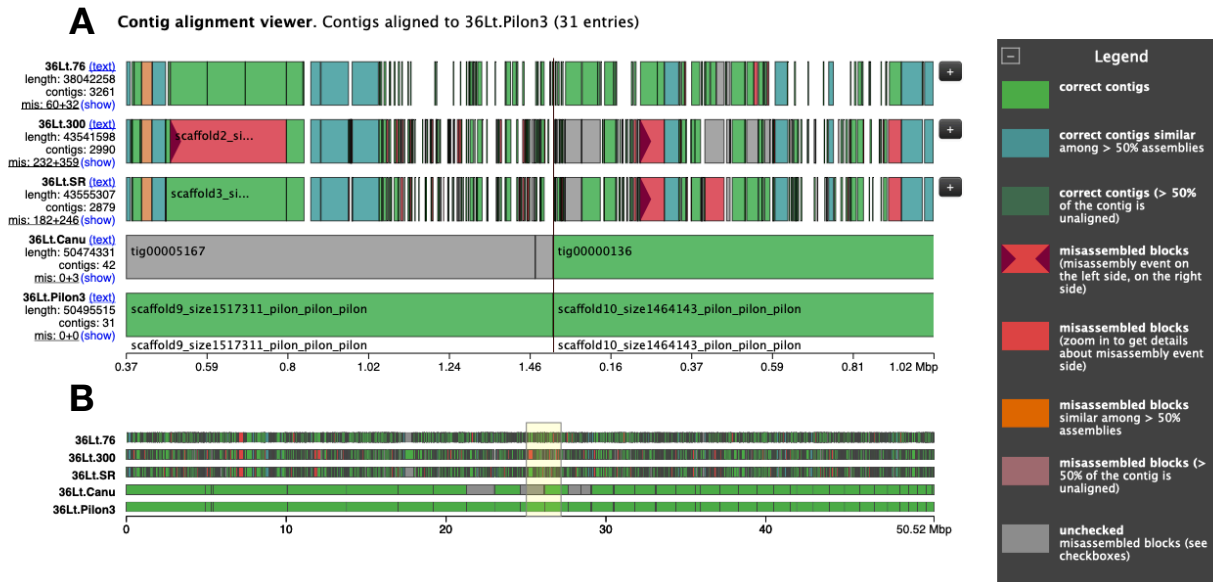


Figure S12. Heatmap comparing the predicted CAZy gene content. Row dendrogram cluster together enzymes with similar copy number means.

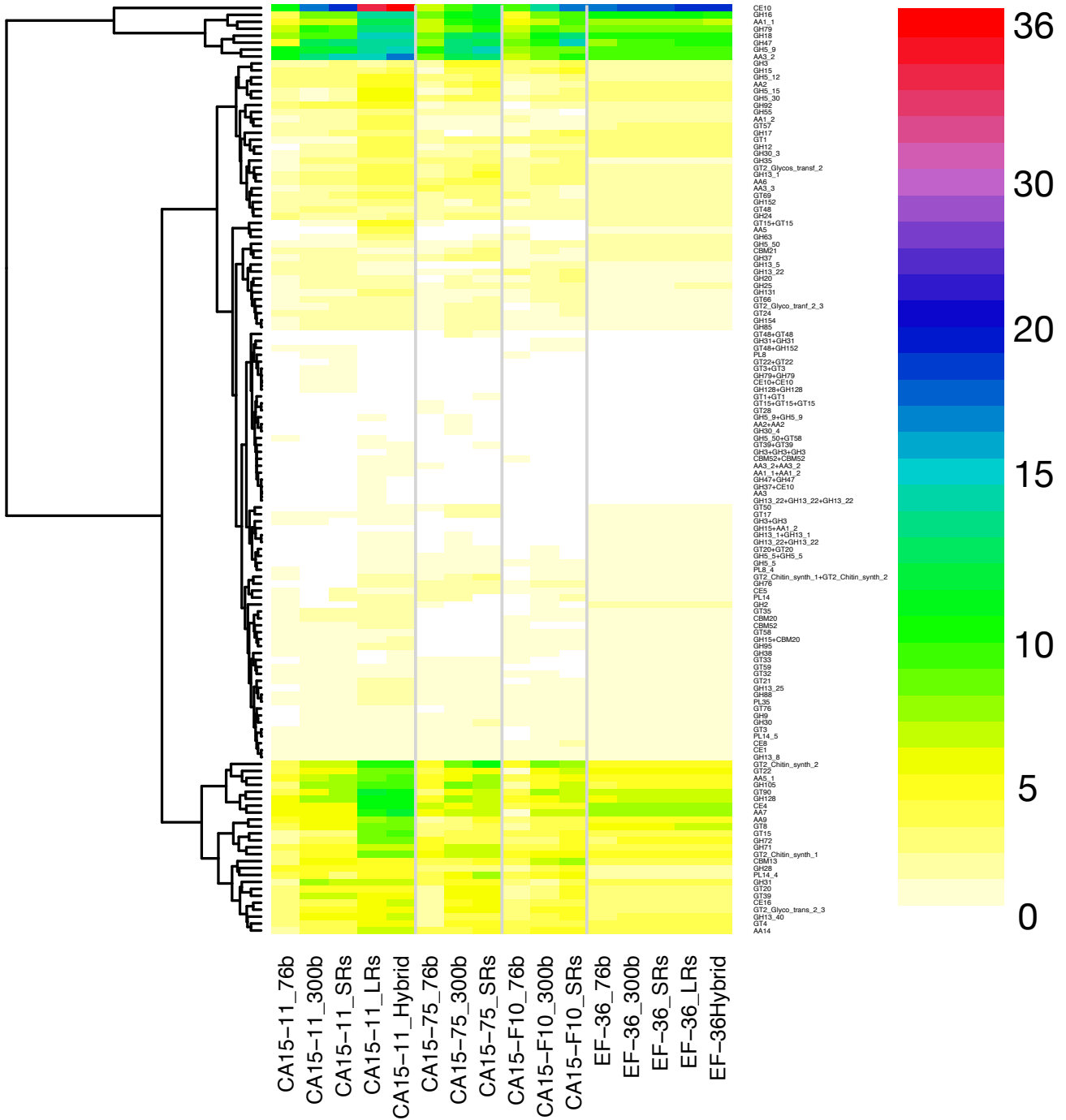


Table S1. Comparison between *Laccaria trichodermophora* EF-36 ABySS (Assembly By Short Sequences) assemblies generated with different *k*-mer sizes.

Assembly	k33	k43	k53	k63	k73
	Contigs				
# Contigs	4,813	4,966	5,056	5,186	74
Largest contig	268,483	268,417	407,597	407,675	7,885
Total length	31,602,418	35,887,993	38,782,502	40,934,162	137,874
GC (%)	48.27	48.15	48.02	47.90	38.66
N50	12,376	14,621	16,272	16,940	1,927
L50	600	576	570	573	22
# N's per 100 kbp	25.03	21.08	27.52	85.18	501.18
	Scaffolds				
# Contigs	3,633	3,682	3,759	3,803	49
Largest contig	488,177	332,910	563,323	511,709	16,978
Total length	31,641,266	35,928,407	38,827,325	40,978,089	138,636
GC (%)	48.27	48.15	48.02	47.90	38.67
N50	18,825	21,647	23,686	25,468	4,798
L50	404	402	397	406	8
# N's per 100 kbp	155.05	142.03	140.03	188.69	968.00

All values considering contigs/scaffolds bigger than 1Kb.

Table S2. Comparison between *Laccaria trichodermophora* EF-36 IDBA_UD (Iterative De Bruijn Assembler with Uneven Depth) assemblies generated with different *k*-mer sizes.

Assembly	k31	k41	k51	k61	k71	k81
# Contigs	6,004	6,326	6,369	6,476	6,437	6,141
Largest contig	108,564	142,015	210,314	303,532	303,552	303,572
Total length	29,141,15 2	33,409,87 6	36,644,31 3	39,142,98 4	41,079,88 9	41,947,04 1
GC (%)	48.31	48.20	48.07	47.91	47.81	47.77
N50	9,231	10,497	12,449	13,714	14,993	16,587
L50	747	740	684	656	631	590
# N's per 100 kbp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	k91	k101	k111	k121	Scaffolds	
# Contigs	5,965	5,967	5,837	5,793	5,684	
Largest contig	407,601	407,621	569,291	569,530	569,530	
Total length	43,077,76 3	44,213,52 1	45,315,08 3	46,287,21 3	46,287,71 7	
GC (%)	47.71	47.64	47.57	47.51	47.51	
N50	18,072	18,991	20,244	21,378	21,961	
L50	558	537	519	508	493	
# N's per 100 kbp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	

All values considering contigs/scaffolds bigger than 1Kb.

Table S3. Comparison between *Laccaria trichodermophora* EF-36 SPAdes (St. Petersburg genome assembler) assemblies generated with different set of *k*-mer sizes.

Assembly	Default	Step10	Step5	Default	Step10	Step5
		Contigs			Scaffolds	
# Contigs	3,915	5,034	5,331	3,785	4,881	4,701
Largest contig	504,919	447,787	478,617	504,919	447,787	478,617
Total length	43,812,471	44,868,831	47,293,303	43,837,338	44,965,206	48,054,544
GC (%)	47.70	47.61	47.48	47.70	47.61	47.43
N50	28,693	23,414	23,761	29,857	24,320	28,092
L50	372	455	478	362	442	419
# N's per 100 kbp	0.00	0.00	0.00	29.06	21.92	27.75

All values considering contigs/scaffolds bigger than 1Kb.

Table S4. Comparison between *Laccaria trichodermophora* EF-36 Velvet assemblies generated with different *k*-mer sizes.

Assembly	k63	k65	k67	k69	k71
Contigs	7,058	8,006	11,717	13,394	156
Largest contig	177,176	94,476	25,735	14,069	26,051
Total length	38,634,369	38,636,637	36,990,772	21,716,930	285,257
GC (%)	47.92	47.91	47.92	48.03	41.86
N50	10,791	8,460	4,116	1,632	1,628
L50	862	1,192	2,699	4,763	39
# N's per 100 kbp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

All values considering contigs/scaffolds bigger than 1Kb.

Table S5. Comparison between *Laccaria trichodermophora* EF-36 best results of different short-reads genome assemblers.

Assembly	ABYSS		IDBA_UD	
	Contigs	Scaffolds	Contigs	Scaffolds
Contigs	5,186	3,803	5,793	5,684
Largest contig	407,675	511,709	569,530	569,530
Total length	40,934,162	40,978,089	46,287,213	46,287,717
GC (%)	47.90	47.90	47.51	47.51
N50	16,940	25,468	21,378	21,961
L50	573	406	508	493
# N's per 100 kbp	85.18	188.69	0.00	0.05
	SPAdes		Velvet	
	Contigs	Scaffolds	Contigs	
Contigs	3,915	3,785	7,058	-
Largest contig	504,919	504,919	177,176	-
Total length	43,812,471	43,837,338	38,634,369	-
GC (%)	47.70	47.70	47.92	-
N50	28,693	29,857	10,791	-
L50	372	362	862	-
# N's per 100 kbp	0.00	29.06	0.00	-

All values considering contigs/scaffolds bigger than 1Kb.

Table S6. Long reads and hybrid assemblies comparison.

Assembly	Canu	Pilon	HybSPADes	MaSuRCA	Wtdbg2	PurgeHap
Strain	CA15-11					
Contigs	1,119	886	9,346	1,422	925	876
Largest contig	917,151	1,052,634	140,606	1,352,507	1,502,983	1,052,634
Total length (Mb)	111.69	112.18	85.23	115.56	74.55	111.90
GC (%)	46.65	46.66	47.15	46.44	46.38	46.67
N50	171,948	238,470	20,484	140,738	207,334	241,037
L50	180	134	1,133	216	91	133
# N's per 100 kbp	0.00	348.50	4,574.74	1.56	0.00	349.37
Strain	EF-36					
Contigs	94	77	1,363	241	224	77
Largest contig	4,959,163	5,316,676	1,506,708	3,140,828	2,571,081	5,316,676
Total length (Mb)	58.99	59.06	53.20	61.05	52.44	59.06
GC (%)	46.84	46.84	47.02	46.73	46.89	46.84
N50	1,351,596	1,464,168	158,178	624,154	522,856	1,464,168
L50	12	12	86	27	24	12
# N's per 100 kbp	0.00	91.36	123.28	0.33	0.00	91.36

All values considering contigs/scaffolds bigger than 1Kb; Canu assemblies were made using only long reads while the remaining five in a hybrid approach:
Pilon were made over the results of Canu, and Purge haplotigs over Pilon.

Table S7. MaxBin analyses results.

	Abundance %	Coverage %	Genome size Mpb
36.LR			
Bin 1	0.12	1.9	21
Bin 2	0.12	11.2	37
11.LR			
Bin 1	0.09	3.7	48
Bin 2	0.08	13.1	65

El contenido de enzimas CAZy y péptidos efectores en los genomas accesorios de *Laccaria trichodermophora* le confiere capacidades simbióticas diferenciales

Rodolfo Enrique Ángeles-Argáiz*† y Roberto Garibay-Orijel†

* Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México, C.P. 04510.

† Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, C.P. 04510.

Palabras clave

Capacidad infectiva, enzimas CAZy, genoma accesorio, predicción de péptidos efectores, variabilidad genómica intraespecífica.

Autor de correspondencia

Roberto Garibay Orijel, Instituto de Biología, Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, A.P. 70-233, C.P. 04510, Ciudad de México, México, +52 56229250 ext. 47836, rgaribay@ib.unam.mx

Resumen

En los genomas de los hongos ectomicorrízicos están codificadas las capacidades fisiológicas que les han permitido lograr la asociación simbiótica con sus hospederos. La variación genética intraespecífica tiene efecto en su fenotipo y en sus interacciones simbióticas. Con la intención de identificar el trasfondo genómico que da a distintas cepas sus capacidades infectivas diferenciales, se realizó el análisis comparativo de cuatro genomas de *Laccaria trichodermophora*. Este es un hongo ectomicorrízico asociado a pinos y con un importante potencial en la biotecnología forestal. A pesar de las diferencias genómicas entre las cepas de *L. trichodermophora*, todas formaron un grupo monofilético hermano a *L. bicolor*. Su genoma *core* estuvo integrado por 6,756 grupos de genes ortólogos y el porcentaje del genoma accesorio varió entre el 18% y el 29% (genes). La batería genética codificante para enzimas de actividad sobre carbohidratos (CAZy) de *L. trichodermophora* es muy similar a la reportada para *L. bicolor*, con genes simbióticos involucrados en la evasión y confrontación del sistema inmune vegetal, en la colonización y organogénesis de la ectomicorriza, en la competencia contra otros microorganismos rizosféricos y en la explotación de la materia orgánica nitrogenada de difícil acceso en el suelo. Sin embargo, la ausencia de genes importantes, como poligalacturonasas GH28 parecen haber comprometido la eficiencia simbiótica de algunas de las cepas analizadas. La cepa CA15-F10 fue la única que codificó el homólogo de la endoglucanasa LbGH5-CBM1, crucial en la formación de la ectomicorriza, lo que en conjunto con su elevada batería de péptidos efectores (SSPs) explica su mayor capacidad simbiótica.

1 Introducción

La simbiosis ectomicorrízica se presenta entre las raíces de más de 30 linajes de plantas (Tedersoo y Brundett 2017) y las hifas de más de 80 linajes de hongos (Tedersoo y Smith 2017) y tiene implicaciones que van desde el establecimiento de las plántulas hasta los ciclos biogeoquímicos globales (Smith y Read, 2009). El estudio de la simbiosis ectomicorrízica se ha visto robustecido por el análisis de genomas completos (Kohler y Martin 2016; Martin *et al.* 2016; Miyauchi *et al.* 2020; Plett y Martin, 2015). Mediante la secuenciación de los primeros genomas de especies micorrízicas se hicieron evidentes las características que llevaron a linajes independientes de hongos saprobios a convertirse en simbioses micorrízicas biótrofos, así como la diversidad y heterogeneidad de los mecanismos moleculares que los hongos micorrízicos emplean en la comunicación con sus socios vegetales (Kuo *et al.* 2014; Martin *et al.* 2008, 2010; Tisserant *et al.* 2013).

Una de las metas del estudio genómico de la simbiosis ectomicorrízica es identificar los “genes simbióticos” con los que cualquier especie de hongo micorrízico entabla comunicación e intercambio con sus distintos hospederos (Kuo *et al.* 2014). Con el análisis y comparación de genomas de hongos biótrofos y saprótrofos, fue posible señalar la pérdida de la capacidad enzimática degradadora de pared celular vegetal como una convergencia evolutiva en hongos ectomicorrízicos. Por otro lado, también se ha hecho evidente que partes importantes de la batería genética involucrada en la comunicación con el hospedero son linaje-específicas (Kohler *et al.* 2015; Kohler y Martin 2016; Martin *et al.* 2016; Plett y Martin, 2015).

En el genoma de *Laccaria bicolor*, se encontraron péptidos efectores (SSPs) inducidos en la micorriza (MiSSPs, Martin *et al.* 2008). Algunos de ellos, como MiSSP7 (Plett *et al.* 2014; Martin *et al.* 2016) o MiSSP7.6 (Kang *et al.* 2020) presentaron actividad efectora en el interior de las células de la raíz de su hospedero, mientras que otras, como MiSSP8 (Pellegrin *et al.* 2019a), mostraron participación en la penetración intercelular. Proteínas efectoras de este tipo son bien conocidas por su papel en la colonización de los tejidos vegetales por parte de hongos patógenos y endófitos (Plett y Martin, 2015; Stergiopoulos y Wit, 2009). Ahora, sabemos que la biología efectora

juega un papel fundamental en la comunicación entre el hongo y la planta durante el establecimiento de la simbiosis, su maduración y desempeño (Pellegrin *et al.* 2019b; Plett y Martin 2011; Plett *et al.* 2011; Rocafort *et al.* 2020; Toro y Brachmann, 2016). Con el empleo de datos transcriptómicos, se identificó un “regulón estable”, compuesto por 1,249 genes involucrados en la regulación de la simbiosis entre *L. bicolor* y algunos de sus hospederos. Simultáneamente, fue identificado un conjunto de 1,210 genes expresados diferencialmente durante la simbiosis, pero esta vez, específicos para los distintos hospederos estudiados *Populus trichocarpa* y *Pseudotsuga menziesii* (Plett *et al.* 2015). Así mismo, los perfiles de expresión diferencial de enzimas de actividad sobre carbohidratos (CAZy) fueron relacionados con las distintas etapas de la ontogénesis de la ectomicorriza (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Con la caracterización de algunas de estas enzimas, como LbGH5-CBM1 (Zhang *et al.* 2018a), la comprensión sobre su participación en la simbiosis comienza a esclarecerse.

La teoría sobre la fisiología de las interacciones micorrízicas se ha forjado sobre una colección de observaciones experimentales y genómicas realizadas en distintas especies o cepas modelo, en muchos casos representantes de linajes micorrízicos independientes. En el caso de la simbiosis ectomicorrízica, modelos como *Laccaria bicolor* (Martin *et al.* 2008) y *Tuber melanosporum* (Martin *et al.* 2010) han permitido comprender aspectos fisio-ecológicos y evolutivos de las interacciones. Al mismo tiempo, la microbiología clásica remarcó la importancia de la identidad de la cepa en el fenotipo de prácticamente cualquier especie microbiana. Ahora, mediante el análisis de genomas completos, se llega a conclusiones similares (Welch *et al.* 2002). De manera experimental se ha comprobado en *L. bicolor* que la identidad de la cepa es determinante en las diferencias tanto en crecimiento micelial *in vitro* como en el desempeño de la planta inoculada (Di Battista *et al.* 1996; Hazard *et al.* 2017; Flores-Almaraz, 2020). Dentro del Género *Laccaria* se ha reportado la variabilidad interespecífica al comparar los genomas de *L. bicolor* y *L. amethystina* (Kholer *et al.* 2015). Pero también, se han detectado importantes diferencias genómicas al interior de la misma especie, como la presencia de doce genes codificantes para hidrofobinas de

la clase 1 en *L. bicolor* S238N-H82 y solo nueve en el de *L. bicolor* 81306 (Plett *et al.* 2012).

Con análisis de genómica comparada enfocada a la diversidad intraespecífica en especies modelo (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*), se detectó que los hongos evolucionan mediante innovaciones a nivel de cepa, como la duplicación de genes, en lugar de la transferencia horizontal a gran escala, y que la mayoría de los genes accesorios se agrupan dentro de las regiones cromosómicas sub-terminales y están involucrados en la patogenicidad y resistencia antimicrobiana (McCarthy y Fitzpatrick, 2019).

Mediante muestreos sub-genómicos se evidenció que el hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus irregularis* (= *Glomus irregularis*, *Rhizoglomus irregulare*) presenta diferencias considerables en el número de copias genéticas entre cepas, divergencia entre las copias, aneuploidía; e incluso en algunas cepas heterocarióticas, esta variabilidad se presenta entre núcleo y núcleo. La variación en sus regiones codificantes es equiparable a la de las regiones no codificantes, lo que se relaciona con características fenotípicas en cuanto al desempeño de la planta simbiote (Wyss *et al.* 2016). Resultados similares se encontraron mediante genómica comparada, las diferencias entre los ensamblajes de siete cepas van desde el tamaño del genoma, el porcentaje de regiones repetidas, número de genes y genes huérfanos. Esta variación afectó elementos transponibles, diversos dominios proteicos funcionales péptidos efectores y otros genes simbióticos. Además, mediante análisis pan-genómicos se encontró el intercambio genético entre cepas, lo que es muy relevante en estos hongos supuestamente clonales, para los que no se conoce reproducción sexual (Chen *et al.* 2018).

Al analizar cuatro cepas geográficamente cercanas del hongo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* en cultivo axénico, se detectaron sutiles diferencias en sus perfiles de expresión transcriptómica. Sin embargo, al modificar las concentraciones de la fuente de carbono (glucosa) en el medio, las distintas cepas reaccionaron de manera considerablemente diferente en cuanto a su acumulación de biomasa y perfil de azúcares en el micelio. En simbiosis con su hospedero, *Eucalyptus grandis*, se

demostró que a pesar de que la respuesta simbiótica general se mantiene en todas las cepas, la mayoría de los genes regulados de manera específica para la simbiosis son cepa específicos. De éstos, cerca de la mitad son de función desconocida, pero también una buena proporción son SSPs, transportadores y enzimas CAZy (Plett *et al.* 2020).

Por lo tanto, cada vez es mas clara la importancia de estudiar la variación genómica intraespecífica para hacer interpretaciones generales, forjar teoría y comprender el trasfondo genético de los fenotipos observados (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020; Chen *et al.* 2018; Hortal *et al.* 2017; Pellitier y Zak, 2018; Plett *et al.* 2020; Hazard *et al.* 2017). La selección de la cepa es crucial en un desarrollo biotecnológico, por lo que es necesario fenotipificarlas y analizar sus genomas.

En este Capítulo se presenta la anotación funcional de cuatro genomas completos de cepas de *Laccaria trichodermophora*, así como el análisis comparativo en busca de genes y funciones potencialmente implicadas en sus capacidades de colonización. Estas cepas representan poblaciones geográficamente aisladas (Quintero-Corrales *et al.* 2020), presentan diferencias en su acumulación de biomasa al ser cultivadas en medios líquido (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020) y también presentan diferencias en su capacidad de colonizar la raíz de su hospedero (Flores-Almaraz, 2020). La cepa EF-36 de *L. trichodermophora* acumula altas concentraciones de biomasa en cultivo líquido (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020), pero desarrolla una pobre e incompleta colonización de la raíz de su hospedero (Flores-Almaraz, 2020), mientras que la cepa CA15-F10 no acumula tanta biomasa en la mismas condiciones de cultivo (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020) pero alcanza buenos porcentajes de micorrización y en tiempos relativamente cortos (Flores-Almaraz, 2020).

Como hipótesis, se asume que dentro del pan-genoma de *L. trichodermophora* se encontrarán diferencias en cuanto al tamaño de familias génicas y a la identidad de los genes. Algunas de estas diferencias, de presentarse en genes involucrados en la simbiosis como SSPs y enzimas CAZy, podrían estar relacionadas con la capacidad de establecer la simbiosis. Por lo tanto, se plantearon las siguientes preguntas de investigación: ¿Cuáles son las principales diferencias genómicas entre las especies del

Género *Laccaria* y sus parientes saprobios más cercanos? ¿Cuáles son los genes comunes a las tres especies de *Laccaria* con genoma secuenciado? ¿Cuáles son los genes exclusivos de cada especie o cepa? y ¿Cómo estas diferencias explican sus capacidades diferenciales para establecer la simbiosis?

Para atender estas interrogantes se planteó analizar de manera comparativa los genomas disponibles de *L. amethystina*, *L. bicolor* y *L. trichodermophora*. De manera particular, identificar los genes compartidos y/o únicos en el pan-genoma *Laccaria trichodermophora*. Así mismo, de entre los genes involucrados en la simbiosis, identificar su variación inter- e intraespecífica en cuanto a identidad y tamaño de familias génicas. Para finalmente, detectar genes potencialmente relacionados con sus capacidades diferenciales para establecer la simbiosis.

2 Material y métodos

2.1 Genomas analizados y modelos de estudio

El modelo de estudio fue la especie *Laccaria trichodermophora* (Muell. 1984), un Basidiomycete ectomicorrízico que se distribuye en México y Estados Unidos de América (Mueller, 1992; Wilson *et al.* 2017). En los volcanes del centro de México, particularmente en el Eje Neovolcánico Transversal Mexicano, es uno de los hongos con mayor producción de esporomas (Montoya *et al.* 2014; Reverchon *et al.* 2012). *Laccaria trichodermophora* se asocia con *Pinus montezumae* en los bosques de alrededor de 3,000 msnm y con *P. harwegii* en los límites superiores del bosque, alrededor de 4,000 msnm. Al estar cercanamente emparentada a *L. bicolor* (Wilson *et al.* 2017) comparte características morfo-anatómicas, pero parte de su ecología es distinta. Mientras *L. bicolor* es generalista pues se asocia tanto a gimnospermas como a angiospermas, *L. trichodermophora* muestra una fuerte preferencia por hospederos en el Género *Pinus* dentro de su rango de distribución natural, los reportes sobre su asociación con *Fagus* o *Quercus* refieren a saltos de hospedero fuera de su distribución natural (Mueller y Strack 1992; Ramos *et al.* 2017). Partiendo de análisis de estructura

poblacional (Quintero-Corrales *et al.* 2020) y de cultivo en medio líquido (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020), se seleccionaron cuatro cepas de *L. trichodermophora* con la intención de capturar la mayor diversidad genética y fenotípica de la especie dentro del centro de México. Los protocolos de extracción de DNA, secuenciación y ensamble genómico fueron reportados por Ángeles Argáiz *et al.* (en preparación, Capítulo III de esta tesis).

Junto con los genomas de *L. trichodermophora*, se analizaron genomas públicamente disponibles que fueron ensamblados y secuenciados con distintas estrategias. El genoma de *L. bicolor* S238N-H82 se ensambló a partir de librerías de fósmidos (Martin *et al.* 2008). Los genomas de *L. amethystina* LaAM-08-1 (Kohler *et al.* 2015), *L. trichodermophora* CA15-F10 y *L. trichodermophora* CA15-75 (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación, Capítulo III de esta tesis) fueron generados mediante secuenciación Illumina. Mientras que los de *L. bicolor* D101_1 (sin publicar, disponible en MycoCosm de JGI; Grigoriev *et al.* 2014), *L. trichodermophora* CA15-11 y *L. trichodermophora* EF-36 (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación) son ensamblajes híbridos (PacBio e Illumina). El tipo de secuenciación y ensamble genómico, así como la calidad del ensamble, pueden tener efectos sobre las inferencias funcionales (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación, Capítulo III de esta tesis), por lo que se tomó en cuenta durante la interpretación de los resultados. Todas las muestras de *Laccaria* pertenecen a especies ectomicorrízicas. No se cuenta con genomas secuenciados de otros representantes de la Familia Hydnangiaceae, por lo que, se incluyeron siete genomas de hongos descomponedores del mantillo, representantes de la Familia más cercana, Psathyrellaceae (Varga *et al.* 2019; Wilson *et al.* 2017) (Tabla 1). Los datos genómicos, así como en código utilizado y otra información relacionada, se encuentran disponibles en línea (<https://github.com/Rodolfo47/LtC.git>).

Tabla 1. Estadísticos básicos, autoría y procedencia de los ensamblajes genómicos utilizados.

Especie	Cepa	Tamaño del genoma (Mpb)	Número de Contigs/Scaffolds	Tamaño del contig/scaffold mayor (Mpb)	N50 (Mpb)	GC (%)	Números de acceso	Secuenciación	Cita
<i>Coprinellus angulatus</i>	CBS 144469	93.565	517	2.228	0.482	52.77	NCBI: PRJNA463278	PacBio	Steindorff et al. 2020
<i>Coprinellus angulatus</i>	CBS 175.51	59.300	273	3.712	0.754	52.56	NCBI: PRJNA496351	PacBio	Floudas et al. 2020
<i>Coprinellus micaceus</i>	FP101781_FA13	77.386	704	2.253	0.315	53.73	NCBI: PRJNA247835	Illumina y PacBio	Varga et al. 2019
<i>Coprinopsis cinerea</i>	okayama7-130	36.192	68	4.146	3.468	51.64	NCBI: PRJNA1447	Sanger	Stajich et al. 2010
<i>Coprinopsis marcescibilis</i>	CBS 121175	38.912	817	1.435	0.134	49.26	NCBI: PRJNA247837	Illumina	Varga et al. 2019
<i>Coprinopsis strossmayeri</i>	76940	33.316	622	1.580	0.190	48.98	NCBI: PRJEB18786	Illumina	Banks et al. 2017
<i>Laccaria amethystina</i>	LaAM-08-1	52.197	1,299	0.841	0.120	42.84	NCBI: PRJNA196025	Illumina	Kohler et al. 2015
<i>Laccaria bicolor</i>	D101_1	69.814	2,820	1.014	0.107	45.52	JGI: 1019115	Illumina y PacBio	-
<i>Laccaria bicolor</i>	S238N-H82	64.877	665	3.566	0.784	42.48	NCBI: PRJNA29019	Sanger	Martin et al. 2008
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-11	111.822	873	1.052	0.241	46.5	NCBI: PRJNA642675	Illumina y PacBio	Ángeles-Argáiz et al. sin publicar
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-75	82.555	28,921	0.127	0.005	46.97	NCBI: PRJNA642675	Illumina	Ángeles-Argáiz et al. sin publicar
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-F10	75.974	34,046	0.091	0.004	47.16	NCBI: PRJNA642675	Illumina	Ángeles-Argáiz et al. sin publicar
<i>Laccaria trichodermophora</i>	EF-36	58.859	72	5.316	1.464	46.83	NCBI: PRJNA642675	Illumina y PacBio	Ángeles-Argáiz et al. sin publicar
<i>Psathyrella aberdarensis</i>	ASM4126641v1	60.609	2,303	0.354	0.057	50.25	NCBI: PRJNA516162	IonTorrent	-

El tamaño del el genoma reportado es posterior a la limpieza de contigs repetidos por Funannotate (ver tabla 2).

2.2 Anotación funcional general

Se utilizó el pipeline Funannotate (v1.7.4, Palmer, 2017) sobre los ensamblajes genómicos para homogeneizar la anotación funcional de todas las muestras. Como primer paso se descartaron *contigs/scaffolds* repetidos (de longitud <N50, de >95% similitud nucleotídica y >95% de cobertura con algún otro *contig/scaffold*) y se enmascararon regiones repetidas del genoma con Tantan (v13, Frith, 2011) (softmasking = repetidos en letras minúsculas). Se sumaron los resultados de tres predictores de modelos génicos: Augustus (v3.3.3, Stanke y Waack, 2003), GlimmerHMM (v3.0.4, Majoros *et al.* 2004) y SNAP (Korf, 2013). Se usó el proteoma predicho de *L. bicolor* S238N-H82 (GCF_000143565.1_V1.0_protein.faa, Martin *et al.* 2008) como evidencia para entrenar al predictor Augustus. Para la anotación funcional se ejecutó InterProScan (v5.41-78.0, Jones *et al.* 2014), con lo que se detectaron términos IPR y términos GO (Gene Ontology Consortium, 2006). Se usó el servidor *online* de fungiSMASH (v5.2.0, Blin *et al.* 2019) para identificar clusters de genes potencialmente implicados en la producción de metabolitos secundarios y el de Phobius (Käll *et al.* 2007) para dominios transmembranales. Con búsquedas HMMer (v3.3.2, Wheeler y Eddy, 2013) se identificaron enzimas CAZy (dbCAN2 v8.0, Zhang *et al.* 2018b) y dominios Pfam (v33.1, Bateman *et al.* 2004), con búsquedas Diamond (v0.9.21, Buchfink *et al.* 2015) sobre la base de datos UniProt KB (v2020_02, UniProt Consortium 2019) se identificaron proteasas (MEROPS v12.0, Rawlings *et al.* 2010), también se predijeron proteínas secretadas (SignalP v4.1, Petersen *et al.* 2011). Se evaluó lo completo de los ensamblajes mediante Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO, colección: basidiomycota_odb9, Simão *et al.* 2005). Para detectar similitudes funcionales entre las muestras se realizaron análisis de escalamiento multidimensional con las matrices de anotación IPR y Pfam.

2.3 Análisis filogenómico

Para confirmar la monofilia de las muestras de *L. trichodermophora*, se hicieron un par de análisis filogenómicos: uno basado en una super-matriz y uno en un super-árbol.

El primero fue un análisis de máxima verosimilitud mediante RAxML (v8.2.12, Stamatakis, 2014) con Funannotate. El análisis usó como modelo de sustitución de aminoácidos JTT+DCMut,100 inferencias rápidas de bootstrap y una búsqueda exhaustiva de máxima verosimilitud, realizado a partir de un super-alineamiento concatenado con longitud de 79,012 aminoácidos e integrado por 148 marcadores BUSCO presentes como copia única en todas las muestras. El segundo fue un super-árbol resultante del consenso de 895 árboles de genes ortólogos. Cada árbol de genes fue inferido por máxima verosimilitud de FastTree (Price *et al.* 2010) con OrthoFinder (v2.5.2, Emms y Kelly, 2015; 2019), y los alineamientos realizados con MAFFT (Kato *et al.* 2013). Al menos 85.7% de las especies analizadas contribuyeron con un gene a los grupos de ortólogos usados. El árbol de especies se consensó con STAG (Emms y Kelly, 2018) y se enraizó con STRIDE basado en los eventos de duplicación genética (Emms y Kelly, 2017). Los árboles resultantes se editaron con FigTree (v1.4.3, Rambaut, 2012).

2.4 Cálculo del pan-genoma

El pan-genoma de *L. trichodermophora* estuvo integrado por la suma de todos los grupos de modelos génicos ortólogos de todos los genomas de la especie, el genoma *core* se integró solo por los ortólogos con (al menos) una copia en cada cepa. La homología entre los modelos génicos se detectó mediante OrthoFinder (v2.5.2, Emms y Kelly, 2015; 2019) sobre los proteomas predichos por Funannotate. OrthoFinder generó grupos de genes ortólogos mediante MCL (Dongen, 2000) a partir de grafos, con genes como nodos conectados por el *score* normalizado de los mejores *hits* recíprocos de BlastP/Diamond (v0.9.21, Buchfink *et al.* 2015). Posteriormente, OrthoFinder hizo árboles para cada grupo de genes, con los que construye un árbol de especies y con base en esa información filogenética corrige los propios grupos de ortólogos (v2.5.2, Emms y Kelly, 2019). Para asegurar una mejor asignación de ortólogos se incluyeron en el análisis las muestras de la Familia Psathyrellaceae como grupo externo (Tabla 1).

2.5 Anotación de enzimas CAZy

Las enzimas CAZy relajan la pared celular de la raíz durante la simbiosis permitiendo la colonización intercelular (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Para profundizar en el análisis de este grupo genético/funcional se partió de la predicción de modelos génicos realizada con Funannotate para posteriormente detectar enzimas CAZy con dbCAN2 (v2.0.11, Zhang *et al.* 2018b). Se utilizaron los resultados del método de búsqueda HMMer (dbCAN-HMMdb-V8), ya que se ha considerado el más robusto de los tres (Stewart *et al.* 2019).

2.6 Predicción de péptidos efectores

Las proteínas efectoras secretadas por los hongos facilitan la infección de los tejidos vegetales. Para su predicción, el proteoma predicho con Funannotate se tamizó con los programas SignalP (v5.0b, Armenteros *et al.* 2019), EffectorP (v2.0, Sperschneider *et al.* 2018a) y ApoplastP (v1.0, Sperschneider *et al.* 2018b). SignalP-5 es un programa basado en redes neurales destinado a la predicción de proteínas secretadas, con el cual se detectó la señal de secreción, se cortó y se discriminó de los motivos transmembranales y las proteínas de localización mitocondrial o de retículo endoplasmático (Armenteros *et al.* 2019). A partir del secretoma, se predijeron los péptidos potencialmente efectores con EffectorP, un programa basado en “Machine Learning”, entrenado con péptidos efectores de hongos patógenos y simbióticos, que toma en cuenta la carga neta de la proteína, longitud de su cadena, su contenido de cisteína y la evidencia de selección diversificante (Sperschneider *et al.* 2018a). A su vez, a partir de estos resultados, se realizó un tercer filtrado con ApoplastP, que selecciona los péptidos con una potencial localización en el apoplasto. Para lo que también, mediante “Machine Learning”, busca secuencias enriquecidas con ácido glutámico y en aminoácidos ácidos pequeños y cargados (Sperschneider *et al.* 2018b). Los péptidos obtenidos después de los tres pasos de filtrado fueron agrupados por su ortología con OrthoFinder, como se describe en la sección 2.4.

3 Resultados y discusión

3.1 Comparación funcional general

Se asignaron anotaciones funcionales o dominios proteicos conocidos a más de la mitad de las proteínas predichas de las muestras de *L. trichodermophora* ((promedio \pm desviación estandar) $\mu = 59.85 \pm 4.62$ %), aunque para las otras muestras del Género *Laccaria* ($\mu = 66.86 \pm 2.84$ %) y para las de la Familia Psathyrellace ($\mu = 72.50 \pm 3.67$ %) el porcentaje de proteínas anotadas fue mayor (Tabla 2). Al comparar la diversidad de funciones representadas por dominios Pfam o IPRs, se observó que las cepas ectomicorrízicas, o sea, todas del Género *Laccaria*, se agrupan entre sí, mientras que las cepas saprobias, aunque de distintos Géneros, formaron un grupo independiente, sin embargo los altos valores de tensión de ambos análisis indican que la ordenación fue arbitraria, ya que este valor indica el grado en que el análisis representa las diferencias entre los datos (Figura 1).

3.2 Posición filogenética

Los análisis filogenómicos apoyan que las cuatro cepas de *L. trichodermophora*, formaron un grupo monofilético bien soportado (soporte *bootstrap* del análisis de supermatriz =100, soporte de las ramas del análisis de super-árbol = 1) en ambos análisis, a pesar de las diferencias genómicas en tamaño y contenido en los genomas . El Género *Laccaria* (100/1) y la especie *L. bicolor* (98/0.997) también aparecen como monofiléticos. Lo mismo ocurrió con todos los Géneros o especies para los que se incluyó más de una muestra en el análisis (Figura 2). La especie hermana de *L. trichodermophora* fue *L. bicolor* (100/1), mientras que *L. amethystina* fue la especie más externa dentro de *Laccaria*, lo que concuerda con previos análisis morfoanatómicos (Osmundson *et al.* 2005) y filogenéticos multi-loci (Wilson *et al.* 2017).

Tabla 2. Principales resultados de la anotación funcional de los ensamblajes genómicos.

Especie	Cepa	Complejidad del ensamblaje (%)	Contigs repetidos	Repetidos enmascarados	Modelos génicos	Proteínas	Proteínas anotadas (%)	tRNAs	Pfam	UniProt	InterProScan	GO	CAZymes	MEROPS	Sec. Met.	Secretados
<i>Coprinellus angulatus</i>	CBS 144469	86.8 (D:46.0)	0; 0 bp (0.00%)	6,800,894 bp (7.27%)	25,190	24,648	70.02	542	18,318	741	43,694	10,139	1,062	603	21	1,894
<i>Coprinellus angulatus</i>	CBS 175.51	86.3 (D:2.6)	0; 0 bp (0.00%)	6,369,509 bp (10.74%)	14,429	14,043	69.73	386	10,912	465	25,847	5,905	606	345	13	892
<i>Coprinellus micaceus</i>	FP101781_FA13	80.9 (D:23.4)	0; 0 bp (0.00%)	8,573,706 bp (11.08%)	18,349	17,881	69.10	468	13,038	611	32,205	7,419	787	459	20	956
<i>Coprinopsis cinerea</i>	okayama7-130	91.1 (D:0.5)	0; 0 bp (0.00%)	3,315,551 bp (9.16%)	11,687	11,419	74.69	268	9,990	451	22,746	5,326	650	312	16	912
<i>Coprinopsis marcescibilis</i>	CBS 121175	91.4 (D:0.7)	0; 0 bp (0.00%)	993,305 bp (2.55%)	11,696	11,459	77.06	237	10,349	399	23,477	5,504	627	333	17	842
<i>Coprinopsis strossmayeri</i>	76940	79.4 (D:0.4)	0; 0 bp (0.00%)	2,417,872 bp (7.26%)	9,585	9,350	77.19	235	8,395	415	20,164	4,790	455	280	15	530
<i>Laccaria amethystina</i>	LaAM-08-1	93.3 (D:1.5)	0; 0 bp (0.00%)	6,190,404 bp (11.86%)	12,635	12,414	69.99	221	10,120	411	23,696	5,428	403	301	19	373
<i>Laccaria bicolor</i>	D101_1	93.8 (D:7.3)	100; 214,808 bp (0.31%)	3,540,422 bp (5.07%)	18,390	17,997	64.47	397	13,102	501	29,865	6,953	530	371	20	203
<i>Laccaria bicolor</i>	S238N-H82	88.8 (D:2.4)	0; 0 bp (0.00%)	8,480,540 bp (13.07%)	14,655	14,319	66.11	339	10,794	412	25,405	5,731	427	344	21	165
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-11	86.1 (D:34.6)	3; 79,604 bp (0.07%)	7,141,517 bp (6.39%)	25,500	24,885	63.11	609	17,121	670	40,199	9,102	635	541	39	141
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-75	49.7 (D:12.1)	125; 85,163 bp (0.10%)	3,871,341 bp (4.69%)	22,024	21,508	56.30	532	10,218	773	27,447	6,934	382	376	15	75
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-F10	53.3 (D:6.0)	101; 68,978 bp (0.09%)	3,323,251 bp (4.37%)	24,980	24,505	55.49	484	10,824	808	30,365	7,899	359	431	22	43
<i>Laccaria trichodermophora</i>	EF-36	81.9 (D:2.0)	5; 203,654 bp (0.34%)	3,574,890 bp (6.07%)	14,410	14,083	64.51	330	9,932	427	23,748	5,446	379	308	17	137
<i>Psathyrella aberdarensis</i>	ASM4126641v1	78 (D:1.9)	0; 0 bp (0.00%)	5,160,575 bp (8.51%)	14,350	14,108	69.73	250	10,056	477	24,763	5,724	604	351	21	99

El porcentaje de completitud del ensamblaje se detectó mediante BUSCO: D = porcentaje de BUSCOs duplicados.

Figura 1. Análisis de escalamiento multidimensional de **(A)** dominios IPR y **(B)** dominios Pfam. Los círculos rojos señalan las muestras del Género *Laccaria*, los círculos verdes señalan las muestras de la Familia Psathyrellaceae. El análisis fue resultado de Funannotate.

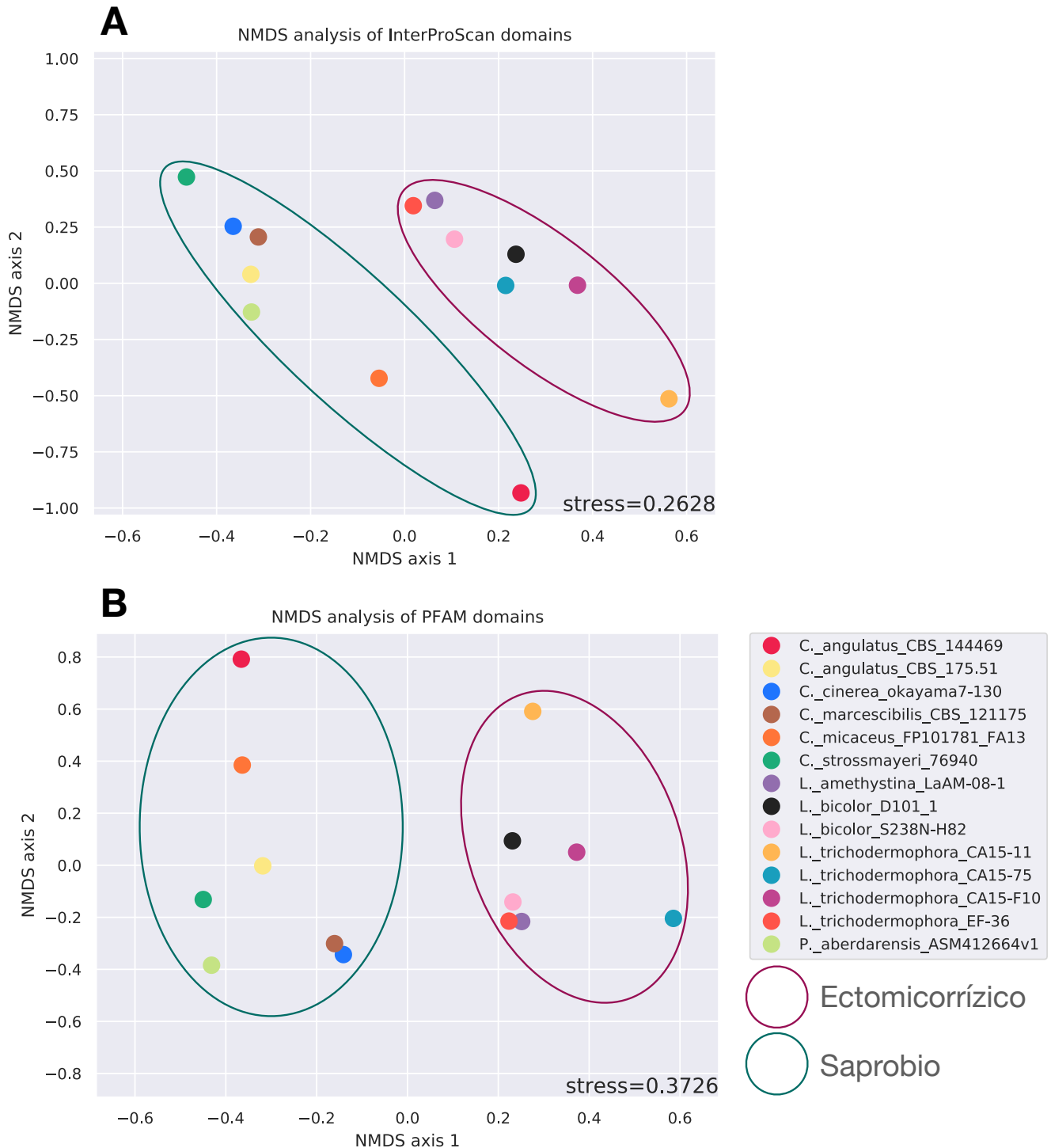
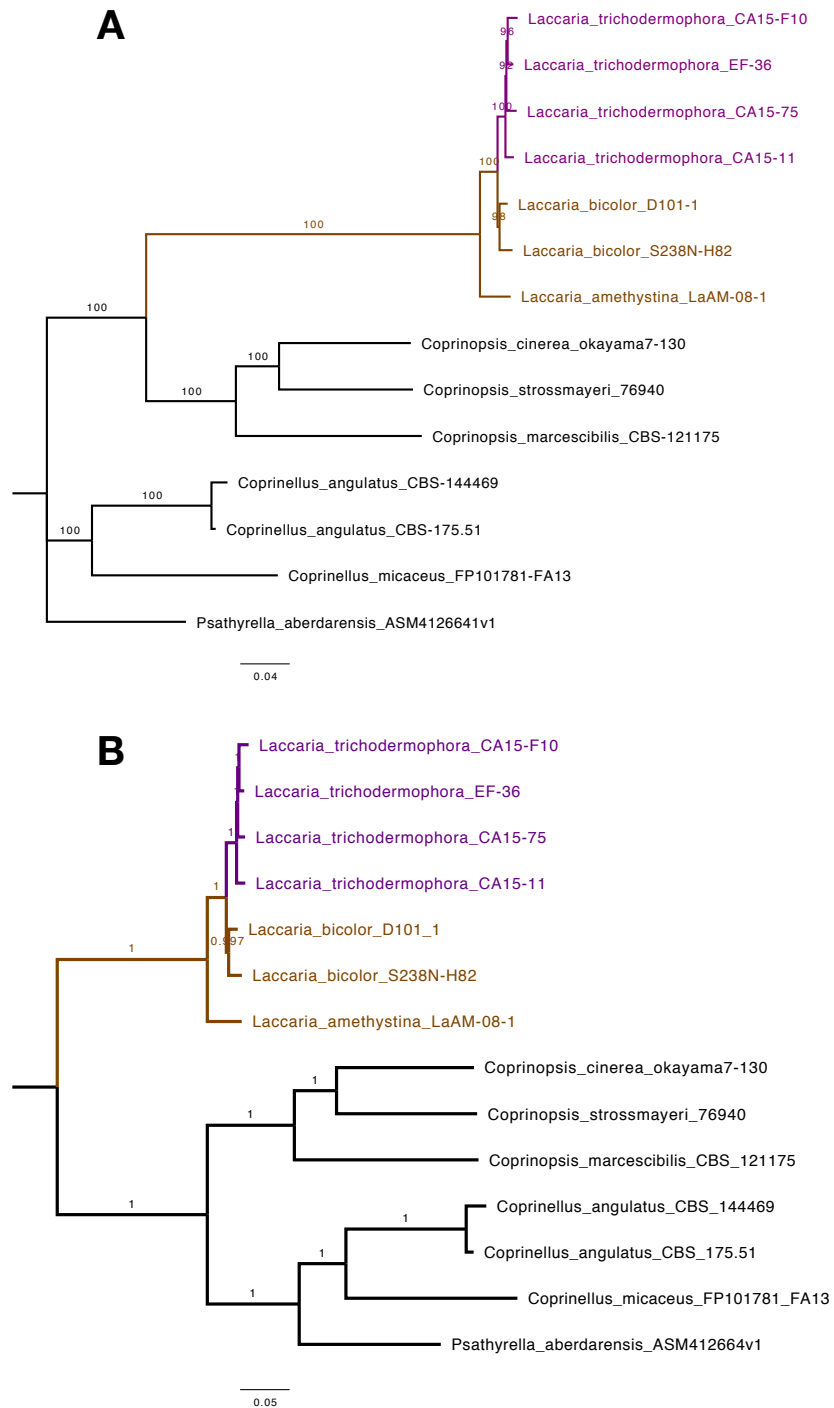


Figura 2. Análisis filogenómicos. **(A)** Análisis de máxima verosimilitud (RAxML) con 148 genes BUSCO en alineamiento concatenado, con modelo de sustitución de aminoácidos JTT+DCMut, 100 inferencias rápidas de bootstrap y una búsqueda exhaustiva de ML. **(B)** Árbol consenso de 895 árboles de genes ortólogos de máxima verosimilitud (FastTree), consensado con STAG y enraizado con STRIDE. Los valores de soporte indican el porcentaje de árboles de genes que soportan la rama.



3.3 El pan-genoma de *Laccaria trichodermophora*

Las distintas cepas de *L. trichodermophora* acumularon entre 14,083 (EF-36) y 24,885 (CA15-11) modelos génicos (Tabla 3). Los 84,981 modelos génicos totales del pan-genoma de *L. trichodermophora* se integraron en 12,513 grupos de ortólogos. El genoma *core* de la especie se integró por 6,756 (54%) grupos de genes ortólogos representados por una o varias copias. En los genomas de cada cepa, del 54% al 76% fueron grupos de ortólogos *core*, lo que en genes representa del 71% al 82% del genoma (Tabla 3, Figura 3B). El genoma de la cepa CA15-F10 presentó el mayor número de grupos de ortólogos exclusivos (717), mientras que la cepa EF-36 presentó el menor (93) (Figura 3A); estas mismas cepas presentaron el mayor y menor número de genes no agrupados en ortólogos respectivamente (1,279 y 193, Tabla 3). En bioensayos de inoculación de las cuatro cepas en las raíces de su hospedero, CA15-F10 fue la que presentó mayor infectividad (Flores-Almaraz, 2020). La relación entre la presencia y eventual expresión de los genes exclusivos de CA15-F10 y su capacidad diferencial de colonización deberá ser comprobada.

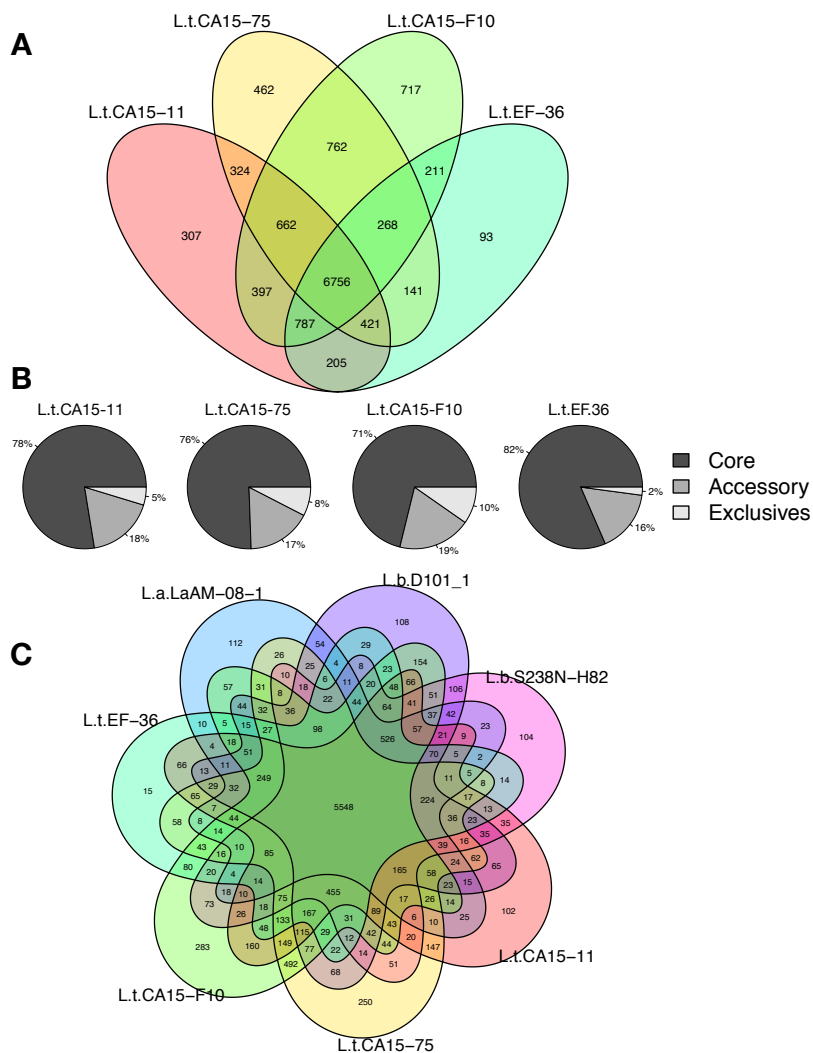
Tabla 3. Número de grupos de ortólogos y genes en distintos estratos pan-genómicos de *Laccaria trichodermophora*.

Cepas	Genes	Genes en grupos de ortólogos	Genes no agrupados # (%)	Grupos de ortólogos # (%) del pan-genoma	Grupos de ortólogos del <i>core</i> -genoma # (%)	Genes del <i>core</i> -genoma # (%)
<i>L. trichodermophora</i> CA15-11	24,885	24,208 (97.28)	677 (2.72)	9,859 (78.79)	6,756 (68.53)	19,303 (77.57)
<i>L. trichodermophora</i> CA15-75	21,508	20,591 (95.72)	917 (4.26)	9,796 (78.29)	6,756 (68.97)	16,250 (75.55)
<i>L. trichodermophora</i> CA15-F10	24,505	23,226 (94.78)	1,279 (5.22)	10,560 (84.39)	6,756 (63.98)	17,439 (71.17)
<i>L. trichodermophora</i> EF-36	14,083	13,890 (98.63)	193 (1.37)	8,882 (70.98)	6,756 (76.06)	11,480 (81.52)
Pan-genoma	84,981	81,915 (96.39)	3,066 (3.61)	12,513 (100)	6,756 (53.99)	-
<i>Core</i> -genoma	64,472	64,472 (75.87)	-	6,756 (53.99)	6,756 (100)	64,472 (75.87)

El conjunto de siete genomas del Género *Laccaria* sumaron 132,594 modelos génicos agrupados en 13,733 ortólogos. Se detectaron solo 5,548 ortólogos compartidos por todas las muestras del Género (Figura 3C). Estos resultados hacen

evidente no sólo la alta variabilidad genómica a nivel de tamaño y contenido génico de la especie *L. trichodermophora*, si no también para *L. bicolor*, que a pesar de solo haber incluido dos muestras en este análisis su diversidad genómica es equiparable a la detectada para *L. trichodermophora*. Este resultado no es sorprendente, pues ya se contaba con evidencia de la disparidad genómica en genes particulares entre cepas de *L. bicolor* (Plett *et al.* 2012) y la inminente publicación del proyecto The *Laccaria* Pan-Genome por parte de JGI/MycoCosm dará más claridad a este fenómeno.

Figura 3. El pan-genoma de *Laccaria trichodermophora*. Los diagramas de Venn representan la intersección de los grupos de genes ortólogos presentes en **(A)** los cuatro genomas de *L. trichodermophora*, o **(C)** los siete genomas del Género *Laccaria* generados por OrthoFinder. **(B)** Gráficos de pastel que representan la cantidad de genes por cepa compartidos por todas las muestras (Core) exclusivos de una solo cepa (Exclusivos) o compartidas por varias, pero no todas las cepas (Accesorios).



En microorganismos bacterianos la relación entre los genes del genoma *core* con respecto al pan-genoma de la especie puede ser tan baja como del 5%, y sus fenotipos asociados suelen presentar características contrastantes, particularmente relacionadas a la interacción con sus hospederos, ya sea de manera simbiótica mutualista o detrimental (González *et al.* 2019; McInerney *et al.* 2017; Rouli *et al.* 2015). En microorganismos eucariontes las cifras no son tan extremas, hongos modelo han presentado genomas *core* de entre el 80 y 90% (McCarthy y Fitzpatrick, 2019). Las relaciones entre *core* y pan-genomas de microorganismos eucarióticos pueden estar influenciadas por el uso de ensamblajes genómicos incompletos, lo que puede afectar ambos estratos genómicos. Sin embargo, es preciso considerar que gran parte de las regiones descubiertas por los ensamblajes genómicos son regiones teloméricas. En hongos asociados a plantas estas regiones típicamente están pobladas por elementos repetidos, que a su vez promueven el enriquecimiento de genes relacionados con la interacción simbiótica (Möller y Stukenbrock, 2017). En muchos casos este tipo de genes teloméricos son más bien pertenecientes al estrato accesorio de los pan-genomas de las especies, por lo que es posible considerar que los efectos de la calidad de los ensamblajes sobre la acumulación de genes en los pan-genomas eucariontes pudiera afectar al genoma accesorio en mayor medida que al *core*. Este fenómeno fue reportado para cepas de *Leptosphaeria maculans* codificantes para genes accesorios de interacción con su hospedero vegetal, pero localizados en *gaps* teloméricos del ensamblaje de referencia (Plissonneau *et al.* 2016). Con el uso de seis ensamblajes “telómero a telómero” del fitopatógeno *Zymoseptoria tritici* se detectaron cromosomas accesorios completos, se destacó la relevancia del genoma accesorio en la interacción con el hospedero y un genoma *core* de cerca del 60% (Plissonneau *et al.* 2018). Esta relación se mantuvo al incrementar el muestreo a 19 genomas de alta calidad procedentes de seis continentes (Badet *et al.* 2020) o incluir una colección global mayor a cien genomas (Plissonneau *et al.* 2018).

Se encontraron 549 grupos de ortólogos del Género *Laccaria* ausentes en *L. trichodermophora*, 20 de ellos fueron anotados a genes conocidos, pero cerca de la mitad tuvieron anotación a dominios funcionales de las bases de datos PFam (310, 56%), InterProScan (390, 71%), términos GO (289, 53%) o las tres (246, 45%). Solo 10

grupos de ortólogos tuvieron anotación a enzimas CAZy, 17 a proteasas MEROPS y 9 con señal de secreción, aunque de estas ninguna proteasa y solo una enzima CAZy (glucanasa GH152) presentó señal de secreción. Además, 100 grupos de ortólogos presentaron dominios transmembranales, de estos solo dos se predijeron como secretados, pero cerca de la mitad tuvieron anotaciones Pfam (52), InterProScan (65), términos GO (43) o los tres (39).

3.4 El poder degradador de pared celular vegetal de *Laccaria*

Se detectaron 259 enzimas CAZy en el genoma de *L. amethystina*, 324 y 295 en los de *L. bicolor* (D101_1 y S238N-H82 respectivamente), mientras que las cepas de *L. trichodermophora* promediaron 310 ± 81 enzimas CAZy (CA15-11: 428, CA15-75: 274, CA15-F10: 289 y EF-36: 248). El Género *Laccaria* promedió 302 ± 61 enzimas CAZy mientras que las especies saprobias de la Familia Psathyrellaceae acumularon 521 ± 159 . Como se esperaba, fueron varias las enzimas CAZy presentes en Psathyrellaceae y ausentes en *Laccaria*. De las 203 funciones CAZy anotadas en total (considerando a los genes que presentaron dos motivos funcionales como distintos a los de un solo motivo) *Laccaria* solo presentó 116 (57%) y Psathyrellaceae 191 (94%). Este patrón se relaciona con el estilo de nutrición de estos dos linajes cercanamente emparentados y es una evidencia más que sostiene la hipótesis de la pérdida de enzimas de actividad sobre pared celular vegetal como una de las principales características genéticas/fisiológicas que definen a la simbiosis ectomicorrízica en Basidiomycota (Kohler *et al.* 2015; Wolfe *et al.* 2012). Sin embargo, también se encontraron algunas enzimas CAZy exclusivas en *Laccaria* (Figura 4), estas se discuten a continuación.

Figura 4. Heatmap de la comparación del contenido de enzimas CAZy (filas) en los genomas de representantes del Género *Laccaria* y representantes de la Familia Psathyrellaceae (columnas). El color blanco representa la ausencia de la sub-familia, los colores fríos representan un número bajo de genes de cada sub-familia mientras los colores cálidos representan altos números de genes. El dendograma agrupa los genes por su ocupación en los genomas y similitud en número de copias. Las barras superiores señalan el estilo trófico de los hongos analizados: morados = ectomicorrízicos (todos del Género *Laccaria*); anaranjados = saprobios (todos de la Familia Psathyrellaceae).

3.4.1 Funciones de *Laccaria* no detectadas en Psathyrellaceae

Los genes CAZy exclusivos de *Laccaria*, no detectados en Psathyrellaceae fueron AA3_4, CE8, GH12, GH13_31, GH30, GH76 y GH95, así como los dímeros AA1_1+AA1_1, GT20+GT20, GH13_1+GH13_1, GH13_8+GH13_8 y GH5_15+GH5_15. Todos los dímeros fueron detectados como monómeros en casi todas las muestras de Psathyrellaceae (excepto GH5_15). La función AA3_4 solo estuvo presente en *L. amethystina*, por el contrario GH30 no se encontró en esta especie pero sí en varias cepas de las otras especies de *Laccaria*. Genes de CE8 se detectaron en todas las especies aunque no en todas las cepas. Genes de GH12 y GH95 fueron detectados en todas las especies pero no en todas las cepas de *L. trichodermophora*. GH13_31 fue exclusiva de la cepa CA15-11 de *L. trichodermophora*, aunque varios miembros de la familia GH13, asignados a otras sub-familias fueron detectados en *Laccaria* y Psathyrellaceae. Finalmente GH76 fue la única función detectada para todas las cepas de *Laccaria* y ninguna de Psathyrellaceae (Figura 4).

Las GH76 son endo- α -mananasas con capacidad de utilizar manano lineal, pero tienen poca actividad en manano ramificado. Este tipo de enzimas están involucradas en la reticulación de lipo-proteínas de la pared celular fúngica actuando como transglicosilasas y manosiltransferasas (CAZyPedia Consortium, 2018). Son comunes en los genomas de patógenos necrotróficos, pero más bien raras en los biotróficos (Zhao *et al.* 2014). Cepas de levaduras patógenas de plantas deficientes en estas funciones son altamente susceptibles a la respuesta inmune vegetal mediada por osmotinas PR-5 (Ibeas *et al.* 2000). Dada la ausencia de esta función en todos los saprobios analizados, y su presencia en todos los ectomicorrízicos, se puede especular que este es uno de los “genes simbióticos” de *Laccaria*, ya que la enzima está relacionada con el “camuflaje molecular”, al enmascarar ramas externas de la quitina ligadas a mananos y d β -glucanos propios de la pared celular fúngica, evadiendo así su detección y atenuando la respuesta inmune de la planta (Gow *et al.* 2017). Lo que a su vez permite el desarrollo de la simbiosis ectomicorrízica (Plett y Martin 2018).

En *L. amethystina* fue detectada la función AA3_4 pero no se detectó en sus congéneres, ni en las especies de Psathyrellaceae. Las enzimas de la subfamilia

AA3_4 son piranosa oxidasas (POX), que participan en facilitar la degradación de compuestos lignocelulósicos. Típicamente se expresan en conjunto con peroxidases (AA2) y monooxigenasas líticas de polisacáridos (AA9), en las puntas de las raíces de ectomicorrizadas probablemente modificando la pared celular de la planta durante la colonización del espacio apoplásico (Kohler *et al.* 2015; Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Estas enzimas son parte del regulón estable independiente a la identidad del hospedero (Plett *et al.* 2015). A diferencia de otras AA3, las POX (AA3_4) están asociadas a vesículas o membranas hifales periplasmáticas, y usan metales y quinonas, que son catalíticamente más eficientes que el oxígeno, como aceptores de iones (Ludwig *et al.* 2018); esto le da a los hongos una actividad fuerte y generalista sobre sustratos lignificados justo sobre la superficie de la hifa.

Por el contrario, *L. amethystina* no presentó las enzimas GH30 (a nivel de familia enzimática), un grupo de xilanasas fúngicas poco específicas, activas tanto en glucuronoxilanos como en arabinoxilanos, que liberan xilosa o xilobiosa de las decoraciones de los xilooligosacáridos de la hemicelulosa y pueden tener actividad transglicosilasa (Espinoza y Eyzaguirre, 2018; Katsimpouras *et al.* 2019). Estas enzimas no se detectaron en las muestras de Psathyrellaceae, pero sí en las otras especies de *Laccaria*. Enzimas similares, clasificadas en la subfamilia GH30_3 fueron detectadas en todas las especies de *Laccaria*, incluyendo *L. amethystina* mientras que GH30_7 solo se detectó en las muestras de Psathyrellaceae. Es difícil interpretar estos resultados, aunque este tipo de enzimas, por actuar sobre la hemicelulosa de la pared primaria, podrían tener funciones simbióticas en la colonización o la organogénesis de la ectomicorriza. Por otra parte, podrían tener alguna participación en la modulación de las comunidades microbianas en la rizósfera mediante la liberación de carbohidratos solubles probióticos.

Las CE8, GH12 y GH95 ausentes en los saprobios en Psathyrellaceae, fueron detectadas en todas las especies de *Laccaria*, aunque no en todas las muestras. Las enzimas CAZy clasificadas en la familia CE8 son metilesterasas de pectina, la cual es el principal componente de la lámina media, y también se encuentra en la pared celular primaria en plantas. Recientemente, se detectó la expresión de CE8 en micelio de *L.*

bicolor S238N-H82 bajo condiciones de agotamiento de nitrógeno, por lo que se asume que esta enzima participa activamente en la obtención de nitrógeno de la materia orgánica del suelo (Nicolás *et al.* 2019). Por otra parte, en los transcriptomas de hongos formadores de micorriza ericoide todas o casi todas sus CE8 fueron sobre expresadas durante la simbiosis (Martino *et al.* 2018). Las enzimas de actividad sobre pectina sobre expresadas en la simbiosis de *L. bicolor* S238N-H82 y *Populus trichocarpa* fueron clasificadas en la familia GH28, no en CE8 (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Sin embargo, la actividad de CE8 anclada a la pared fúngica, en conjunto con expansinas, se ha asociado a la penetración de la hifa en el espacio apoplástico, a pesar de que su expresión es disminuida en la ectomicorriza (Vincent *et al.* 2012). En este trabajo se detectó la presencia de metilesterasas de la familia CE8 en el genoma de la cepa S238N-H82 de *L. bicolor*, pero no en el de la cepa D101-1 de la misma especie, de manera similar, solo dos cepas de *L. trichodermophora* (CA15-75 y EF-36) codificaron esta enzima en sus genomas, mientras que la cepa *L. amethystina* LaAM-08-1 presentó dos genes. El número y diversidad de estas enzimas podría estar relacionado con la capacidad diferencial de colonización de la raíz del hospedero.

Las GH95, son α -L-fucosidasas y α -L-galactosidasas de acción sobre oligosacáridos y arabinoxilano, componentes de la hemicelulosa. Al igual que CE8, GH95, fueron sobre-expresadas en las micorrizas ericoides de *Oidiodendron maius* (Martino *et al.* 2018) y al igual que CE8, están ausentes en los genomas de hongos endófitos como *Xylona heveae* (Gazis *et al.* 2016) aunque esta enzima no se destaca en los transcriptomas o secretomas de *L. bicolor* en investigaciones previas.

Las GH12 son endo- β -1,4-glucanasas capaces de degradar celulosa y son una de las pocas familias de enzimas degradadoras de celulosa remanentes en *Laccaria*. Estas enzimas también presentan actividad hidrolasa sobre xiloglucano. Su sobre expresión ha sido detectada en fases tempranas de la colonización de la raíz (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Se ha observado el relajamiento de la pared celular vegetal por este tipo de enzimas, propias de hongos Ascomycota, en ensayos experimentales (Yuan, 2001). Se ha detectado que sustituciones particulares en la secuencia de aminoácidos del sitio catalítico de las endoglucanasas fúngicas de la

familia GH12 propician modificaciones estructurales, que a su vez transforman xiloglucanasas específicas en glucanasas más generalistas (Damásio *et al.* 2014), por lo que es posible que el análisis evolutivo sobre secuencias y dominios estructurales permita hipotetizar el componente de la pared celular vegetal que es sustrato de las GH12 de *Laccaria* y así aproximarse al entendimiento de su participación en la simbiosis o en la explotación de la materia orgánica en el suelo.

3.4.2 Las funciones CAZy más numerosas en *Laccaria*

En los genomas de *Laccaria*, las 10 funciones CAZy más numerosas fueron CE10, AA3_2, GH18, GH47, GH16, GH5_9, GH79, GT2_Chitin_synth_2, GT90 y AA1_1. Este patrón fue constante al interior de las especies y cepas. En el genoma de *L. amethystina* se detectó un alto número de enzimas CAZy de las actividades CE10 (14 genes), GH16 (10), GH5_9 (10) y AA7 (10). En los genomas de *L. bicolor*, las enzimas CAZy más numerosas fueron CE10 (19 y 17 genes en las cepas D101_1 y S238N-H82 respectivamente), GH16 (13 y 12), GH18 (12 y 11), GH5_9 (10 y 10). En los genomas de *L. trichodermophora* las enzimas CAZy más numerosas fueron CE10 (24, 11, 15 y 15 genes en las cepas CA15-11, CA15-75, CA15-F10 y EF-36 respectivamente), AA3_2 (18, 17, 14, 10), GH47 (15, 14, 13, 12) y GH18 (16, 13, 12, 10).

La enzima CAZy más numerosa en todas las especies y cepas de *Laccaria* fue CE10, aunque Psathyrellaceae presentó contenidos aún mayores (16 ± 4 vs 23 ± 6). CE10 pertenece a la superfamilia de las esterasas de carbohidratos, pero particularmente CE10 es una acetilesterasa. Esta familia fue retirada de la base de datos CAZy dado que la gran mayoría de sus integrantes presentan actividad sobre sustratos distintos a carbohidratos, como ésteres y gliceroles decorativos (CAZylopedia Consortium, 2018). Por ejemplo, una CE10 de *Aspergillus* presenta actividad sobre ésteres de vinilo de cadena corta (derivados de alcohol) y tricilgliceroles (Bourne *et al.* 2004), mientras que otra presenta actividad sobre propilenglicol derivado de ácidos grasos (Oleas *et al.* 2017). Son raros los hongos fitopatógenos que codifican altos contenidos de acetilesterasa de la familia CE10, como *Macrophomina phaseolina* (32 genes, Islam *et al.* 2012), *Corynespora cassiicola* (92 genes, Looi *et al.* 2017) o *Colletotrichum truncatum* (87 genes, Rao y Nandineni, 2017) por lo que se les

considera con estilos infectivos poco habituales. Las especies hemibiotróficas de Oomycetes codifican mayor cantidad de acetiltransferasa CE10 que las biotróficas o necrotroficas (Vries y Vries, 2020), y no presentan un patrón general en cuanto a su transcripción en micelio de vida libre o micelio infeccioso, por lo que se infiere que las distintas especies usan sus acetiltransferasas durante su actividad saprobia o patógena de manera diferencial (Vries y Vries, 2020). Así mismo, la transcripción de estos genes por parte de Oomycetes asociados a plantas es más variable (de una especie a otra) que las patógenas de animales, aunque estadísticamente similares (Vries y Vries, 2020). Ya que las acetiltransferasas de la familia CE10 no fueron expresadas por hongos filamentosos cultivados en presencia de glucosa (a pesar de codificarlos en sus genomas), es posible que estas enzimas desempeñen un papel en la conversión de biomasa relacionado con la modificación de la lignina (Arntzen *et al.* 2020). En *Laccaria*, algunos de estos genes podrían estar participando en la modificación de la pared vegetal en la colonización y organogénesis en conjunto con LPMOs (AA9), mientras que algunos otros en la explotación de la materia orgánica del suelo. CE10 es una familia CAZy poco estudiada y con características enzimáticas que la hacen interesante para su estudio desde la perspectiva de las simbiosis fúngicas, sin embargo ha pasado desapercibida.

La segunda subfamilia CAZy mejor representada en los genomas de *Laccaria* es la actividad auxiliar AA3_2, aunque en comparación con sus parientes saprobios está reducida a un tercio (*Laccaria* = 12 ± 4 , Psathyrellaceae 34 ± 11 genes); cabe destacar que homodímeros de este dominio fueron detectados en *L. trichodermorphora* y no en sus congéneres. De manera general, las enzimas CAZy con actividades auxiliares son familias de proteínas catalíticas que están implicadas en la degradación de las paredes celulares vegetales gracias a su capacidad de ayudar a otras enzimas (GH, PL y CE) a acceder a los carbohidratos que la componen. Particularmente, en AA3_2 se encuentran oxidoreductasas de alcohol arílico (AAO), glucosa oxidasas (GOX) o glucosa deshidrogenasas (GDH) y piranosas deshidrogenasas (PDH). Las AAO son secretadas por hongos Basidiomycetes, particularmente saprobios de pudrición blanca y descomponedores del mantillo, ya que están involucradas en la degradación de la lignina. Los principales sustratos de las AAO son alcoholes bencílicos secretados del

metabolismo secundario, o alcoholes relacionados que se acumulan durante la degradación de la lignina. Durante la reacción de oxidación se forma peróxido de hidrógeno, esencial para la actividad de las peroxidasas degradadoras de lignina. Por su parte GOX y GDH catalizan la oxidación de β -D-glucosa hacia D-glucano-1,5-lactona selectivamente. Ambas enzimas son estructuralmente similares y difíciles de discriminar por su secuencia. Las GOX reducen el oxígeno a peróxido, mientras que las GDH prefieren quinonas o fenoxi-radicales sobre el oxígeno, como aceptores de iones (CAZypedia Consortium, 2018). A estas enzimas fúngicas se les ha atribuido la neutralización de la actividad de la laccasa de la planta durante la colonización de los tejidos vegetales por parte de hongos patógenos (Sygmund *et al.* 2011). Simultáneamente, PDHs catalizan oxidaciones y di-oxidaciones, y se caracterizan por su alta promiscuidad en cuanto a sustratos mono-, oligo- y polisacáridos. Se detectó su sobre expresión en el micelio de *Laccaria* cultivado en condiciones pobres de nitrógeno, por lo que estas funciones podrían ser parte de la oxidación de compuestos recalcitrantes del suelo, en la búsqueda de nitrógeno que se les ha atribuido a los HEM (Nicolás *et al.* 2019).

La familia GH18 agrupa glicosil hidrolasas con actividades catalíticas tanto quitinasas como endo- β -N-acetilglucosaminidasas. Pueden ser endo-quitinasas no procesivas o endo/ecto procesivas, que producen quitobiosa, o productos más largos, pero no actúan sobre trímeros o tetrámeros (Davies *et al.* 2013). Así que estas enzimas CAZy participan en la síntesis, degradación y remodelación de la propia pared hifal e incluso podrían participar en el antagonismo y depredación que *Laccaria* ejerce en contra de otros hongos micotróficos como especies de *Trichoderma* (Werner *et al.* 2002).

Otra glicosil hidrolasa, esta vez en la familia GH47, se detectó entre las enzimas CAZy más numerosas del Género. Son exo- α -1,2-mannosidasas de clase 1, localizadas en retículo endoplásmico y dictiosoma participantes en la maduración de las glicoproteínas, por lo que se consideran de metabolismo central (Williams y Williams 2015).

Las GHs miembros de la familia 16 tienen actividad en los enlaces glicosídicos β -1,4 o β -1,3 en varios glucanos y galactanos, algunos con actividad transglicosilasa como xiloglicosil transferasas o enzimas de reticulación de quitina/beta-glucano (CAZyedia Consortium, 2018). La abundancia de estos genes en los genomas de *Laccaria* los hacen candidatos a una profunda exploración. El gran tamaño y diversidad funcional de la familia GH16 hace difícil su estudio, aunque recientemente fue propuesta una clasificación robusta y más detallada (Viborg *et al.* 2019). En *L. bicolor*, las numerosas GH16 se consideran implicadas en la remodelación, tanto de la pared vegetal como de la pared fúngica (particularmente sobre β -glucanos), y se detectó su sobre expresión en el micelio de vida libre (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Así mismo, estas enzimas podrían ser responsables de características nutracéuticas y/o inmunopotenciadoras de los esporomas de este Género de hongos comestibles silvestres.

Las especies de *Laccaria* codificaron 10 ± 3 genes de GH5_9, mientras que solo 2 o 3 genes para las otras funciones de la familia GH5 (GH5_12, GH5_15, GH5_30 o GH5_50). A diferencia de muchas CAZy, el contenido de GH5_9 en *Laccaria* no es muy distinto al de Psathyrellaceae (12 ± 3), aunque la diversidad funcional de GH5 en Psathyrellaceae asciende a 16 sub-familias. GH5 es una de las familias de glicosil hidrolasas más grandes, son también conocidas como la familia celulasa A y contiene enzimas de actividad sobre pared vegetal y fúngica. GH5_9 son enzimas modificadoras de la pared celular fúngica. Esta subfamilia sólo contiene enzimas fúngicas secretadas o ancladas a la membrana (CAZyedia Consortium, 2018). En ascomycetes han sido identificadas como exo- β -1,3-glucanasas modificadoras de pared celular fúngica (Koseki *et al.* 2018) y productoras de material de la pared (Aspeborg *et al.* 2012). Sin embargo, a estas enzimas se les ha atribuido participación en la colonización de tejidos vegetales por parte de hongos endófitos (Bhatnagar *et al.* 2018; Ehsan *et al.* 2020).

Dentro de la familia GH5, el único representante de la sub-familia GH5_5 se asume como la única enzima de actividad directa sobre celulosa en el genoma de *L. bicolor* S238N-H82, esta se encuentra asociada a un, también único, módulo de unión a carbohidrato de la familia CBM1 (Martin *et al.* 2008). Dicho complejo presentó expresión en la ectomicorriza, se predijo como secretado y su relación filogenética con

las GH5_5 fúngicas fue analizada (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Posteriormente se demostró que la expresión, de la llamada LbGH5-CBM1, está inducida en la ectomicorriza, que tiene su mayor actividad sobre celulosa y galactomananos, pero no sobre pared fúngica y que su localización es la periferia de las hifas que forman la red de Hartig y el manto (Zhang *et al.* 2018a). En este trabajo detectamos al homólogo de LbGH5-CBM1 asignado a la subfamilia GH5_5 y asociado a CMB1 en los genomas de las dos cepas de *L. bicolor* pero solo en la cepa CA15-F10 de *L. trichodermophora*, pero no en *L. amethystina* ni en las otras cepas de *L. trichodermophora*. Recientemente se comprobó la infectividad de las cuatro cepas de *L. trichodermophora* y se detectó que sólo la cepa CA15-F10 fue capaz de desarrollar ectomicorrizas maduras, mientras que las otras tres cepas colonizaron las raíces de *Pinus montezumae* desarrollando estructuras incompletas y poco numerosas (Flores-Almaraz, 2020). Cabe destacar que solo con los programas DIAMOND o HotPep se detectó esta proteína con todos sus dominios (ver: /C3/out/dbCAN/*overview.txt en el repositorio de GitHub) mientras que con HMMer solo se detectaron los dominios GH5_5 (Figura 4).

GH79 es una familia de β -glucuronidasas con actividad sobre arabinogalactanos protéicos, un componente de la pared celular vegetal que en la raíz se han relacionado con la regulación de la colonización por patógenos y mutualistas (Nguema-Ona *et al.* 2013). Las funciones GH79 son típicamente más abundantes en Ascomycetes (Zhao *et al.* 2014) y les da mayores capacidades saprobias y preferencias particulares por sustrato a hongos formadores de micorriza ericoide (Martino *et al.* 2018). Los genomas de *Laccaria* promediaron solo un poco más genes de esta familia que los de Psathyrellaceae (9 ± 3 vs 7 ± 3). La presencia de GH79 en el genoma de *L. bicolor* S238N-H82 fue interpretada como una capacidad para degradar oligosacáridos animales o bacterianos (Martin *et al.* 2008). En particular a los miembros de esta familia subexpresados en la ectomicorriza de *Laccaria* se les atribuye actividad en la defensa contra bacterias patógenas (Veneault-Fourrey *et al.* 2014), al igual que en el genoma de *Russula griseocarnosa* (Yu *et al.* 2020). La expresión de estas enzimas se relacionó con el enriquecimiento de biomasa bacteriana en la materia orgánica del suelo en experimentos metagenómicos (López-Mondéjar *et al.* 2020). Al mismo tiempo, varios

genes GH79 presentan péptidos señal o anclajes glicosilfosfatidilinositol, lo que es característico de enzimas de actividad en la pared fúngica (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Algunos miembros de esta familia fueron sobre expresados en la ectomicorriza de *L. bicolor* S238N-H82, por lo que se sugiere que estos genes GH79, mediante la hidrolización del arabinogalactano protéico, pueden estar implicados en la comunicación entre las células fúngicas y las células de la raíz (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). En las ectomicorrizas de *Hebeloma cylindrosporum* y *Pinus pinaster* también se detectaron GH79 sobreexpresadas (Doré *et al.* 2015), mientras que en las de *Pisolithus microcarpus* y *Eucalyptus grandis*, sus β -glucuronidasas GH79 estuvieron subexpresadas (Plett *et al.* 2020). Así que esta es una de las familias CAZy para las que sí se cuenta con información transcriptómica y proteómica de la simbiosis, lo que permite suponer que algunas enzimas de esta familia participan en la colonización y la organogénesis mientras que otras enzimas participan en la protección contra patógenos bacterianos o el forrajeo en busca de fuentes carbonadas y nitrogenadas en forma de microartrópodos, nemátodos, necromasa y otros hongos del suelo (Perez-Moreno y Read, 2001).

En los genomas de *Laccaria* se detectó un número considerablemente alto de los genes GT2_Chitin_synth_2. Estos genes están presentes en prácticamente todos los hongos (Zhao *et al.* 2013), dado que la quitina es el principal componente de la pared celular fúngica. Expansiones en estos genes fueron detectadas en *L. bicolor* S238N-H82 (Veneault-Fourrey *et al.* 2014), aunque al comparar los contenidos de estos genes en el Género *Laccaria* con sus relativos saprobios se presentaron valores similares (8 ± 2 vs 7 ± 3). Este tipo de genes son abundantes en hongos patógenos dimórficos (Prakash *et al.* 2020) y en hongos micorrízico arbusculares, como *Gigaspora margarita* (38 genes, Venice *et al.* 2020). De entre las enzimas CAZy sobre expresadas durante la infección de *Colletotrichum lupini*, GT2 fue la única que no estuvo relacionada con la degradación de la pared vegetal, principalmente en estados avanzados de la infección, por lo que no se interpretó como relacionada con la formación del apresorio, su estructura de penetración e infección (Dubrulle *et al.* 2020). Las actividades potencialmente simbióticas de las sintetasas de quitina son proteger la pared celular fúngica de la acción de la quitinasa de la planta y evadir la detección y consecuente

activación de su respuesta inmune, en ambos casos a través de la desacetilación de su quitina a quitosano. Sin embargo esta reacción química recae principalmente en enzimas de la familia CE4 por su actividad desacetilasa (Merzendorfer, 2011; Veneault-Fourrey *et al.* 2014), por lo que GT2 más bien podría estar involucrada en la plasticidad de las paredes de la red de Hartig.

Otra glicosil transferasa, esta vez de la familia GT90 fue numerosa en los genomas de *Laccaria*, un poco más que en los de Psathyrellaceae (8 ± 3 vs 6 ± 2). Estas enzimas son xilosiltransferasas y glucosiltransferasas participantes en la síntesis de UDP-xilosa y UDP-glucosa (CAZypedia Consortium, 2018). GT90 se detectó como activa de manera intracelular en el genoma del micorrízico ericoide *Cairneyella variabilis* (Midgley *et al.* 2016) y su expresión aumentó durante la simbiosis entre *Cenococcum geophilum* con *Pinus sylvestris*, pero no con *Populus tremula* × *Populus alba* (de Freitas Pereira *et al.* 2018). Es muy numerosa en el genoma de la levadura endófito *Rhodotorula mucilaginosa* (Sen *et al.* 2019), aunque su actividad en las levaduras patógenas *Cryptococcus neoformans* se ha asociado a la formación de la cápsula, la cual es su principal factor de virulencia. La cápsula está formada de glucuronoxilomananos y galactoxilomananos, y aparentemente tiene una función del “camuflaje molecular” (Griffith *et al.* 2004; Muszewska *et al.* 2018). Tanto GT90 como GT2 son las principales funciones GT en los genomas de Basidiomycetes saprobios basales (Aliyu *et al.* 2020). Por lo tanto, de haber relación de estas funciones con la biología de la simbiosis ectomicorrízica en *Laccaria*, deberá estar asociada a genes particulares, potencialmente involucrada en la evasión de la respuesta inmune vegetal.

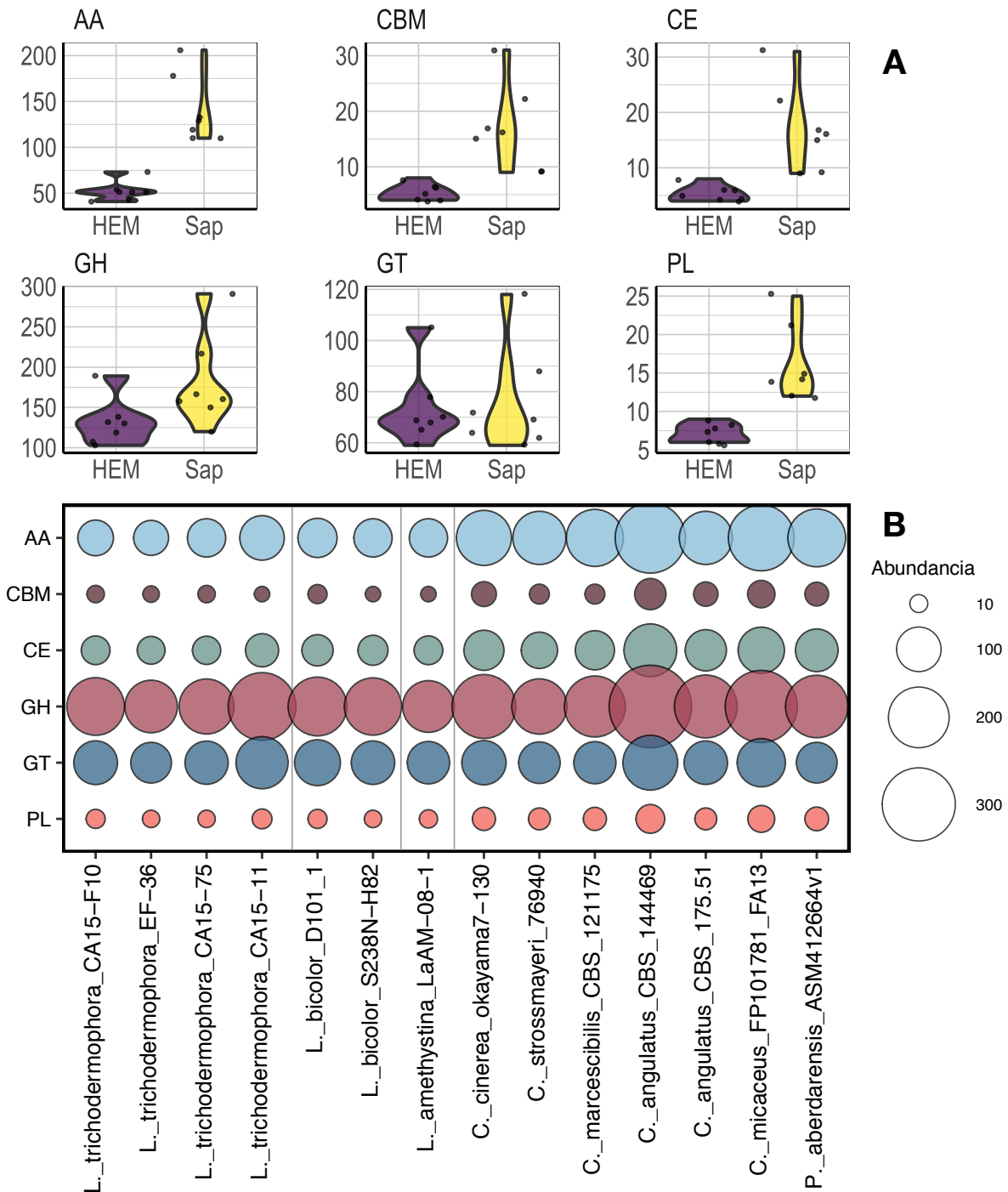
En la familia AA1_1 se encuentran laccasas, oxidoreductasas y oxigenasas multicobre con participación en la degradación de lignina. Aunque en *Laccaria* esta función CAZy es una de las 10 más representadas (7 ± 2) es considerablemente menos numerosa que en Psathyrellaceae (16 ± 6), sin embargo, *L. trichodermophora* presentó genes con doble dominio activo. El hongo micorrízico arbuscular *G. margarita* presenta expandida la familia AA1, la expresa y secreta de manera abundante en simbiosis, particularmente cuando el hongo contiene bacterias endosimbióticas, lo que se ha interpretado como un mecanismo de colonización de la raíz (Venice *et al.* 2020). El

hongo ectomicorrízico *Paxillus involutus* expresa AA1_1 en el suelo, en condiciones experimentales de baja disponibilidad de carbono, pero no a baja disponibilidad de nitrógeno. Al mismo tiempo, tanto *P. involutus* como *L. bicolor* expresan otras laccasas (AA1 no clasificadas a subfamilia) en condiciones de poco nitrógeno y en coordinación con peptidasas y transportadores de nitrógeno (Nicolás *et al.* 2019). En este trabajo solo se detectaron AA1_1 y AA1_2 en los genomas de *Laccaria*, pero la función AA1_2 solo presentó de 1 a 3 genes en cada genoma. Los hongos formadores de micorriza ericoide presentan un juego considerablemente más grande de estos genes en comparación con los hongos ectomicorrízicos e incluso más grandes que la de los saprobios. La mayoría de las laccasas y oxigenasas multicobre de *Laccaria* son homologas a las de *C. cinerea*, algunas se expresan en la ectomicorriza, otras en el micelio y otras en el basidioma, su estructura macroscópica de reproducción sexual (Courty *et al.* 2009), por lo que las potenciales funciones simbióticas no están distribuidas a lo ancho de esta familia CAZy.

3.4.3 Las funciones CAZy de *Laccaria trichodermophora*

Al contrario de lo esperado, la especie *L. trichodermophora* no presentó un número considerablemente menor de enzimas CAZy en sus genomas en comparación con las especies generalistas de *Laccaria*, aunque de manera individual la mayoría de las cepas de *L. trichodermophora* sí presentaron menos enzimas CAZy que cualquiera de las cepas de *L. bicolor*, aunque más que la cepa de *L. amethystina* (Figura 5). Es así que se asume que el número total de genes codificantes para enzimas CAZy, considerando todas las sub-familias enzimáticas, no se relaciona con la preferencia por hospedero en este Género ectomicorrízico, por lo que, de existir esta relación, deberá estar en la presencia, tamaño o identidad de sub-familias particulares.

Figura 5. Comparación de la abundancia de genes codificantes para las seis súper-familias de enzimas CAZy. **(A)** Las gráficas de violín comparan HEM (hongos ectomicorrízicos) contra Sap (saprobios). **(B)** El tamaño de la burbuja representa el número de genes. (AA: Actividades Auxiliares, CBM: Módulos de Unión a Carbohidratos, CE: Carbohidrato Esterasas, GH: Glicosil Hidolasas, GT: Glicosiltransferasas, PL: Liasas de Polisacárido) en los genomas de *Laccaria* y sus parientes saprobios en Psathyrellaceae.



Fueron pocos los genes CAZy exclusivos de *L. trichodermophora*: AA1_1+AA1_1 (lacasas), AA3_2+AA3_2 (celobiosa deshidrogenasa), GH13_1+GH13_1 (amilasas), GH13_31, GH13_8+GH13_8 (amilasas), todos compuestos por homodímeros de funciones compartidas con otras especie de *Laccaria* analizadas e incluso con Psathyrellaceae. Genes con múltiples dominios catalíticos de la misma función incrementan la potencia enzimática, por lo que la multiplicación de estos dominios podría traducirse en mayor afinidad por sustrato y velocidad de reacción.

Al comparar entre cepas de *L. trichodermophora*, se encontraron pocas funciones CAZy restringidas a una sola cepa. La cepa CA15-11 presentó un número de enzimas CAZy alrededor de un tercio mayor al del resto de las muestras de *L. trichodermophora*. Esta cepa fue secuenciada y ensamblada con datos de segunda y tercera generación de secuenciación, y su genoma y exoma también presentaron un tamaño mayor al resto de las muestras. Sin embargo, aunque el genoma de EF-36 fue generado mediante los mismos protocolos y tipo de datos, su genoma, exoma y CAZoma no son mayores a los del resto de las muestras (Tabla 2). A pesar del alto número de enzimas CAZy de la cepa CA15-11, no se detectaron diferencias relevantes en su diversidad funcional (Figura 4). Las únicas seis enzimas CAZy restringidas a la cepa CA15-11 fueron AA1_1+AA1_1, AA3, AA3_2+AA3_2, GH13, GH13_1+GH13_1 y GH13_31. De estas, todas las funciones de doble dominio fueron también detectadas con dominio simple en las demás muestras. Las enzimas AA3 son celobiosa deshidrogenasas, no se detectaron en las otras muestras de *L. trichodermophora* ni en *L. bicolor*, pero sí en *L. amethystina* (tres genes). Las enzimas GH13 son amilasas, solo se presentó una copia en *L. trichodermophora* CA15-11, una en *L. bicolor* D101-1 y una en *P. aberdarensis*. Mientras que las amilasas asignadas a la subfamilia GH13_31 no se encontraron en ninguna de las muestras analizadas a excepción de CA15-11.

Las funciones exclusivas de CA15-75 fueron: β -galactosidasa de GH2 compartidas con todas las muestras excepto con las otras cepas de *L. trichodermophora*; endo- β -N-acetylglucosaminidasas de GH85 también compartidas con todas las muestras excepto con las otras cepas de *L. trichodermophora* ni con *L. bicolor* S238N-H82; y β -galactosyltransferasas de GT28, detectadas solo en *L. bicolor* y *Coprinopsis*.

Las únicas dos funciones CAZy restringidas a CA15-F10 fueron GH5_5, una celulasa simbiótica sobre la que ya se discutió su potencial relación con capacidades infectivas de esta cepa; y GH25 una lisozima compartida con *L. bicolor* D101-1. La familia de GH25 son lisozimas conocidas como del tipo de *Chalaropsis*, por haber sido descubiertas en dicho hongo (Hash *et al.* 1967), aunque se han encontrado con mayor frecuencia en bacterias y bacteriófagos (Taylor y Davies, 2011). Estas enzimas típicamente escinden en el enlace glicosídico β -1,4, entre ácido N-acéilmurámico y al N-acetilglucosamina del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Esta enzima se ha reportado acompañada de un motivo de secreción, por lo que se le atribuye una posición extracelular (Taylor y Davies, 2011). Por consiguiente, funciones relacionadas con actividad antibacteriana o con el acceso a nutrientes propios de las paredes bacterianas o sus contenidos celulares. Enzimas CAZy de la familia GH25 han sido detectadas en más de 40 genomas de hongos (Zhao *et al.* 2014). Las GH25 caracterizadas muestran baja identidad (18-51%), pero son muy conservadas en su dominio funcional. En contraste, los residuos de asociación al sustrato no son conservados (Korczynska *et al.* 2010). GH25 como función exclusiva de *L. trichodermophora* CA15-F10 no es un resultado robusto, pues esta lisozima ha sido detectada en el transcriptoma y secretoma de *L. bicolor* S238N-H82 en estudios previos (Vincent *et al.* 2012) y se sobre expresa en la ectomicorriza. En *H. cylindrosporum* es sobre expresada un poco en la micorriza *in vitro* pero mucho más en la ectomicorriza en vivero (Doré *et al.* 2015) donde se espera una mayor y más compleja diversidad microbiana. Estas lisozimas podrían ser exploradas biotecnológicamente como antimicrobianos alternativos.

Un hallazgo interesante, fue la ausencia de genes codificantes para glucosidasas de la familia GH152 en todos los genomas de *L. trichodermophora*, mientras que estuvieron presentes en todos los genomas de la especie hermana *L. bicolor* y en la mayoría de los saprobios cercanos. En plantas estas enzimas son comunes, conocidas como “thaumatin-like”, presentan actividad de unión a la calosa (Li *et al.* 2020; Trudel *et al.* 1998), un componente efímero de la pared celular vegetal, típicamente encontrado en células crecientes, dañadas o bajo estrés biótico. En *Populus trichocarpa* su expresión fue abundante en el floema y en las zonas de expansión radial del cambium

(Kumar *et al.* 2019), lo que confirma su participación en el metabolismo de la calosa en tejidos en desarrollo. Cepas de *Pleurotus* mutantes en factores transcripcionales relacionados a la pudrición blanca mostraron una baja en la expresión de varias de sus GH152 (Wu *et al.* 2020), lo que hace evidente la participación de estas enzimas en la actividad saprobia en hongos de esa naturaleza. Enzimas GH152 de *Lentinula edodes*, un patógeno de encinos, demostraron actividad endo-1,3- β -D-glucosidasa y degradación de lentinanos (β -glucanos) de la propia pared fúngica (Sakamoto *et al.* 2006) lo que respalda la participación de enzimas vegetales de esta familia como parte de la respuesta inmune antifúngica, aunque también se les pueden atribuir el papel de disimular la pared celular fúngica durante la infección. En contraste, y a pesar de que los β -glucanos son integrales de pared en prácticamente todos los hongos, no todos los hongos codifican GH152 (Blatzer *et al.* 2020), y en contra de lo esperado, no se encontraron estas enzimas en el repertorio de glucosidasa usadas por bacterias que se alimentan de biomasa fúngica (Starke *et al.* 2020). La familia GH152 fue recientemente incorporada a la base de datos CAZy (Garron *et al.* 2019), lo que podría explicar que no se mencione en los estudios enfocados a enzimas CAZy en la simbiosis de *L. bicolor* (ej., Veneault-Fourrey *et al.* 2014) sin embargo, la afinidad molecular y su participación fisio-ecológica en la organogénesis y la interacción planta-hongo, en otros modelos, hacen a GH152 un candidato para descartar su participación como uno de los genes simbióticos.

Del mismo modo, ortólogos de genes codificantes para enzimas CAZy de las familias GH28 y GH16 fueron detectados como ausentes en los genomas de *L. trichodermophora*, pero presentes en otras muestras de *Laccaria*. Ya se mencionó que algunas de las poligalacturonasas GH28 de *L. bicolor* S238N-H82 se detectaron sobre expresadas en su ectomicorriza madura o temprana con *P. trichocarpa*, a lo que los autores llamaron “remodelación suave (de la pared celular vegetal) a través de la hidrólisis de la pectina (homogalacturonano)” (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Las poligalacturonasas GH28 son parte del llamado “regulón estable”, un grupo de genes que se expresan a niveles homogéneamente altos a través del desarrollo de la ectomicorriza tanto en *P. trichocarpa* como en *Pseudotsuga menziesii* (Plett *et al.* 2015). Poligalacturonasas GH28 están incluidas entre las funciones CAZy remanentes

de ancestros saprobios, pero neofuncionalizadas a la remodelación de la raíz para la penetración de la lamina media y la colonización de los espacios intercelulares por la red de Hartig, no solo por *L. bicolor* (Kohler *et al.* 2015; Martin *et al.* 2008), si no también por otros Basidiomycetes (Doré *et al.* 2015) y Pezizomycetes (Martin *et al.* 2010; Murat *et al.* 2018). Es decir, la ausencia de este gene, de ser ortólogo a GH28 de *L. bicolor* S238N-H82 definitivamente impacta en la actividad simbiótica de *L. trichodermophora*.

Es imprescindible mencionar que, como en el caso de la glucosiltransferasa de xilano (GH16) laccasas (AA1_1) o NADPH: p-benzoquinona oxidoreductasa (AA6), no todos los genes anotados con una función CAZy particular estuvieron agrupados en un solo grupo de ortólogos, es así que en este análisis las cepas de *L. bicolor* presentaron dos o tres genes de GH28, los saprobios hasta nueve, y las cepas CA15-11 y CA15-F10 de *L. trichodermophora* presentaron un gene. Cave reiterar que de entre las cuatro cepas estudiadas, CA15-F10 fue la única que generó ectomicorrizas maduras en las raíces de *P. montezumae* (Flores-Almaraz, 2020).

En la batería genética codificante para enzimas CAZy del Género *Laccaria* se detectó evidencia de su estilo de vida ectomicorrízico, al compararla con sus parientes saprobios asimbióticos. Las endo- α -mananasas (GH76), sintetetas de quitina (GT2) y glicosil transferasas (GT90), mediante la remodelación de pared fúngica, despliegan un “camuflaje molecular” que le permite a *Laccaria* soportar y evadir la respuesta inmune del hospedero e incluso inhibirla mediante oxidoreductasas (AA3_2). Metílesterasas (CE8) y endo- β -1,4-glucanasas (GH12) propician de la penetración de la hifa en el espacio apoplástico, y permiten el relajamiento de la pared celular vegetal. Quitinasas (GH18) participan en el antagonismo y depredación que *Laccaria* ejerce en contra de otros hongos micotróficos de la rizósfera. Incluso, fueron detectadas enzimas involucradas en características nutraceuticas del Género (GH16). Mientras que β -glucuronidasas (GH79) y otras enzimas CAZy parecen participar en dos frentes al intervenir en la colonización y organogénesis de la ectomicorriza con algunos de sus miembros, y en la explotación de nutrientes del suelo con otros miembros, principalmente en la búsqueda y transporte de compuestos nitrogenados. No se

detectaron funciones exclusivas en *L. trichodermophora*, aunque al comparar el estrato accesorio de los genomas de las especies de *Laccaria*, la ausencia de ortólogos de poligalacturonasas (GH28) en varias cepas compromete su capacidad simbiótica, particularmente la cepa CA15-F10 fue la única para la que se pudo detectar el ortólogo de la endoglucanasa con modulo de unión LbGH5-CBM1, asignado a la subfamilia GH5_5, lo que podría explicar la pobre capacidad colonizadora detectada para el resto de las cepas (Flores-Almaraz, 2020).

3.5 Los péptidos efectores de *Laccaria trichodermophora*

El Género *Laccaria* codificó para 367 SSPs intracelulares en total (Figura 6), OrthoFinder asignó 252 genes (68.7%) a 62 grupos de ortólogos, lo que hace evidente el gran número de genes huérfanos (>30% de SSPs intracelulares del Género) y/o la rápida tasa evolutiva que actúa sobre este tipo de genes. Solo 5 de estos grupos de ortólogos contó con genes representantes de todas las especies (Figura 6B) y de estos grupos solo uno estuvo enteramente compuesto por genes de copia única. *Laccaria trichodermophora* codificó entre 932 (CA15-11) y 512 (EF-36) péptidos secretados, de los cuales entre 156 (CA15-F10) y 80 (EF-36) fueron predichos como péptidos efectores (SSPs). De entre los efectores predichos, 78 (CA15-F10) y 44 (EF-36) son secretados al interior de la célula vegetal; estas cantidades fueron equiparables a las contenidas en los genomas de las otras especies de *Laccaria* (Figura 6).

Los SSPs intracelulares de *L. trichodermophora* se agruparon en 58 grupos de ortólogos (solo 4 grupos de ortólogos menos que en el Género), 9 de estos grupos se consideran parte del genoma *core* de la especie (5 de ellos son también parte del core de *Laccaria*) integrados por máximo 3 parálogos. La cepa CA15-F10 presentó 8 grupos de ortólogos de SSPs intracelulares únicos, mientras que el resto de las cepas presentaron 2 (Figura 7A). Además, entre 31 (CA15-F10) y 11 (EF-36) SSPs no fueron agrupadas y representan genes huérfanos. El alto contenido de SSPs intracelulares en CA15-F10 podría estar relacionado con sus capacidades simbióticas superiores a las de las otras cepas de *L. trichodermophora*.

Figura 6. Comparación del contenido de péptidos secretados, efectores y péptidos efectores de localización no apoplástica en los genomas de *Laccaria*. Los números en gris sobre las barras indican el número total de péptidos secretados o de efectores, los números en negro dentro de las barras indican el número de péptidos secretados o efectores excluyendo los efectores o no apoplásticos según el caso. En el eje X se presentan las cepas de *Laccaria* con el Género y especie abreviados.

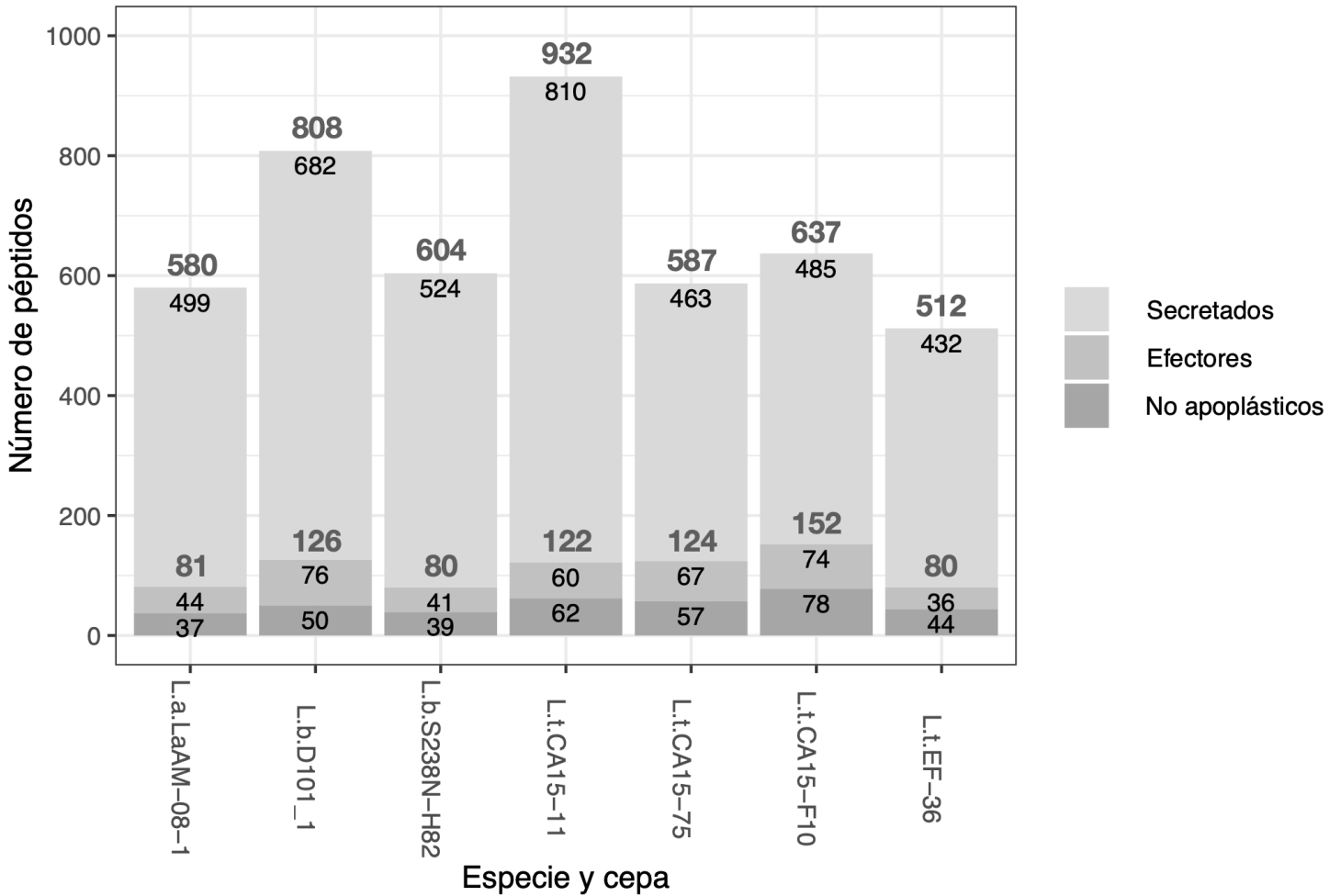
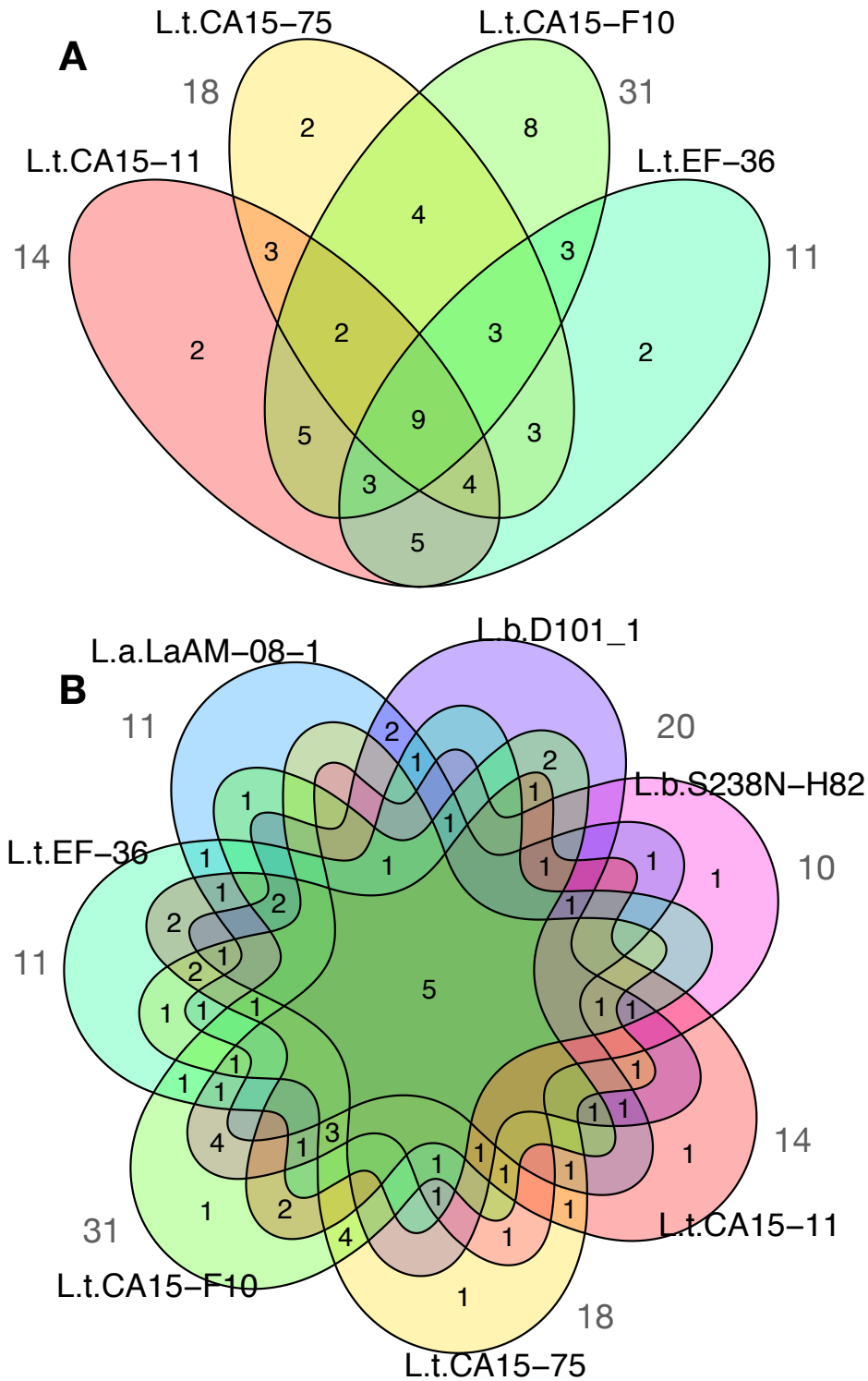


Figura 7. Intersecciones entre los grupos de ortólogos de péptidos efectores no apoplásticos de **(A)** varias cepas de *L. trichodermophora* y **(B)** siete cepas de *Laccaria*. Los números grises fuera de los círculos representan la cantidad de genes no asignados a grupos de ortólogos. La ortología entre los péptidos fue detectada con OrthoFinder.



Dada la naturaleza no enzimática de este tipo de proteínas, no se cuenta con información que permita inferir su función. Es imprescindible destacar la dificultad de su predicción, no solo por los programas específicamente destinados a detectar el secretoma o los efectores, si no desde la predicción de los modelos génicos. En este trabajo, mediante tblastn, detectamos una o dos copias homólogas a MiSSP7 de *L. bicolor* en los ensamblajes genómicos de todas las muestras (Tabla 3), por el contrario, este importante péptido no fue detectado (con blastp) en el grupo de péptidos efectores, ni en el secretoma, ni siquiera en el proteoma de ninguna de las muestras, lo que indica que nuestros protocolos de predicción de genes no fueron capaces de detectarlos.

4 Conclusiones

1. Se confirmó que a pesar de las diferencias genómicas entre las cepas de *L. trichodermophora*, forman un grupo monofilético bien soportado, hermano a la especie *L. bicolor*.

2. Al analizar los genomas de *L. trichodermophora* de manera pan-genómica se hizo evidente una gran cantidad de genes cepa específicos y un genoma *core* de alrededor de 6,756 grupos de genes ortólogos. El genoma accesorio comprendió entre el 18 y el 29% de los genes predichos.

3. Se detectaron 549 grupos de ortólogos de *Laccaria* ausentes en *L. trichodermophora*, entre los cuales menos de la mitad tuvieron algún tipo de anotación funcional.

4. La batería genética codificante para enzimas CAZy del *L. trichodermophora* es muy similar a la reportada para *L. bicolor* con genes simbióticos involucrados en la evasión y confrontación del sistema inmune vegetal, la colonización y organogénesis de la ectomicorriza, la competencia contra otros microorganismos rizosféricos y la explotación de la materia orgánica nitrogenada de difícil acceso en el suelo.

5. Sin embargo, varias cepas de *L. trichodermophora* no presentaron genes centrales en el desarrollo de la simbiosis, como es el caso de la poligalacturonasas GH28 y la endoglucanasa GH5_5 con modulo de unión a carbohidrato CBM1, ambas funciones presentes en la cepa CA15-10, lo que en conjunto con su elevada batería de SSPs intracelulares se relaciona con su mayor capacidad de colonización.

6. Dada la naturaleza de los análisis de genómica comparada, todos los hallazgos planteados demandan un respaldo experimental.

5 Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM IN-210217. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención otorgada al primer autor, por la asesoría bioinformática a Diana Hernández Oaxaca, Alicia Mastretta Yañes y Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán, y al grupo UATI por la administración de los servidores del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, donde se realizaron todos los análisis.

6 Referencias

Aliyu, H., Gorte, O., Zhou, X., Neumann, A., & Ochsenreither, K. (2020). In silico proteomic analysis provides insights into phylogenomics and plant biomass deconstruction potentials of the Tremelalles. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 226.

Ángeles-Argáiz, R. E., Carmona-Reyes, I. A., Quintero-Corrales, C. A., Medina-Macías, F. J., Blancas-Cabrera, A., Valdez-Cruz, N. A., ... & Garibay-Orijel, R. (2020). From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*. *Fungal biology*, 124(3-4), 205-218.

- Ángeles-Argáiz, R., Aguirre-Beltrán, L. F. L., Quintero-Corrales, C. A., Trujillo-Roldán, M. A., Castillo-Ramírez, S., Garibay-Orijel, R. (en preparación). Long-read sequencing do not collapse the genome assemblies of *Laccaria trichodermophora* strains (CA15-11, CA15-75, CA15-F10 and EF-36) and highlights intraspecific genome diversity. *Genomes, Genes and Genetics*.
- Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., ... & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, 37(4), 420-423.
- Arntzen, M. Ø., Bengtsson, O., Várnai, A., Delogu, F., Mathiesen, G., & Eijsink, V. G. (2020). Quantitative comparison of the biomass-degrading enzyme repertoires of five filamentous fungi. *Scientific reports*, 10(1), 1-17.
- Aspeborg, H., Coutinho, P. M., Wang, Y., Brumer, H., & Henrissat, B. (2012). Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC evolutionary biology*, 12(1), 186.
- Badet, T., Oggenfuss, U., Abraham, L., McDonald, B. A., & Croll, D. (2020). A 19-isolate reference-quality global pangenome for the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *BMC biology*, 18(1), 1-18.
- Banks, A. M., Barker, G. L., Bailey, A. M., & Foster, G. D. (2017). Draft genome sequence of the coprinoid mushroom *Coprinopsis strossmayeri*. *Genome Announcements*, 5(14).
- Barreto-Bergter, E., Pinto, M. R., & Rodrigues, M. L. (2004). Structure and biological functions of fungal cerebroside. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76(1), 67-84.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., ... & Studholme, D. J. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 32(suppl_1), D138-D141.

- Bhatnagar, J. M., Sabat, G., & Cullen, D. (2018). The foliar endophyte *Phialocephala scopiformis* DAOMC 229536 secretes enzymes supporting growth on wood as sole carbon source. *BioRxiv*, 354365.
- Blatzer, M., Beauvais, A., Henrissat, B., & Latgé, J. P. (2020). Revisiting Old Questions and New Approaches to Investigate the Fungal Cell Wall Construction. *The Fungal Cell Wall: An Armour and a Weapon for Human Fungal Pathogens*, 331-369.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., ... & Weber, T. (2019). antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic acids research*, 47(W1), W81-W87.
- Bourne, Y., Hasper, A. A., Chahinian, H., Juin, M., de Graaff, L. H., & Marchot, P. (2004). *Aspergillus niger* protein EstA defines a new class of fungal esterases within the α/β hydrolase fold superfamily of proteins. *Structure*, 12(4), 677-687.
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 12(1), 59-60.
- CAZypedia Consortium. (2018). Ten years of CAZypedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes. *Glycobiology*, 28(1), 3-8. from http://www.cazypedia.org/index.php?title=Main_Page&oldid=13510.
- Chen, E. C., Mathieu, S., Hoffrichter, A., Sedzielewska-Toro, K., Peart, M., Pelin, A., ... & Corradi, N. (2018). Single nucleus sequencing reveals evidence of inter-nucleus recombination in arbuscular mycorrhizal fungi. *Elife*, 7, e39813.
- Courty, P. E., Hoegger, P. J., Kilaru, S., Kohler, A., Buee, M., Garbaye, J., ... & Kües, U. (2009). Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 182(3), 736-750.
- Damásio, A. R., Rubio, M. V., Oliveira, L. C., Segato, F., Dias, B. A., Citadini, A. P., ... & Squina, F. M. (2014). Understanding the function of conserved variations in the

- catalytic loops of fungal glycoside hydrolase family 12. *Biotechnology and bioengineering*, 111(8), 1494-1505.
- Davies G., Juge N, Eijsink V (2013). Glycoside Hydrolase Family 18. in CAZypedia, available at URL <http://www.cazy.org/GH25.html>.
- De Freitas Pereira, M., Veneault-Fourrey, C., Vion, P., Guinet, F., Morin, E., Barry, K. W., ... & Peter, M. (2018). Secretome analysis from the ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum*. *Frontiers in microbiology*, 9, 141.
- Di Battista, C., Selosse, M. A., Bouchard, D., Stenström, E., & Le Tacon, F. (1996). Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycological Research*, 100(11), 1315-1324.
- Doré, J., Perraud, M., Dieryckx, C., Kohler, A., Morin, E., Henrissat, B., ... & Gay, G. (2015). Comparative genomics, proteomics and transcriptomics give new insight into the exoproteome of the basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* and its involvement in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 208(4), 1169-1187.
- Dubrulle, G., Picot, A., Madec, S., Corre, E., Pawtowski, A., Baroncelli, R., ... & Pensec, F. (2020). Deciphering the Infectious Process of *Colletotrichum lupini* in *Lupin* through Transcriptomic and Proteomic Analysis. *Microorganisms*, 8(10), 1621.
- Ehsan, T., Reza, R. N., Das, A., Ahmed, O., Baten, A. A., Ferdous, A. S., ... & Khan, H. (2020). Genome and secretome analysis of jute endophyte *Grammothele lineata* strain SDL-CO-2015-1: Insights into its lignocellulolytic structure and secondary metabolite profile. *Genomics*.
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2015). OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome biology*, 16(1), 1-14.
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2017). STRIDE: species tree root inference from gene duplication events. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3267-3278.

- Emms, D. M., & Kelly, S. (2018). STAG: species tree inference from all genes. *BioRxiv*, 267914.
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2019). OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome biology*, 20(1), 1-14.
- Espinoza, K., & Eyzaguirre, J. (2018). Identification, heterologous expression and characterization of a novel glycoside hydrolase family 30 xylanase from the fungus *Penicillium purpurogenum*. *Carbohydrate research*, 468, 45-50.
- Flores-Almaraz, V. (2020). Viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo vegetativo ectomicorrízico de *Laccaria trichodermophora*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 103 pp.
- Frith, M. C. (2011). A new repeat-masking method enables specific detection of homologous sequences. *Nucleic acids research*, 39(4), e23-e23.
- Garron, M. L., & Henrissat, B. (2019). The continuing expansion of CAZymes and their families. *Current opinion in chemical biology*, 53, 82-87.
- Gazis, R., Kuo, A., Riley, R., LaButti, K., Lipzen, A., Lin, J., ... & Hibbett, D. S. (2016). The genome of *Xylona heveae* provides a window into fungal endophytism. *Fungal biology*, 120(1), 26-42.
- Gene Ontology Consortium. (2006). The gene ontology (GO) project in 2006. *Nucleic acids research*, 34(suppl_1), D322-D326.
- González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Pérez-Carrascal, O. M., Vinuesa, P., Juárez, S., ... & Romero, D. (2019). Phylogenomic *Rhizobium* species are structured by a continuum of diversity and genomic clusters. *Frontiers in microbiology*, 10, 910.
- Gow, N. A., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *The fungal kingdom*, 267-292.
- Griffith, C. L., Klutts, J. S., Zhang, L., Lavery, S. B., & Doering, T. L. (2004). UDP-glucose dehydrogenase plays multiple roles in the biology of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51669-51676.

- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., ... & Smirnova, T. (2014). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic acids research*, 42(D1), D699-D704.
- Hash, J. H., & Rothlauf, M. V. (1967). The N, O-Diacetylmuramidase of *Chalaropsis* Species I. purification and crystallization. *Journal of Biological Chemistry*, 242(23), 5586-5590.
- Hazard, C., Kruitbos, L., Davidson, H., Mbow, F. T., Taylor, A. F., & Johnson, D. (2017). Strain identity of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* is more important than richness in regulating plant and fungal performance under nutrient rich conditions. *Frontiers in microbiology*, 8, 1874.
- Hortal, S., Plett, K. L., Plett, J. M., Cresswell, T., Johansen, M., Pendall, E., & Anderson, I. C. (2017). Role of plant–fungal nutrient trading and host control in determining the competitive success of ectomycorrhizal fungi. *The ISME journal*, 11(12), 2666-2676.
- Ibeas, J. I., Lee, H., Damsz, B., Prasad, D. T., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., ... & Narasimhan, M. L. (2000). Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *The Plant Journal*, 23(3), 375-383.
- Islam, M. S., Haque, M. S., Islam, M. M., Emdad, E. M., Halim, A., Hossen, Q. M. M., ... & Alam, M. (2012). Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC genomics*, 13(1), 1-16.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., ... & Pesseat, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W429-W432.
- Kang, H., Chen, X., Kempainen, M., Pardo, A. G., Veneault-Fourrey, C., Kohler, A., & Martin, F. M. (2020). The small secreted effector protein MiSSP7. 6 of *Laccaria*

- bicolor* is required for the establishment of ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental microbiology*, 22(4), 1435-1446.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Katsimpouras, C., Dedes, G., Thomaidis, N. S., & Topakas, E. (2019). A novel fungal GH30 xylanase with xylobiohydrolase auxiliary activity. *Biotechnology for biofuels*, 12(1), 120.
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., ... & Martin, F. (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature genetics*, 47(4), 410-415.
- Kohler, A., & Martin, F. (2016). The evolution of the mycorrhizal lifestyles—a genomic perspective. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, 87-106.
- Korczynska, J. E., Danielsen, S., Schagerlöf, U., Turkenburg, J. P., Davies, G. J., Wilson, K. S., & Taylor, E. J. (2010). The structure of a family GH25 lysozyme from *Aspergillus fumigatus*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(9), 973-977.
- Korf, I. (2013). SNAP: Semi-HMM-based Nucleic Acid Parser. Ian Korf homepage: <http://homepage.mac.com/iankorf>.
- Koseki, T., Ishikawa, M., Kawasaki, M., & Shiono, Y. (2018). β -Diglycosidases from microorganisms as industrial biocatalysts: biochemical characteristics and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(20), 8717-8723.
- Kumar, V., Hainaut, M., Delhomme, N., Mannapperuma, C., Immerzeel, P., Street, N. R., ... & Mellerowicz, E. J. (2019). Poplar carbohydrate-active enzymes: whole-genome annotation and functional analyses based on RNA expression data. *The Plant Journal*, 99(4), 589-609.

- Kuo, A., Kohler, A., Martin, F. M., & Grigoriev, I. V. (2014). Expanding genomics of mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in microbiology*, 5, 582.
- Li, Y. Q., Lei, L., Nong, X., Tang, H., & Luo, C. B. (2020). Plant carbohydrate-active enzymes in bamboo *Neosinocalamus affinis*: identification, classification and function in lignocellulose biosynthesis in herbivore defence. *Nordic Journal of Botany*, 38(3).
- López-Mondéjar, R., Tláškal, V., Větrovský, T., Štursová, M., Toscan, R., da Rocha, U. N., & Baldrian, P. (2020). Metagenomics and stable isotope probing reveal the complementary contribution of fungal and bacterial communities in the recycling of dead biomass in forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 148, 107875.
- Looi, H. K., Toh, Y. F., Yew, S. M., Na, S. L., Tan, Y. C., Chong, P. S., ... & Kuan, C. S. (2017). Genomic insight into pathogenicity of dematiaceous fungus *Corynespora cassicola*. *PeerJ*, 5, e2841.
- Ludwig R. y Kracher D. (2018). Auxiliary Activity Family 3. in CAZyedia, available at URL <http://www.cazy.org/GH25.html>.
- McInerney, J. O., McNally, A., & O'Connell, M. J. (2017). Why prokaryotes have pangenomes. *Nature microbiology*, 2(4), 1-5.
- Majoros, W. H., Pertea, M., & Salzberg, S. L. (2004). TigrScan and GlimmerHMM: two open source ab initio eukaryotic gene-finders. *Bioinformatics*, 20(16), 2878-2879.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., ... & Grigoriev, I. V. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452(7183), 88-92.
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P. M., Jaillon, O., ... & Wincker, P. (2010). Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*, 464(7291), 1033-1038.
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Veneault-Fourrey, C., & Hibbett, D. S. (2016). Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 14(12), 760-773.

- Martino, E., Morin, E., Grelet, G. A., Kuo, A., Kohler, A., Daghino, S., ... & Perotto, S. (2018). Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist*, 217(3), 1213-1229.
- McCarthy, C. G., & Fitzpatrick, D. A. (2019). Pan-genome analyses of model fungal species. *Microbial genomics*, 5(2).
- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *European journal of cell biology*, 90(9), 759-769.
- Midgley, D. J., Rosewarne, C. P., Greenfield, P., Li, D., Vockler, C. J., Hitchcock, C. J., ... & Tran-Dinh, N. (2016). Genomic insights into the carbohydrate catabolism of *Cairneyella variabilis* gen. nov. sp. nov., the first reports from a genome of an ericoid mycorrhizal fungus from the southern hemisphere. *Mycorrhiza*, 26(4), 345-352.
- Miyauchi, S., Kiss, E., Kuo, A., Drula, E., Kohler, A., Sánchez-García, M., ... & Martin, F. M. (2020). Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. *Nature communications*, 11(1), 1-17.
- Möller, M., & Stukenbrock, E. H. (2017). Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 756.
- Montoya, A., Kong, A., Garibay-Orijel, R., Méndez-Espinoza, C., Tulloss, R. E., & Estrada-Torres, A. (2014). Availability of wild edible fungi in La Malinche National Park, México. *Journal of Mycology*, 2014.
- Mueller, G. M. (1992). Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. Chicago: Field Museum of Natural History.
- Mueller, G. M., & Strack, B. A. (1992). Evidence for a mycorrhizal host shift during migration of *Laccaria trichodermorphora* and other agarics into neotropical oak forests. Evidencia de un cambio de hospedero micorrízico durante la migración de *Laccaria trichodermorphora* y otros agaricales dentro de bosques de robles neotropicales. *Mycotaxon.*, 45, 249-256.

- Murat, C., Payen, T., Noel, B., Kuo, A., Morin, E., Chen, J., ... & Martin, F. M. (2018). Pezizomycetes genomes reveal the molecular basis of ectomycorrhizal truffle lifestyle. *Nature ecology & evolution*, 2(12), 1956-1965.
- Muszewska, A., Piłsyk, S., Perlińska-Lenart, U., & Kruszewska, J. S. (2018). Diversity of cell wall related proteins in human pathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 4(1), 6.
- Nguema-Ona, E., Viché-Gibouin, M., Cannesan, M. A., & Driouich, A. (2013). Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. *Trends in plant science*, 18(8), 440-449.
- Nicolás, C., Martin-Bertelsen, T., Floudas, D., Bentzer, J., Smits, M., Johansson, T., ... & Tunlid, A. (2019). The soil organic matter decomposition mechanisms in ectomycorrhizal fungi are tuned for liberating soil organic nitrogen. *The ISME journal*, 13(4), 977-988.
- Oleas, G., Callegari, E., Sepúlveda, R., & Eyzaguirre, J. (2017). Heterologous expression, purification and characterization of three novel esterases secreted by the lignocellulolytic fungus *Penicillium purpurogenum* when grown on sugar beet pulp. *Carbohydrate research*, 443, 42-48.
- Osmundson, T. W., Cripps, C. L., & Mueller, G. M. (2005). Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. *Mycologia*, 97(5), 949-972.
- Palmer, J., Funannotate. <https://funannotate.readthedocs.io/en/latest/index.html>. Copyright 2017 Revision 05b18107.
- Pellegrin, C., Daguerre, Y., Ruytinx, J., Guinet, F., Kemppainen, M., Frey, N. F. D., ... & Veneault-Fourrey, C. (2019a). *Laccaria bicolor* MiSSP8 is a small-secreted protein decisive for the establishment of the ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental microbiology*, 21(10), 3765-3779.
- Pellegrin, C., Martin, F., & Veneault-Fourrey, C. (2019b). Molecular signalling during the ectomycorrhizal symbiosis. In *Biology of the Fungal Cell* (pp. 95-109). Springer, Cham.

- Pellitier, P. T., & Zak, D. R. (2018). Ectomycorrhizal fungi and the enzymatic liberation of nitrogen from soil organic matter: why evolutionary history matters. *New Phytologist*, 217(1), 68-73.
- Perez-Moreno, J., & Read, D. J. (2001). Nutrient transfer from soil nematodes to plants: a direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant, Cell & Environment*, 24(11), 1219-1226.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785.
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., ... & Martin, F. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8299-8304.
- Plett, J. M., Gibon, J., Kohler, A., Duffy, K., Hoegger, P. J., Velagapudi, R., ... & Martin, F. (2012). Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(3), 199-209.
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., ... & Martin, F. (2011). A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology*, 21(14), 1197-1203.
- Plett, K. L., Kohler, A., Lebel, T., Singan, V. R., Bauer, D., He, G., ... & Anderson, I. C. (2020). Intra-species genetic variability drives carbon metabolism and symbiotic host interactions in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Environmental Microbiology*.
- Plett, J. M., & Martin, F. M. (2018). Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *The Plant Journal*, 93(4), 729-746.

- Plett, J. M., & Martin, F. (2015). Reconsidering mutualistic plant–fungal interactions through the lens of effector biology. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 45-50.
- Plett, J. M., & Martin, F. (2011). Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics*, 27(1), 14-22.
- Plett, J. M., Tisserant, E., Brun, A., Morin, E., Grigoriev, I. V., Kuo, A., ... & Kohler, A. (2015). The mutualist *Laccaria bicolor* expresses a core gene regulon during the colonization of diverse host plants and a variable regulon to counteract host-specific defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3), 261-273.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., ... & Balesdent, M. H. (2016). A game of hide and seek between avirulence genes AvrLm4-7 and AvrLm3 in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*, 209(4), 1613-1624.
- Plissonneau, C., Hartmann, F. E., & Croll, D. (2018). Pangenome analyses of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveal the structural basis of a highly plastic eukaryotic genome. *BMC biology*, 16(1), 1-16.
- Prakash, H., Karuppiyah, P., Al-Dhabi, N., Prasad, G. S., Badapanda, C., Chakrabarti, A., & Rudramurthy, S. M. (2020). Comparative genomics of *Sporothrix* species and identification of putative pathogenic-gene determinants. *Future Microbiology*, 15(15), 1465-1481.
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one*, 5(3), e9490.
- Quintero-Corrales, C., Ángeles-Argáiz, R., Jaramillo-Correa, J. P., Piñero, D., Garibay-Orijel, R., & Mastretta-Yanes, A. (2020). Allopatric instead of parapatric divergence in an ectomycorrhizal fungus (*Laccaria trichodermorphora*) in tropical sky-islands. *Fungal Ecology*, 47, 100966.
- Rambaut, A. (2012). FigTree v1. 4.

- Ramos, A., Bandala, V. M., & Montoya, L. (2017). A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relict forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycoKeys*, (27), 77.
- Rao, S., & Nandineni, M. R. (2017). Genome sequencing and comparative genomics reveal a repertoire of putative pathogenicity genes in chilli anthracnose fungus *Colletotrichum truncatum*. *PLoS One*, 12(8), e0183567.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1), D227-D233.
- Reverchon, F., del Pilar Ortega-Larrocea, M., & Pérez-Moreno, J. (2012). Soil factors influencing ectomycorrhizal sporome distribution in neotropical forests dominated by *Pinus montezumae*, Mexico. *Mycoscience*, 53(3), 203-210.
- Rocafort, M., Fudal, I., & Mesarich, C. H. (2020). Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Current opinion in plant biology*, 56, 9-19.
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New microbes and new infections*, 7, 72-85.
- Sakamoto, Y., Watanabe, H., Nagai, M., Nakade, K., Takahashi, M., & Sato, T. (2006). *Lentinula edodes* *tlg1* encodes a thaumatin-like protein that is involved in lentinan degradation and fruiting body senescence. *Plant physiology*, 141(2), 793-801.
- Sen, D., Paul, K., Saha, C., Mukherjee, G., Nag, M., Ghosh, S., ... & Tripathy, S. (2019). A unique life-strategy of an endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1—a comparative genomics viewpoint. *DNA Research*, 26(2), 131-146.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210-3212.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018a). Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular plant pathology*, 19(9), 2094-2110.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018b). ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytologist*, 217(4), 1764-1778.
- Stajich, J. E., Wilke, S. K., Ahrén, D., Au, C. H., Birren, B. W., Borodovsky, M., ... & Deng, J. (2010). Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11889-11894.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stanke, M., & Waack, S. (2003). Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. *Bioinformatics*, 19(suppl_2), ii215-ii225.
- Starke, R., Morais, D., Větrovský, T., Lopez Mondejar, R., Baldrian, P., & Brabcová, V. (2020). Feeding on fungi: genomic and proteomic analysis of the enzymatic machinery of bacteria decomposing fungal biomass. *Environmental Microbiology*, 22(11), 4604-4619.
- Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. (2009). Fungal effector proteins. *Annual review of phytopathology*, 47, 233-263.
- Stewart, R. D., Auffret, M. D., Warr, A., Walker, A. W., Roehe, R., & Watson, M. (2019). Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery. *Nature biotechnology*, 37(8), 953-961.
- Sygmund, C., Klausberger, M., Felice, A. K., & Ludwig, R. (2011). Reduction of quinones and phenoxy radicals by extracellular glucose dehydrogenase from *Glomerella cingulata* suggests a role in plant pathogenicity. *Microbiology*, 157(11), 3203-3212.

- Taylor, E and Davies, G. (2011). Glycoside Hydrolase Family 25. in CAZypedia, available at URL <http://www.cazy.org/GH25.html>.
- Tedersoo, L., & Brundrett, M. C. (2017). Evolution of ectomycorrhizal symbiosis in plants. In *Biogeography of mycorrhizal symbiosis* (pp. 407-467). Springer, Cham.
- Tedersoo, L., & Smith, M. E. (2017). Ectomycorrhizal fungal lineages: detection of four new groups and notes on consistent recognition of ectomycorrhizal taxa in high-throughput sequencing studies. In *Biogeography of mycorrhizal symbiosis* (pp. 125-142). Springer, Cham.
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., ... & Martin, F. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(50), 20117-20122.
- Toro, K. S., & Brachmann, A. (2016). The effector candidate repertoire of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *Bmc Genomics*, 17(1), 1-13.
- Trudel, J., Grenier, J., Potvin, C., & Asselin, A. (1998). Several thaumatin-like proteins bind to β -1, 3-glucans. *Plant physiology*, 118(4), 1431-1438.
- UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, 47(D1), D506-D515.
- Van Dongen S. Graph clustering by flow simulation (2000). PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.
- Varga, T., Krizsán, K., Földi, C., Dima, B., Sánchez-García, M., Sánchez-Ramírez, S., ... & Andreopoulos, W. (2019). Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. *Nature ecology & evolution*, 3(4), 668-678.
- Veneault-Fourrey, C., Commun, C., Kohler, A., Morin, E., Balestrini, R., Plett, J., ... & Martin, F. (2014). Genomic and transcriptomic analysis of *Laccaria bicolor* CAZome reveals insights into polysaccharides remodelling during symbiosis establishment. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 168-181.

- Venice, F., Ghignone, S., Salvioli di Fossalunga, A., Amselem, J., Novero, M., Xianan, X., ... & Bonfante, P. (2020). At the nexus of three kingdoms: the genome of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* provides insights into plant, endobacterial and fungal interactions. *Environmental microbiology*, 22(1), 122-141.
- Viborg, A. H., Terrapon, N., Lombard, V., Michel, G., Czjzek, M., Henrissat, B., & Brumer, H. (2019). A subfamily roadmap of the evolutionarily diverse glycoside hydrolase family 16 (GH16). *Journal of Biological Chemistry*, 294(44), 15973-15986.
- Vincent, D., Kohler, A., Claverol, S., Solier, E., Joets, J., Gibon, J., ... & Martin, F. (2012). Secretome of the free-living mycelium from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Journal of proteome research*, 11(1), 157-171.
- de Vries, S., & de Vries, J. (2020). A Global Survey of Carbohydrate Esterase Families 1 and 10 in Oomycetes. *Frontiers in genetics*, 11, 756.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G. I. I., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., ... & Blattner, F. R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 17020-17024.
- Werner, A., Zadworny, M., & Idzikowska, K. (2002). Interaction between *Laccaria laccata* and *Trichoderma virens* in co-culture and in the rhizosphere of *Pinus sylvestris* grown in vitro. *Mycorrhiza*, 12(3), 139-145.
- Wheeler, T. J., & Eddy, S. R. (2013). nhmmer: DNA homology search with profile HMMs. *Bioinformatics*, 29(19), 2487-2489.
- Williams R y Williams S (2015). Glycoside Hydrolase Family 47. en CAZyedia, available at URL <http://www.cazy.org/GH25.html>.
- Wilson, A. W., Hosaka, K., & Mueller, G. M. (2017). Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist*, 213(4), 1862-1873.

- Wolfe, B. E., Tulloss, R. E., & Pringle, A. (2012). The irreversible loss of a decomposition pathway marks the single origin of an ectomycorrhizal symbiosis. *PloS one*, 7(7), e39597.
- Wu, H., Nakazawa, T., Takenaka, A., Kodera, R., Morimoto, R., Sakamoto, M., & Honda, Y. (2020). Transcriptional shifts in delignification-defective mutants of the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *FEBS letters*, 594(19), 3182-3199.
- Wyss, T., Masclaux, F. G., Rosikiewicz, P., Pagni, M., & Sanders, I. R. (2016). Population genomics reveals that within-fungus polymorphism is common and maintained in populations of the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *The ISME journal*, 10(10), 2514-2526.
- Yu, F., Song, J., Liang, J., Wang, S., & Lu, J. (2020). Whole genome sequencing and genome annotation of the wild edible mushroom, *Russula griseocarnosa*. *Genomics*, 112(1), 603-614.
- Yuan, S., Wu, Y., & Cosgrove, D. J. (2001). A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. *Plant Physiology*, 127(1), 324-333.
- Zhang, F., Anasontzis, G. E., Labourel, A., Champion, C., Haon, M., Kemppainen, M., ... & Martin, F. (2018a). The ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* releases a secreted β -1, 4 endoglucanase that plays a key role in symbiosis development. *New Phytologist*, 220(4), 1309-1321.
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., ... & Yin, Y. (2018b). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W95-W101.
- Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., & Xu, J. R. (2014). Erratum to: comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC genomics*, 15(1), 6.

Discusión general y conclusiones

La necesidad de un bioinoculante vegetativo forestal y las implicaciones de la selección del germoplasma

El fracaso de los programas de reforestación no se puede atribuir a un solo factor técnico, pero ofrecer a las plantas producidas en vivero la posibilidad de sobrevivir al trasplante a campo gracias a la micorrización controlada es una responsabilidad científica y social con implicaciones económicas y ambientales importantes. Los bioinoculantes a base de esporas contienen una gran cantidad de propágulos latentes y genéticamente diversos, que al ser producidos a partir de esporomas silvestres son una muy buena estrategia para los viveros situados en las plantaciones (Repác *et al.* 2011). Los inóculos vegetativos ofrecen la posibilidad de su producción en altos volúmenes, pero ya que consisten en micelio activo de una cepa en particular, su formulación, las técnicas para su aplicación en la planta y la selección de las cepas son determinantes.

El objetivo de las plantaciones influye en el diseño de los procesos e inóculos empleados. En cualquier caso, es necesaria la compatibilidad entre las especies usadas como bioinóculos, las plantas, y las condiciones climáticas y edáficas de los sitios de plantación. Por otra parte, la micorrización controlada puede estar destinada a la aforestación de suelos degradados, sin “vocación forestal”, o la propagación de hongos comestibles silvestres. En estos escenarios, el suelo carece de microorganismos competentes y tanto las plantas como los hongos son artificialmente introducidos al ambiente. Se ha reportado que hongos de los Géneros *Amanita*, *Laccaria* o *Suillus* producen abundantes fructificaciones en este tipo de sistemas forestales manejados (ej., Barroetaveña *et al.* 2007; Hayward *et al.* 2015; Karkouri *et al.* 2006; Nuñez *et al.* 2009; Policelli *et al.* 2019). Además, es justo en estos sistemas donde la propagación de hongos ectomicorrízicos comestibles han dado mejores resultados (ej., Guerin-Laguet *et al.* 2020; Morte *et al.* 2020).

En los casos en que los inoculantes ectomicorrízicos estén destinados a la conservación, no se espera que las especies inoculadas permanezcan a largo plazo, se busca impulsar la dinámica sucesional y permitir que la biota nativa eventualmente ocupe su nicho, esto es una de las metas finales de la restauración ecológica

(Argüelles-Moyao y Garibay-Orijel, 2018; Young, 2020). En los sitios forestales ya existen comunidades microbianas, generalmente muy diversas en los suelos y raíces de las plantas vecinas (Argüelles-Moyao *et al.* 2017; Álvarez-Manjarrez *et al.* 2018; García-Guzmán *et al.* 2017). Estos hongos nativos suelen desplazar a los hongos inoculados en las plantas de reforestación (ej., Flores-Rentería *et al.* 2018; Hortal *et al.* 2009). No se deberá perder de vista que el objetivo de los bioinoculantes ectomicorrízicos es la sobrevivencia de la planta durante los primeros años posteriores al trasplante a campo. Una planta que logró establecerse, puede entonces prescindir del inoculante particular y hacer simbiosis con los microorganismos nativos del suelo, mismos que seguramente podrán satisfacer sus necesidades nutricionales y de toda índole. Es así que la potencial debilidad (en cuanto a la diversidad genética) del la “monoinoculación” es eventualmente eliminada por la diversidad natural.

El uso de microorganismos nativos a los sitios de reforestación no solo tiene el efecto de evitar la introducción artificial (Dickie *et al.* 2016). Se ha demostrado que *Laccaria* desarrolla una simbiosis más efectiva (en cuanto a la nutrición de la planta) cuando sus socios vegetales son especies simpátricas (Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019). *Laccaria*, como otros HEM, son pioneros o de etapas tempranas de la sucesión ecológica (ej. De la Bastide *et al.* 1994; Nara *et al.* 2003). En este trabajo se desarrollaron las bases para la producción de inóculo, destinado a especies particulares de pino, habitantes de sitios forestales, particulares también. Sin embargo, el uso de consorcios biológicos ofrece un panorama más completo y exitoso para las reforestaciones de conservación. Es decir, lo que se busca es eventualmente inocular varias especies de plantas pioneras con diferentes hongos capaces de asociarse a plantas en la segunda o tercera etapa de la sucesión, y hacerlo de manera longitudinal y escalonada en tiempo y espacio, para así promover la “migración asistida” (Argüelles-Moyao y Garibay-Orijel, 2018).

En cualquier caso, si la intención es la micorrización controlada de números elevados de plantas, usar inóculos vegetativos seleccionados a partir de la microbiota local permitirá una homogénea micorrización y la obtención de resultados esperados en vivero y en campo, evitando además la problemática de la introducción accidental de

agentes desconocidos, como lo son otros hongos ectomicorrízicos competidores, microorganismos patógenos (que atacan la planta de vivero o las plantas silvestres en las plantaciones), e incluso artrópodos comensales y potenciales plagas (Dickie *et al.* 2016; Repáč *et al.* 2011). La prospección y correcta selección del germoplasma permitirá además, la valorización de los recursos microbianos locales y la detección/ uso de cepas “elite” con capacidades productivas, simbióticas u organolépticas deseadas o superiores. Al mismo tiempo, es por sí misma una línea innovadora que permitirá la independencia económica y la soberanía tecnológica ante los inóculos importados, mismos que son producidos con especies exóticas a los bosques mexicanos.

Los primeros bioinoculantes, compuestos de bacterias diazotróficas “rizobios” (aplicadas a la agricultura) tienen más de cien años (Santos *et al.* 2019). Desde entonces, la correcta selección de cepas y especies ha sido un tema relevante (Drew *et al.* 2012). Se han detectado diferencias en la infectividad (capacidad de colonización) o en la efectividad (grado o potencia del efecto benéfico o antagónico) de cepas usadas como inoculantes microbianos, tanto de hongos como de bacterias, aplicados al control de plagas, al manejo de enfermedades y a la promoción del crecimiento vegetal en la agricultura y el manejo forestal. En algunos modelos, las diferencias fenotípicas de las cepas fueron ligadas con la presencia/ausencia o regulación de genes o procesos moleculares (Chen *et al.* 2018; Fields *et al.* 2021; Mathieu *et al.* 2018; Rohrllich *et al.* 2018; Valero-Jiménez *et al.* 2016). El potencial biotecnológico de *Laccaria trichodermophora* como bioinoculante forestal está dado por la suma de algunas de sus características ecológicas y la posibilidad del cultivo axénico de su micelio. Sin embargo el estudio de la genética de estas características y las diferencias entre cepa y cepa sigue siendo un reto, principalmente en especies no modelo.

En el segundo Capítulo de esta tesis, el micelio de la cepa EF-36 de *L. trichodermophora* demostró que puede crecer y producir abundante biomasa al ser cultivado en medio líquido, lo que hace evidente la viabilidad de su producción masiva como bioinoculante vegetativo forestal (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020). En los cultivos

ensayados, el micelio de *L. trichodermophora* creció en forma de colonias en medio sólido en caja Petri, y desarrolló distintas coloraciones y morfologías al ser sometido a condiciones de cultivo y distintos nutrientes. Al ser cultivado en medio líquido en matraz agitado alcanzó sus máximos crecimientos cuando la transferencia de oxígeno fue mayor, dada por la hidrodinámica del matraz “bafleado”. Mientras que en condiciones similares (de transferencia volumétrica de oxígeno, pH, medio de cultivo y concentración de la fuente de carbono) en biorreactor de columna de burbujas, el tamaño de los *pellets* fue tan alto que la transferencia de nutrientes (entre ellos el oxígeno) se redujo, por lo que los cultivos no pudieron igualar la producción de biomasa alcanzada en matraz (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020). Tanto la formulación del inoculante para su aplicación y la comprobación de su infectividad se investigaron posteriormente.

En los genomas de las cepas de *L. trichodermophora* fueron detectadas importantes diferencias, que van desde el tamaño del genoma (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación: Capítulo III de esta tesis), expansiones en familias particulares de genes y número e identidad de péptidos y enzimas involucradas en las actividades simbióticas (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación: Capítulo IV de esta tesis). Estas diferencias en el contenido génico pueden permanecer enmascaradas cuando el ensamble genómico se hace a partir de secuencias cortas, por lo que con el uso de secuencias largas como las de PacBio, las regiones repetidas no se colapsan y el verdadero tamaño de las familias génicas puede ser detectado (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación: Capítulo III de esta tesis; Rhie *et al.* 2021; Whibley *et al.* 2021; Yahav y Privman, 2019). Sin embargo, independientemente del tipo de secuenciación y de los métodos de ensamble, algunas cepas de *L. trichodermophora* presentaron mayores contenidos de péptidos potencialmente efectores y de enzimas CAZy relacionadas con la simbiosis (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación: Capítulo IV de esta tesis). Al analizar estos genomas de manera comparativa, se detectó la ausencia de dos importantes enzimas involucradas en la colonización de la raíz en los genomas de las cepas no infectivas; así mismo la cepa infectiva (CA15-F10) presentó un número mayor de péptidos predichos potencialmente efectores. Las enzimas fueron una poligalacturonasa GH28 y la endoglucanasa GH5_5 con módulo de unión a carbohidrato CBM1, ambas con funciones simbióticas reconocidas en *L. bicolor* S238N-H83 mediante genómica,

transcriptómica, bioensayos e ingeniería genética (Plett *et al.* 2015; Veneault-Fourrey *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2018).

Es así que gracias a las herramientas genómicas fue posible atribuir un fenotipo simbiótico a la ausencia de genes particulares, sin embargo la secuenciación genómica podría ser innecesaria en la mayoría de los proyectos prospectivos. El diseño de primers o sondas de hibridación puede ser una alternativa más inmediata para la detección de genes conocidos. La comprobación directa de los fenotipos en interacción deberá siempre ser un requisito temprano, sin embargo, al tratar con grupos grandes de cepas, particularmente para la generación de inoculantes ectomicorrízicos vegetativos, el aislamiento, la propagación axénica y el montaje de los bioensayos suele ser retador, y consume mucho tiempo y espacio.

La ploidía, la actividad de transposones y la domesticación microbiana podría explicar las diferencias en los tamaños genómicos de *Laccaria trichodermophora*

La calidad de un ensamblaje genómico y su integridad dependen tanto de las metodologías de secuenciación y ensamble, como de las características intrínsecas del propio genoma (Alkan 2011). Los hongos Basidiomycetes, como *L. trichodermophora*, desarrollan sus esporomas a partir de micelio secundario, el cual presenta células binucleadas. Ambos núcleos son haploides, pero pueden tener una composición alélica idéntica (homocarión) o distinta (heterocarión) (Ulloa y Hanlin, 2000). Este fenómeno complica el ensamble genómico, ya que con el uso de secuencias cortas pareadas (Illumina o BGI), tanto los alelos como los genes parálogos (o regiones duplicadas por actividad de transposones) suelen estar colapsados en los ensamblajes genómicos, lo que resulta en ensamblajes haploides altamente fragmentados y de tamaños reducidos (Smits 2019). Por otra parte, mediante el uso de secuencias largas (PacBio o NanoPore) las regiones duplicadas o repetitivas se sostienen, pero además de la necesidad del pulido con secuencias cortas (Montoliu-Nerin *et al.* 2020), las distintas versiones alélicas también se ensamblan de manera independiente, lo que resulta en ensamblajes genómicos de tamaños exagerados, debido a falsas duplicaciones (Rhie *et*

al. 2021; Whibley *et al.* 2021; Yahav y Privman, 2019), por lo que protocolos enfocados a la limpieza de este tipo de artefactos son indispensables (Roach *et al.* 2018). Además, se ha estimado que el tamaño del genoma de algunos hongos ectomicorrízicos, particularmente especies de *Amanita*, es mayor que lo propuesto por sus ensamblajes genómicos, esto debido a su complejidad en términos de las regiones repetidas de los genomas eucariontes, lo que a su vez es promovido por la actividad de transposones (Hess *et al.* 2014; 2018).

Para ofrecer una hipótesis robusta de ensamblaje genómico, en el tercer Capítulo de esta tesis se usaron múltiples métodos bioinformáticos y datos de secuenciación de segunda y tercera generación, de manera independiente o híbrida. Es importante reiterar que el micelio cultivado de donde se extrajo el DNA para la secuenciación genómica, fue aislado a partir del contexto de esporomas silvestres, por lo que los aislamientos obtenidos consisten en micelio secundario producto de la plasmogamia y con composición genética nuclear diploide $n + n$. Se decidió obtener aislamientos puros de esta fuente debido a que es precisamente el micelio secundario (y no el micelio primario haploide producto de la germinación de una basidiospora meiótica) el tejido con el que los Basidiomycetes ectomicorrízicos colonizan las raíces de sus hospederos vegetales (Smith y Read, 2010). Además, obtener cultivos puros a partir del contexto de los esporomas es más sencillo en comparación con los cultivos monospóricos. Ya que los protocolos de cultivos monospóricos parten de diluciones de esporas, mismas que no siempre germinan en medio nutritivo, para posteriormente ensayar cruces hasta encontrar genets compatibles, que se “apareen” y generen micelio secundario infectivo.

Además de detectar el efecto del tipo de secuenciación y los métodos de ensamblaje sobre la hipótesis genómica y la predicción funcional, en el Capítulo III se detectó una importante diversidad genómica intraespecífica, evidente en primera instancia en el tamaño del genoma (Tabla 1). Simultáneamente, al predecir el tamaño esperado por profundidad de *k-meros*, se obtuvieron resultados contrastantes entre cepas, pero consistentes entre métodos (CA15-F10 = 139.26, CA15-11 = 134.42, CA15-75 =

129.18, EF-36 = 65.1 Mbp promedio) (Ángeles-Argáiz *et al.* en proceso: Capítulo III de esta tesis).

Tabla 1. Tamaños de los ensamblajes genómicos de las cuatro cepas de *Laccaria trichodermophora*.

Cepa y ensamble	CA15-11	CA15-11 enmascarado	CA15-75	CA15-75 enmascarado	CA15-F10	CA15-F10 enmascarado	EF-36	EF-36 enmascarado
Tamaño del ensamble (>= 0 bp)	111,901,891	111,822,287	94,069,926	82,555,314	96,960,722	75,974,168	59,062,912	58,859,258
Tamaño del ensamble >= 1000 bp)	111,901,891	111,822,287	75,346,584	75,343,489	65,267,308	65,266,201	59,062,912	58,859,258
Número de contigs (>= 0 bp)	876	873	71,988	28,921	114,118	34,046	77	72
Número de contigs (>= 1000 bp)	876	873	18,845	18,842	18,694	18,693	77	72
Tamaño del contig mayor	1,052,634	1,052,634	127,703	127,703	91,720	91,720	5,316,676	5,316,676
GC (%)	46.67	46.67	47.04	47.04	47.21	47.21	46.84	46.87
N50	241,037	241,037	5,359	5,364	4,036	4,043	1,464,168	1,464,168
L50	133	133	3,932	3,924	4,809	4,800	12	12
# N's por 100 kbp	349.37	349.62	140.46	140.61	97.97	98.06	91.36	91.67

El “enmascaramiento” del ensamble se realizó con el *pipeline* FunAnnotate (Palmer y Stajich, 2017) y es el reportado en el Capítulo IV, mientras que el no enmascarado se usó en el Capítulo III.

Tomando en cuenta que sólo para las cepas CA15-11 y EF-36 se contó con datos de secuenciación de tercera generación, y que los resultados de estimación del tamaño por profundidad de *k-mero* son congruentes con los ensamblajes de estas dos cepas, se asume que los ensamblajes genómicos de las cepas CA15-75 y CA15-F10 están colapsados por efecto del uso de lecturas cortas. Sin embargo, con los análisis realizados en el Capítulo III, las causas de esta drástica diferencia en tamaños genómicos no pudieron ser explicados.

Por lo anterior se plantean dos posibles hipótesis: 1) La cepa EF-36 es un homocarión con un ensamble (híbrido) de tamaño correcto, las otras tres son heterocariones, de las cuales solo CA15-11 tiene un ensamble (híbrido) de tamaño correcto, mientras que para CA15-75 y CA15-F10 se obtuvieron ensamblajes colapsados por efecto del uso de lecturas cortas; 2) La expansión de los genomas en tres de las cuatro cepas es efecto de actividad reciente de transposones, que impactó de manera diferencial las poblaciones del centro del país.

La primera hipótesis, de sostenerse, significa que el ensamble de la cepa CA15-11 no es un ensamble haploide y en él se representan los dos núcleos heterocariones de manera independiente. En otras palabras, todo el ensamble de CA15-11 está duplicado y los métodos de limpieza y “enmascaramiento” ejecutados no fueron efectivos. De sostenerse la segunda, significa que la diversidad genómica intraespecífica de *L. trichodermophora* es enorme, y que este fenómeno podría extrapolarse a *L. bicolor* o a otros Basidiomycetes con ecologías o historias evolutivas similares.

A manera de perspectiva, para rechazar estas hipótesis, serán necesarios análisis bioinformáticos y experimentos citológicos. La medición de contenido de DNA nuclear mediante citometría de flujo ofrece un dato puntual de la cantidad de cromatina contenida en cada núcleo (Bourge *et al.* 2018; Tavares *et al.* 2014). Herramientas bioinformáticas de la genómica de poblaciones, como VCFtools (Danecek *et al.* 2011), ipyrad (Eaton y Overcast, 2020) o detectRUNS (Biscarini *et al.* 2018), en conjunto con los datos de genómica poblacional de *L. trichodermophora* (Quintero-Corrales *et al.* 2020), ofrecen la posibilidad de evaluar métricas sobre el contenido alélico, cantidad de genes parálogos e índices de heterocigotidad. Así mismo, la anotación y predicción de regiones repetidas y transposónicas deberá llevarse a cabo con el uso de herramientas como RepeatMasker (Tarailo-Graovac y Chen, 2009) o SGA-PreQC (Simpson, 2013).

Además de la variación natural del tamaño genómico entre las cepas de *L. trichodermophora*, ya sea inducida por su ploidía o no, el manejo en laboratorio del germoplasma pudo propiciar una reducción de su contenido genómico. Como se mencionó, todas las cepas aquí secuenciadas fueron aisladas a partir de esporomas silvestres. Se ha detectado que los esporomas de algunos Basidiomycetes

ectomicorrízicos, como los del Género *Clavulina*, presentan perfiles isotópicos relacionados a la obtención de nutrientes del suelo mientras que los perfiles de otros esporomas son claramente relacionados a la nutrición biotrófica micorrízica (Pérez-Pazos *et al.* 2019). La evidencia sobre el continuo saprotrofría-biotrofia se sigue acumulando (Smith *et al.* 2017), sin embargo son muy raros los ejemplos en el que un hongo de hábito ectomicorrízico logre completar su ciclo de vida en independencia a su hospedero vegetal (Sanmee *et al.* 2010). Por lo que se asume que los esporomas silvestres de *L. trichodermophora* debieron estar asociados a las raíces de un pino hospedero, para poder fructificar. Es decir, en estado silvestre, las cuatro muestras de *L. trichodermophora* tuvieron capacidad simbiótica. En contraste, en el laboratorio, solo una de ellas (CA15-F10) desarrolló ectomicorrizas *in vitro* (Flores-Almaraz, 2020) y presentó un juego genético simbiótico completo (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación: Capítulo IV de esta tesis), lo que pudo ser resultado de la domesticación de estas cepas en laboratorio.

Se entiende por “domesticación” a la modificación genética y fenotípica de un organismo al ser aislado de su población ancestral con la intención de mejorar sus características útiles. En microbiología, se ha usado el término para referirnos a estos procesos desde una perspectiva dirigida a cepas particulares y en escalas de tiempo operativo para la ciencia o la industria. Particularmente, es deseable que una cepa microbiana logre sobrevivir en cultivo puro y/o mejorar sus capacidades fermentativas después de haber sido aislada de un ambiente natural. Los principales ejemplos de la domesticación de microorganismos se refieren a levaduras o bacterias de las bebidas o alimentos fermentados mediante mecanismos genómicos como *pseudogenización*, hibridación interespecífica, duplicación genética y transferencia horizontal (Gibbons y Rinker, 2015; Steensels *et al.* 2019). Hongos macroscópicos comestibles, como algunos representantes cultivados de los Géneros *Lentinula* (Smith, 2021) o *Auricularia* (Zhao *et al.* 2019) también muestran evidencias de domesticación en sus genomas. La tradición milenaria del cultivo de hongos comestibles explica estos ejemplos, aunque también se han documentado cambios genómicos en cepas microbianas aisladas del campo y mantenidas en laboratorio a escalas de tiempo mucho menores (Clark y Anderson, 2004; Valenzuela-Miranda *et al.* 2020).

En los ambientes naturales, los microbios se enfrentan a condiciones abióticas lábiles y a una intensa competencia por los nutrientes, pues los nutrientes se distribuyen de forma heterogénea en tiempo y espacio. En contraste, los medios de cultivo en laboratorio representan un nicho estable, abundante, simplificado y sin competencia en el que la selección artificial pronto impulsa la optimización del genoma microbiano (Gibbons y Rinker, 2015). Particularmente, microorganismos simbióticos (mutualistas o parásitos) pierden genes relacionados con su estilo de nutrición biotrófica o con la colonización y comunicación con el hospedero, lo que ha sido usado por ejemplo para el desarrollo de vacunas a partir de microorganismos patógenos atenuados, por ejemplo (Valenzuela-Miranda *et al.* 2020; Toida, 2020). Además, a diferencia de los procesos “tradicionales de domesticación microbiana” como la que se dio durante el desarrollo de la cerveza o el yogurt, donde una población es sometida a un nicho particular y la crianza selectiva refiere a una población o comunidad microbiana con un abierto intercambio genético al interior de la población y con poblaciones ambientales (Steensels *et al.* 2019), en condiciones de laboratorio se aísla una cepa pura y se somete a un nicho estable, por lo que los procesos evolutivos plausibles en esas condiciones no son dados por las dinámicas poblacionales, sino por la reproducción clonal y vegetativa sin intercambio ni flujo genético.

Las cepas de *L. trichodermophora* fueron aisladas en los años 2013 y 2015 para estudiar su comportamiento en cultivo puro y la estructura de sus poblaciones silvestres, pero fue hasta los años 2018 y 2019 que se realizó la secuenciación de sus genomas y los ensayos de micorrización controlada. Además, estas cepas no sobrevivieron a los ensayos de criopreservación para el mantenimiento de un banco de trabajo (Ángeles-Argáiz, 2015), por lo que su mantenimiento se logró solo mediante resiembras seriales con periodicidad semestral. Por lo que además de la variación natural en el tamaño y contenido genómico, estas cepas pudieron ser sujeto de la pérdida de genes simbióticos como resultado de las presiones selectivas que el cultivo continuo y las resiembras seriales ejercen sobre los genomas. Es importante mencionar que no hay una relación directa con el tamaño del genoma y la capacidad simbiótica de las cepas o con la velocidad de crecimiento o acumulación de biomasa (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020; Ángeles-Argáiz *et al.* en proceso: Capítulo III de esta tesis).

Por otro lado, la cepa con el genoma más pequeño (EF-36) sí es dos años más vieja que el resto. Se ha reportado la reducción del tamaño del genoma bacteriano 10% menor al tamaño original después de 200 pases de cultivo (Valenzuela-Miranda *et al.* 2020). Así que se asume que las resiembras consecutivas pueden tener un efecto importante en la pérdida de genes funcionales, pero no es el principal factor que explica la variación en tamaño genómico. Por otra parte, para analizar el efecto del número de pases o la edad de la cepa en su contenido génico, sería necesario el diseño experimental expreso para generar los genomas del esporoma silvestre, la cepa en cultivo puro y un número de cepas sometidos a distinta cantidad de pases de cultivo serial, acompañado de experimentos de micorrización controlada con distintos subcultivos.

La preferencia de los hongos ectomicorrízicos por su hospedero

Una de las características a tomar en cuenta durante la prospección del germoplasma ectomicorrízico para el desarrollo de bioinoculantes forestales es la compatibilidad con el hospedero (Dulmer *et al.* 2014; Repáč, 2011). Aunque al compararlos con hongos formadores de micorriza arbuscular, los HEM puedan parecer específicos, muchas especies son generalistas, ya que se asocian a diversas familias, Géneros y especies de plantas (Tedersoo y Brundrett, 2017; Tedersoo y Smith, 2017). Un bioinoculante de un hongo generalista puede funcionar para distintas especies forestales, pero el uso de especies “especialistas” limita la dispersión de los inóculos introducidos. Sin embargo, el salto de hospedero ha sido un motor evolutivo para la diversificación de los HEM (Ángeles-Argáiz y Garibay-Orijel, 2019), por lo que a diferencia de los hongos patógenos (Borah *et al.* 2018), son raros los ejemplos de HEM con rangos de hospederos muy estrechos (Geml *et al.* 2009; Kennedy *et al.* 2011; Lofgren *et al.* 2020; Looney *et al.* 2016; Polme *et al.* 2017).

Son varios los factores que determinan la preferencia por hospedero de un HEM. Desde la perspectiva ecológica, las características edáficas, la sucesión de las comunidades fúngicas y vegetales y la exclusión competitiva explican este fenómeno (Corrales *et al.* 2021; Essene *et al.* 2017; Kennedy *et al.* 2020; Nara, 2008; Truong *et al.*

2019). Desde la perspectiva genómica, la identidad de los péptidos efectores y algunos metabolitos secundarios han demostrado implicaciones en la comunicación con hospederos particulares (Lofgren *et al.* 2020; Plett *et al.* 2015). Otro grupo genético con un potencial efecto en la preferencia por hospedero son las enzimas CAZy, involucradas en la colonización de los tejidos vegetales (Veneault-Fourrey *et al.* 2014).

La preferencia por hospedero es un campo recientemente explorado en la simbiosis ectomicorrízica (Lofgren *et al.* 2018; Kennedy *et al.* 2020; Pérez-Pazos *et al.* 2021), particularmente desde la perspectiva genómica (Lofgren *et al.* 2020), mientras que la preferencia, e incluso la especificidad hacia un hospedero ha sido ampliamente estudiada en hongos simbióticos de carácter fitopatógeno (ej., Borah *et al.* 2018; Fouché *et al.* 2018; Henry *et al.* 2021; Poloni y Schirawski, 2016; Rana *et al.* 2017). En estos modelos, los llamados “genes de resistencia” de las plantas interactúan con los “genes de virulencia” de los hongos (Borah *et al.* 2018; Rana *et al.* 2017). Los péptidos efectores también desempeñan un papel importante en la selección del hospedero. Otros elementos moleculares de especificidad son toxinas producto metabolismos secundarios. Sin embargo, no todos los efectores, metabolitos secundarios o genes de virulencia se relacionan con la especificidad (Borah *et al.* 2018). Elementos genéticos codificantes para péptidos efectores presentan dinámicas genómicas y evolutivas particulares y distintas a otros elementos de los genomas fúngicos. Comúnmente son elementos con tasas evolutivas mayores, tanto en su diversificación como su multiplicación (Fouché *et al.* 2018; Möller y Stukenbrock, 2017). Se sitúan en regiones teloméricas y subteloméricas, incluso pueden formar parte de los llamados “cromosomas de patogenicidad o linaje específicos” donde la elevada actividad de transposones es la fuerza molecular que alimenta los modelos evolutivos conocido como “arm race” y “two-speed genome”. Estas mismas características dificultan su detección (Möller y Stukenbrock, 2017).

La evolución y diversificación de los elementos genéticos codificantes para péptidos efectores ocurre tan rápido que es evidente a escalas poblacionales. Es decir, distintas poblaciones de la especie presentan genes distintos que les dan patogenicidad y especificidad. Debido a esto, se han descrito “razas”, “patovars” y “*formae speciales*”.

Además, a diferencia de los HEM (quienes presentan una limitada batería de genes para la degradación de la pared celular vegetal), los hongos patógenos (particularmente necrotróficos) presentan fuertes capacidades degradadoras de los tejidos vegetales, actuando en muchos casos como saprobios de descomposición temprana (Borah *et al.* 2018; Möller y Stukenbrock, 2017).

En HEM, muchas de las enzimas CAZy de actividad sobre pared celular vegetal están más bien involucradas en el desarrollo de la ectomicorriza. Por lo que se plantea aquí la hipótesis de que la relación entre la composición diferencial de la pared celular radical del hospedero y el contenido de enzimas CAZy específicas de sustrato podrían tener un papel en la capacidad de colonización de los tejidos vegetales, y por ende, en la preferencia por hospedero. Por lo que la comparación de HEM restringidos a hospederos de maderas duras o de maderas blandas con HEM generalistas permitirá rechazar esta hipótesis. Además, la capacidad de contender con los compuestos antifúngicos presentes en las resinas de las coníferas podría ser también considerado como un factor de virulencia para la colonización de estos hospederos. La variación en estos genes deberá ser analizadas mediante la expresión diferencial en asociación con los distintos hospederos y mediante genómica comparada entre especies de hongos. Sin embargo atendiendo a las dinámicas evolutivas descritas para los hongos patógenos, es posible que el comportamiento de estos elementos, aquí propuestos como factores de virulencia, tenga una escala mas bien poblacional, por lo que la comparación de cepas naturalmente asociadas a los distintos hospederos podrá dar luz al fenómeno de la preferencia por el hospedero.

En todo caso, la documentación precisa de los hospederos naturales de las cepas analizadas como la comprobación experimental de la asociación con distintos hospederos será crucial para la interpretación de los resultados. Además, la simple presencia/ausencia de genes dista de la función biológica, por lo que la detección de su expresión mediante RNA-seq, proteómica y metabolómica ofrece una panorama integral de la fisiología molecular de la interacción ectomicorrízica.

Conclusiones

- 1) El desarrollo de protocolos para la producción masiva de un inoculante ectomicorrízico forestal permitió no sólo la producción de grandes volúmenes de micelio, si no también hizo evidente la necesidad de la correcta y oportuna selección del germoplasma mediante la detección de su potencial simbiótico.
- 2) *Laccaria trichodermophora* fue capaz de crecer en medio líquido en distintos contenedores, formulaciones del medio nutritivo y parámetros de cultivo, y alcanzó rendimientos de hasta $Y_{X/S} = 0.54 \pm 0.09 \text{ gBiomasa/gGlucosa}$.
- 3) Los genomas de distintas cepas de *Laccaria trichodermophora* variaron en tamaño entre 59.1 y 111.9 Mpb. Estas diferencias se centran principalmente en el tamaño de las familias génicas. El genoma *core* de la especie representa del 54% al 76% de las familias de genes homólogos.
- 4) La ausencia de genes simbióticos, como los codificantes para la poligalacturonasas GH28 y la endoglucanasa con modulo de unión a carbohidrato GH5_5-CBM1, así como el número e identidad de péptidos efectores se relacionan con la pérdida de la capacidad simbiótica en algunas de las cepas analizadas.
- 5) Mediante la generación y análisis de genomas de distintas cepas destinadas a la inoculación de pino, se hizo evidente no sólo la alta diversidad genómica intraespecífica, si no también el posible efecto que la manipulación a largo plazo tiene sobre el contenido génico simbiótico de cepas particulares y la necesidad de la continua prospección enfocada a los sitios de reforestación y a las especies forestales.

Referencias Bibliográficas

- Alvarez-Manjarrez, J., Garibay-Orijel, R., & Smith, M. E. (2018). Caryophyllales are the main hosts of a unique set of ectomycorrhizal fungi in a Neotropical dry forest. *Mycorrhiza*, 28(2), 103-115.
- Ángeles-Argáiz, R. E. (2015) Propagación de cepas de hongos ectomicorrízicos con fines de inoculación. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 111 pp.
- Ángeles-Argáiz, R. E., Aguirre-Beltrán, L. F. L., Quintero-Corrales, C. A., Trujillo-Roldán, M. A., Castillo-Ramírez, S., Garibay-Orijel, R. (en preparación). Long-read sequencing do not collapse the genome assemblies of *Laccaria trichodermophora* strains (CA15-11, CA15-75, CA15-F10 and EF-36) and highlights intraspecific genome diversity. *Genomes, Genes and Genetics*.
- Ángeles-Argáiz, R. E., Carmona-Reyes, I. A., Quintero-Corrales, C. A., Medina-Macías, F. J., Blancas-Cabrera, A., Valdez-Cruz, N. A., ... & Garibay-Orijel, R. (2020). From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*. *Fungal biology*, 124(3-4), 205-218.
- Ángeles-Argáiz, R. E. y Garibay-Orijel, R. (2019). La evolución de la simbiosis ectomicorrízica desde la perspectiva genómica. *Scientia fungorum*, 49: e1247.
- Ángeles-Argáiz, R. E. y Garibay-Orijel, R. (En preparación) El contenido de enzimas CAZy y péptidos efectores en los genomas accesorios de *Laccaria trichodermophora* le confiere capacidades simbióticas diferenciales.
- 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(1), 53-65.
- 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*, 28(5), 509-521.
- Barroetaveña, C., Cázares, E., & Rajchenberg, M. (2007). Ectomycorrhizal fungi associated with ponderosa pine and Douglas-fir: a comparison of species richness in native western North American forests and Patagonian plantations from Argentina. *Mycorrhiza*, 17(5), 355-373.

- Biscarini, F., Cozzi, P., Gaspa, G., & Marras, G. (2018). detectRUNS: detect runs of homozygosity and runs of heterozygosity in diploid genomes.
- Borah, N., Albarouki, E., & Schirawski, J. (2018). Comparative methods for molecular determination of host-specificity factors in plant-pathogenic fungi. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 863.
- Bourge, M., Brown, S. C., & Siljak-Yakovlev, S. (2018). Flow cytometry as tool in plant sciences, with emphasis on genome size and ploidy level assessment. *Genetics & Applications*, 2(2), 1-12.
- Campos-Lopez, A. (En proceso). Cambios metabólicos en el hongo ectomicorrízico *Laccaria trichodermophora* provocados por la relación C:N del medio de cultivo y su efecto sobre la infectividad. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Carmona-Reyes, I. A. (En preparación) Caracterización del cultivo sumergido de *Laccaria trichodermophora* en matraces agitados y su escalamiento a biorreactores bajo el parámetro de kla. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Carrasco-Hernández, V., Rodríguez Trejo, D. A., Pérez Moreno, J., Duarte Zaragoza, V. M., Navarro Sandoval, J. L., & Quintero Lizaola, R. (2018). Evaluación del costo de producción de inoculantes ectomicorrízicos neotropicales a base de esporas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(2), 417-429.
- Chen, E. C., Morin, E., Beaudet, D., Noel, J., Yildirim, G., Ndikumana, S., ... & Corradi, N. (2018). High intraspecific genome diversity in the model arbuscular mycorrhizal symbiont *Rhizophagus irregularis*. *New Phytologist*, 220(4), 1161-1171.
- Clark, T. A., & Anderson, J. B. (2004). Dikaryons of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*: evolution in long-term culture. *Genetics*, 167(4), 1663-1675.
- Comandini, O., Rinaldi, A. C., & Kuyper, T. W. (2012). Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: a continuous challenge. M. Pagano. *Mycorrhiza: occurrence in natural and restored environments*. Nova Science Publishers. Nueva York. p, 165-200.
- Corrales, A., Xu, H., Garibay-Orijel, R., Alfonso-Corrado, C., Williams-Linera, G., Chu, C., ... & Smith, M. E. (2021). Fungal communities associated with roots of two closely related Juglandaceae species with a disjunct distribution in the tropics. *Fungal Ecology*, 50, 101023.

- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., ... & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.
- De la Bastide, P. Y., Kropp, B. R., & Piché, Y. (1994). Spatial distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *New Phytologist*, 127(3), 547-556.
- Dickie, I. A., Nuñez, M. A., Pringle, A., Lebel, T., Tourtellot, S. G., & Johnston, P. R. (2016). Towards management of invasive ectomycorrhizal fungi. *Biological Invasions*, 18(12), 3383-3395.
- Drew, E., Herridge, D., Ballard, R., O'Hara, G., Deaker, R., Denton, M., ... & Ballard, N. (2012). *Inoculating legumes: a practical guide*. Grains Research and Development Corporation.
- Dulmer, K. M., LeDuc, S. D., & Horton, T. R. (2014). Ectomycorrhizal inoculum potential of northeastern US forest soils for American chestnut restoration: results from field and laboratory bioassays. *Mycorrhiza*, 24(1), 65-74.
- Eaton, D. A., & Overcast, I. (2020). ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets. *Bioinformatics*, 36(8), 2592-2594.
- Essene, A. L., Shek, K. L., Lewis, J. D., Peay, K. G., & McGuire, K. L. (2017). Soil type has a stronger role than *Dipterocarp* host species in shaping the ectomycorrhizal fungal community in a Bornean lowland tropical rain forest. *Frontiers in plant science*, 8, 1828.
- Fields, B., Moffat, E. K., Friman, V. P., & Harrison, E. (2021). The impact of intra-specific diversity in the rhizobia-legume symbiosis. *Microbiology*, 167(4), 001051.
- Flores-Almaraz, V. (2020). Viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo vegetativo ectomicorrízico de *Laccaria trichodermophora*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 103 pp.
- Flores-Rentería, D., Barradas, V. L., & Álvarez-Sánchez, J. (2018). Ectomycorrhizal pre-inoculation of *Pinus hartwegii* and *Abies religiosa* is replaced by native fungi in a temperate forest of central Mexico. *Symbiosis*, 74(2), 131-144.
- Fouché, S., Plissonneau, C., & Croll, D. (2018). The birth and death of effectors in rapidly evolving filamentous pathogen genomes. *Current opinion in microbiology*, 46, 34-42.
- Franco-Maass, S., Burrola-Aguilar, C., Arana-Gabriel, Y., & García-Almaraz, L. A. (2016). A local knowledge-based approach to predict anthropic harvesting pressure zones of wild edible

- mushrooms as a tool for forest conservation in Central Mexico. *Forest policy and economics*, 73, 239-250.
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A., & Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*, 93(4), 855-863.
- García-Guzmán, O. M., Garibay-Orijel, R., Hernández, E., Arellano-Torres, E., & Oyama, K. (2017). World-wide meta-analysis of *Quercus* forests ectomycorrhizal fungal diversity reveals southwestern Mexico as a hotspot. *Mycorrhiza*, 27(8), 811-822.
- Garibay-Orijel, R., Martínez-Ramos, M., & Cifuentes, J. (2009). Disponibilidad de esporomas de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista mexicana de biodiversidad*, 80(2), 521-534.
- Geml, J., Laursen, G. A., Timling, I., McFarland, J. M., Booth, M. G., Lennon, N., ... & Taylor, D. L. (2009). Molecular phylogenetic biodiversity assessment of arctic and boreal ectomycorrhizal *Lactarius* Pers.(Russulales; Basidiomycota) in Alaska, based on soil and sporocarp DNA. *Molecular Ecology*, 18(10), 2213-2227.
- Gibbons, J. G., & Rinker, D. C. (2015). The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Current opinion in genetics & development*, 35, 1-8.
- Guerin-Laguet, A., Butler, R., & Wang, Y. (2020). Advances in the Cultivation of *Lactarius deliciosus* (Saffron Milk Cap) in New Zealand. In *Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World* (pp. 141-161). Springer, Cham.
- Hayward, J., Horton, T. R., & Nuñez, M. A. (2015). Ectomycorrhizal fungal communities coinvasive with Pinaceae host plants in Argentina: Gringos bajo el bosque. *New Phytologist*, 208(2), 497-506.
- Henry, P. M., Pincot, D. D., Jenner, B. N., Borrero, C., Aviles, M., Nam, M. H., ... & Gordon, T. R. (2021). Horizontal chromosome transfer and independent evolution drive diversification in *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *New Phytologist*, 230(1), 327-340.
- Hess, J., Skrede, I., Chaib De Mares, M., Hainaut, M., Henrissat, B., & Pringle, A. (2018). Rapid divergence of genome architectures following the origin of an ectomycorrhizal symbiosis in the genus *Amanita*. *Molecular biology and evolution*, 35(11), 2786-2804.

- Hess, J., Skrede, I., Wolfe, B. E., LaButti, K., Ohm, R. A., Grigoriev, I. V., & Pringle, A. (2014). Transposable element dynamics among asymbiotic and ectomycorrhizal *Amanita* fungi. *Genome Biology and Evolution*, 6(7), 1564-1578.
- Hortal, S., Pera, J., & Parladé, J. (2009). Field persistence of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus*: effects of inoculation strain, initial colonization level, and site characteristics. *Mycorrhiza*, 19(3), 167-177.
- Karkouri, K. E., Selosse, M. A., & Mousain, D. (2006). Molecular markers detecting an ectomycorrhizal *Suillus collinitus* strain on *Pinus halepensis* roots suggest successful inoculation and persistence in Mediterranean nursery and plantation. *FEMS microbiology ecology*, 55(1), 146-158.
- Kennedy, P. G., Garibay-Orijel, R., Higgins, L. M., & Ángeles-Argáiz, R. (2011). Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza*, 21(6), 559-568.
- Kennedy, P. G., Gagne, J., Perez-Pazos, E., Lofgren, L. A., & Nguyen, N. H. (2020). Does fungal competitive ability explain host specificity or rarity in ectomycorrhizal symbioses?. *PloS one*, 15(8), e0234099.
- Kong, A., Montoya, A., García-de Jesús, S., Ramírez-Terrazo, A., Andrade, R., Ruan-Soto, F., ... & Estrada-Torres, A. (2018). Hongos ectomicorrizógenos del Parque Nacional Lagunas de Montebello, Chiapas. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(3), 741-756.
- Lofgren, L. A., Nguyen, N. H., Vilgalys, R., Ruytinx, J., Liao, H. L., Branco, S., ... & Kennedy, P. G. (2020). Comparative genomics reveals dynamic genome evolution in host specialist ectomycorrhizal fungi. *The New Phytologist*.
- Lofgren, L., Nguyen, N. H., & Kennedy, P. G. (2018). Ectomycorrhizal host specificity in a changing world: can legacy effects explain anomalous current associations?. *New Phytologist*, 220(4), 1273-1284.
- Looney, B. P., Ryberg, M., Hampe, F., Sánchez-García, M., & Matheny, P. B. (2016). Into and out of the tropics: global diversification patterns in a hyperdiverse clade of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, 25(2), 630-647.
- López-García, A., Jiménez-Ruiz, M., & Pérez-Moreno, J. (2017). Vocablos relacionados con el recurso micológico en el idioma de la cultura chinanteca de la Sierra Norte del estado de Oaxaca, México. *Revista mexicana de micología*, 46, 9-18.

- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., ... & Grigoriev, I. V. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452(7183), 88-92.
- Mathieu, S., Cusant, L., Roux, C., & Corradi, N. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi: intraspecific diversity and pangomes. *New Phytologist*, 220(4), 1129-1134.
- Möller, M., & Stukenbrock, E. H. (2017). Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 756.
- Montoliu-Nerin, M., Sánchez-García, M., Bergin, C., Grabherr, M., Ellis, B., Kutschera, V. E., ... & Rosling, A. (2020). Building *de novo* reference genome assemblies of complex eukaryotic microorganisms from single nuclei. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Morte, A., Gutiérrez, A., & Ródenas, A. N. (2020). Advances in desert truffle mycorrhization and cultivation. In *Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World* (pp. 205-219). Springer, Cham.
- Mueller, G. M. (1992). Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. Chicago: Field Museum of Natural History.
- Mueller, G. M., & Strack, B. A. (1992). Evidence for a mycorrhizal host shift during migration of *Laccaria trichodermophora* and other agarics into neotropical oak forests. *Mycotaxon.*, 45, 249-256.
- Nara, K. (2008). Community developmental patterns and ecological functions of ectomycorrhizal fungi: implications from primary succession. In *Mycorrhiza* (pp. 581-599). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Nara, K., Nakaya, H., Wu, B., Zhou, Z., & Hogetsu, T. (2003). Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytologist*, 159(3), 743-756.
- Núñez, M. A., Horton, T. R., & Simberloff, D. (2009). Lack of belowground mutualisms hinders Pinaceae invasions. *Ecology*, 90(9), 2352-2359.
- Palmer, J., & Stajich, J. E. (2017). Funannotate: eukaryotic genome annotation pipeline.
- Pérez, F., Castillo-Guevara, C., Galindo-Flores, G., Cuautle, M., & Estrada-Torres, A. (2012). Effect of gut passage by two highland rodents on spore activity and mycorrhiza formation of

two species of ectomycorrhizal fungi (*Laccaria trichodermophora* and *Suillus tomentosus*). *Botany*, 90(11), 1084-1092.

Pérez-Moreno, J., Lorenzana-Fernández, A., Carrasco-Hernández, V., & Yescas-Pérez, A. (2010). Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Ixta-Popo, Zoquiapan y anexos. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT. Montesillo, Estado de México. 167 pp.

Pérez-Moreno, J., & Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivos que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29(5), 239-247.

Pérez-Pazos, F. E. (2018) Diversidad, ecología y huella isotópica de *Clavulina* en bosques de *Abies* al suroeste de la cuenca de México. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 103 pp.

Pérez-Pazos, E., Certano, A., Gagne, J., Lebeuf, R., Siegel, N., Nguyen, N., & Kennedy, P. G. (2021). The slippery nature of ectomycorrhizal host specificity: *Suillus* fungi associated with novel pinoid (*Picea*) and abietoid (*Abies*) hosts. *Mycologia*, 1-11.

Pérez-Pazos, E., Villegas-Ríos, M., Garibay-Orijel, R., & Salas-Lizana, R. (2019). Two new species of *Clavulina* and the first record of *Clavulina reae* from temperate *Abies religiosa* forests in central Mexico. *Mycological Progress*, 18(9), 1187-1200.

Plett, J. M., Tisserant, E., Brun, A., Morin, E., Grigoriev, I. V., Kuo, A., ... & Kohler, A. (2015). The mutualist *Laccaria bicolor* expresses a core gene regulon during the colonization of diverse host plants and a variable regulon to counteract host-specific defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3), 261-273.

Plett, J. M., & Martin, F. (2015). Reconsidering mutualistic plant–fungal interactions through the lens of effector biology. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 45-50.

Plett, J. M., & Martin, F. (2011). Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics*, 27(1), 14-22.

Policelli, N., Bruns, T. D., Vilgalys, R., & Nuñez, M. A. (2019). Suilloid fungi as global drivers of pine invasions. *New Phytologist*, 222(2), 714-725.

Polme, S., Bahram, M., Kõljalg, U., & Tedersoo, L. (2017). Biogeography and specificity of ectomycorrhizal fungi of *Coccoloba uvifera*. In *Biogeography of mycorrhizal symbiosis* (pp. 345-359). Springer, Cham.

- Poloni, A., & Schirawski, J. (2016). Host specificity in *Sporisorium reilianum* is determined by distinct mechanisms in maize and sorghum. *Molecular plant pathology*, 17(5), 741-754.
- Quintero-Corrales, C., Ángeles-Argáiz, R., Jaramillo-Correa, J. P., Piñero, D., Garibay-Orijel, R., & Mastretta-Yanes, A. (2020). Allopatric instead of parapatric divergence in an ectomycorrhizal fungus (*Laccaria trichodermophora*) in tropical sky-islands. *Fungal Ecology*, 47, 100966.
- Ramírez-Miguel, A. A., Hernández-Díaz, A. F., Valenzuela-Encinas, C., Garibay-Orijel, R., & Truong, C. (2021) Hongos ectomicorrízicos asociados a plantas jóvenes de *Pinus patula* y *Quercus crassifolia* en plantaciones del sistema matarrasa de la Sierra Juárez de Oaxaca, México. *Scientia Fungorum*.
- Ramos, A., Bandala, V. M., & Montoya, L. (2017). A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relict forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycKeys*, (27), 77.
- Rana, A., Sahgal, M., & Johri, B. N. (2017). *Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant–host interaction. In *Developments in fungal biology and applied mycology* (pp. 159-199). Springer, Singapore.
- Repáč, I. (2011). Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. In *Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae* (pp. 43-63). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Reverchon, F., del Pilar Ortega-Larrocea, M., & Pérez-Moreno, J. (2012). Soil factors influencing ectomycorrhizal sporome distribution in neotropical forests dominated by *Pinus montezumae*, Mexico. *Mycoscience*, 53(3), 203-210.
- Rhie, A., McCarthy, S. A., Fedrigo, O., Damas, J., Formenti, G., Koren, S., ... & Jarvis, E. D. (2021). Towards complete and error-free genome assemblies of all vertebrate species. *Nature*, 592(7856), 737-746.
- Roach, M. J., Schmidt, S. A., & Borneman, A. R. (2018). Purge Haplotigs: allelic contig reassignment for third-gen diploid genome assemblies. *BMC bioinformatics*, 19(1), 1-10.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Garibay-Orijel, R., Santiago-Morales, B., & Lindig-Cisneros, R. (2020). Comparación entre las abundancias de esporomas y ectomicorrizas del Género *Laccaria* en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista mexicana de biodiversidad*, 91.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., del Pilar Ortega-Larrocea, M., & Arellano-Torres, E. (2019). Sympatric species

develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90.

Rohrlich, C., Merle, I., Mze Hassani, I., Verger, M., Zuin, M., Besse, S., ... & Costet, L. (2018). Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*. *PLoS one*, 13(7), e0199199.

Sanmee, R., Lumyong, S., Lumyong, P., & Dell, B. (2010). *In vitro* cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand. *Mycoscience*, 51(1), 15-22.

Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1), 1-22.

Simpson, J. SGA-PreQC. (2013), <https://github.com/jts/sga/wiki/preqc>.

Smith, C. A. (2021). Macrosynteny analysis between *Lentinula edodes* and *Lentinula novae-zelandiae* reveals signals of domestication in *Lentinula edodes*. *Scientific reports*, 11(1), 1-11.

Smith, G. R., Finlay, R. D., Stenlid, J., Vasaitis, R., & Menkis, A. (2017). Growing evidence for facultative biotrophy in saprotrophic fungi: data from microcosm tests with 201 species of wood-decay basidiomycetes. *New Phytologist*, 215(2), 747-755.

Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

Smits, T. H. (2019). The importance of genome sequence quality to microbial comparative genomics. *BMC genomics*, 20(1), 1-4.

Steensels, J., Gallone, B., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). Domestication of industrial microbes. *Current biology*, 29(10), R381-R393.

Tarailo-Graovac, M., & Chen, N. (2009). Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences. *Current protocols in bioinformatics*, 25(1), 4-10.

Tavares, S., Ramos, A. P., Pires, A. S., Azinheira, H. G., Caldeirinha, P., Link, T., ... & Talhinhos, P. (2014). Genome size analyses of Pucciniales reveal the largest fungal genomes. *Frontiers in plant science*, 5, 422.

Tedersoo, L., & Brundrett, M. C. (2017). Evolution of ectomycorrhizal symbiosis in plants. In *Biogeography of mycorrhizal symbiosis* (pp. 407-467). Springer, Cham.

- Tedersoo, L., & Smith, M. E. (2017). Ectomycorrhizal fungal lineages: detection of four new groups and notes on consistent recognition of ectomycorrhizal taxa in high-throughput sequencing studies. In *Biogeography of mycorrhizal symbiosis* (pp. 125-142). Springer, Cham.
- Toida, I. (2000). Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 80(6), 291-291.
- Truong, C., Gabbarini, L. A., Corrales, A., Mujic, A. B., Escobar, J. M., Moretto, A., & Smith, M. E. (2019). Ectomycorrhizal fungi and soil enzymes exhibit contrasting patterns along elevation gradients in southern Patagonia. *New Phytologist*, 222(4), 1936-1950.
- Ulloa, M., & Hanlin, R. T. (2000). *Illustrated dictionary of mycology*. APS press.
- Valero-Jiménez, C. A., Faino, L., Spring, D., Smit, S., Zwaan, B. J., & van Kan, J. A. (2016). Comparative genomics of *Beauveria bassiana*: uncovering signatures of virulence against mosquitoes. *BMC genomics*, 17(1), 1-11.
- Valenzuela-Miranda, D., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., & Gallardo-Escárate, C. (2020). Long-term serial culture of *Piscirickettsia salmonis* leads to a genomic and transcriptomic reorganization affecting bacterial virulence. *Aquaculture*, 529, 735634.
- Veneault-Fourrey, C., Commun, C., Kohler, A., Morin, E., Balestrini, R., Plett, J., ... & Martin, F. (2014). Genomic and transcriptomic analysis of *Laccaria bicolor* CAZome reveals insights into polysaccharides remodelling during symbiosis establishment. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 168-181.
- Whibley, A., Kelley, J. L., & Narum, S. R. (2021). The changing face of genome assemblies: guidance on achieving high-quality reference genomes.
- Wilson, A. W., Hosaka, K., & Mueller, G. M. (2017). Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist*, 213(4), 1862-1873.
- Yahav, T., & Privman, E. (2019). A comparative analysis of methods for *de novo* assembly of hymenopteran genomes using either haploid or diploid samples. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Young, T. P. (2000). Restoration ecology and conservation biology. *Biological conservation*, 92(1), 73-83.

Zhang, F., Anasontzis, G. E., Labourel, A., Champion, C., Haon, M., Kemppainen, M., ... & Martin, F. (2018). The ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* releases a secreted β -1, 4 endoglucanase that plays a key role in symbiosis development. *New Phytologist*, 220(4), 1309-1321.

Zhao, Y., Wang, L., Zhang, D., Li, R., Cheng, T., Zhang, Y., ... & Gao, S. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals relationship of three major domesticated varieties of *Auricularia auricula-judae*. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.

Anexo 1. Mapa de distribución de especies para la introducción de la tesis

Rodolfo Ángeles, Septiembre del 2021

Objetivo:

Mostrar la distribución de *Laccaria trichodermophora*, *Pinus montezumae* y *P. hartwegii* en un mapa.

Procedimiento:

1. Descargar los datos de GBIF
2. Hacer la grafica con R

Ejecución:

1. Navegar hasta GBIF (<https://www.gbif.org/>), buscar cada especie, descargar las ocurrencias en formato .csv y guardarlos en el directorio `/Users/REAnAr/Omix/maps_PhD`.
2. Ejecutar el siguiente código en RStudio.

```
#go to wd
setwd('/Users/REAnAr/Omix/maps_PhD')

#instal and load packages
install.packages("maptools")
install.packages("rgeos")
install.packages("raster")
install.packages("rgdal")
install.packages("dismo")

library(maptools)
library(rgeos)
library(raster)
library(rgdal)
library(dismo)

#create the map
data("wrlld_simpl") #the map

#load the points
Lt <- read.csv("Lt.csv")
Lt.coords = Lt[,c(10, 22, 23)]
```

```
Pm <- read.csv("Pm.csv")
Pm.coords = Pm[,c(10, 22, 23)]
Ph <- read.csv("Ph.csv")
Ph.coords = Ph[,c(10, 22, 23)]

##plotting
#narrow mexico
plot(wrld_simpl, xlim=c(-115,-80), ylim=c(10,35), axes=T)

#put the points
points(Pm.coords$decimalLongitude, Pm.coords$decimalLatitude, col="yellowgreen", pch=2,
cex = 0.4)
points(Ph.coords$decimalLongitude, Ph.coords$decimalLatitude, col="forestgreen", pch=6,
cex = 0.4)
points(Lt.coords$decimalLongitude, Lt.coords$decimalLatitude, col="purple", pch=1, cex =
0.6)

##end
```

Anexo 2. Nubes de palabras para los resúmenes de cada capítulo

Rodolfo Ángeles, Septiembre del 2021

Objetivo:

Facilitar al lector una idea rápida del contenido de cada capítulo mediante una imagen.

Procedimiento:

1. Crear un .txt para cada capítulo.
2. Generar una matriz de conteo de palabras con *text mining* en RStudio.
3. Generar las gráficas.

Ejecución:

1. A partir de la última versión de la tesis (14 de septiembre del 2021), exportar los textos de cada capítulo (sin referencias) a archivos `.txt` independientes y situarlos en `/Users/REAnAr/Omix/nube`.
2. Ejecutar el siguiente código en RStudio para hacer la matriz.

```
#go to wd
setwd('/Users/REAnAr/Omix/nube')

#install and load packages
if(!require(NLP))
{install.packages("NLP", dependencies = TRUE)}
# for text mining
if(!require(tm))
{install.packages("tm", dependencies = TRUE)}
# for text stemming
if(!require(SnowballC))
{install.packages("SnowballC", dependencies = TRUE)}
# word-cloud generator
if(!require(wordcloud))
{install.packages("wordcloud", dependencies = TRUE)}
# word-cloud generator 2
if(!require(wordcloud2))
{install.packages("wordcloud2", dependencies = TRUE)}
# color palettes
if(!require(RColorBrewer))
{install.packages("RColorBrewer", dependencies = TRUE)}
```

```

library("tm")
library("SnowballC")
library("wordcloud")
library("wordcloud2")
library("RColorBrewer")

#Load the text
filePath <- "reactores.txt"
text <- readLines(filePath,encoding="UTF-8")

# Convert Character Vector between Encodings
text = iconv(text, to="ASCII//TRANSLIT")

#formato de texto
corpus <- Corpus(VectorSource(text))
d <- tm_map(corpus, tolower) # go to lowercase
d <- tm_map(d, stripWhitespace) # remove blanks
d <- tm_map(d, removePunctuation) # remove punctuation marks
d <- tm_map(d, removeNumbers) # remove numeric characters

#take off pronouns and little words of both languages
d <- tm_map(d, removeWords, stopwords("spanish"))
d <- tm_map(d, removeWords, stopwords("english"))

# create the matrix
tdm <- TermDocumentMatrix(d)
findFreqTerms(tdm, lowfreq=20)
frecuentes<-findFreqTerms(tdm, lowfreq=20)

#findAssocs(tdm, "laccaria", 0.45)
#findAssocs(tdm, frecuentes, rep(0.45, rep=5) )

#get the sums
m <- as.matrix(tdm) #lo vuelve una matriz
v <- sort(rowSums(m),decreasing=TRUE) #lo ordena y suma
df <- data.frame(word = names(v),freq=v) # lo nombra y le da formato de data.frame

### make a barplot

barplot(df[1:10,]$freq, las = 2, names.arg = df[1:10,]$word,
        col = "lightblue", main = "PALABRAS MÁS FRECUENTES", ylab = "Frecuencia de
palabras")

```

3. Ejecutar el siguiente código en RStudio para hacer la gráfica.


```
### make the word cloud

#wordcloud(words = df$word, freq = df$freq, min.freq = 6,
#          max.words=100, random.order=FALSE, rot.per=0.35,
#          colors=brewer.pal(8, "Dark2"))

subsample <- df[1:80, ]
wordcloud2(subsample, size = 1, ellipticity = 0.3)

### end
```