



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
EVOLUCIÓN

**DIVERSIDAD DE ECTOMICORRIZAS EN LA SELVA TROPICAL DE  
CHAMELA, JALISCO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**JULIETA ALVAREZ MANJARREZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
**COMITÉ TUTOR: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
**DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA**  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA

**MÉXICO, D.F.**

**OCTUBRE, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
EVOLUCIÓN

**DIVERSIDAD DE ECTOMICORRIZAS EN LA SELVA TROPICAL DE  
CHAMELA, JALISCO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**JULIETA ALVAREZ MANJARREZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
**COMITÉ TUTOR: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
**DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA**  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA

**MÉXICO, D.F.**

**OCTUBRE, 2014**

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

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de Septiembre de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ALVAREZ MANJARREZ JULIETA** con número de cuenta **513014583** con la tesis titulada **"DIVERSIDAD DE ECTOMICORRIZAS EN LA SELVA TROPICAL DE CHAMELA, JALISCO"**, realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL**:

Presidente: DRA. MARIA DEL CARMEN AUXILIO GONZALEZ VILLASEÑOR  
Vocal: DR. SIGFRIDO SIERRA GALVAN  
Secretario: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RIOS  
Suplente: DRA. JENY SOLANGE SOTUYO VAZQUEZ  
Suplente: M. EN C. CELIA ELVIRA AGUIRRE ACOSTA

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 1° de octubre de 2014.

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

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

## **Agradecimientos**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM la formación profesional emitida.

Agradezco los financiamientos brindados por UNAM-PAPIIT IN218210 y UNAM-PAPIIT IN223114 que hicieron posible este trabajo. De igual forma agradezco al CONACyT por la beca 280553, que tuve durante todos mis estudios de maestría.

Doy gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas por permitirme hacer una estancia de investigación en Estados Unidos. Agradezco el apoyo económico al programa de BECAS MIXTAS CONACyT 2014-MZO2015 MOVILIDAD EN EL EXTRANJERO 290842, y al apoyo financiero PAEP 2014.

Agradezco a mi tutor principal Dr. Roberto Garibay Orijel, que bajo su excelente dirección y apoyo incondicional, hizo posible la conclusión de mi maestría.

Agradezco a cada uno de los miembros de mi comité tutorial: a la Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos por todos sus comentarios positivos, apoyo y colaboración. De igual forma agradezco a la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea por ayudar a dirigir esta tesis, por sus comentarios y correcciones.

## **Agradecimientos personales**

La vida nos guía por caminos misteriosos, mismos que me hicieron llegar a concluir mis estudios de la Maestría en Ciencias Biológicas. Le doy gracias a la vida por todas las maravillas y oportunidades que me da a diario.

Gratifico a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme llevar a cabo mis estudios de posgrado. Agradezco al Instituto de Biología, UNAM por haber sido el espacio donde transcurriera mi formación profesional.

De igual forma agradezco a la Estación de Biología de Chamela de la UNAM, por haberme permitido hacer el trabajo de campo, brindarme el espacio para hacer la revisión de muestras y facilitarme material, que fue de gran utilidad para el muestreo.

Agradezco al Dr. Matthew E. Smith por haberme abierto las puertas para hacer una estancia de investigación en el *Plant Pathology Department* de *University of Florida*. La estancia fue enriquecedora tanto a nivel académico como personal, muchas gracias.

Agradezco al de Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología, a cargo de la M. en C. Laura Márquez, por haber secuenciado todas las muestras de esta tesis.

Agradezco a cada uno de los miembros de mi jurado: a la Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor, Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos, Dra. Jeny Solange Sotuyo Vázquez, M. en C. Celia Elvira Aguirre Acosta y Dr. Sigfrido Sierra Galván. Cada una de sus excelentes correcciones y comentarios ayudaron a la conformación de esta tesis.

Agradezco a mi familia por todo el apoyo, cariño, consejos, y todo el amor que me han dado desde siempre. Muchas gracias por todo, los amo mucho.

Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio Andrés Argüelles Moyao, Rodolfo Enrique Ángeles Argáiz, Carolina Piña Páez, Olimpia Mariana García Guzmán, Ibeth Rodríguez Gutiérrez y María Magdalena Contreras Pacheco. Mi experiencia en el laboratorio no sería nada sin ustedes.

Hago un especial agradecimiento a Rodolfo Ángeles Argáiz, por haberme ayudado a la recolecta de las muestras, y por ser siempre un gran amigo. De igual forma agradezco a Andrés Argüelles Moyao por ayudarme a la recolección de muestras, por ser una persona bellísima y excelente amigo. También agradezco a Amaranta Ramírez Terrazo, por extenderme siempre su apoyo ante diferentes situaciones. Muchas gracias por todo chicos.

Agradezco a todo el personal de la Estación de Biología de Chamela. Al Dr. Jorge Humberto Vega Rivera, M. en C. Enrique Ramírez García, a Ignacia Rubio Crisosto, Norma Barocio, doña Margarita Cárdenas, doña Evangelina Robles Jiménez, a Diego Flores López, a María Guadalupe Vidrio Robles y a Gloria Margarita Sánchez Cárdenas. Gracias por hacer de mi estancia algo entrañable.



## Dedicatoria

Dedico principalmente esta tesis a todas aquellas personas que se sientan fascinadas por el reino de los hongos, en especial por las asociaciones micorrízicas.

Dedico la tesis a mis padres, Juliana Catalina Manjarrez Gutiérrez y Manlio Favio Alvarez Barradas. También la dedico a mis hermanas Aurora, Victoria, Aldonza y Jimena. A todos ustedes les doy mil gracias por todo su amor que me dan siempre. Los amo mucho.

Dedico la tesis a mi familia del Estado de México. A mi abuelita Engracia, a mis primos Carlos, Jaime, Carolina, Paola, Karina, Sofia, Daniela, Gloria, Pilar, Víctor, Nora, Roque, Anahí, Cristian. También a mis tíos Matilde, Juanita, Blanca, Leticia, María Eugenia, Neri, Melesio, Víctor, Felipe, Humberto, Jaime y Víctor Hugo. Los quiero mucho.

Dedico la tesis a mi familia de Veracruz. A mi abuelita Haydeé, a mis primos Luisa, Yamile, Emilia, Catalina, Siddartha, Jorge y Ricardo. De igual forma a mis tíos: Julieta, Isabel, Clara, Rafael, Cuahutémoc, Omar, Jorge y Lucio. Los quiero mucho mucho.

Dedico esta tesis a mis compañeros del Laboratorio de Sistemática, Ecología y Aprovechamiento de Ectomicorrizas del Instituto de Biología. A Andrés, Rodolfo, Carolina, Mariana, Ibeth y Magdalena.

Así mismo dedico la tesis al Dr. Matthew E. Smith de la *University of Florida*, quien mostró gran interés en el tema y me apoyó en todo lo que le fue posible.

Además dedico la tesis a mis amigos del Laboratorio de Biodiversidad y Sistemática de Hongos del Instituto de Ecología, A.C. Al Dr. Víctor M. Bandala Muñoz, la Dra. Leticia Montoya Bello y Biól. David Ramos Rendón.

De igual forma dedico la tesis a mis amigos que formé durante la maestría. A Amaranta Ramírez Terrazo, a Ana Gabriela Martínez Becerril, a Adriana Benítez Villaseñor, a Domingos Szabo, a Cecilia Cordero Oviedo, a Eugenia Senties Aguilar, a Gabriel López Segoviano, a Alejandro Salinas, a Edith Villa Galaviz, a Adrián Bojórquez. Gracias por siempre echarme las porras que necesitaba.

Dedico la tesis a mis amigos de toda la vida, que también se han vuelto mi familia. A Karen Camarena Vázquez, Sarahí Flores Carrión, Haydée Hernández Yáñez, Valeria Guzmán Jacob, Edith Garay Serano, César Pastor García Cruz, Emanuel Sierra Velázquez y José Guadalupe Colmenares Natharen. Los quiero y extraño siempre.

“... jaguares en las marañas  
y pájaros sobre el río  
Es un bello desafío  
La selva con la montaña.

Amanecen los jornales  
Una ilusión campesina  
De céfiro es la colina  
Y alegría en los manantiales...”

- Canción popular Por los caminos del sur

## Índice

Resumen .....	19
Abstract.....	21
1. Introducción.....	23
2. Marco teórico.....	26
2.1 Micorrizas en función de los nutrimentos del suelo .....	26
2.2 Nutrimentos del suelo en bosque tropical caducifolio.....	27
2.3 Micorrizas en bosques tropicales.....	28
3. Antecedentes.....	30
3.1 Estudio de la diversidad fúngica con secuencias de DNA.....	44
4. Objetivo general .....	47
4.1 Objetivos particulares .....	47
5. Hipótesis.....	48
6. Metodología.....	49
6.1 Sitio de estudio.....	49
6.1.1 Bosque tropical caducifolio.....	50
6.1.2 Bosque tropical subperennifolio.....	52
6.1.3 Caracterización edáfica .....	52
6.2 Muestreo .....	53
6.3 Técnicas moleculares .....	55
6.3.1 Extracción de DNA .....	55
6.3.2 PCR de la región ITS del DNA fúngico.....	55
6.3.3 PCR de la región <i>rbcL</i> del fitobionte .....	57
6.4 Identificación molecular de especies .....	59
6.4.1 Identificación molecular del micobionte.....	59
6.4.2 Identificación molecular del fitobionte .....	60
6.5 Análisis bioinformáticos y filogenéticos.....	60
6.6 Análisis estadístico.....	62
6.7 Caracterización morfológica y anatómica de las ectomicorrizas.....	63
6.7.1 Deshidratación e inclusión .....	63

6.7.2 Montado, cortes y tinción.....	64
6.7.3 Preparaciones permanentes .....	64
7. Resultados.....	65
7.1 Recolectas .....	65
7.2 Identificación molecular de especies .....	66
7.2.1 Agrupación y delimitación de las especies fúngicas .....	67
7.2.2 Identificación molecular del micobionte.....	69
7.2.3 Agrupación y delimitación de las especies vegetales.....	78
7.2.4 Identificación molecular del fitobionte .....	78
7.3 Relación planta-hongo .....	79
7.4 Diversidad de hongos ectomicorrizógenos .....	83
7.4.1 Riqueza y abundancia de HECM .....	83
7.4.2 Distribución de las ectomicorrizas .....	86
7.4.3 Comparación del muestreo de rizosfera y suelo bajo esporomas.....	91
7.5 Caracterización de morfotipos .....	92
7.5.1 <i>Tremelloscypha</i> sp.+ <i>Achatocarpus gracilis</i> (Morfotipo H8Snt11) .....	95
7.5.2 <i>Clavulina</i> sp. 4 + <i>Guapira macrocarpa</i> (Morfotipo Cresalat1) .....	96
7.5.3 <i>Clavulina</i> sp. 1+ <i>Guapira macrocarpa</i> (Morfotipo 5bA2-19).....	98
7.5.4 <i>Clavulina</i> sp. 1+ <i>Guapira macrocarpa</i> (Morfotipo 5bA2-13).....	100
7.5.5 <i>Clavulina</i> sp. 1 + <i>Guapira macrocarpa</i> (Morfotipo 5bA2-9).....	101
7.5.6 <i>Clavulina</i> sp. 1 + <i>Guapira macrocarpa</i> (Morfotipo 5bA2-5).....	102
7.5.7 <i>Clavulina</i> sp. 1 + Nyctaginaceae 5 (Morfotipo 5bA2-15) .....	103
7.5.8 <i>Clavulina</i> sp. 1 + ¿? (Morfotipo 5bA2-6) .....	104
7.5.9 <i>Clavulina</i> sp. 1 + ¿? (Morfotipo 5bA2-10) .....	106
7.5.10 <i>Clavulina</i> sp. 1 + ¿? (Morfotipo 5bA2-17) .....	108
7.5.11 <i>Clavulina</i> sp. 1 + secuencia de doble banda (Morfotipo 5bA2-2) .....	110
7.5.12 <i>Clavulina</i> sp. 1+ Nyctaginaceae 1 (Morfotipo 5bA2-16) .....	111
7.5.13 <i>Clavulina</i> sp. 1 + ¿? (Morfotipo 5bA2-4) .....	111
7.5.14 <i>Tomentella</i> sp. 1 + Nyctaginaceae 6 (Morfotipo 5bA2-18).....	112
7.5.15 <i>Tomentella</i> sp. 1 + Nyctaginaceae 1 (Morfitipo 15bA1-1) .....	113
7.5.16 <i>Tomentella</i> sp. 1 + <i>Guapira macrocarpa</i> (Morfotipo 09A1-1).....	114

7.5.17 <i>Tomentella</i> sp. 1 + Polygonaceae 1 (Morfotipo 09A1-3).....	114
7.5.18 <i>Tomentella</i> sp. 1+ Nyctaginaceae 7 (Morfotipo 09A1-6).....	115
7.5.19 <i>Tomentella</i> sp. 2 + Nyctaginaceae 8 (Morfotipo 9bA1-5).....	116
7.5.20 <i>Tomentella</i> sp. 2 + <i>Guapira macrocarpa</i> (Morfotipo 14bA2-1).....	117
7.5.21 <i>Tomentella</i> sp. 3 + ¿? (Morfotipo H8Snt9).....	118
7.5.22 <i>Thelephora versatilis</i> + Polygonaceae 1 (Morfotipo 02H1-10).....	119
7.5.23 <i>Thelephora versatilis</i> + <i>Achatocarpus gracilis</i> (Morfotipo ThSnt1).....	120
7.5.24 <i>Thelephora versatilis</i> + Araliaceae (Morfotipo 11H3-3).....	121
7.5.25 <i>Thelephora versatilis</i> + ¿? (Morfotipo 11H3-1).....	121
7.5.26 <i>Thelephora versatilis</i> + ¿? (Morfotipo 11H3-4).....	122
7.5.27 <i>Thelephora versatilis</i> + ¿? (Morfotipo Theleph snt2).....	123
7.5.28 <i>Thelephora versatilis</i> + ¿? (Morfotipo 11H3-6).....	124
7.5.29 <i>Thelephora pseudoversatilis</i> + ¿? (Morfotipo 11H2-2).....	125
7.5.30 ¿? + Sapotaceae (Morfotipo 02H1-4).....	125
7.5.31 ¿? + Polygonaceae 2 (Morfotipo 02H1-11).....	126
7.5.32 ¿? + Polygonaceae 6 (Morfotipo 02H1-12).....	126
7.5.33 ¿? + Polygonaceae 3 (Morfotipo 02H1-5).....	127
7.5.34 ¿? + Nyctaginaceae 3 (Morfotipo 5bA2-8).....	128
7.5.35 ¿? (Morfotipo 09A1-4).....	128
7.5.36 ¿? (Morfotipo 11H3-7).....	129
7.5.37 Secuencia con doble banda + <i>Guapira macrocarpa</i> (Morfotipo 5bA2-3).....	129
7.5.38 Secuencia amplificada débilmente (Morfotipo 15H6-8).....	129
7.5.39 Secuencia con doble banda + ¿? (Morfotipo 09A1-9).....	131
7.5.40 Secuencia con doble banda+ ¿? (Morfotipo 6bH1-1).....	131
7.5.41 Secuencia con doble banda (Morfotipo 5bA2-7).....	132
8. Discusión.....	133
8.1 Identificación molecular de especies.....	133
8.1.1 Identificación molecular de especies fúngicas.....	133
8.1.2 Determinación de especies vegetales.....	135
8.1.3 Relación hongo-planta.....	138
8.2 Diversidad fúngica ectomicorrizógena en los trópicos.....	144

8.2.1 Distribución de los HECM en la EBCh .....	145
8.2.2 Riqueza y abundancia de los HECM en la EBCh .....	147
8.2.3 Comparación entre muestreos .....	149
8.3 Morfotipos de ectomicorrizas .....	151
9. Conclusiones.....	154
10. Perspectivas .....	155
11. Literatura citada .....	156
APÉNDICES .....	179

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ilustración que explica la distribución de los diferentes tipos de micorriza de acuerdo a los nutrimentos disponibles del suelo .....	29
<b>Figura 2.</b> Fotografías de esporomas resupinados de las especies <i>Clavulina cinereoglobosa</i> y <i>C. cerebriformis</i> .....	45
<b>Figura 3.</b> Mapa de la Reserva Biológica de Chamela, Jalisco, donde se encuentra la Estación de Biología Chamela .....	50
<b>Figura 4.</b> Mapa de distribución del bosque tropical caducifolio en México .....	50
<b>Figura 5.</b> Programa de PCR para la amplificación de la región ITS de hongos .....	56
<b>Figura 6.</b> Programa de PCR para la amplificación de la región <i>rbcL</i> del fitobionte .....	59
<b>Figura 7.</b> Mapa de la distribución espacial de los puntos de muestreo .....	66
<b>Figura 8.</b> Neighbour-Joining de las especies de <i>Thelephora</i> y <i>Tomentella</i> amplificadas en las raíces .....	68
<b>Figura 9.</b> Análisis filogenético bayesiano de la familia Clavulinaceae .....	75
<b>Figura 10.</b> Basidiomas de <i>Tricholosporum</i> sp. en campo.....	77
<b>Figura 11.</b> Relaciones simbióticas entre hongos y plantas encontradas a través de las raíces con apariencia de ectomicorriza .....	82
<b>Figura 12.</b> Abundancia de las especies fúngicas encontradas a partir de la amplificación de las ectomicorrizas .....	83
<b>Figura 13.</b> Abundancia de los hongos ectomicorrizógenos a nivel de familia .....	84
<b>Figura 14.</b> Distribución de las especies de HECM en la EBCh, amplificadas a partir de las raíces.....	87
<b>Figura 15.</b> Especies de HECM encontradas en los dos tipos de vegetación .....	88
<b>Figura 16.</b> Distribución de los genets de <i>Tremelloscypha</i> sp. ....	89
<b>Figura 17.</b> Distribución de los genets de <i>Thelephora versatilis</i> .....	90
<b>Figura 18.</b> Distribución de los genets de <i>Tomentella</i> sp. 1 .....	90
<b>Figura 19.</b> Curva de rarefacción de especies encontradas por muestreo de rizosfera de hospederos ectomicorrizicos junto con la curva por muestreo del suelo debajo de esporomas .....	92
<b>Figura 20.</b> Ectomicorriza de <i>Tremelloscypha</i> sp. asociada a <i>Achatocarpus gracilis</i> .....	95
<b>Figura 21.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 4 con <i>Guapira macrocarpa</i> .....	97
<b>Figura 22.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 asociado a <i>Guapira macrocarpa</i> .....	99
<b>Figura 23.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 asociado a <i>Guapira macrocarpa</i> .....	100

<b>Figura 24.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 asociada a <i>Guapira macrocarpa</i> .....	101
<b>Figura 25.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 asociada a <i>Guapira macrocarpa</i> .....	102
<b>Figura 26.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 asociado a Nyctaginaceae 5 .....	103
<b>Figura 27.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 asociado a una planta desconocida .....	105
<b>Figura 28.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 asociado a una planta desconocida .....	107
<b>Figura 29.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 asociado a una planta desconocida .....	109
<b>Figura 30.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 asociada a una planta desconocida .....	110
<b>Figura 31.</b> Ectomicorriza de <i>Clavulina</i> sp. 1 con planta desconocida .....	111
<b>Figura 32.</b> Ectomicorriza de <i>Tomentella</i> sp.1 con Nyctaginaceae 6 .....	112
<b>Figura 33.</b> Ectomicorriza de <i>Tomentella</i> sp. 1 asociado a Nyctaginaceae 1 .....	113
<b>Figura 34.</b> Ectomicorriza de <i>Tomentella</i> sp.1 asociado a <i>Guapira macrocarpa</i> .....	114
<b>Figura 35.</b> Ectomicorriza de <i>Tomentella</i> sp. 1 con Polygonaceae 1 .....	114
<b>Figura 36.</b> Ectomicorriza de <i>Tomentella</i> sp.1 asociado a Nyctaginaceae 7 .....	115
<b>Figura 37.</b> Ectomicorriza de <i>Tomentella</i> sp. 2 asociado a Nyctaginaceae 8 .....	116
<b>Figura 38.</b> Ectomicorriza de <i>Tomentella</i> sp. 2 asociado a <i>Guapira macrocarpa</i> .....	117
<b>Figura 39.</b> Corte transversal de la punta ectomicorrizada de <i>Tomentella</i> sp. 3 asociada a una planta desconocida .....	118
<b>Figura 40.</b> Ectomicorriza de <i>Thelephora versatilis</i> asociada a Polygonaceae 1 .....	119
<b>Figura 41.</b> Ectomicorriza de <i>Thelephora versatilis</i> asociado a <i>Achatocarpus gracilis</i> ...	120
<b>Figura 42.</b> Ectomicorriza de <i>Thelephora versatilis</i> asociado a Araliaceae .....	121
<b>Figura 43.</b> Ectomicorriza de <i>Thelephora versatilis</i> asociado a una planta desconocida ..	121
<b>Figura 44.</b> Ectomicorriza de <i>Thelephora versatilis</i> asociado a una planta desconocida ..	122
<b>Figura 45.</b> Ectomicorriza de <i>Thelephora versatilis</i> asociada a una planta desconocida ..	123
<b>Figura 46.</b> Ectomicorriza de <i>Thelephora versatilis</i> asociada a una planta desconocida ..	124
<b>Figura 47.</b> Ectomicorriza de <i>Thelephora pseudoversatilis</i> asociada a una planta desconocida .....	125
<b>Figura 48.</b> Ectomicorriza de hongo desconocido asociado a una planta de la familia Sapotaceae .....	125
<b>Figura 49.</b> Ectomicorriza de hongo desconocido asociado a Polygonaceae .....	126
<b>Figura 50.</b> Ectomicorriza de hongo desconocido asociado a una planta de la familia Polygonaceae 6 .....	126
<b>Figura 51.</b> Morfotipo de hongo desconocido asociado a Polygonaceae 3 .....	127
<b>Figura 52.</b> Morfotipo no identificado .....	128



<b>Figura 53.</b> Morfotipo no identificado .....	129
<b>Figura 54.</b> Hongo desconocido asociado a <i>Guapira macrocarpa</i> .....	129
<b>Figura 55.</b> Morfotipo no identificado .....	130
<b>Figura 56.</b> Morfotipo no identificado .....	131
<b>Figura 57.</b> Ectomicorriza no identificada .....	131
<b>Figura 58.</b> Ectomicorriza no identificada .....	132
<b>Figura 59.</b> Análisis bayesiano del orden Caryophyllales con la región <i>rbcL</i> .....	143

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Lista de plantas que han sido reportadas como hospederos ectomicorrízicos en bosques tropicales y dunas costeras .....	31-43
<b>Cuadro 2.</b> Fórmula de la reacción maestra para la PCR de la región ITS del DNA fúngico .....	56
<b>Cuadro 3.</b> Fórmula de la reacción maestra para la PCR de la región <i>rbcL</i> del DNA vegetal .....	58
<b>Cuadro 4.</b> Número de agrupaciones y secuencias únicas que se formaron al ensamblar a diferentes porcentajes de similitud .....	67
<b>Cuadro 5.</b> Identificación molecular de las especies de hongos ectomicorrizógenos ....	70-72
<b>Cuadro 6.</b> Especies de hongos amplificadas a partir de raíces y que no son identificadas como ectomicorrizógenos.....	73-74
<b>Cuadro 7.</b> Interacciones ectomicorrízicas en Chamela, Jalisco .....	79-80
<b>Cuadro 8.</b> Hongos no ectomicorrizógenos amplificadas de raíces de diferentes especies vegetales .....	80
<b>Cuadro 9.</b> Genetos de cada una de las especies de hongos ectomicorrizógenos.....	85
<b>Cuadro 10.</b> Micobionte y fitobionte de cada uno de los morfotipos caracterizados ....	93-94

## Índice de Apéndices

<b>Apéndice I.</b> Lista de especies que se consideraron como posibles hospederos ectomicorrizicos para la EBCh. ....	180-181
<b>Apéndice II.</b> Comparación de agrupaciones formados a diferentes porcentajes de similitud. ....	182-184
<b>Apéndice III.</b> Análisis de máxima verosimilitud de la familia Ceratobasidiaceae hecho en RAxML (modelo GTR+I+ $\Gamma$ ). ....	185
<b>Apéndice IV.</b> Análisis de NJ de todas las familias de plantas amplificadas a partir de las raíces. ....	186-188
<b>Apéndice V.</b> Genetos de todas las especies de HECM encontrados a través de la amplificación de las ectomicorrizas. ....	189-190
<b>Apéndice VI.</b> Fotografías de esporomas y especies vegetales de importancia para esta tesis. ....	191-193

## Resumen

Los hongos micorrizógenos tienen la capacidad de formar una relación simbiótica con las raíces de las plantas, favoreciéndose ambos al haber un intercambio de nutrientes. La mayor parte de los estudios en México sobre hongos ectomicorrizógenos (HECM) han sido llevados a cabo en zonas templadas, en bosques de *Quercus* y *Pinus* principalmente. Sin embargo, es en las zonas tropicales de nuestro país donde se expresa la mayor parte de nuestra biodiversidad. El sitio de estudio donde se llevó a cabo el presente trabajo es la Estación de Biología Chamela (con coordenadas N 19°30' y O 105°03'), localizada dentro de la Reserva de la Biósfera Chamela-Cuixmala ubicada en el municipio de La Huerta, Jalisco. Este trabajo pretendió describir la diversidad epígea, es decir los esporomas, y la parte hipógea, es decir las ectomicorrizas (ECM). Para ello se recolectaron todos los esporomas de HECM que fueron encontrados en el sitio de muestreo y debajo de ellos se tomaron muestras de suelo con cuatro núcleos. Del esporoma se tomó una pequeña porción antes de secarlo y se conservó en alcohol al 96% para posteriormente extraer su DNA. En total se recolectaron 29 esporomas de HECM, pertenecientes a los géneros *Phaeoclavulina*, *Thelephora* y *Tremelloscypha*.

También se recolectaron muestras fértiles de los posibles hospederos ectomicorrízicos y se secaron para generar ejemplares de herbario. Por cada posible hospedero se recolectó suelo de su rizosfera con cuatro núcleos. El suelo fue revisado al estereomicroscopio y se separaron todas las puntas de raíces que tuvieran apariencia de ECM. Una parte de la ECM se colocó en alcohol al 96% para su posterior extracción de DNA, y el resto se fijó en Navashin para su caracterización. Para la caracterización se realizaron cortes de los morfotipos con microtomo de rotación, y a partir de los cuales se describieron morfológicamente a 42 ECM.

Para reconocer a los micobiontes de cada ECM, se amplificó la región ITS del rDNA de las ECM y de los esporomas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hizo con *primers* exclusivos de hongos ITS1F-ITS4. De las 205 ECM que se recolectaron en total, 191 muestras tuvieron buena amplificación. Todas ellas se mandaron secuenciar con los dos *primers*, se editaron con el programa Geneious 6.1.4 y se obtuvieron 109 secuencias consenso de buena calidad. Con el mismo software se agruparon todas las secuencias al 97% de similitud para formar MOTUs (*Molecular Operational Taxonomic Unit*). Del agrupamiento se conformaron 10 MOTUs y 9 secuencias únicas de HECM. También se secuenciaron 13 hongos de los cuales se desconoce su capacidad micorrízica. Las ECM más abundantes fueron las de *Tremelloscypha* sp., *Thelephora versatilis* y *Clavulina* sp. 1. La familia con mayor riqueza de especies fue Thelephoraceae y en segundo lugar Clavulinaceae. Las familias con menor riqueza fueron Entolomataceae, Inocybaceae y Russulaceae.

El reconocimiento del fitobionte se hizo con la amplificación de la región *rbcL* del DNAc. El marcador molecular fue suficiente para determinar hasta nivel de familia. Las familias Achatocarpaceae, Araliaceae, Fabaceae subfamilias Caesalpinioideae y Papilionoideae, Moraceae, Nyctaginaceae, Polygonaceae y Sapotaceae presentaron asociación ectomicorrízica. Aunque la familia Fabaceae es la más abundante y presenta la mayor riqueza en el sitio de estudio, no fue la familia con más ectomicorrizas.

*Guapira macrocarpa* (Nyctaginaceae) se asoció con nueve HECM, siendo el principal hospedero ectomicorrízico. *Achatocarpus gracilis* (Achatocarpaceae) se asoció con siete especies de HECM, además de ser por primera vez reportada como ectomicorrízica. *G. macrocarpa* y *A. gracilis* se asociaron con el 68.4% de los HECM encontrados. La asociación más frecuente fue *Tremelloscypha* sp. con *A. gracilis*. La especie más generalista fue *Tomentella* sp. 1 con seis hospederos distintos.

Con el análisis de rarefacción de los dos muestreos con núcleos se encontró que ninguno saturó la curva de acumulación de especies. Sin embargo la probabilidad de encontrar una ECM en el suelo bajo esporomas fue mayor ( $P = 0.22$ ) que la probabilidad en la rizosfera de los hospederos potenciales ( $P = 0.15$ ). El índice de Simpson ( $1-D = 0.85$ ) y Shannon ( $H = 2.24$ ;  $E_h = 0.49$ ) indican que la probabilidad de encontrar otras especies de HECM es alta. Se encontró mayor diversidad en el bosque tropical caducifolio ( $1-D = 0.79$ ) que en el subperennifolio ( $1-D = 0.71$ ).

La diversidad de los HECM está en función de la densidad de los hospederos. Por la disposición espacial que ocupan los hongos, se determinó que estos hongos se encuentran en pequeñas islas agrupadas en los hospederos y que puede haber especificidad hongo-planta.

## Abstract

Mycorrhizal fungi have the ability to form a symbiotic relationship with the roots of plants, favoring both with the exchange of nutrients. Most of the studies in Mexico on ectomycorrhizal fungi (ECMF) have been conducted in temperate areas, *Quercus* and *Pinus* forests mainly. However, it is in the tropical areas of our country where most of our biodiversity is expressed. The study site was carried out at the Chamela Biological Station (with coordinates 19° 30' N and 105° 03' W), located within the Biosphere Reserve Chamela-Cuixmala in the municipality of La Huerta, Jalisco. This study sought to describe the diversity above ground, *i.e.* the sporocarps, and the hypogean part, *i.e.* the ectomycorrhizae (ECM). All the ECMF sporocarps were sampled and below them we collected soil samples with four soil-cores. From the sporocarps we took a small portion before drying and stored in 96% alcohol for later extract their DNA. In total we sampled 29 ECMF sporocarps, belonging to the genera *Phaeoclavulina*, *Tremelloscypha* and *Thelephora*.

Leaves from the potential ectomycorrhizal hosts were also collected and dried to generate herbarium specimens. For each possible host, its rhizosphere was collected with four soil-cores. The soil was revised with a stereomicroscope, and all root tips that had ECM appearance were separated. A part of the ECM was placed in 96% alcohol for later DNA extraction, and the remainder was fixed in Navashin for characterization. To characterize morphotypes cuts were performed with rotation microtome, it was morphologically described 42 ECM.

To recognize the mycobionts in each ECM, the ITS rDNA region of the ECM and sporocarps was amplified. The polimerase chain reaction (PCR) was done with exclusive fungal primers, ITS1F- ITS4. From the 205 ECM that were collected in total, 191 samples had good amplification. All were sent to sequence the two primers, were edited with Geneious 6.1.4 software, and 109 consensus sequences were obtained with good quality. With the same software all sequences were assembled to 97% similarity to form MOTUs. The assembling formed 10 MOTUs and 9 unique ECMF sequences. We also sequenced 13 fungi which their mycorrhizal capacity unknown. The most abundant ECM were *Tremelloscypha* sp., *Thelephora versatilis* and *Clavulina* sp. 1. The family with highest species richness was Thelephoraceae and secondly Clavulinaceae. Families with less species richness were Entolomataceae, Inocybaceae and Russulaceae.

For the recognition of the phytobiont, we amplified the *rbcL* region from cpDNA. The molecular marker was enough to determine to family level. Families Achatocarpaceae, Araliaceae, Fabaceae subfamilies Caesalpinioideae and Papilionoideae, Moraceae, Nyctaginaceae, Polygonaceae and Sapotaceae presented ectomycorrhizal association. Although the Fabaceae family is the most abundant and has the greatest species richness in the study site, this was not the mainly family of the ectomycorrhizal hosts.

*Guapira macrocarpa* (Nyctaginaceae) was associated with nine ECMF species, and was the main ectomycorrhizal host. *Achatocarpus gracilis* (Achatocarpaceae) was associated with seven species of ECMF, besides being first reported as ectomycorrhizal host. *G. macrocarpa* and *A. gracilis* were associated with 68.4% of the ECMF found. The most frequent association was *Tremelloscypha* sp. with *A. gracilis*. The generalist species was *Toментella* sp. 1 with six different hosts.

With the rarefaction analysis of the two sampled with soil-cores, have found none saturated the species accumulation curve. However, the likelihood of finding an ECM on the ground under sporocarps was higher ( $P = 0.22$ ) than the probability in the rhizosphere of potential hosts ( $P = 0.15$ ). The Simpson Index ( $1-D = 0.85$ ), and Shannon ( $H = 2.24$ ,  $E_h = 0.49$ ) indicates that the probability of finding other ECMF species is high. Greater diversity was found in the tropical dry forest ( $1-D = 0.79$ ) than in the tropical wet forest ( $1-D = 0.71$ ).

ECMF diversity depends on the density of the host. Owing to the spatial arrangement occupying by ECMF, was determined that these fungi are found in small islands, grouped in the host and may have fungus-plant specificity.

## 1. Introducción

Los hongos tienen una importancia ecológica imprescindible al formar parte de la microbiota que ayuda a la degradación de materia orgánica en el suelo y el reciclado de los nutrientes. La diversidad de hongos estimada para el planeta es de 5.1 millones de especies y únicamente se tienen registradas 97 330 especies de hongos (Blackwell, 2011). Prácticamente los hongos se encuentran en cualquier ecosistema del planeta, siendo superados apenas por la diversidad adaptativa de las bacterias (Raspór & Zupan, 2006). Además de encontrarse interaccionando con todo tipo de organismos, de manera saprobia, parásita, mutualista, etcétera.

Existen hongos que interactúan de forma mutualista con las raíces de las plantas. A estos hongos se les conoce como micorrizógenos, derivado del griego “*μυκοσ*” hongo, “*ρηζοσ*” raíz y “*γενεσις*” génesis. El órgano de interacción que forman tanto el hongo como la planta, es llamado micorriza. Por medio de la micorriza ambos organismos se favorecen mediante intercambio de nutrientes (Trappe, 2005). La planta cede fotosintatos a los hongos y a cambio, los hongos le proporcionan principalmente nitrógeno en forma de iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y aminoácidos; así como fósforo en forma de fosfato ( $\text{PO}_4^+$ ) (Smith & Read, 2008). El 86% de las plantas terrestres adquieren nutrientes a través de las micorrizas (Brundrett, 2009).

Smith y Read (1997, 2008) dividen a las micorrizas en siete tipos: endomicorriza, ectendomicorriza, ericoide, monotropoide, arbutoide, orquideoide y ectomicorriza. Esta última, objeto de estudio de la presente tesis, se caracteriza por tener un manto que es una estructura compuesta de hifas que envuelve a las raíces terciarias. El manto puede variar extensamente en grosor, color y textura dependiendo de la combinación particular del hongo y la planta (Halling, 2001). Algunos mantos presentan hifas emergentes que pueden derivar en micelio externo (Brundrett *et al.*, 1996). Otra característica importante es la red de Hartig, que es el conjunto de hifas las cuales penetran intercelularmente en la raíz y es donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes (Peterson *et al.*, 2004; Smith & Read, 2008). Se calcula que 6000 especies vegetales y de 20000 a 25000 especies de hongos, forman ectomicorrizas (Rinaldi *et al.*, 2008; Brundrett, 2009). Si estas cantidades se extrapolan con la diversidad estimada para hongos y 220000-420000 especies de plantas (Scotland & Wortley, 2003), el 1.4-2.7% de las plantas se encontrarían ectomicorrizadas, mientras que el 0.4-0.5% de los hongos formarían ectomicorrizas.

Algunas especies de hongos ectomicorrizógenos (HECM) varían la tolerancia de las plantas ante condiciones adversas y favorecen el crecimiento en ambientes extremos, como a la elevada salinidad (Bandou *et al.*, 2006). A su vez, decrecen los efectos negativos causados por patógenos en los bosques tropicales (Alexander & Lee, 2005; Mangan *et al.*, 2010). De igual manera, ayudan a las plantas deciduas a formar nuevamente material



fotosintético, proporcionándoles carbono proveniente de la red ectomicorrízica (Bréda *et al.*, 2013).

La taxonomía convencional de los hongos macroscópicos se ha basado en la caracterización de la fase sexual (Garibay-Orijel *et al.*, 2013; Hibbett & Taylor, 2013) es decir, los esporomas. Tal es el caso de los HECM, los cuales pertenecen a los phyla Basidiomycota y Ascomycota (Smith & Read, 2008). Tedersoo *et al.* (2010a) reportan que se han descrito 6000 especies de HECM.

Las técnicas moleculares han servido como herramienta para la identificación taxonómica de los hongos formadores de ectomicorrizas (Gardes *et al.*, 1993; Horton y Bruns, 2001; Kõljalg *et al.*, 2005; Bahram *et al.*, 2013) y se ha encontrado una biodiversidad que se desconocía (Tedersoo *et al.*, 2006a, 2006b, 2010b, 2012a; Blackwell, 2011), debido a que muchas veces no se encontraban los esporomas de dichos hongos (Tedersoo *et al.*, 2010b). México, un país megadiverso, ha contribuido a enriquecer de manera muy somera las bases de datos moleculares de hongos. Por ejemplo en las bases UNITE+NCBI (Kõljalg *et al.*, 2013), se tienen 4565 secuencias de México, donde sólo 419 secuencias provienen de ectomicorrizas. En comparación con el resto del mundo se tienen 432389 secuencias hongos, donde 13759 provienen de ECM.

La comunidad científica ha puesto mayor atención al estudio de los HECM en los bosques templados y boreales, sobre todo porque los especialistas habitan en países donde predomina esa vegetación (Alexander, 2006; Wolfe *et al.*, 2009; Becerra & Zak, 2011). Los HECM se encuentran en abundancia en los bosques templados y boreales (Bâ *et al.*, 2012), donde se encuentran asociados a la mayoría de las especies vegetales que forman parte del ecosistema. De igual forma, los estudios en México sobre HECM han sido llevados a cabo en zonas templadas, en bosques de *Quercus* (Morris *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2009; Smith & Pfister, 2009; Lamus *et al.*, 2012; García-Guzmán *et al.*, 2014) y de *Pinus* (e.g. Valdés *et al.*, 2006; Perea-Estrada *et al.*, 2009; Carrasco-Hernández *et al.*, 2011; Méndez-Neri *et al.*, 2011; Reverchon *et al.*, 2012; Garibay-Orijel *et al.*, 2013) principalmente. Sin embargo, es en los bosques tropicales donde se expresa la mayor parte de la biodiversidad mundial (Hillebrand, 2004). Esta generalidad aplica de igual manera al reino de los hongos (Arnold & Lutzoni, 2007).

En cuanto a los hongos micorrizógenos, la mayoría de las plantas en los trópicos presentan micorriza arbuscular pero una minoría importante, ecológicamente hablando, presenta ectomicorrizas (Alexander, 2006). Para el caso de los HECM en un contexto global, se estima que el patrón de distribución en los trópicos, es contrario al resto de plantas y animales, esto podría deberse en parte a la densidad de hospederos que se encuentran en los trópicos (Tedersoo & Nara, 2010; Kennedy *et al.*, 2012; Bahram *et al.*, 2013).

Los ecosistemas tropicales experimentan un reciclado de nutrimentos rápido, lo que sugiere que tales condiciones pueden contribuir relativamente a la baja riqueza de HECM

(Tedersoo *et al.*, 2012a). El estatus micorrízico de las plantas y la dinámica del carbono están fuertemente relacionados, ya que el follaje de árboles ectomicorrízicos en bosques templados y boreales, tienen menor tasa de descomposición comparado con las plantas que presentan micorriza arbuscular (Cornelissen *et al.*, 2001).

Como se comentó, el estudio de los HECM es incipiente para los trópicos. Sin embargo la mayoría de los trabajos existentes se han realizado en bosques tropicales perennifolios donde se han identificado familias de plantas que son hospederos ectomicorrízicos. Estas familias han sido principalmente Dipterocarpaceae y Fabaceae (Tedersoo *et al.*, 2010b).

Los bosques tropicales caducifolios (BTC) muestran una temporalidad marcada debido a la disponibilidad de agua. El agua juega un papel importante que determina los ciclos biológicos del ecosistema. Principalmente el reciclado de nutrientes y la producción de biomasa, además de la distribución de las especies están en función del agua (Balvanera *et al.*, 2002). Aunado a esto, se estima una gran variación de la disponibilidad de este recurso, cambiando de manera errática entre años (García-Oliva *et al.*, 1991).

La desaparición de los ecosistemas es inminente, sin embargo es de especial atención el BTC, pues ha sido catalogado con mayor riesgo (Miles *et al.*, 2006). Este tipo de vegetación también conocido como selva baja caducifolia, abarca el 42% de los ecosistemas tropicales a nivel mundial, siendo el segundo ecosistema tropical con mayor área (Murphy & Lugo, 1986; Miles *et al.*, 2006); en Latinoamérica ocupa el 47% del área forestal (Houghton *et al.*, 1991). No obstante es uno de los ecosistemas que se ven mayormente afectados debido a cambios de uso de suelo para actividades agrícolas y fragmentación del bosque (Quesada *et al.*, 2009). La inusual diversidad beta del BTC, combinado con la concentración endémica de taxa (Dirzo & Raven, 2003) es un aspecto que tiene importancia biogeográfica e implicaciones en la conservación (Dirzo *et al.*, 2011).

El aporte al conocimiento de las ectomicorrizas en bosques tropicales caducifolios de México, sienta las bases para posteriores estudios de ecología y restauración de estos bosques tropicales.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Micorrizas en función de los nutrimentos del suelo

El nitrógeno (N) y el fósforo (P) son elementos esenciales que limitan el crecimiento de las plantas terrestres (Wassen *et al.*, 2005; Chapman *et al.*, 2006). Estos elementos se encuentran presentes en forma de solutos en el suelo y como cationes enlazados a las arcillas y humus. Los solutos son fácilmente absorbidos por la vegetación, mientras que los cationes son retenidos en el suelo, siendo una reserva importante de nutrimentos (Flores-Pastor, 2000). La disponibilidad de nutrimentos en el suelo está en función de la forma química en la que se encuentran y de la capacidad de las plantas para movilizarlos y absorberlos (Lambers *et al.*, 2008b). Las plantas han desarrollado diferentes adaptaciones para contrarrestar sus limitaciones nutricionales, como mecanismos de resorción, reciclado interno de nutrimentos, asignación y uso de P y N para el crecimiento (Lambers *et al.*, 2008a). La asimilación de nutrimentos del suelo se da en el área próxima a las raíces, conocida como rizosfera. Los exudados de las raíces regulan las comunidades microbianas, facilitan las simbiosis mutualistas, modifican propiedades físicas y químicas del suelo, e inhiben el crecimiento de especies de plantas competitivas (Bais *et al.*, 2004; Sanon *et al.*, 2009).

Otra de las estrategias que las plantas han desarrollado, son asociaciones mutualistas con microorganismos, como bacterias y hongos en sus raíces. La asociación que forman los hongos en las raíces de las plantas, se conoce como micorriza. A los siete tipos de micorrizas reconocidos por Smith y Read (1997) se les puede agrupar en tres grandes grupos según su estructura (ectomicorrizas, endomicorrizas y ectendomicorrizas) (Hernández-Cuevas *et al.*, 2003).

- i) Endomicorrizas: Angiospermas, Gimnospermas y Pteridofitas presentan este tipo de asociación con hongos (Smith & Read, 2008). Las hifas crecen entre los espacios intersticiales de la raíz, a la vez que invaginan las células de ésta. La hifa se ramifica y genera una invaginación de la pared celular, formando un área de intercambio de nutrimentos entre los dos organismos, llamado apoplasto. Las estructuras formadas por los hongos pueden ser arbuscúlos, vesículas u ovillos. Los hongos formadores de arbuscúlos y vesículas pertenecen al Phylum Glomeromycota. Los ovillos son formados por hongos basidiomicetos asociados a plantas de la familia Orchidaceae.
- ii) Ectomicorrizas: órganos de intercambio entre Angiospermas y Gimnospermas con hongos de los phyla Ascomycota y Basidiomycota. Se caracterizan por tener un manto fúngico, es decir, hifas que envuelven las raíces terciarias. A partir de este manto se pueden encontrar hifas emergentes, que conforman micelio externo, rizomorfos, esclerocios, etc. (Agerer, 1991). Dependiendo de las estructuras que conformen las hifas, existen diferencias en la exploración del hongo en el suelo para

la absorción de nutrimentos (Agerer *et al.*, 2012). A su vez presentan hifas entre las células corticales, conformando una red o ensamble de hifas a lo que se nombra como red de Hartig (Agerer, 1991).

- iii) Ectendomicorrizas: Los hongos forman un manto al igual que en las ectomicorrizas, pero las hifas penetran las células corticales como en las endomicorrizas. Existen variaciones en estas últimas estructuras: como ganchos hifales en las células de la raíz, que definen a la micorriza monotrofoide; así como ovillos en las micorrizas ericoride y arbutoide.

En el caso particular de las ectomicorrizas, éstas juegan un papel importante en la absorción de nutrimentos inorgánicos del suelo y en la liberación de P y N de las formas orgánicas a través de la hidrólisis (Lambers *et al.*, 2008b; Smith & Read, 2008).

## **2.2 Nutrimentos del suelo en bosque tropical caducifolio**

La heterogeneidad de nutrimentos en el suelo en los BTC puede deberse a la topografía y a factores que afectan el desarrollo del suelo y de la vegetación (Campo-Alves, 2003; Ramírez-López *et al.*, 2012). Directamente los nutrimentos en suelo varían con los cambios de la disponibilidad de agua, calidad de los desechos orgánicos y su tasa de descomposición (Rincón & Huante, 1994). La concentración de N del suelo disminuye según aumenta la elevación (Solís, 1993). En el ejemplo de los árboles ectomicorrízicos del miombo africano, se ha encontrado que hay un enriquecimiento de N mayor que el de las plantas que presentan nódulos (Högberg, 1982).

El fósforo orgánico es la forma principal que existe en el suelo del bosque tropical caducifolio (Álvarez-Santiago, 2002). La vegetación responde al aumento en disponibilidad de P en el suelo, particularmente en época de lluvias cuando el P tiene mayor demanda (Lal *et al.*, 2001). El contenido de P en el material fotosintético y proveniente de la hojarasca disminuye de 0.13 a 0.08% con la elevación (Campo-Alves, 2003).

La caída de las hojas constituye una entrada de nutrimentos sincronizada. La hojarasca aporta el 0.5-1.9% de N y el 0.01%-0.15% de P, siendo más importante su aporte de N en comparación con el P. Las plantas absorben el P, potasio (K) y magnesio (Mg), mientras que el calcio (Ca) es inmovilizado. El N es balanceado entre la absorción y la inmovilización en los tejidos (Jaramillo & Sanford, 1995). En la época de secas los nutrimentos incrementan en el suelo debido a la declinación de las poblaciones microbianas y a la baja demanda por parte de las plantas (Lambert *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 1989; García-Méndez *et al.*, 1995).

La ecología del BTC está en función del agua, por lo que se ha encontrado que la formación de raíces varía con las estacionalidades. Castellanos Albores (1998) mencionó

que la estacionalidad es importante para la formación de raíces finas a una profundidad de 0-5 cm. Durante la época de sequías, aumenta la mortalidad de las raíces finas y al empezar las lluvias (julio-agosto) hay formación de las mismas. Sin embargo, a mayor profundidad (5-10 cm) la mortalidad de las raíces no varía conforme la estacionalidad. La mortalidad de las raíces y su descomposición incorporan más N al suelo que la caída de hojas (Vogt *et al.*, 1986; Vitousek & Sanford, 1986).

### **2.3 Micorrizas en bosques tropicales**

Los bosques tropicales se definen por tener estacionalidad en su ciclo hidrológico, por la homogeneidad en la temperatura a lo largo del año y por un fotoperiodo constante (Cecon, 2013). De acuerdo a Cox (2001), las zonas tropicales corresponden a áreas biogeográficas, que pueden ser subdivididas en Paleotrópico, parte del continente asiático y africano, y Neotrópico como parte de México, América Central y Sudamérica. Aspectos que fueron tomados como base en este trabajo.

En los bosques tropicales, donde existe una enorme diversidad biológica, se conoce poco sobre sus interacciones micorrízicas. La mayoría de las plantas en los trópicos se encuentran asociados a hongos formadores de micorriza arbuscular (Moyersoen *et al.*, 2001; McGuire *et al.*, 2008). Existe la hipótesis de que las plantas ectomicorrízicas en los trópicos se encuentran en suelos pobres en nutrientes con acumulación de hojarasca en la superficie y humus (Torti *et al.*, 1999; Henkel, 2003). El suelo en los bosques tropicales presenta una variación edáfica a nivel local, que influye en la estructura de la comunidad vegetal (Peay *et al.*, 2010).

Los árboles ectomicorrízicos pertenecientes a la familia Fabaceae y Dipterocarpaceae, forman grandes parches “monodominantes” en los bosques tropicales (Henkel, 2003; McGuire, 2007) y constituyen un alto porcentaje del área basal. Dícese monodominantes a bosques conformados por grandes extensiones de la misma familia de plantas (Alexander, 2006). Particularmente en BTC se conoce poco de los HECM, para este ecosistema se reporta que la mayoría de las plantas presentan simbiosis micorrízica arbuscular (Smith & Read, 2008). La dinámica de nutrientes en el suelo podría estar explicando la distribución de los hongos arbusculares y ectomicorrizógenos en este tipo particular de bosques (Figura 1), así como las poblaciones de sus hospederos vegetales.

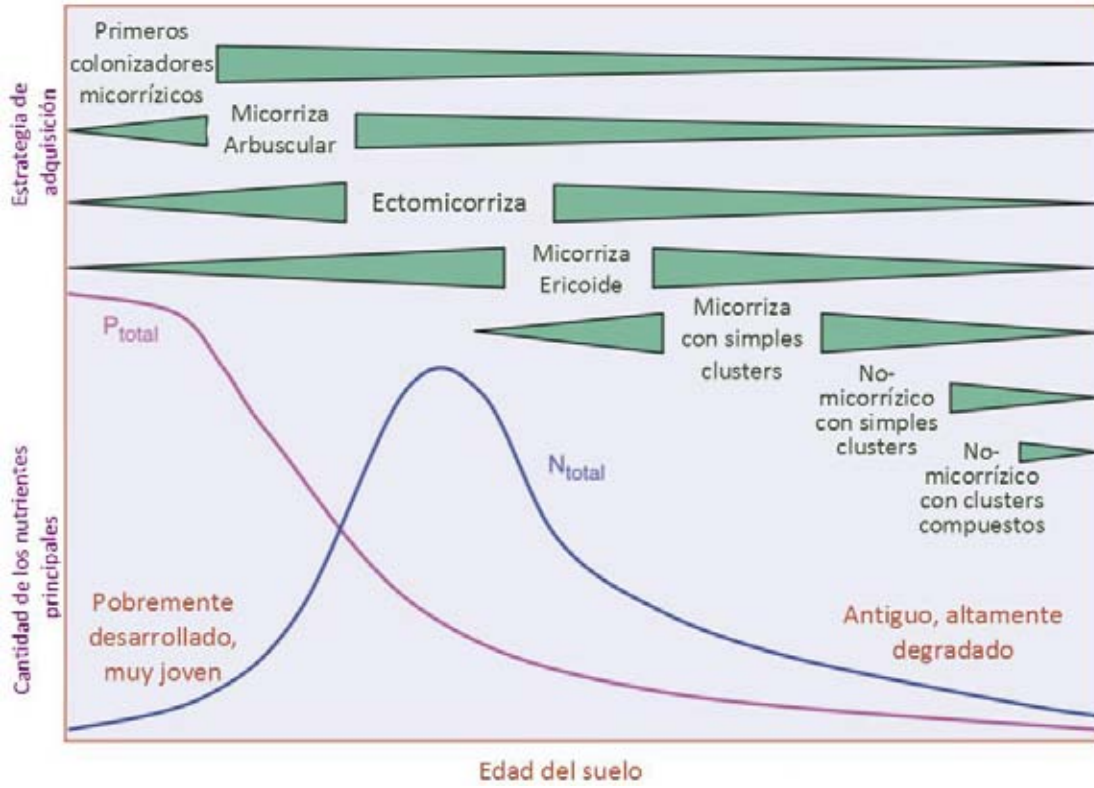


Figura 1. Ilustración que explica la distribución de los diferentes tipos de micorriza de acuerdo a los nutrimentos disponibles del suelo. Tomada y modificada de Lambers *et al.*, 2008b.

### 3. Antecedentes

El estudio de las ectomicorrizas inició con Frank en 1885, quien trabajaba el cultivo de las trufas en los bosques templados de Prusia (Frank, 2005). Fue en los 1950's, prácticamente setenta años después, cuando se empezaron a estudiar las ECM de las zonas tropicales (Fassi, 1957; Ashford & Allaway, 1982; Högberg, 1982; Alexander & Högberg, 1986). Desde entonces se han realizado investigaciones de diferentes índoles sobre ectomicorrizas en los trópicos, incluyendo identificación de las plantas que tienen ectomicorrizas, hasta experimentos de inoculación.

Muchos estudios de los HECM en los trópicos se han basado en estudios taxonómicos con sus esporomas. Incluso antes de que la biología molecular se usara para la identificación de los hongos, se generaban morfotipos, es decir caracterizaciones morfológicas y anatómicas de las ectomicorrizas (Agerer, 1991).

En los bosques tropicales se ha observado que existe este tipo de asociación simbiótica con diferentes angiospermas, pero en menor proporción que con los hongos vesículo-arbusculares (Moyersoen *et al.*, 2001). En la Cuadro 1 se enlistan las angiospermas tropicales de las que se conoce su estatus ectomicorrízico, así como los hongos que se asocian a ellas.

Las dos familias vegetales que han sido más estudiadas son Fabaceae y Dipterocarpaceae. La familia Fabaceae está dividida en tres subfamilias: Mimosoideae, Caesalpinoideae y Papilionoideae. De la subfamilia Caesalpinoideae se reportan el mayor número de géneros ectomicorrízicos, mientras que de Papilionoideae y Mimosoideae se conoce poco.

La familia Dipterocarpaceae se encuentra distribuida en África, Asia y Sudamérica, y en los tres continentes se han llevado a cabo estudios sobre sus simbiontes fúngicos (Brearley, 2012). Esta familia no se distribuye en México, en cambio la familia Fabaceae es dominante en algunos de los bosques tropicales del país.

**Cuadro 1. Listado de plantas que han sido reportadas como hospederos ectomicorrizicos en bosques tropicales y áreas costeras.**

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
Asteropeiaceae	<i>Asteropeia</i>	Madagascar	Bosque tropical perennifolio	<i>Amanita, Boletus, Cantharellus, Cortinarius, Pisolithus, Russula, Scleroderma, Xerocomus</i>	-	1	Ducousso <i>et al.</i> , 2008; Bâ <i>et al.</i> , 2012
Dipterocarpaceae	<i>Dipterocarpus</i>	India, Sarawak, Malasia Borneo	Bosque tropical perennifolio	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986
				-	Atheliales, Boletaceae, Boletales, Clavulinaceae, Elaphomycetaceae, Entolomataceae, <i>Lactarius</i> , Russulales, Russulaceae, Sclerodermataceae, <i>Sebacina</i> , Sordariales, Thelephoraceae, <i>Tomentella</i>	4	Peay <i>et al.</i> , 2010
		Tailandia	Bosque tropical perennifolio	<i>Amanita, Boletellus, Boletus, Cantharellus, Clitopilus, Inocybe, Entoloma, Fuscoboletinus, Gastroboletus, Lactarius, Pisolithus, Phylloporus, Russula</i>	-	3	Dell <i>et al.</i> , 2005
			Bosque tropical	<i>Amanita, Austrogautieria,</i>	<i>Amanita</i> , Atheliaceae, <i>Astraeus</i> , Boletales,	3	Dell <i>et al.</i> , 2005



Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
			caducifolio	<i>Astraeus, Boletellus, Boletochate, Boletus, Cantharellus, Craterellus, Clavulina, Gastroboletus, Heimiella, Inocybe, Entoloma, Lactarius, Phylloporus, Pisolithus, Russula, Scleroderma, Sinoboletus, Xerocomus</i>	<i>Cenococcum, Ceratobasidium, Clavulina, Craterellus, Elaphomyces, Laccaria, Lactarius, Gymnomyces, Hydnobolites, Inocybe, Phialemonium, Pseudocraterellus, Rhodoveronaea, Russula, Russulaceae, Sebacina, Scleroderma, Sordariales, Thelephoraceae, Tomentella</i>	4	Phosri <i>et al.</i> , 2012
	<i>Hopea</i>	India	Bosque tropical perennifolio	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986
		Tailandia	Bosque tropical perennifolio y caducifolio	*	-	3	Dell <i>et al.</i> , 2005
	<i>Marquesia</i>	Zambia	Pastizales tropicales y subtropicales	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986; Bâ <i>et al.</i> , 2012
	<i>Monotes</i>	Zambia y Tanzania	-	-	-	5; 2	Högberg, 1982; Alexander & Högberg, 1986; Bâ <i>et al.</i> , 2012
	<i>Pakaraimaea</i>	Caroní, Bolívar, Venezuela	Bosque tropical perennifolio	-	<i>Amanita, Clavulinaceae, Cortinarius, Inocybe, Sebacina</i>	2 y 4	Moyersoen, 2006
		Guyana	Bosque tropical perennifolio	Agaricales, <i>Amanita, Austroboletus, Boletellus, Clavulina,</i>	Agaricales, <i>Amanita, Austroboletus, Boletellus, Boletus, Clavulina,</i>	6	Smith <i>et al.</i> , 2013

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
				<i>Cortinarius, Lactarius, Russula, Tylopilus, Xerocomus</i>	<i>Cortinarius, Elaphomyces, Hysterangiales, Lactarius, Polyporales, Russula, Tomentella, Tylopilus, Xerocomus</i>		
	<i>Shorea</i>	India	Bosque tropical subperennifolio	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986
		Sarawak, Malasia	Bosque tropical perennifolio	-	-	2	
		Tailandia	Bosque tropical perennifolio	*	-	3	Dell <i>et al.</i> , 2005
			Bosque tropical caducifolio	*	*	3	Dell <i>et al.</i> , 2005; Phosri <i>et al.</i> , 2012
	<i>Vateria</i>	India	Bosque tropical perennifolio	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986
	<i>Vateriopsis</i>	Seychelles	-	Hymenochaetoide	Boletoide, <i>Cortinarius</i> , Canthareloide, Hymenochaetoide, Russuloide, Sordariomycetes, Thelephoroide	7	Tedersoo <i>et al.</i> , 2007
Fabaceae subfamilia Caesalpinioideae	<i>Azelia</i>	Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Newbery & Alexander, 1988

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
		Ghana	Bosque tropical subperennifolio	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986
		Tanzania	Pastizales tropicales y subtropicales	-	-	2	
		Guinea e India	Bosque tropical perennifolio	<i>Amanita</i> , Boletoides, <i>Boletus</i> , <i>Chalciporus</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Leccinum</i> , <i>Russula</i> , Russuloide, <i>Scleroderma</i> , Sclerodermatoide, <i>Strobilomyces</i> , Thelephoroide, <i>Tomentella</i> , <i>Tricholoma</i> , Tricholomatoide, <i>Tubosaeta</i> , <i>Xerocomus</i>	<i>Albatrellus</i> , <i>Amanita</i> , <i>Boletellus</i> , Boletoides, <i>Boletus</i> , <i>Cantharellus</i> , <i>Chalciporus</i> , <i>Gyroporus</i> , <i>Hydnum</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Leccinum</i> , <i>Pisolithus</i> , <i>Russula</i> , <i>Scleroderma</i> , Sclerodermatoide, <i>Sebacina</i> , <i>Strobilomyces</i> , <i>Thelephora</i> , Thelephoroide, <i>Tomentella</i> , <i>Tricholoma</i> , Tricholomatoide, <i>Tulasnella</i> , <i>Xerocomus</i>	7	Riviere <i>et al.</i> , 2007
	<i>Anthonotha</i>	Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Chuyong <i>et al.</i> , 2000
		Sur de Guinea	Bosque tropical perennifolio	*	Basidiomycota, <i>Boletus</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Russula</i> , Russulaceae, <i>Scleroderma</i> , Thelephoraceae, Tricholomataceae	8	Diédhiou <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aphanocalyx</i>	Korup National Park,	Bosque tropical	-	-	5	Newbery & Alexander, 1988

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
	<i>Berlinia</i>	Camerún Korup National Park, Camerún	perennifolio Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Newbery & Alexander, 1988; Chuyong <i>et al.</i> , 2000
	<i>Brachystegia</i>	Tanzania Zambia Congo	Pastizales tropicales y subtropicales -	- -	- -	2 5	Alexander & Högberg, 1986 Fassi & Fontana, 1962
	<i>Cryptosepalum</i>	Guinea	Bosque tropical perennifolio	-	Basidiomycota, <i>Clavulina</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Russula</i> , Russulaceae, <i>Scleroderma</i> , Thelephoraceae	7	Riviere <i>et al.</i> , 2007; Diédhiou <i>et al.</i> , 2010
			Bosque tropical caducifolio	*	*	7	Riviere <i>et al.</i> , 2007
	<i>Didelotia</i>	Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Newbery & Alexander, 1988; Chuyong <i>et al.</i> , 2000
	<i>Dicymbe</i>	Montañas de Pakaraima, Guyana	Bosque tropical perennifolio	<i>Amanita</i> , <i>Austroboletus</i> , <i>Boletellus</i> , <i>Cantharellus</i> , <i>Chalciporus</i> , <i>Clavulina</i> , <i>Coltricia</i> , <i>Coltriciella</i> , <i>Cortinarius</i> , <i>Craterellus</i> , <i>Elaphomyces</i> , <i>Entoloma</i> , <i>Gyroporus</i> , <i>Hysterangium</i> , <i>Inocybe</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Phylloporus</i> , <i>Pseudotulostoma</i> ,	<i>Amanita</i> , Atheliales, <i>Austroboletus</i> <i>Boletellus</i> , <i>Cantharellus</i> , <i>Clavulina</i> , <i>Cortinarius</i> , <i>Craterellus</i> , <i>Inocybe</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Pseudotulostoma</i> , <i>Russula</i> , Sebaciniales, <i>Tomentella</i> , <i>Tylopilus</i> , <i>Xerocomus</i>	1; 7	Henkel <i>et al.</i> , 2002, 2003, 2006a, 2006b, 2011; Miller <i>et al.</i> , 2001 Fulgenzi <i>et al.</i> , 2007, 2010; Smith <i>et al.</i> , 2011

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
				<i>Pulveroboletus, Russula, Tremellodendron, Sebacina, Tomentella, Tylopilus, Xerocomus</i>			
	<i>Gleditsia</i>	Uruguay	-	-	-	5	Frioni <i>et al.</i> , 1999
	<i>Gilbertiodendron</i>	Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Newbery & Alexander, 1988
		Congo	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Fassi, 1960; Torti & Coley, 1999
		Guinea e India	Bosque tropical perennifolio	*	*	7	Riviere <i>et al.</i> , 2007
		Sierra Leona	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Bakarr & Janos, 1996
	<i>Intsia</i>	Papua Nueva Guinea	-	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986
		Seychelles	-	Hymenochaetoide, Theleforoide, <i>Tomentella</i>	<i>Boletellus</i> , Boletoides, <i>Cortinarius</i> , Hymenochaetoide, <i>Scleroderma</i> , Theleforoide	7	Tedersoo <i>et al.</i> , 2007
	<i>Julbernardia</i>	Tanzania Zambia	Pastizales tropicales y subtropicales	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986
		Congo	Bosque tropical	-	-	5	Fassi & Fontana, 1961; Torti &

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
			perennifolio				Coley, 1999
		Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Newbery & Alexander, 1988
	<i>Microberlinia</i>	Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Newbery & Alexander, 1988; Chuyong <i>et al.</i> , 2000; Newbery <i>et al.</i> , 2000; Green & Newbery, 2002
	<i>Monopethalanthus</i>	Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	*	-	7	Newbery & Alexander, 1988; Riviere <i>et al.</i> , 2007
	<i>Paraberlinia</i>	Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	*	*		Onguene & Kuyper, 2001
	<i>Paramacrolobium</i>	Guinea e India	Bosque tropical perennifolio	*	*	7	Riviere <i>et al.</i> , 2007; Diédhiuo <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pelligriniodendron</i>	Guinea e India	Bosque tropical perennifolio	*	*	7	Riviere <i>et al.</i> , 2007
	<i>Tetraberlinia</i>	Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Newbery & Alexander, 1988; Newbery <i>et al.</i> , 2000; Riviere <i>et</i>

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
	<i>Toubaouate</i>	Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	<i>al.</i> , 2007 Onguene & Kuyper, 2001
Fabaceae subfamilia Mimosoideae	<i>Acacia</i> <i>Calliandra</i> <i>Prosopis</i>	Uruguay	-	-	-	5	Frioni <i>et al.</i> , 1999
Fabaceae subfamilia Papilionoideae	<i>Aldina</i>	Montañas de Pakaraima, Guyana	Bosque tropical perennifolio	<i>Amanita, Austroboletus, Boletellus, Cantharellus, Chalciporus, Clavulina, Cortinarius, Craterellus, Entoloma, Lactarius, Russula, Tylopilus, Xerocomus</i>	<i>Amanita, Austroboletus, Atheliales, Boletellus, Cantharellus, Clavulina, Cortinarius, Craterellus, Inocybe, Lactarius, Pseudotulostoloma, Russula, Sebaciales, Tomentella, Tylopilus, Xerocomus</i>	3; 5; 7	Henkel <i>et al.</i> , 2002; McGuire <i>et al.</i> , 2008; Smith <i>et al.</i> , 2011
	<i>Lonchocarpus</i>	Uruguay	-	-	-	5	Frioni <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pericopsis</i>	Zambia	Pastizales tropicales y subtropicales	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986
Gnetaceae	<i>Gnetum</i>	Brasil	Bosque tropical perennifolio	<i>Amanita, Austroboletus, Chalciporus, Entoloma, Gymnopilus, Lactarius, Russula, Scleroderma, Tylopilus, Xerocomus</i>	-	3; 7	Singer & Araujo 1979; St John 1980
		Caatinga, Venezuela	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Moyersoen, 1993

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
		África	-	-	-	5	Fassi, 1957
		Papua Nueva Guinea	Bosque tropical perennifolio secundario	-	<i>Inocybe, Russula-Lactarius, Sordariales, Tomentella-Thelephora, Scleroderma</i>		Tedersoo & Pöhlme, 2012
		Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	¿?	2,8	Bechem & Alexander, 2012
Melastomataceae	<i>Graffenrieda</i>	Reserva Biológica San Francisco, Ecuador	Bosque tropical perennifolio	-	Leotiomycetes, Sordariomycetes y Dothideomycetes	2,4	Haug <i>et al.</i> , 2004
Myrtaceae	<i>Melaleuca</i> <i>Tristania</i>	Tailandia Malasia	-	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986
Nyctaginaceae	<i>Guapira</i>	Venezuela	Bosque tropical perennifolio	-	-	1	Moyersoen, 1993
		Parque Nacional de Yasuni, Ecuador	Bosque tropical perennifolio	-	<i>Cantharellus, Clavulina, Inocybe, /russula-lactarius<sup>+</sup>, /tomentella-thelephora<sup>+</sup></i>	8	Tedersoo <i>et al.</i> , 2010b
	<i>Pisonia</i>	El Consuelo, Ecuador	Bosque de niebla	-	<i>Russula, Lactarius, /tomentella-thelephora<sup>+</sup>, Ascomycete</i>	2,8	Haug <i>et al.</i> , 2005
		Sur de Ecuador	Bosque tropical perennifolio	-	<i>/tomentella-thelephora<sup>+</sup></i>	2,8	Haug <i>et al.</i> , 2014



Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
		Seychelles	-	<i>Tomentella</i>	<i>Tomentella</i>	2,8	Ashford & Allaway, 1985; Suvi <i>et al.</i> , 2010
	<i>Neea</i>	Amazonia, Brasil	Bosque tropical perennifolio	<i>Amanita, Cantharellus, Cortinarius, Craterellus, Lactarius, Phyllobolites, Phylloporus, Russula, Tylopilus, Xerocomus</i>	-	3	Singer & Araujo, 1979; Janos, 1980; St John, 1980
		Perú	-	-	-	2	Alexander & Hogberg, 1986
		Guyana Francesa	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Béreau <i>et al.</i> , 1997
		Cuyabeno, Ecuador	Bosque tropical perennifolio	-	<i>Amanita, Cantharellus, Entoloma, Inocybe, Paxillus, Russula, Scleroderma, Thelephoraceae</i>	3,5	Lunt & Hegder, 1996
		Sur de Ecuador	Bosque tropical perennifolio	-	<i>Russula, Lactarius, /tomentella-thelephora<sup>+</sup>, Ascomycota</i>	2,4	Kottke & Haug, 2004; Haug <i>et al.</i> , 2004
		Sur de Venezuela	Bosque tropical perennifolio	¿?	-	1	Moyersoen, 1993
Phyllantaceae	<i>Uapaca</i>	Guinea e India	Bosque tropical perennifolio	<i>Lactarius, Leccinum, Russula, Scleroderma, Strobilomyces, Tomentella, Tricholoma, Tricholomatoide Tubosaeta, Xerocomus</i>	<i>Boletus, Clavulina, Clavulinaceae, Lactarius, Leccinum, Phylloporus, Russula, Russuloide, Scleroderma, Sclerodermatoide, Thelephoroide,</i>	3, 4	Riviere <i>et al.</i> , 2007; Diédhiuo <i>et al.</i> , 2010

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
					Thelephoraceae, <i>Tomentella</i> , <i>Tricholoma</i>		
		Zambia	Bosque tropical perennifolio	-	-	2	Högberg & Pearce, 1986; Alexander & Högberg, 1986
		Madagascar	Bosque tropical perennifolio	<i>Afroboletus</i> , <i>Amanita</i> , <i>Coletus</i> , <i>Cantharellus</i> , <i>Gyroporus</i> , <i>Leccinum</i> , <i>Rubinoboletus</i> , <i>Russula</i> , <i>Scleroderma</i> , <i>Suillus</i> , <i>Xerocomus</i>	<i>Afroboletus</i> , <i>Amanita</i> , <i>Boletus</i> , <i>Cantharellus</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Leccinum</i> , <i>Rubinoboletus</i> , <i>Scleroderma</i> , <i>Tricholoma</i> , <i>Xerocomus</i>	2, 6	Ramanankierana <i>et al.</i> , 2007
		Burkina Faso	Bosque tropical perennifolio	<i>Amanita</i> , <i>Austrogautieria</i> , <i>Boletellus</i> , <i>Cantharellus</i> , <i>Coltricia</i> , <i>Inocybe</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Russula</i> , <i>Scleroderma</i> , <i>Sclerogaster</i> , <i>Strobilomyces</i> , <i>Tubosaeta</i> , <i>Xerocomus</i>	-	3	Sanon <i>et al.</i> , 1997
		Nigeria	Bosque tropical perennifolio	-	-	2	Redhead, 1968
		Korup National Park, Camerún	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Newbery & Alexander, 1988
		Tanzania	Pastizales tropicales y subtropicales	-	-	2	Alexander & Högberg, 1986

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor	
				Esporomas	Ectomicorrizas			
Polygonaceae	<i>Coccoloba</i>	Cuba	Dunas costeras	<i>Amanita, Cantharellus, Fistulinella, Inocybe, Lactarius, Russula, Scleroderma, Xerocomus</i>	-	3	Kresiel, 1970; Pegler, 1983	
		México	Dunas costeras	-	<i>Scleroderma, Thelephoraceae</i>	2, 8	Alvarez-Manjarrez, 2012	
		Venezuela	-	¿?	-	-	5	Moyersoen, 1993
		Guyana Francesa	Bosque tropical perennifolio	-	-	-	5	Béreau <i>et al.</i> , 1997
		Trinidad y Tobago	Dunas costeras	<i>Scleroderma</i>	-	-	3	Reid, 1977
		Puerto Rico, Mona e Islas Guana	Dunas costeras	<i>Amanita, Boletus, Lactarius, Russula</i>	-	-	3	Miller <i>et al.</i> , 2007
		Brasil	Bosque tropical perennifolio	-	-	-	2	Landim de Souza, 2003
		Belice República Dominicana	Dunas costeras	<i>Boletus, Xerocomus</i>	-	-	3	Ortiz-Santana <i>et al.</i> , 2007
		Ecuador	Bosque tropical perennifolio	-	<i>Amanita, Cantharellus, Clavulina, /russula-lactarius<sup>+</sup>, Sebacina, /tomentella-thelephora<sup>+</sup></i>	-	8	Tedersoo <i>et al.</i> , 2010b
			<i>Gymnopodium</i>	México	Bosque tropical caducifolio	-	-	5

Familia	Género	Lugar	Ecosistema	Hongos ectomicorrizógenos asociados		Tipo de estudio	Autor
				Esporomas	Ectomicorrizas		
Proteaceae	<i>Faurea</i>	Zambia	Bosque tropical perennifolio	-	-	2	Högberg & Pearce, 1986
Salicaceae	<i>Salix</i>	Sudamérica	Vegetación riparia	<i>Neopaxillus</i>	-	3	Singer 1953
		Argentina	-	-	<i>Inocybe, Tomentella</i>	2, 4	Becerra <i>et al.</i> , 2009
Sapotaceae	<i>Glycoxylon</i>	Brasil	Bosque tropical perennifolio	*	-	3	Singer & Araujo, 1979
	<i>Manilkara</i>	República del Congo	Bosque tropical perennifolio	-	-	5	Torti & Coley, 1999
Sarcolanaceae	<i>Leptolaena</i> <i>Sarcolaena</i> <i>Schizolaena</i> <i>Xyloolaena</i>	Madagascar	Bosque tropical perennifolio	<i>Boletus, Pisolithus, Russula</i>	-	1	Ducousso <i>et al.</i> , 2008

En color azul se encuentran sombreados todos los estudios que se han llevado a cabo en el Neotrópico. Las casillas coloreadas en color naranja son estudios que se han realizado en BTC en cualquier parte del mundo. Las casillas con asterisco (\*) indican que la diversidad de hongos encontrada para esa planta, ya fue mencionada en casillas anteriores. Los nombres que presentan (†) indican linajes de HECM. Las casillas que presentan un guión (-) se refiere a la falta de información por no ser parte de los objetivos del trabajo. Las casillas con signos de interrogación (?) indican la cita de la información por otra literatura, pero a la cual no se tuvo acceso para corroborar. 1: Recolección de esporomas en bosques específicos de un género vegetal; 2: caracterización de morfotipos; 3: recolección de esporomas en bosque mixto sin especificar género vegetal; 4: identificación molecular de ECM, 5: reconocimiento de árboles tropicales como hospederos ectomicorrízicos, 6: búsqueda de esporomas, de ECM e identificación molecular de ambos, 7: búsqueda de esporomas, de ECM e identificación molecular de ambos, junto con la identificación de la planta, 8: búsqueda de ECM secuenciando a la planta y al hongo.

Phosri *et al.* (2012) realizaron un trabajo sobre la diversidad y composición de la comunidad de ectomicorrizas (ECM) de un bosque tropical caducifolio en Tailandia, con monodominancia de la familia Dipterocarpaceae. Este es el primer estudio que se lleva a cabo con técnicas de biología molecular para identificación del micobionte en un bosque tropical caducifolio, descubriendo 22 géneros ectomicorrizógenos (Cuadro 1).

Existen otros trabajos como el de Frioni *et al.* (1999) que, a pesar de que no reportan el tipo de vegetación donde se muestreó, tiene componentes florísticos de BTC. Ellos reportan a *Acacia*, *Calliandra*, *Lonchocarpus* y *Prosopis*, como ectomicorrízicos en Uruguay. Su trabajo constó en identificar raíces con apariencia de ectomicorriza y describir qué plantas mostraron estas estructuras. En ciertos bosques, conseguir la rizosfera de una planta específica es un trabajo difícil, debido a la cantidad de raíces de diferentes plantas que están entremezcladas. La información proveniente de esta metodología, no es del todo certera.

También existe la posibilidad de que a pesar de que se observen estructuras de manto en las raíces, no se trate de una verdadera ECM sino de un hongo saprobio. La evidencia que brinda el hacer caracterizaciones morfológicas y anatómicas de las raíces, no deja lugar a dudas de que se trate de asociación ectomicorrízica.

Uno de los pocos trabajos que se tiene sobre caracterización de ECM e identificación con marcadores moleculares en el Neotrópico, es el trabajo de Haug *et al.* (2005) en Ecuador, donde estudiaron la asociación ectomicorrízica de *Guapira* y *Neea* (Nyctaginaceae). Encontraron los linajes /*russula-lactarius* y /*tomentella-thelephora*, además de un ascomicete en las raíces. También encontraron en sus morfotipos, hifas intracelulares provenientes del manto, lo cual es una característica rara en ECM.

Para el caso de las ectomicorrizas en el trópico mexicano el único trabajo es el de Alvarez-Manjarrez (2012), donde se realizaron caracterizaciones de morfotipos de *Coccoloba uvifera* en la costa del norte de Veracruz. A pesar de que sólo se describieron dos ECM se menciona que se encontraron 12 morfotipos diferentes. *Coccoloba* es un género que ha sido reportado en diversos lugares del mundo como ectomicorrízico (Kreisel, 1971; Pegler, 1983; Miller *et al.*, 2000; Tedersoo *et al.*, 2010b).

### **3.1 Estudio de la diversidad fúngica con secuencias de DNA**

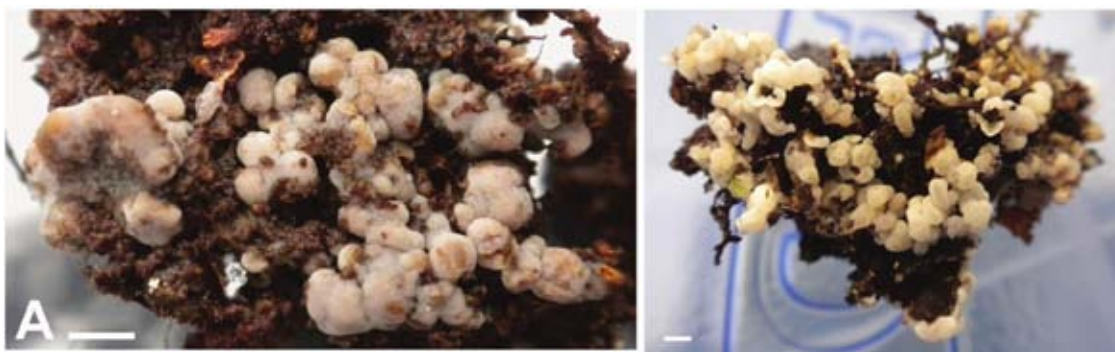
La taxonomía clásica se ha basado en la morfología de los organismos. Para el caso de los hongos macroscópicos, las descripciones de las especies se han basado en los caracteres que presentan sus esporomas, es decir ascomas y basidiomas (Hibbett & Taylor, 2013); sin embargo la genética molecular ha proporcionado información adicional relacionada con la identificación de especies. Un ejemplo de ello serían los métodos de

códigos de barras, que a partir de uno o más regiones génicas, se puede usar como diagnóstico para identificar las especies (Matz & Nielsen, 2005; Abdo & Golding 2007) o pueden ser identificadas especies crípticas (Bickford *et al.*, 2007). Sin embargo el uso de diferentes regiones génicas, la variabilidad del umbral para delimitación de especies y los algoritmos de agrupamiento, representan un reto para estimar diversidad (Setaro *et al.*, 2011).

El estudio de la diversidad en hongos presenta algunas dificultades conceptuales. La diversidad se compone de riqueza y abundancia de especies. Recordando que riqueza se refiere al número de especies, mientras que abundancia es el número de individuos por especie (Begon *et al.*, 2006). Tomando en cuenta la biología de los hongos, la mayoría se encuentran inmersos en el sustrato del cual se alimentan. Para el caso de los hongos ectomicorrizógenos, se tratan de hongos compuestos por hifas filamentosas. Ya que los HECM y las ectomicorrizas se encuentran en el suelo, no es posible definir fácilmente individuos. No obstante otro de los beneficios que ha traído la secuenciación de DNA, es que se puedan definir secuencias únicas como individuos (Lentendu *et al.*, 2011). De esta manera, el uso de las herramientas moleculares son de gran ayuda para determinar diversidad de HECM, no tan sólo a partir de esporomas, sino de las mismas ECM.

Como se mencionó anteriormente se ha demostrado que la diversidad encontrada a través de esporomas y de ectomicorrizas, es distinta. Existen familias de HECM que presentan estructuras reproductivas inconspicuas. Sus hábitos no permiten su simple apreciación, como es el caso de la familia Thelephoraceae, Sebacinaceae y/o Clavulinaceae, que algunos de sus miembros forman esporomas resupinadas (Figura 2). También existe la posibilidad de que los hongos no presenten reproducción sexual, por lo que nunca se encuentran los esporomas de esas especies.

Cabe resaltar que la familia Thelephoraceae es muy importante en la ecología de las ectomicorrizas, pues se le encuentra en abundancia en muchos ecosistemas además de ser una de las más diversas (Yorou *et al.*, 2007; Bahram *et al.*, 2013). Para el caso de Clavulinaceae, el género *Clavulina* presenta mayor número de especies en zonas tropicales que en templadas, sugiriendo que algunos de los HECM tuvieron ancestros en los trópicos y tuvieron radiación en áreas templadas (Kennedy *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Esporomas resupinadas de las especies *Clavulina cinereoglobosa* (izquierda) y *C. cerebriformis* (derecha). Tomada de Uehling *et al.*, (2012); barra=10 mm.

Smith *et al.* (2013) realizaron identificación de los micobiontes presentes en las raíces de *Pakaraimea dipterocarpacea* (Dipterocarpaceae), muestreando los esporomas y las ECM. Los esporomas fueron identificados taxonómicamente y secuenciados. Con las secuencias de las ECM y los esporomas, se trató de llegar al grupo taxonómico de las ECM. Sin embargo, sólo 14 de los 52 MOTUs, que fueron generados a partir de las secuencias de ECM, correspondieron con las 24 especies descritas con taxonomía tradicional. En esta tesis se intentó realizar la identificación de los hongos al recolectar los esporomas de HECM, secuenciarlos y comparar las secuencias con las de las ECM.

De los pocos trabajos que se han llevado a cabo en BTC sobre HECM en México, está el trabajo de Hasselquist *et al.* (2011). Ellos encontraron cuatro especies de boletales no identificados, para la península de Yucatán en la Reserva Ecológica del Edén y mencionaron que hay cuatro posibles hospederos ectomicorrízicos en la zona: *Guapira*, *Neea*, *Pisonia* (Nyctaginaceae) y *Coccoloba* (Polygonaceae).

El único antecedente directo del sitio de estudio es el trabajo de Agaricomycetes clavarioides en la Estación de Biología de Chamela, Jalisco (Ramírez-López *et al.*, 2012). Por medio de muestreo de esporomas, se describieron dos especies de *Clavulina* sp., *Phaeoclavulina* aff. *articulotela*, *Ramaria* aff. *moelleriana*, *R.* aff. *rainierensis*, *Thelephora versatilis* y *T. pseudoversatilis* (Ramírez-López *et al.*, en proceso) todas ellas pertenecientes a géneros de HECM. Además de haber obtenido un alto valor del índice de diversidad de Shannon-Wiener (0.97) para hongos clavarioides en general.

## **4. Objetivo general**

- Realizar el primer diagnóstico de la diversidad de hongos y plantas ectomicorrízicas en los bosques tropicales caducifolio y subperennifolio de la Estación de Biología de Chamela, Jalisco, IBUNAM.

### **4.1 Objetivos particulares**

- Identificar a los micobiontes y fitobiontes directamente de las ectomicorrizas con marcadores moleculares.
- Reconocer la relación específica de hongo-planta de cada ectomicorriza.
- Conocer la diversidad de hongos ectomicorrizógenos haciendo un muestreo de esporomas y ectomicorrizas.
- Diagnosticar con dos métodos de muestreo, el más efectivo para encontrar ectomicorrizas en este ecosistema, muestreando en el suelo bajo los esporomas y en la rizosfera de los posibles hospederos ectomicorrízicos.
- Caracterizar morfológica y anatómicamente las ectomicorrizas, mencionando tanto al hongo como a la planta simbiote.



## 5. Hipótesis

- Dado que estudios con esporomas de hongos ectomicorrizógenos en la EBCh han demostrado una baja diversidad, es de esperarse que muchas de las especies que encontremos formando ectomicorrizas tengan esporomas inconspicuos o carezcan de reproducción sexual.
- Ya que la familia Fabaceae es dominante en la zona de estudio, se espera que particularmente los miembros de la subfamilia Caesalpinoideae, sean los principales hospederos ectomicorrízicos de la Estación de Biología de Chamela, Jal.
- Dado que en la zona predominan los hospederos micorrízico arbusculares y que los ectomicorrízicos se encuentran dispersos, la probabilidad de encontrar ectomicorrizas en el suelo debajo de esporomas de HECM será mayor que en un muestreo realizado en la rizosfera de los posibles hospederos ectomicorrízicos.

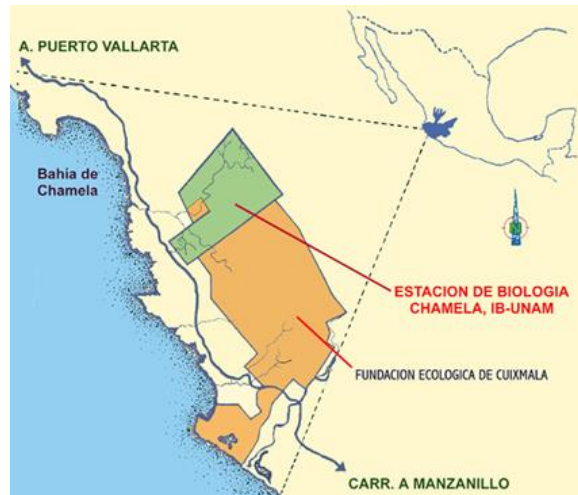
## 6. Metodología

### 6.1 Sitio de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en la Estación de Biología Chamela (con coordenadas N 19°30', O 105°03'), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, localizada dentro de la Reserva de la Biósfera Chamela-Cuixmala (RBCC) ubicada en el municipio de La Huerta, Jalisco (Figura 3). La estación presenta una extensión de 3319 ha, mientras que la RBCC abarca 13142 hectáreas (Noguera *et al.*, 2002).

El clima, según el sistema de Köppen, es cálido subhúmedo (Aw0(x')i) en verano mientras que la estación hibernal es seca (Bshw). Hay una estacionalidad marcada, presentándose los meses de lluvia de julio a octubre, donde se lleva a cabo el 84% de la precipitación promedio anual, cayendo en promedio 784.8 mm por año (1977-2011). Esta precipitación es variable debido a las tormentas asociadas a los ciclones, que se presentan generalmente en septiembre-octubre. El resto del año, de noviembre a julio, se cuenta con un periodo de sequía con algunas lluvias ligeras en invierno. La temperatura media anual es de 24.6 °C (1978-2000) con una temperatura máxima en promedio de 30.3 °C que coincide con el inicio de lluvias, y mínima de 19.5 °C. La humedad atmosférica relativa se mantiene superior al 65%, aumentando en los meses de mayor precipitación (Bullock, 1986; Solís, 1993; García-Oliva *et al.*, 1995).

Rzedowski (1978) reconoció once tipos de vegetación para todo el territorio nacional; en el caso de la costa del Pacífico mexicano se han caracterizado al BTC, como ecosistema predominante en la Estación de Chamela, y el bosque tropical subperennifolio (BTS), el cual se encuentra asociado a cañadas y arroyos. Los bosques tropicales caducifolios en México cubren 60% del área ocupada por los bosques tropicales del país (Figura 4). También es conocido como “selva baja caducifolia” y en otros países se le conoce como *tropical dry forest* o *seasonally dry tropical forest* (Rzedowski, 1978; Trejo & Dirzo, 2000).



**Figura 3. Mapa de la Reserva Biológica de Chamela, Jalisco, donde se encuentra la Estación de Biología Chamela (EBCh).** Figura tomada de la página de internet de la Estación (<http://www.ibiologia.unam.mx/ebchamela/www/reservacc.html>; última consulta: 15/10/2014).

### 6.1.1 Bosque tropical caducifolio

Este bioma abarca desde el sur de Sonora y el suroeste de Chihuahua hasta Chiapas, pasando por el centro del país siguiendo las vertientes de los Ríos Santiago y Balsas, hacia la Depresión Central de Chiapas, a través del Istmo de Tehuantepec. Por el lado del Golfo de México ocurre en 3 regiones aisladas: al sur de Tamaulipas, sureste de San Luis Potosí, norte de Veracruz y noreste de Querétaro; al centro de Veracruz y la tercera parte en la Península de Yucatán. Además está presente en el extremo sur de Baja California (Rzedowski, 1978; Rzedowski & Calderón de Rzedowski, 2013) (Figura 4).



**Figura 4. Mapa de distribución del bosque tropical caducifolio en México.** Tomado de Rzedowski & Calderón de Rzedowski (2013).

Sus árboles alcanzan una altura de ocho a 12 m, ramificándose a baja altura, además de otras formas de vida, como arbustos y lianas (Trejo & Dirzo, 2000). Su flora es muy diversa y en conjunto con los bosques tropicales subperennifolios y espinosos, se estima que comprende alrededor de 20% de la flora mexicana (aproximadamente 6,000 especies), siendo aproximadamente 40% de sus especies endémicas de México (Rzedowski, 1991).

Se han registrado 125 familias de plantas vasculares en la región de Chamela-Cuixmala; las familias con mayor número de especies son Fabaceae con 160 especies (14.0%) (Caesalpinioideae: 33 especies; Mimosoideae: 47 especies; Papilionoideae: 80 especies) y Euphorbiaceae con 94 especies (8.2%) (Lott & Atkinson, 2002). En casi todas las selvas neotropicales, la familia Fabaceae es la más diversa en especies (Gentry, 1988; Villaseñor e Ibarra, 1998) y en todos los sitios de selvas secas discutidos por Gentry (1995). Trejo (1998) encontró que las familias mejor representadas en sus muestreos de la RBCC eran Fabaceae, Euphorbiaceae, Cactaceae, Compositae y Burseraceae. Estas cinco familias comprendieron el 43% del total de especies registradas.

La familia con mayor número de árboles es Fabaceae (57 especies), con 23.4% de los árboles de toda la flora de la región. Géneros representantes incluyen *Albizia*, *Caesalpinia*, *Jatropha*, *Lonchocarpus*, *Lysiloma*, *Mimosa*, *Platymiscium* y *Poeppigia*. Familias de árboles comunes en Chamela, incluyen a Anacardiaceae, Annonaceae, Nyctaginaceae, Polygonaceae y Solanaceae.

Los géneros con mayor número de especies son *Ipomoea* (26 especies), *Tillandsia* (17), *Croton* (16), *Mimosa* (13), *Cyperus* (13), *Acalypha* (13), *Solanum* (12), *Lonchocarpus* (12), *Phyllanthus* (11), *Euphorbia* (11), *Cordia* (11) y *Acacia* (11). Entre los géneros más diversos (>10 spp.), *Lonchocarpus* es el único enteramente arborescente y casi todas sus especies en Chamela son endémicas a la costa del Pacífico, además de ser muy abundantes (Lott *et al.*, 1987). En este mismo sentido *Bursera* (9 spp.), *Caesalpinia* (9 spp.) y *Jatropha* (7 spp.), juegan un papel importante por su abundancia y número de especies en el BTC.

Los géneros presentes en Chamela, importantes en zonas áridas y que son principalmente de distribución cosmopolita, son *Acacia*, *Asitida*, *Caesalpinia*, *Cassia*, *Jatropha*, *Mimosa*, *Randia*, *Salvia*, y *Solanum* (Rzedowski, 1973). Hay algunos géneros muy diversificados en selvas bajas, como *Bursera*, *Jatropha*, *Lonchocarpus*, *Croton* e *Ipomoea* (Trejo, 1998), contribuyen con una porción relativamente alta de especies endémicas para la zona.

En cuanto a la flora arbustiva, constituye el 20.7% de toda la vegetación. Predomina la familia Fabaceae y Euphorbiaceae, mientras que las especies más comunes son *Achatocarpus gracilis*, *Capparis indica*, *Casearia corymbosa*, *Croton roxanae*, *Erythroxylum havanense*, *Hybanthus mexicanus*, *Justicia candicans*, *Piper* spp., *Randia thurberi*, *Sapramthus microcarpus* y *Trichilia trifolia* (Durán *et al.*, 2002).

### 6.1.2 Bosque tropical subperennifolio

Este tipo de vegetación se encuentra asociado a cuerpos de agua, como ríos o arroyos. En el caso de la RBCC se asocia a los ríos Tomatlán, San Nicolás, Chamela, Cuixmala y Purificación (Durán *et al.*, 2002). Dentro de la EBCh se puede encontrar este tipo de vegetación próxima al arroyo Zarco, Colorado y las afluentes de ambos.

Las especies vegetales que conforman el bosque tropical subperennifolio (BTS) mantienen parcialmente sus hojas durante la época de sequía. Las especies arbóreas llegan a medir de 20 a 30 m de altura, abundando árboles de tallo grueso (DAP  $\geq$ 30 cm). Los árboles representativos de esta vegetación son: *Astronium graveolens*, *Brosimum alicastrum*, *Bursera arborea*, *Coccoloba barbadensis*, *Couepia poliandra*, *Cynometra oaxacana*, *Ficus insipida*, *F. pertusa*, *Guarea glabra*, *Lonchocarpus guatemalensis*, *Sciadodendron excelsum*, *Sideroxylon capiri*, *Tabebuia rosea*, *Roseodendron donnell-smithii*, *Thoungidium decandrum*, *Urera caracasana* y *Vitex hemsleyi* (Lott *et al.*, 1987; Barajas-Morales & Pérez-Jiménez, 1990; Bullock & Solís-Magallanes, 1990; Lott 1993).

### 6.1.3 Caracterización edáfica

La variedad de condiciones geomorfológicas dan lugar a suelos con características edafo-ecológicas en sitios diferentes. Cada una de las condiciones relacionadas con el balance hídrico, la aireación y los nutrimentos del suelo, pueden repercutir sobre la estructura, la composición y el funcionamiento de los bosques tropicales caducifolios (Schaaf, 2002). Además los factores edáficos pueden ser causa de una monodominancia, observada en algunos bosques tropicales secos de América Central (Hartshorn, 1988). Asimismo, la fenología de la vegetación, así como la floración y la foliación (Holbrook *et al.*, 1995) y la producción de hojarasca (Martínez-Yrizar & Sarukhán, 1990) están asociados a la humedad del suelo entre otros factores. Además de la humedad, se ha establecido también que los nutrimentos del suelo y su variabilidad estacional, así como la biomasa microbiana (Jaramillo & Sanford, 1995) y la fauna del suelo (Cuevas, 1995) juegan un papel importante en el establecimiento de la vegetación y en su conservación durante la época seca.

La EBCh tiene cinco unidades mayores de relieve: montaña, lomeríos, superficies de erosión, superficies de nivelación y valle. Las características geomorfológicas y edáficas varían por cada una de estas unidades, presentando para montaña Regosoles éutricos, cambisoles crómicos, Lixisoles háplicos y Ferralsoles háplicos. Los lomeríos presentan Regosoles éutricos, Cambisoles éutricos, Cambisoles crómicos, Luvisoles crómicos, Leptosoles réndzicos y Leptosoles líticos (Cotler *et al.*, 2002).

Del total de la extensión territorial de la EBCh, 852.14 km<sup>2</sup> es ocupado por laderas sobre granito con regosol eútrico, es decir el 78.23% del suelo corresponde a esta unidad morfo-edafológica (Martínez-Trinidad *et al.*, 2008). En general los suelos son caracterizados como entisoles jóvenes poco desarrollados con poca materia orgánica en lomeríos con un pH entre 6 y 7 (Bullock, 1986; Martínez-Yrizar & Sarukhán, 1993; Solís, 1993; García-Oliva *et al.*, 1995, 2002).

## 6.2 Muestreo

Ya que no se contaba con información de cuáles podrían ser los hospederos ectomicorrízicos, el listado florístico de Chamela (Lott, 1993) sirvió como referencia para seleccionar las plantas que se analizarían como posibles hospederos ectomicorrízicos. Con la revisión bibliográfica y el listado florístico, se escogieron las familias de plantas que se encontraran reportadas aunque no se tuviera el reporte de esos géneros. Las plantas escogidas fueron todos los árboles pertenecientes a la familia Fabaceae, Nyctaginaceae y Polygonaceae (Apéndice I).

Se realizaron tres temporadas de campo, la primer temporada se hizo en los meses de julio-agosto de 2012 y la segunda fue en octubre-noviembre de 2012, mientras que la tercera se llevó a cabo en octubre del 2013; se seleccionaron estas fechas por ser época de lluvias en la zona de estudio. Para las primeras dos temporadas, se trazó previamente una cuadrícula de 100 x 100 m en el mapa de veredas georeferenciado, tomando 40 cuadrantes al azar que se encontraran sobre las veredas. No se tomaron en cuenta los cuadrantes que coincidieran con el eje central debido a que el suelo se encontraba muy compacto para poder hacer el muestreo. Por cada temporada se tomaron 20 cuadrantes, de tal forma que en el año 2012 se muestrearon los 40 cuadrantes.

Los cuadrantes se registraron en un GPS Garmin etrex Vista HCx® como *waypoints* de referencia. A partir del punto marcado por el GPS se muestreó un transecto de 100 m sobre la vereda. En cada uno de los transectos:

- 1) Se seleccionaron dos o tres árboles que fueran de los géneros posiblemente ectomicorrízicos. En cada árbol se tomaron cuatro núcleos de suelo a 1.5 m aprox. del tronco, en ángulos al azar con la ayuda de una cuadro de números aleatorios y una brújula. Los núcleos de suelo se tomaron con tubos de PVC de 2.5 cm diámetro x 30 cm de largo. Las muestras obtenidas por los cuatro núcleos se juntaron en una misma bolsa, la cual fue marcada con el nombre de la planta, el transecto y el número de árbol muestreado.
- 2) La recolección de esporomas se hizo de manera oportunista, muestreando todos los esporomas con apariencia de géneros ectomicorrizógenos que se encontraban en las veredas. Los esporomas se conservaron en papel encerado hasta llegar al

laboratorio de la estación, para su posterior descripción morfológica. Debajo de cada esporoma se tomaron cuatro núcleos de suelo, los cuales se juntaron para conformar una sola muestra de suelo.

Los esporomas fueron descritos usando guías morfológicas, guía de colores COMEX y utilizando KOH al 3% para ver si presentaban algún cambio de coloración. Al terminar la descripción se colocó una pequeña parte del esporoma en alcohol al 96% para su posterior extracción de DNA. Enseguida fueron secados en una secadora de aire caliente a 60 °C aprox., durante 2-3 días, dependiendo del material. Los esporomas secos se guardaron en bolsas de papel rotuladas con el código con el que se les describió, se mantuvieron en las bolsas hasta su traslado al Laboratorio de Sistemática, Ecología y Aprovechamiento de Micorrizas del Instituto de Biología de la UNAM.

Las muestras de suelo tanto de hospederos como de esporomas, se transportaron al laboratorio de la Estación donde se tamizó y se lavó el exceso de suelo bajo agua corriente, de tal manera que se separaran adecuadamente las raíces para posteriormente observarlas al estereomicroscopio. En el estereomicroscopio se tomaron todas las posibles raíces con apariencia de ectomicorriza. De las puntas ectomicorrizadas donde se obtuvo suficiente material, una parte de la ectomicorriza se colocó en alcohol al 96% y otra parte en Navashin (Sandoval-Zapotitla, 2005), en el cual se dejó fijando durante 24 h; pasando este tiempo se lavaron las muestras con agua corriente y se pusieron en alcohol al 70%. En la primer temporada de muestreo se utilizó FAA en vez de Navashin, dejando las muestras durante casi seis meses en este fijador, hasta que se hicieron los cortes al microtomo.

Todas las muestras obtenidas se procesaron con técnicas de biología molecular y de caracterización morfológica, que se describen posteriormente. De los resultados del 2012 se decidió realizar un tercer muestreo, ya que se obtuvieron resultados que debían ser corroborados. La tercera temporada de muestreo (octubre 2013), fue un muestreo dirigido a comprobar que algunas de las plantas que aparecían en las secuencias, fueran ectomicorrízicas. En el GPS se ubicaron los puntos de donde cada secuencia fue obtenida previamente, y se buscó llegar al punto preciso para ubicar la planta hospedera. Al identificar al fitobionte, se prensó una muestra, intentando tuviera estructuras fértiles, es decir flor y/o fruto. Las muestras prensadas fueron deshidratadas a 65 °C. En bolsas de silica gel se colocó una pequeña parte, principalmente de hoja, para permitir su secado y preservar el DNA. De cada una de estas plantas se hizo rastreo de raíces, recolectando sólo raíces terciarias.

Las raíces se revisaron bajo el microscopio estereoscópico, buscando ectomicorrizas. Todos los morfotipos encontrados se fijaron en alcohol al 96% y de los que se tuvo suficiente muestra, se colocaron en Navashin durante 24 h, enjuagando posteriormente bajo agua corriente y fijándolas en alcohol al 70%.

Al igual que en los muestreos del 2012, se recolectaron todos los esporomas ectomicorrizógenos que se encontraron y se registró su ubicación en GPS. Cada esporoma

fue caracterizado y fotografiado. Se tomó una parte de los esporomas para fijarlo en alcohol mientras que el resto de la recolecta se deshidrató a 65 °C.

## **6.3 Técnicas moleculares**

### **6.3.1 Extracción de DNA**

La extracción de DNA se hizo de las muestras de ectomicorrizas, esporomas y hojas, con el kit de extracción de REDEExtract-N-Amp Plant PCR kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La extracción se realizó con los siguientes ajustes:

- 1) Se colocaron 15  $\mu$ L de solución de extracción (ES) para esporomas y hojas, en tubos de 150  $\mu$ L, mientras que para las ectomicorrizas se usaron 10  $\mu$ L.
- 2) En los tubos con ES se colocó tejido (1-2 mm) de la ECM, esporoma u hoja, de tal manera que la muestra quedó inmersa en la solución.
- 3) En el termociclador se realizó un ciclo de 10 min a 65 °C y 10 min a 95 °C.
- 4) Al terminar el ciclo se agregó 15  $\mu$ L de solución de disolución (DS) en cada pozo, y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Se guardó en refrigeración a 4 °C; a esta temperatura el DNA se encuentra estable y mantiene su estructura.

### **6.3.2 PCR de la región ITS del DNA fúngico**

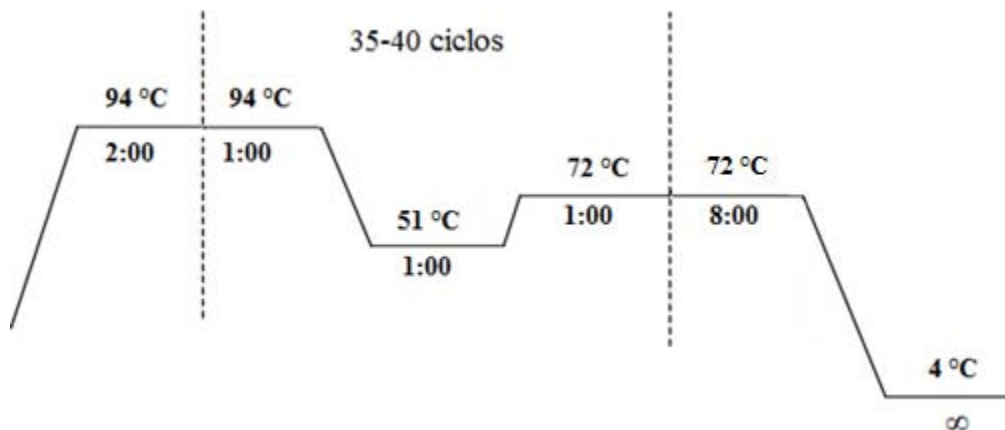
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hizo para la región ITS rDNA de todas las ectomicorrizas con el kit USB RubyTaq PCR Master Mix (Affymetrix). La combinación de *primers* usada fue ITS1F-ITS4 (50mM). Además se empleó agua destilada estéril, y 1  $\mu$ L de DNA de cada muestra. Las cantidades de cada uno de los reactivos se muestran en la cuadro 2.



**Cuadro 2. Fórmula de la reacción maestra para la PCR de la región ITS del DNA fúngico.** Para la preparación de la mezcla maestra se siguió el orden de los reactivos tal como se muestra en la cuadro.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen por número de reacciones</b>
Agua estéril	11.0 $\mu$ L
<i>Primer</i> : ITS1F (50mM)	0.25 $\mu$ L
<i>Primer</i> : ITS4 (50mM)	0.25 $\mu$ L
RubyTaq Mastermix	12.5 $\mu$ L
DNA	1.0 $\mu$ L
<b>TOTAL</b>	<b>25.0 <math>\mu</math>L</b>

Las muestras fueron procesadas en termocicladores 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, NY, EU) y PCR System 9700 (GeneAmp, NY, EU), con ciclos específicos para los *primers* usados (Figura 4).



**Figura 5. Programa de PCR para la amplificación de la región ITS de hongos.**

Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1%, teñido previamente con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, CA, EU). Se cargó el gel con 5  $\mu$ L del producto de PCR y se corrió en una cámara de electroforesis a 100 volts durante 45 min. El gel se observó en una cámara de rayos UV (Kodak-Eastman) para revelar las bandas. Las muestras con buenas amplificaciones se limpiaron con USB ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix, CA, EU). El procedimiento fue preparar una mezcla de agua ultrapura con Exosap 1:1, donde se puso 1  $\mu$ L de cada reactivo por muestra a limpiar. De

esta mezcla se colocaron 2  $\mu\text{L}$  en cada pozo, y 3.5  $\mu\text{L}$  de producto de PCR. En el termociclador se incubó a 37 °C por 45 min y a 80 °C por 15 min.

Al hacer el primer proceso de amplificación de la región ITS, se obtuvieron muestras que amplificaron débilmente, otras donde se observó en el gel más de una banda amplificada, y otras donde no se tuvo amplificación. Para cada uno de los problemas se procedió de manera diferente. El DNA de las muestras que amplificaron débilmente o que no tuvieron amplificación, fue diluido 1:10 en agua destilada estéril. La PCR se hizo con la misma cantidad de reactivos que se reportó previamente, y en el termociclador se aumentó a 40 ciclos de alineamiento (Figura 5). En algunas muestras se obtuvieron hasta seis bandas amplificadas para una sola extracción de DNA, por lo que se optó por utilizar *primers* específicos de hongos Basidiomycota. Los parámetros fueron los mismos que los previamente reportados y los *primers* específicos fueron ITS1F-ITS4b (Gardes & Bruns, 1993) a 50 mM.

Los productos de PCR limpios se mandaron al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología. La lectura de las muestras se llevaron a cabo en un secuenciador Automático ABI 3100 (Applied Biosystems, NY, EU). Todas las muestras se secuenciaron con los *primers forward* (*f*) y *reverse* (*r*), de manera que se obtuvieron dos secuencias por muestra. A partir de que se obtuvieron las secuencias *f* y *r*, se analizaron con el software Geneious v6.1.4 (2005-2014 Biomatters Ltd.). En Geneious se ensamblaron las secuencias *f* y *r* de cada muestra, siempre y cuando tuvieran mínimo 60% de similitud. Después de ensamblar los pares, se generaron secuencias consenso y se editaron. La edición implica corregir las bases que muestran algún error de lectura por parte del software, y eliminar los extremos de la secuencia donde se muestra una mala lectura del secuenciador. Las secuencias *f* o *r* que no se ensamblaron con su respectivo par, se editaron individualmente.

Las secuencias consenso se sometieron a un nuevo agrupamiento: todas las secuencias consenso fueron agrupadas al 100, 99, 98, 97, 96 y 95% de similitud. Cada una de las nuevas secuencias consenso se comparó contra la base de nucleótidos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por medio del algoritmo Mega BLAST. Las agrupaciones conformadas al 97% de similitud fueron consideradas como especies, mientras que las agrupaciones al 100% de similitud, se tomaron como genets.

### 6.3.3 PCR de la región *rbcL* del fitobionte

La región *rbcL* es ampliamente usada para el código de barras de plantas terrestres (Hollingsworth *et al.*, 2009). Esta región es de fácil amplificación, pero al tratarse de la subunidad larga de ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa de cpDNA, es una región sumamente conservada (Kress & Erickson, 2007). No obstante es un componente esencial para la

combinación de *primers* que ayudan a la discriminación de especies (Hollingsworth *et al.*, 2009).

De la misma extracción que se hizo para identificar al hongo asociado en la ectomicorriza, se tomó DNA para amplificar la región *rbcL* del fitobionte. Se realizó la PCR utilizando la combinación de *primers* *rbcL-a\_F* (5'-ATGTCACCACAA-ACAGAGACTAAAGC-3') y *rbcL-a\_R* (5'-CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTC-3') a 10 mM (Kress & Erickson, 2007), según la reacción que se muestra en la Cuadro 3 y el programa de la Figura 6.

De algunas micorrizas de las cuales ya se tenían buenas secuencias de hongos, no se habían logrado amplificar la región *rbcL*. Por ello se procedió a diluir el DNA 1:10. Para la PCR se usó 1 µL de este DNA diluido. El programa del termociclador se modificó, aumentando a 40 ciclos y bajando 2 °C la temperatura de alineamiento.

La limpieza de los productos de PCR y la secuenciación se realizaron usando los mismos protocolos que se usaron para la región ITS. Las secuencias obtenidas de esta región, se compararon con las bases de datos del NCBI y BOLDSsystems.

**Cuadro 3. Fórmula de la reacción maestra para la PCR de la región *rbcL* del DNA vegetal.** Para la preparación de la mezcla maestra se siguió el orden de los reactivos tal como se muestra en la cuadro.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen por número de reacciones</b>
Agua estéril	10.5 µL
Primer: <i>rbcL-a_R</i> (10mM)	0.5 µL
Primer: <i>rbcL-a_F</i> (10mM)	0.5 µL
RubyTaq	12.5 µL
DNA	1.0 µL
TOTAL	25.0 µL

En el termociclador se usaron ciclos específicos de la región *rbcL*:

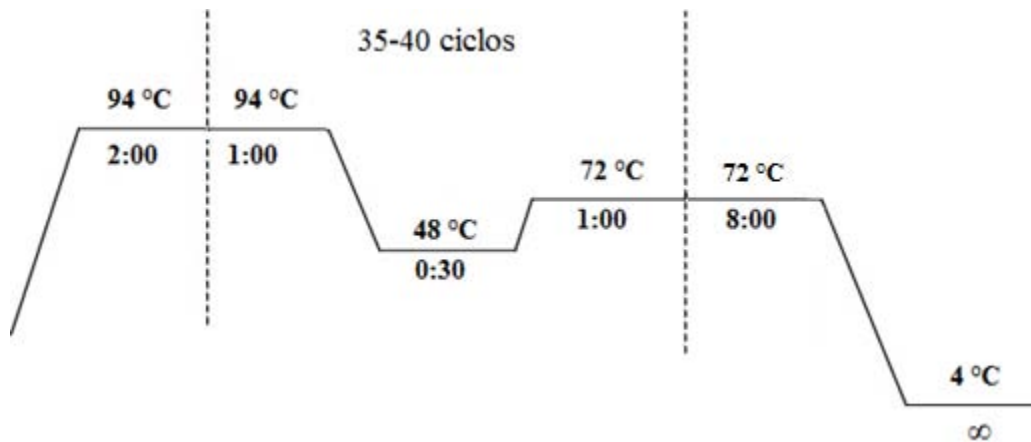


Figura 6. Programa de PCR para la amplificación de la región *rbcL* del fitobionte.

## 6.4 Identificación molecular de especies

### 6.4.1 Identificación molecular del micobionte

En este trabajo se usaron muestras ambientales, por lo que la delimitación de especies se basó en el análisis de similitud genética al comparar entre porcentajes de similitud y la especie con la que se comparaba en el NCBI (Kõljalg *et al.*, 2013). Como se dijo en la introducción, las especies fúngicas históricamente se han descrito a partir de los esporomas de los hongos. Sin embargo, aunque se pretendió recolectar todos los esporomas de los HECM de Chamela, la diversidad relacionada entre los esporomas y las ectomicorrizas, es diferente (Tedersoo *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007).

Previamente se ha identificado que puede existir una sub- o sobreestimación de la diversidad de especies, de acuerdo al umbral de similitud que se tome como criterio de delimitación (Kõljalg *et al.*, 2013). A pesar de que sigue sin esclarecerse cuál es el mejor criterio, se considera al 97% de similitud como aceptable (Nilsson *et al.*, 2008; Setaro *et al.*, 2011). El criterio de delimitación puede diferenciar entre la variación intraespecífica y la divergencia interespecífica. Una vez establecido el criterio, las distancias genéticas ayudan a dilucidar límites entre especies o taxa monofiléticos. Además, el umbral de la distancia genética ayuda a identificar y asignar grupos taxonómicos a las muestras (del Prado *et al.*, 2010). Es por ello que se hizo un análisis de porcentaje de similitud al que se agrupan las secuencias obtenidas para poderles considerar especies y asignarles un nombre.

En el programa Geneious® se hicieron agrupaciones (MOTU, por sus siglas en inglés *Molecular Operational Taxonomic Unit* (Blaxter *et al.*, 2005)) del 100 hasta el 95% de similitud. Los grupos resultantes del 100%, que son genéticamente idénticos, son los

denominados genets (Apéndice V), mientras que del 99 al 95% los denominados MOTUs al 99, 98, 97%, etc.

Cada MOTU se comparó con la base de datos NCBI utilizando MegaBLAST. Las identificaciones moleculares se hicieron buscando el mayor porcentaje de similitud, así como la cobertura de la secuencia. En algunos casos se llegó a la identificación de la especie, comparando las secuencias de las raíces con las secuencias de los esporomas recolectados, que fueron identificados.

El criterio para considerar que un hongo era ectomicorrizógeno, fue el de tener conocimiento con reportes previos de que la especie o género fuera HECM en otro lugar del mundo. De igual forma, no se consideró HECM a las secuencias que no se les pudo identificar a nivel de género.

#### **6.4.2 Identificación molecular del fitobionte**

Con el objetivo de hacer la identificación del fitobionte se realizó la recolección de hojas de los hospederos ectomicorrizicos. El DNA se extrajo de las hojas, la región *rbcL* fue amplificada y secuenciada. Estas secuencias se compararon con las secuencias provenientes de raíces. La amplificación de la *rbcL* de las raíces sólo se hizo cuando se había obtenido una buena amplificación de DNA fúngico.

Con todas las secuencias vegetales se generaron genets al 100%, los cuales se compararon contra las bases de datos BOLD Systems (<http://www.boldsystems.org/>; última consulta: 15/10/2014) y NCBI. Después se realizó un análisis de distancias por Neighbour-Joining, donde se incluyeran todas las secuencias provenientes de ectomicorrizas, y se agregaron secuencias que tuvieran un porcentaje de similitud alta con las secuencias de ECM.

#### **6.5 Análisis bioinformáticos y filogenéticos**

La edición de todas las secuencias de hongos y plantas, y la formación MOTUs se hizo con el programa Geneious® v6.1.4. En este programa también se realizó el análisis de similitud genética con el algoritmo Mega BLAST del NCBI.

Algunos datos de la tesis fueron estudiados usando diferentes herramientas de sistemática molecular. Como se explicó previamente, en la delimitación de especies se emplearon árboles de distancia para resolver el porcentaje de similitud de las secuencias fúngicas y para identificar a las plantas simbiotes.

En la delimitación de especies fúngicas se realizó un análisis de Neighbour-Joining (NJ) para determinar si el porcentaje de similitud, fue adecuado para separar especies de la familia Thelephoraceae. El análisis se realizó con todas las secuencias que se obtuvieron de la familia Thelephoraceae, el alineamiento se llevó a cabo con MUSCLE en Mesquite® v.2.75 (Maddison & Maddison, 2008). El alineamiento se ajustó visualmente en Mesquite, tratando de corregir los errores que cometió MUSCLE. El NJ se hizo con el software PAUP® v4.0 (Swofford, 2003) con parámetros preestablecidos, UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) y rapid bootstrap con 1000 réplicas. El UPGMA se usó como algoritmo de agrupación mientras que el bootstrap fue para dar apoyo a las ramas del árbol formado.

Para reconocer el género de uno de los miembros de la familia Clavulinaceae que apareció en las secuencias obtenidas, se realizó un análisis bayesiano. El análisis se realizó con MrBayes® v3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) con Reversible-Jump (Pagel & Meade, 2006) y  $1 \times 10^6$  iteraciones. En el análisis se incluyeron todas las secuencias obtenidas de Clavulinaceae, además de descargar secuencias de vouchers de *Clavulina*, *Membranomyces*, *Clavulicium* y *Multiclavula*, usando esta última como grupo externo.

Entre las secuencias de hongos amplificadas a partir de la raíz que no se consideraron HECM, se encontró un hongo de la familia Ceratobasidiaceae. Esta familia presenta diversas formas de nutrición, siendo una de ellas la de la simbiosis ectomicorrízica (Tedersoo *et al.*, 2010b; Veldre *et al.*, 2013), por lo que se procedió a hacer un análisis de máxima verosimilitud (ML) para probar si la secuencia encontrada, pertenecía a algún clado ectomicorrizógeno. Todas las secuencias que estudiaron Veldre *et al.* (2013) como ECM, se descargaron del NCBI. En Mesquite® v.2.75 se realizó la matriz con las secuencias descargadas y la que se amplificó en este trabajo. El alineamiento se llevó a cabo con MAFFT® v7.0 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>; última consulta: 15/10/2014), donde se indicó ajustar la dirección de las secuencias hacia un mismo sentido. El árbol de ML se hizo con RAxMLgui, con la secuencia de *Ceratobasidium* sp. AB198714 como grupo externo, con modelo de sustitución GTR+I+ $\Gamma$  y rapid bootstrap de 1000 réplicas. La edición de todos los árboles se hizo con Inkscape® v.0.48 (<http://www.inkscape.org/>; última consulta: 15/10/2014) y FigTree® v.1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>; última consulta: 15/10/2014).

Para la delimitación de especies vegetales se realizó un NJ con secuencias derivadas del muestreo y de BOLD Systems; ésta es una base de datos moleculares curada, de muestras ambientales y de colecciones científicas, y que cuenta con 53416 especies de plantas. Para este análisis se muestrearon las secuencias de BOLD Systems que tuvieran mayor porcentaje de similitud con las secuencias de las ECM. Todas las secuencias se unieron en una matriz con MEGA® v5.0 (Tamura *et al.*, 2011), donde se alineó con MUSCLE y se realizó el árbol con los parámetros preestablecidos.

## 6.6 Análisis estadístico

Una vez fijado el porcentaje de delimitación de especies del micobionte, se realizaron gráficas de abundancia de especies, de abundancia por familia, y de genets por especies. La riqueza, abundancia y diversidad del bosque se obtuvo de las tres temporadas de muestreo realizadas.

La abundancia de especies se determinó, usando como unidad de muestreo cada bolsa de suelo extraída por rizosfera de las especies de hospederos y debajo de cada esporoma. La bolsa de suelo estaba conformada por cuatro núcleos tomados por cada muestra. A pesar de que en el tercer muestreo también se encontraron ectomicorrizas, esos datos no se tomaron en cuenta para la comparación de los muestreos, ya que las muestras no fueron recolectadas con núcleos.

Para hacer la comparación del muestreo bajo los esporomas o en la rizosfera de los hospederos, se realizó en software R® v3.1.0 una curva de rarefacción de especies por cada uno de los tipos de muestreo. La función empleada fue {specaccum (x, method = “random”)} del paquete Vegan (Oksanen *et al.*, 2012). El método “random” calcula la media de la curva de rarefacción de especies y su desviación estándar. Este método hace permutaciones al azar en la matriz y muestrea sin reemplazamiento (Gotelli & Colwell 2001). Las curvas generadas por cada uno de los muestreos se unieron en una misma gráfica y se agregaron los intervalos de confianza al 95%.

Los cálculos de diversidad se hicieron usando el Índice de Diversidad de Simpson (1-D), con la fórmula:

$$D = \frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)}$$

Donde  $n$  es el dato de abundancia por especie y  $N$  el número de abundancia total. En seguida se resta 1-D.

y el Índice de diversidad de Shannon ( $H$ ) con la fórmula:

$$H = - \sum \rho_i \ln \rho_i$$

donde  $\rho_i$  es la proporción de la abundancia de la especie y que se calcula:

$$\rho_i = \frac{n_i}{N}$$

donde  $n_i$  es la abundancia por cada una de las especies, y  $N$  el número total de muestras.

Derivado del índice de Shannon, se calculó el índice de homogeneidad ( $E_h$ ), con la siguiente fórmula:

$$E_h = \frac{H}{H_{max}} = H/\ln N$$

## **6.7 Caracterización morfológica y anatómica de las ectomicorrizas**

Previamente a la caracterización, las muestras habían sido colocadas en diferentes fijadores. Durante la primer temporada de muestreo se fijaron en FAA durante aprox. seis meses; pasando ese tiempo se lavó cada muestra y se colocaron en etanol al 70%. En la segunda temporada el fijador empleado fue Navashin, donde se dejó fijar cada ECM durante 24 h, después se enjuagó el Navashin con agua y se colocaron las ECM en etanol al 70%.

Las muestras en alcohol al 70% se usaron para caracterizar la morfología y anatomía de las ectomicorrizas de acuerdo al protocolo de Agerer (1991) y la guía Ludwin-Maximilians (Agerer & Rambold, 2004-2011). En algunas de las muestras, donde se tenía suficiente material para realizar cortes manuales y a microtomo, se tomó la punta micorrizada, se colocó entre Parafilm® en una gota de agua y con ayuda de una navaja de afeitar de doble filo se efectuaron cortes transversales y longitudinales. Estos cortes se montaron en un portaobjetos con KOH al 3% (el cual ayuda a rehidratar las células fúngicas) y se observaron al microscopio óptico con objetivos 40 y 100x. Además se hizo desprendimiento de manto para proceder con la descripción anatómica, es decir se tomaron datos y fotos del manto externo, manto interno, red de Hartig y micelio externo.

### **6.7.1 Deshidratación e inclusión**

Todas las muestras pasaron por un procesamiento necesario para realizar cortes con el microtomo de rotación (modificado de Sandoval-Zapotitla, 2005). Como las muestras ya se encontraban en alcohol al 70%, se realizó directamente la deshidratación con alcohol butílico terciario (ABT) a diferentes concentraciones, al 35, 50, 60, 70, 85 y 95% y dos veces al 100%. Cada reactivo se dejó mínimo 24 h deshidratando el tejido. Se marcó con un plumón el volumen que tenía de ABT absoluto cada frasco. Después se metió en una estufa a 58-60 °C y se agregó Paraplast® cada 30 min hasta doblar el volumen inicial de ABT. De nuevo se marcó el volumen al que llegó con el paraplast + ABT, se destapó el frasco durante 12 h para permitir la evaporación de ABT. Como último paso de la deshidratación



se vertió el paraplast que contenía a las muestras, se reemplazó por paraplast puro previamente fundido y se dejó 48 h en estufa a 58-60 °C.

### **6.7.2 Montado, cortes y tinción**

Para realizar los cortes longitudinales y/o transversales, se armaron pequeños cubos de papel por cada una de las muestras. Dentro de los cubos se posicionaron cada una de las ECM y se vertió encima paraplast fundido hasta rellenar todo el cubo, de manera que todo el tejido quedó inmerso. El paraplast se dejó enfriar hasta que se formó un bloque sólido que contuviera a la muestra. Los cubos se dejaron reposar 24 h en refrigeración para que se endureciera lo suficiente. Los cubos de paraplast se sacaron del recipiente de papel que las contenía. Enseguida se montaron en cubos de madera previamente encerados con ayuda de un mechero y agujas de disección. El exceso de cera se eliminó con una navaja de afeitar y se dejó nuevamente enfriar por lo menos 24 h a 4 °C.

Una vez que el cubo de paraplast montado en el cubo de madera se solidificó, se procedió a hacer los cortes con el microtomo de rotación. Los cortes se hicieron con un grosor de 10-12  $\mu\text{m}$ . Los cortes resultantes se pasaron a un baño de flotación rociado previamente con grenetina para crear tensión superficial; con un portaobjetos se tomaron las muestras, y se dejaron escurrir por 24 h hasta secar. Después los portaobjetos con los cortes se dejaron en una estufa a 58-60 °C durante 30 min en una canastilla de metal, para que el paraplast se derritiera de la muestra. Inmediatamente la canastilla se colocó en xileno durante 20 min, después en xileno-alcohol absoluto (1:1) por 10 min y se rehidrató en alcoholes gradualmente: 100%, 95%, 70%, 50% y 30% durante 5 min en cada uno. La tinción se hizo con safranina, en la cual se sumergió la canastilla con los portaobjetos durante 24 h y se enjuagó bajo agua corriente para quitar el exceso de colorante. La canastilla se dejó secando sobre papel absorbente por 24 h. Luego se deshidrató en alcohol del 30 hasta el 100% durante 5 min en cada uno. Para contrastar la safranina, se tiñó con en verde rápido durante 5 min, enseguida se bañaron dos veces las muestras con alcohol absoluto durante 5 min. Para fijar los colorantes se fijó en aceite de clavo durante 10 min y se lavó en CitriSolv® durante 5 min.

### **6.7.3 Preparaciones permanentes**

Los cortes de las muestras se volvieron placas permanentes al poner resina sintética y colocar un cubreobjetos que cubriera completamente la tira de cortes. Las preparaciones se dejaron secando en un horno a 60 °C durante 15 días, después se limpiaron y etiquetaron adecuadamente.

## 7. Resultados

### 7.1 Recolectas

Se muestrearon 40 transectos repartidos de manera aleatoria en las diferentes veredas de la EBCh (Figura 7), donde se revisaron un total de 91 muestras conformadas por 364 núcleos de suelo.

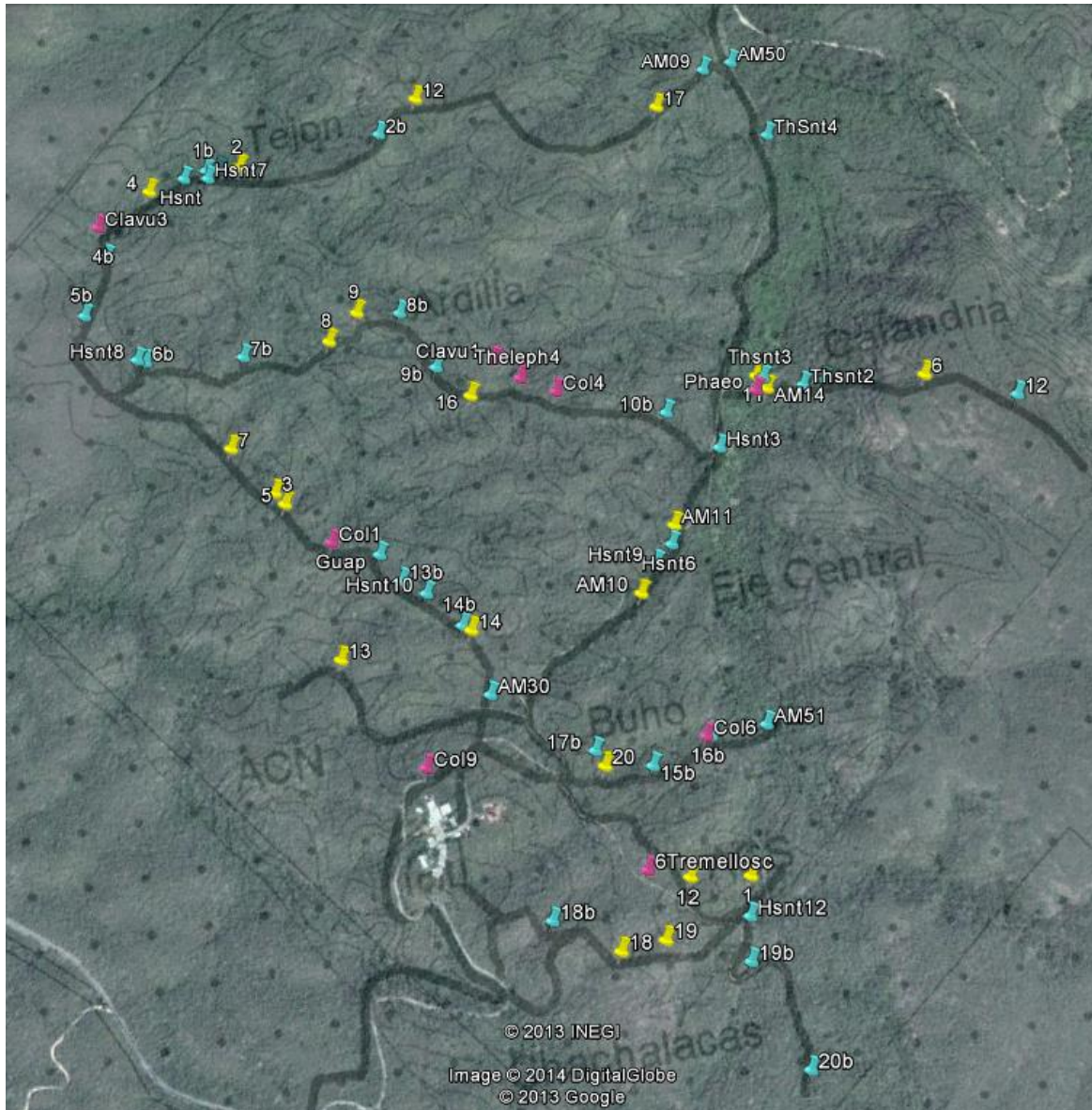
En el muestreo de julio-agosto 2012 se tomaron un total de 39 muestras de suelo contando tanto la rizosfera de plantas ectomicorrízicas, como debajo de esporomas. Los árboles bajo los cuales se tomaron muestras fueron: *Acacia* s.l., *Caesalpinia* s.l., *Coccoloba*, *Cynometra oaxacana*, *Gliricidia sepium*, *Guapira*, *Haematoxylum* y *Lonchocarpus*. Los únicos esporomas de HECM encontrados, fueron de *Thelephora versatilis* y *T. pseudoversatilis*. Se obtuvieron 105 muestras de ectomicorrizas y ocho de esporomas, de los cuales se realizó todo el procedimiento molecular hasta obtener secuencias tanto de ITS como de *rbcL*.

En el muestreo de Octubre-Noviembre 2012 se recolectaron 52 muestras de suelo, tomando en cuenta tanto la rizosfera de plantas como el suelo debajo de los esporomas. Los géneros de árboles bajo los cuales se muestreó la rizosfera fueron *Caesalpinia*, *Coccoloba*, *Guapira*, *Haematoxylum* y *Lonchocarpus*. Los esporomas de hongos ectomicorrizógenos encontrados fueron: cinco de *T. versatilis*, uno de *T. pseudoversatilis*, dos de *Tremelloscypha* sp. y uno de *Phaeoclavulina* sp (Apéndice VI). De todos ellos se hizo la amplificación de la región ITS y se obtuvo la secuencia. Se recolectaron 97 ectomicorrizas de las cuales se extrajo el DNA y se amplificaron las regiones ITS y *rbcL*.

En el muestreo de octubre 2013, se realizaron cinco recolectas de esporomas de *Thelephora versatilis*, cuatro de *Tremelloscypha* sp. y una de *Phaeoclavulina* sp. Se recolectaron 46 muestras de ectomicorrizas; de todo el material obtenido se realizó extracción de DNA y PCR de ITS y *rbcL*. En cuanto a las plantas, se recolectó la rizosfera y se tomó una muestra para herbario de 34 plantas, entre ellas: *Achatocarpus gracilis* (Achatocarpaceae), *Crescentia alata* (Bignoniaceae), *Ficus* sp. (Moraceae), *Coccoloba* sp. (Polygonaceae), *Guapira macrocarpa* (Nyctaginaceae), *Lonchocarpus* sp. (Fabaceae), *Roseodendron donell-smithii* (Bignoniaceae). Además se tomaron otras muestras de plantas que no se lograron identificar en campo pero que se encontraban próximas a los esporomas de las especies fúngicas.

Entre todos los muestreos, se recolectaron 18 muestras de *T. versatilis*, seis de *Tremelloscypha* sp., dos de *Phaeoclavulina* sp. y una de *T. pseudoversatilis*. En total se secuenciaron 205 ectomicorrizas con ITS y *rbcL*. Se recolectaron 64 vouchers de plantas de los géneros: *Achatocarpus*, *Crescentia*, *Roseodendron*, *Acacia*, *Caesalpinia* spp.,

*Cynometra*, *Gliricidia*, *Haematoxylum*, *Lonchocarpus* spp., *Ficus* spp., *Guapira*, *Coccoloba* y otras plantas que se desconoce su identificación.



**Figura 7. Mapa de la distribución espacial de los puntos de muestreo.** En color amarillo se muestran los transectos realizados en julio-agosto 2012, los azules corresponden con el muestreo de octubre-noviembre 2012 y los de color rosa son los sitios donde se muestreo en octubre del 2013. Mapa de las veredas georreferenciadas sobrepuesto en Google Earth®.

## 7.2 Identificación molecular de especies

La identificación molecular de los simbiontes en las raíces nos permitió conocer que efectivamente, existen asociaciones ectomicorrízicas en el BTC de la Estación de Biología de Chamela, Jalisco. Se logró la identificación a nivel de género de los HECM encontrados

a partir de la raíz. Igualmente se identificaron plantas de las cuales se suponía su relación ectomicorrízica, y otras especies no documentadas en la literatura, como hospederos ectomicorrízicos.

### 7.2.1 Agrupación y delimitación de las especies fúngicas

Se realizaron agrupaciones con diferentes porcentajes de similitud, yendo del 100 al 95%. En el Apéndice II se resumen los resultados de las agrupaciones formadas a los diferentes porcentajes de similitud. Estas agrupaciones van cambiando conforme se disminuye el grado de similitud. Sin embargo existen secuencias que son lo suficientemente diferentes para no agruparse en ninguno de los porcentajes (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Número de agrupaciones y secuencias únicas que se formaron al ensamblar a diferentes porcentajes de similitud.**

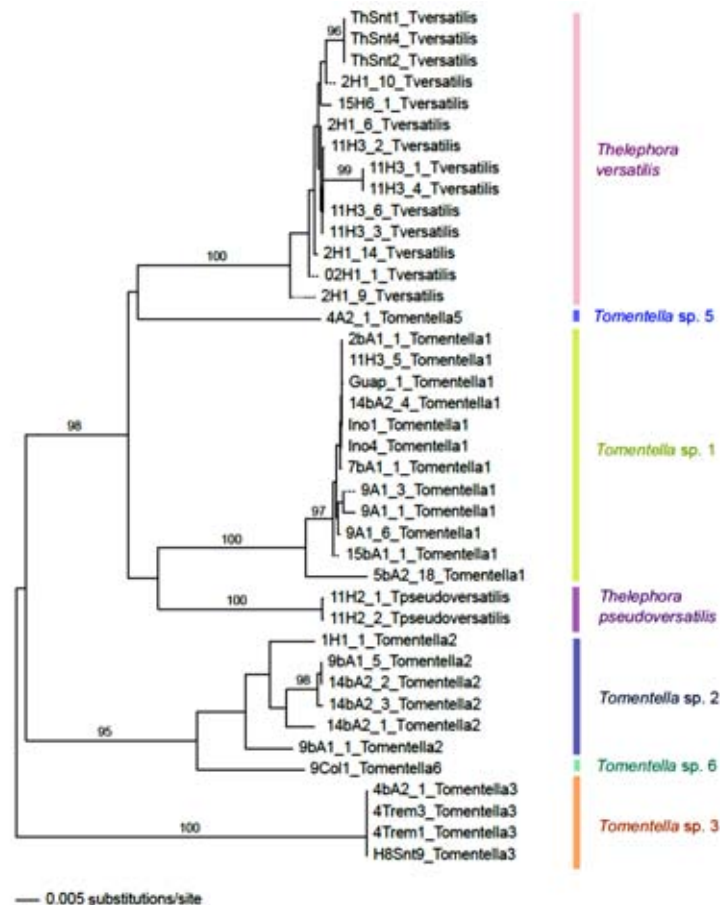
Porcentaje de similitud	Número de agrupaciones conformadas	Número de secuencias únicas
100%	15	33
99%	10	12
98%	10	10
97%	10	9
96%	10	9
95%	10	8

En el primer agrupamiento se realizó al 100%, donde se ensamblaron todas las secuencias de ectomicorrizas sin esporomas. Del resultado de esta agrupación, se obtuvieron 48 genets en total, donde 15 de ellos se conformaron por más de una sola secuencia o MOTUs al 100%. Conforme se agruparon a menor porcentaje de similitud las secuencias, prácticamente todas fueron lo suficientemente diferentes, se formaron 10 MOTUs y unas cuantas secuencias únicas. A partir del 99% de similitud, los MOTUs formados se mantuvieron, sin embargo las secuencias pertenecientes al género *Tomentella*, tuvieron una variación tal que cada que se disminuyó el porcentaje de similitud volvían a agruparse. Esto expresa una continua variación entre las especies de *Tomentella*, y de una alta tasa de sustitución nucleotídica.

Ya que las agrupaciones no variaron entre el 97 y 96% de similitud, se decidió hacer la delimitación de especies con base en el criterio que se emplea en la literatura para la mayoría de los hongos, es decir el 97% (Nilsson *et al.*, 2008; Setaro *et al.*, 2011). Bajo este

criterio de delimitación, se obtuvieron 19 especies de HECM, únicamente amplificando raíces; 20 especies contando las recolectas de los esporomas de *Phaeoclavulina* sp.

Con las secuencias de *Thelephora* y *Tomentella* se realizó un análisis de Neighbor-Joining con el objetivo de determinar si el porcentaje de similitud al 97% estaba realizando la separación adecuada de los diferentes grupos de /tomentella-thelephora (Figura 8). El análisis indicó que el 97% reflejó adecuadamente los MOTUs, además de mostrar cuáles son las secuencias que se agrupaban conforme se disminuyó el porcentaje de similitud. Por ejemplo, la secuencia 5bA2\_18 se agrupó al 97% de similitud con *Tomentella* sp. 1, con un porcentaje de similitud más alto (>97%) se encontró como secuencia única. Las muestras 11H3\_1 y 1H1\_1 también fueron separadas en secuencias únicas cuando se hacían agrupaciones >97% de similitud. Sin embargo al 97% la muestra 11H3\_1 que se agrupó con *Thelephora versatilis* y 1H1\_1 con *Tomentella* sp. 2. Las secuencias únicas como *Tomentella* sp. 4, 5 y 6 siguieron manteniéndose como especies distintas.



**Figura 8. Neighbour-Joining de las especies de *Thelephora* y *Tomentella* amplificadas en las raíces.** NJ+UPGMA hecho con 1000 réplicas de rapid bootstrap en PAUP, en las ramas se muestran los valores de bootstrap arriba del 95%. Las barras que se muestran de lado derecho indican el agrupamiento de las secuencias al 97% de similitud y sus nombres designados.

### 7.2.2 Identificación molecular del micobionte

De las muestras de suelo se obtuvieron 209 raíces con apariencia de ECM, donde 181 raíces tuvieron una buena amplificación de la región ITS. De esas 181 muestras, 114 muestras se lograron secuenciar exitosamente. Con esas secuencias se confirmó que 99 raíces tenían un hongo ectomicorrizógeno (Cuadro 5). También de esas 114 secuencias se obtuvieron 13 secuencias donde la identificación molecular fue poco específica, por lo que no se consideraron HECM en sentido estricto (Cuadro 6). Las raíces que no se lograron identificar, tuvieron amplificación débil o tuvieron amplificación múltiple de la región ITS.

Hubo 29 recolectas de esporomas de géneros previamente reconocidos como HECM, los cuales fueron secuenciados, sin embargo sólo de 22 se obtuvieron buenas secuencias. Tanto de las secuencias de los esporomas como de las ectomicorrizas se agruparon MOTUs al 97% de similitud, en algunos casos los MOTUs fueron conformados por secuencias de esporomas y ectomicorrizas (Cuadro 5). Sin embargo la mayoría de los MOTUs se conformaron con secuencias de ECM, es decir, que no se obtuvieron los cuerpos fructíferos de esos HECM.

Los MOTUs y secuencias únicas se compararon con la base de datos del NCBI, donde se tomaron en cuenta las secuencias con mayor porcentaje de similitud y cobertura. Prácticamente sólo tres de las 20 especies que se encontraron, tienen una similitud igual o mayor al 97% de similitud con secuencias encontradas en el NCBI. Esas especies corresponden a los taxa *Thelephora pseudoversatilis*, *Tomentella* sp. 4 y *Tremelloscypha* sp. La especie *Thelephora pseudoversatilis* tiene un porcentaje del 99.4 de similitud con una secuencia proveniente del tipo de la especie recolectada en Chamela.

Únicamente a partir de las raíces se determinó que existen cinco especies de *Clavulina*, una especie de *Entoloma*, dos especies de *Inocybe*, dos especies de *Russula*, dos especies de *Thelephora*, seis especies de *Tomentella*, y una de *Tremelloscypha*. Los esporomas recolectados ayudaron a identificar a tres especies amplificadas en las raíces, éstas fueron *Thelephora versatilis*, *T. pseudoversatilis* y *Tremelloscypha* sp. No se encontraron las ectomicorrizas de *Phaeoclavulina* sp.

**Cuadro 5. Identificación molecular de las especies de hongos ectomicorrizógenos**

<b>Gpo.<sup>1</sup></b>	<b>No. Seq<sup>2</sup></b>	<b>ECM<sup>3</sup></b>	<b>Espo<sup>4</sup></b>	<b>Identificación propia<sup>5</sup></b>	<b>Identificación usando NCBI</b>	<b>Similitud</b>	<b>Cobertura</b>	<b>No. acceso NCBI</b>
1	34	29	5	<b><i>Tremelloscypha</i> sp.</b>	<i>Tremelloscypha dichroa</i>	98.3%	98.21%	KF061282
					<i>Tremelloscypha dichroa</i>	97.6%	98.21%	KF061279
					<i>Tremelloscypha</i> sp.	95.7%	99.55%	KF472155
					<i>Sebacina pileata</i>	98.0%	82.54%	KF307630
2	25	14	11	<b><i>Thelephora versatilis</i></b>	Uncultured <i>Tomentella</i>	94.2%	96.94%	FJ210774
					Uncultured <i>Tomentella</i>	92.7%	100%	HM146874
					<i>Thelephora</i> sp.	92.5%	92.43%	JN858076
					Uncultured <i>Tomentella</i>	92.4%	93.01%	GU969250
3	16	16	0	<b><i>Clavulina</i> sp.1</b>	<i>Membranomyces spurius</i>	88%	45.36%	KF218966
					Uncultured Clavulinaceae	87.4%	48.19%	JX625256
					<i>Clavulina cinérea</i>	82.8%	99.66%	JN228228
					Uncultured <i>Clavulina</i>	87.3%	74.66%	FR852053
4	8	8	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 1</b>	Uncultured Thelephoraceae	92.7%	99.72%	JN704829
					Thelephorales sp.	93.3%	96.58%	DQ195592
					Uncultured <i>Tomentella</i>	92.8%	98.01%	FJ013069
					Uncultured <i>Tomentella</i>	93.5%	95.01%	FJ210774
5	6	6	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 2</b>	Uncultured Thelephoraceae	97.1%	91.39%	JX548248
					<i>Tomentella subvilacina</i>	91.3%	99.56%	HM189984
					Thelephorales sp.	91.4%	99.42%	DQ195592
					<i>Tomentella subvilacina</i>	91.3%	99.56%	HM189981
6	4	4	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 3</b>	Uncultured <i>Tomentella</i>	93.0%	100%	EU625861
					<i>Tomentella stuposa</i>	92.5%	93.10%	EU819523
					Uncultured <i>Tomentella</i>	92.4%	99.41%	FJ013054
					Uncultured <i>Tomentella</i>	91.9%	99.12%	JX630377
7	3	3	0	<b><i>Clavulina</i> sp. 2</b>	<i>Clavulina</i> cf. <i>amethystina</i>	92.6%	100%	EU862203
					<i>Clavulina</i> sp.	92.6%	100%	JX287358
					<i>Clavulina cinérea</i>	92.0%	99.86%	JQ272409
					<i>Clavulina</i> cf. <i>cinérea</i>	91.8%	100%	EU862209

Gpo. <sup>1</sup>	No. Seq <sup>2</sup>	ECM <sup>3</sup>	Espo <sup>4</sup>	Identificación propia <sup>5</sup>	Identificación usando NCBI	Similitud	Cobertura	No. acceso NCBI
8	3	3	0	<b><i>Russula</i> sp. 1</b>	Uncultured <i>Russula</i>	85.0%	100%	EF218808
					Uncultured <i>Russula</i>	85.2%	98.48%	FJ013070
					Uncultured <i>Russula</i>	85.1%	98.06%	JF519248
					Uncultured <i>Russula</i>	84.7%	100%	GU134514
9	3	2	1	<b><i>Thelephora pseudoversatilis</i></b>	<i>Thelephora</i> sp.	99.4%	95.68%	JX075890
					Uncultured <i>Tomentella</i>	94.2%	100%	HQ336691
					Uncultured <i>Tomentella</i>	93.8%	100%	HM146874
					Uncultured Thelephoraceae	93.6%	100%	JN704829
10	2	2	0	<b><i>Inocybe</i> sp. 1</b>	<i>Inocybe lanuginosa</i>	85.4%	66.76%	HQ604316
					<i>Inocybe lanuginosa</i>	85.2%	66.76%	JQ888172
					<i>Inocybe appendiculata</i>	81.3%	100%	HQ604528
					<i>Inocybe splendentoides</i>	81.0%	99.56%	JF908149
U1	1	1	0	<b><i>Clavulina</i> sp. 3</b>	<i>Clavulina</i> cf. <i>amethystina</i>	92.0%	100%	EU8622204
					<i>Clavulina cinérea</i>	91.0%	100%	JQ272409
					<i>Clavulina</i> sp.	91.0%	100%	JX287358
					<i>Clavulina</i> cf. <i>amethystina</i>	92.0%	92.0%	GU550110
U2	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 4</b>	Uncultured Thelephoraceae	88.7%	96.6%	EF101772
					<i>Tomentella</i> sp.	97.6%	96.6%	KF472143
					<i>Tomentella</i> sp.	95.2%	80.06%	FR682090
					Uncultured Thelephoraceae	92.8%	87.0%	KF836019
U3	1	1	0	<b><i>Inocybe</i> sp. 2</b>	<i>Inocybe</i> sp.	81.0%	99.0%	HQ586875
					<i>Inocybe calospora</i>	81.0%	99.0%	HQ586852
					<i>Inocybe nitidiuscula</i>	83.0%	71.0%	HQ604474
					<i>Inocybe abietis</i>	83.0%	71.0%	HQ604473
U4	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 5</b>	Uncultured <i>Tomentella</i>	95.0%	90.0%	JF419514
					<i>Tomentella ellisii</i>	95.0%	89.0%	AB634268
					<i>Tomentella ellisii</i>	95.0%	95.0%	HQ406823
					Uncultured <i>Tomentella</i>	94.0%	100%	FJ013069
U5	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 6</b>	Uncultured Thelephoraceae	93.0%	100%	AY667424
					Thelephorales sp.	93.0%	100%	DQ195592
					Uncultured <i>Tomentella</i>	92.0%	100%	HM146874



Gpo. <sup>1</sup>	No. Seq <sup>2</sup>	ECM <sup>3</sup>	Espo <sup>4</sup>	Identificación propia <sup>5</sup>	Identificación usando NCBI	Similitud	Cobertura	No. acceso NCBI
U6	1	1	0	<b>Entoloma sp.</b>	Uncultured <i>Tomentella</i>	93.0%	98.0%	AJ879664
					<i>Entoloma olivaceohebes</i>	89.0%	83.0%	JX454804
					<i>Entoloma vernum</i>	88.0%	83.0%	JX454830
					<i>Entoloma cuspidiferum</i>	88.0%	98.0%	EU784218
					<i>Entoloma proterum</i>	88.0%	86.0%	JX454821
U7	1	1	0	<b>Russula sp. 2</b>	Uncultured Russulaceae	91.0%	99.0%	DQ061886
					<i>Russula cf. chloroides</i>	91.0%	84.0%	DQ422016
					Uncultured Russulaceae	91.0%	99.0%	DQ061906
					<i>Russula brevipes</i>	90.0%	99.0%	FJ845429
					<b>Clavulina sp. 4</b>	93.3%	100%	JX287358
U8	1	1	0	<b>Clavulina sp. 4</b>	<i>Clavulina cf. amethystina</i>	93.2%	100%	EU862208
					Uncultured <i>Clavulina</i>	92.8%	100%	GQ219825
					Uncultured <i>Clavulina</i>	92.9%	98.60%	JF519035
					<b>Clavulina sp. 5</b>	90.8%	87.02%	GU550110
U9	1	1	0	<b>Clavulina sp. 5</b>	<i>Clavulina cf. amethystina</i>	90.2%	83.33%	JX644433
					Uncultured <i>Clavulina</i>	89.6%	100%	EU862204
					<i>Clavulina cf. amethystina</i>	89.2%	85.38%	FJ197924
					Uncultured <i>Clavulina</i>			

Se indica la abundancia de especies de las ectomicorrizas, amplificadas directamente de las raíces y agrupadas con secuencias de esporomas. <sup>1</sup>Gpo. = Número del MOTU o secuencia única; <sup>2</sup>No. seq = número de secuencias que conforman cada MOTU; <sup>3</sup>ECM = Secuencia perteneciente a ectomicorrizas; <sup>4</sup>Espo = Secuencia perteneciente a esporomas; <sup>5</sup>Identificación propia = Nombre que se decidió designar a cada uno de los MOTUs o secuencias únicas.

**Cuadro 6. Especies de hongos amplificadas a partir de raíces y que no son identificadas como ectomicorrizógenos.**

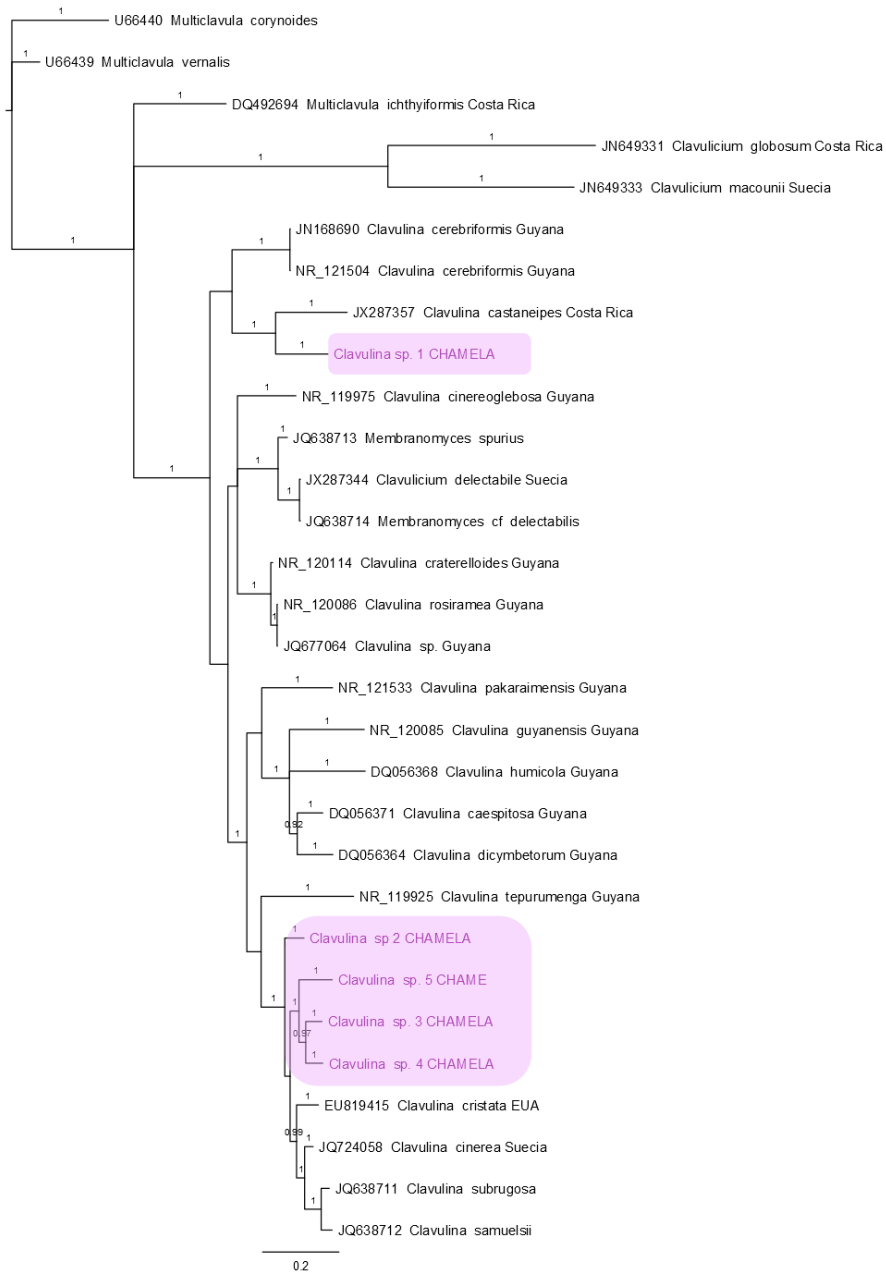
No. de secuencias		Identificación propia	Reconocimiento en NCBI	Similitud	Cobertura <sup>2</sup>	No. de acceso <sup>3</sup>
Raíz	Esp <sup>1</sup>					
1	0	<b>Agaricaceae sp.</b>	Agaricaceae sp.	89.6%	87.03%	HQ839742
			Lepiotaceae sp.	87.7%	95.15%	EF527380
			<i>Leucoagaricus leucothites</i>	85.5%	99.60%	JQ683081
			<i>Leucoagaricus sp.</i>	87.2%	93.98%	GU136203
1	2	<b>Podoscypha sp.</b>	<i>Podoscypha elegans</i>	91.2%	96.79%	JN649354
			<i>Podoscypha petalodes</i>	89.6%	93.72%	KF475892
			<i>Podoscypha bolleana</i>	89.0%	99.02%	JN649354
			<i>Podoscypha brasiliensis</i>	89.6%	93.72%	JN649355
1	0	<b>Marasmiaceae sp.</b>	Uncultured Agaricales	93.8%	94.42%	GQ924034
			<i>Marasmiellus candidus</i>	91.9%	98.37%	EF175514
			Uncultured <i>Campanella</i>	90.1%	99.86%	FJ857924
			Uncultured <i>Marasmius</i>	89.6%	99.86%	KF718228
1	0	<b>Clitopilus sp.</b>	Uncultured Basidiomycota	96.9%	99.86%	HM240196
			Uncultured basidiomycete	94.7%	99.86%	EU489989
			<i>Clitopilus scyphoides</i>	94.7%	99.86%	KC176282
			<i>Clitopilus prunulus</i>	92.9%	97.87%	EU273512
1	0	<b>Agaricales 1</b>	<i>Clitoybe leucodiatreta</i>	83.4%	69.05%	JF907819
			Uncultured basidiomycete	82.9%	72.78%	AM902007
			<i>Lepista sordida</i>	82.8%	68.91%	JF420892
			<i>Entoloma sp.</i>	82.7%	71.63%	AB691991
2	0	<b>Ascomycete</b>	Uncultured ascomycete	89.0%	93.64%	EU520603
			<i>Botryosphaeria dothidea</i>	82.8%	100%	JQ936677
			<i>Botryosphaeria dothidea</i>	82.5%	100%	JN638454
			Uncultured soil fungus	96.4%	99.35%	EU490120
1	0	<b>Geastrum sp.</b>	<i>Geastrum morganii</i>	90.6%	97.79%	KC581971
			<i>Geastrum striatum</i>	90.3%	97.79%	KC581960
			<i>Geastrum hungaricum</i>	90.3%	97.79%	KC581963
			<i>Geastrum campestre</i>	90.1%	97.79%	KC581999
1	0	<b>Ceratobasidiaceae</b>	Uncultured <i>Thanatephorus</i>	93.7%	100%	AB520310
			<i>Ceratobasidium sp.</i>	90.6%	100%	JX243936
			<i>Ceratobasidium sp.</i>	90.3%	99.59%	DQ097889
			Uncultured <i>Ceratobasidium</i>	92.7%	83.97%	GU327498
1	0	<b>Agaricales 2</b>	<i>Chondrostereum purpureum</i>	89.9%	53.69%	AY354211
			<i>Cyphella digitalis</i>	86.1%	57.55%	DQ486698

No. de secuencias		Identificación propia	Reconocimiento en NCBI	Similitud	Cobertura <sup>2</sup>	No. de acceso <sup>3</sup>
Raíz	Esp <sup>1</sup>					
			<i>Laccaria bicolor</i>	85.7%	59.53%	JN942806
			Uncultured <i>Laccaria</i>	85.7%	59.53%	GU998178
1	0	<b><i>Auricularia</i> sp.</b>	<i>Auricularia nigricans</i>	97.9%	98.08%	JX065167
			<i>Auricularia fuscosuccinea</i>	95.5%	100%	JX065157
			<i>Auricularia delicata</i>	94.4%	100%	JX065158
			<i>Auricularia mesenterica</i>	97.2%	81.95%	JX065170
1	0	<b>Agaricales 3</b>	<i>Melanoleuca bulanipes</i>	98.9%	42.82%	JN616471
			<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	97.8%	45.26%	JF926522
			<i>Pluteus atomarginatus</i>	97.3%	44.77%	JX857464
			Uncultured soil fungi	97.3%	45.50%	GU083051
1	1	<b><i>Tricholosporum</i> sp.</b>	<i>Tricholosporum porphyrophyllum</i>	83.4%	100%	KC969668
			<i>Tricholosporum</i> sp.	83.0%	97.88%	HG000016
			<i>Hygrophorus chrysodon</i>	94.6%	36.16%	KF381524
			<i>Cuphophyllus</i>	95.5%	35.45%	HM020683
1	1	<b><i>Scytinopogon</i> sp.</b>	Uncultured fungus	90.0%	63.56%	KC588787
			Uncultured basidiomycete	85.0%	100%	EU490099
			Uncultured ascomycete	84.4%	100%	EU490118
			<i>Trechispora subspaherospora</i>	88.9%	61.07%	AF347080

Las secuencias de estos hongos fueron agrupadas al 97%, algunas de ellas son secuencias únicas, mientras que otras se agruparon con secuencias de esporomas. <sup>1</sup>Esp = Esporoma; <sup>2</sup>Cobertura = Porcentaje de cobertura con la que se compara la secuencia encontrada en el NCBI; <sup>3</sup>Número de acceso del GenBank.

La especie *Clavulina* sp. 1 se determinó que pertenecía a este género a partir de un análisis bayesiano (Figura 9). Además en este mismo análisis se incluyeron todas las secuencias de la familia Clavulinaceae que se habían obtenido. Las secuencias *Clavulina* sp. 2 a sp. 5 se relacionaron más entre sí que con otras secuencias, exceptuando a *Clavulina* sp. 1, quien se relacionó más con una *Clavulina* de Costa Rica (Uehling *et al.*, 2012).

Gracias a la colaboración con la M. en C. Itzel Ramírez López y la Dra. Margarita Villegas Ríos, se secuenciaron los esporomas de las especies de *Clavulina* que ellas encontraron en la EBCh. Las secuencias de estos se compararon con las secuencias obtenidas de las ectomicorrizas y ninguna de las especies que ellas describieron, fueron las especies que se amplificaron de las raíces. Esto nos habla de diversidad del género *Clavulina* en la zona de estudio.



**Figura 9. Análisis filogenético bayesiano de la familia Clavulinaceae.** Las secuencias que se encuentran encerradas en color morado corresponden a las muestras obtenidas de la EBCh, el resto de las secuencias fueron descargadas de secuencias vouchers del NCBI.

Uno de los resultados más interesantes que se obtuvo, es sobre el hongo identificado como *Tremelloscypha* sp. La especie *Tremelloscypha dichroa* (Oberwinkler *et al.*, 2014), previamente llamada *T. gelatinosa*, ha sido documentado para diferentes bosques tropicales y subtropicales, desde Florida, Jamaica (Wells & Oberwinkler, 1982) hasta Calakmul, Campeche (Sierra *et al.*, 2012) y Quintana Roo (Guzmán, 2004). En la vertiente del pacífico se encuentra reportada para Suchiapa, Chiapas (Bandala *et al.*, 2012, 2014).

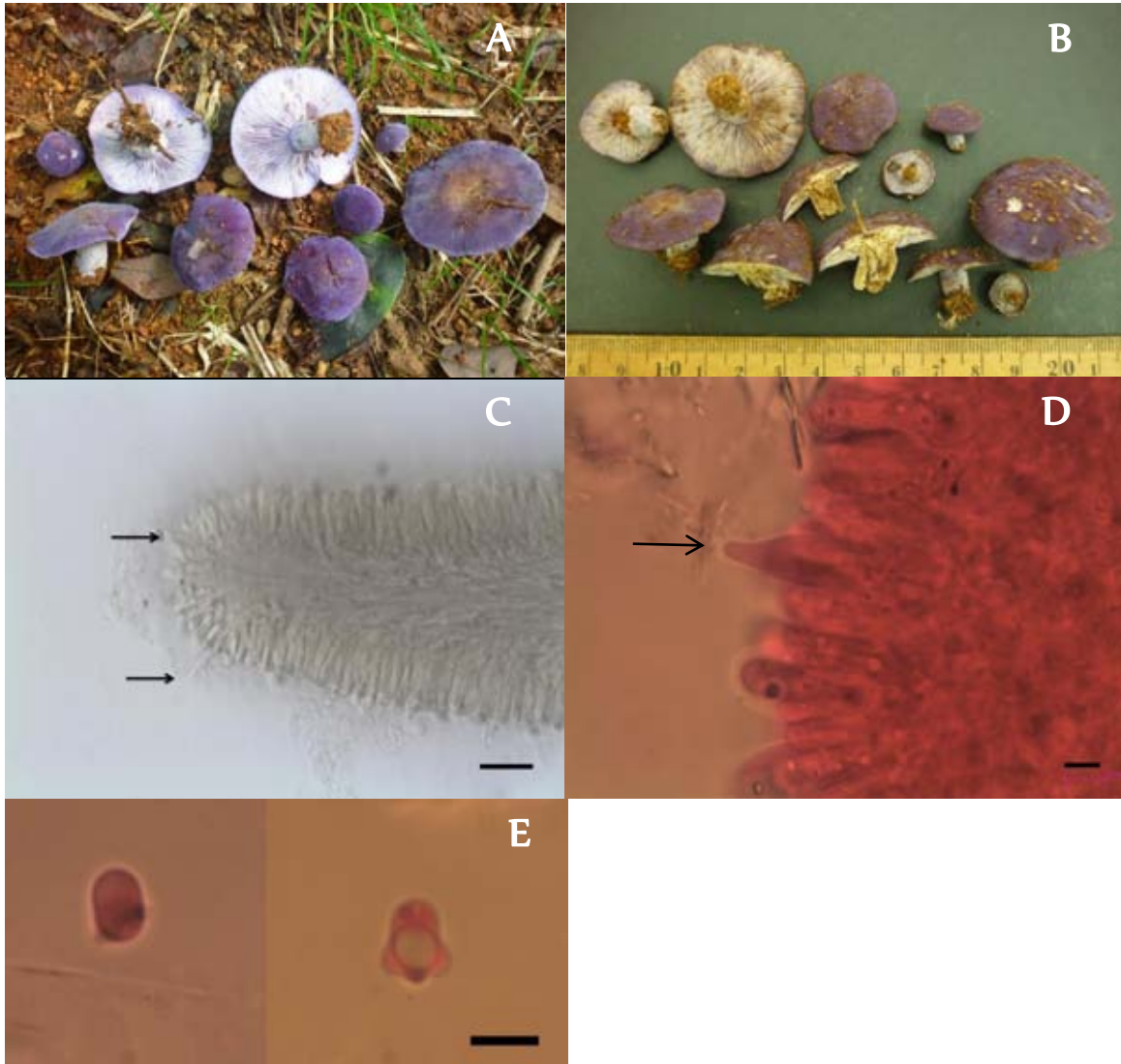
Aunque Bandala *et al.* (2012) mencionaron su posible relación con *Gymnopodium floridbundum* (Polygonaceae), este hospedero no se encuentra en la EBCh.

Weiß y Oberwinkler (2001) obtuvieron la secuencia (código de acceso AF291376) de un ejemplar voucher de *T. dichroa* recolectada en México, identificada por Guzmán, sin embargo la *Tremelloscypha* de la EBCh no fue similar a ésta. También se encontró la posible sinonimia que existe entre *Sebacina pileata*, especie descrita para Belice y el resto de los especímenes descritos como *Tremelloscypha dichroa*.

Aunque los géneros *Entoloma*, *Inocybe* y *Russula* se compararon con secuencias del NCBI por debajo del 90% de similitud, se puede afirmar que se trata de miembros de esos géneros pues no se encontró ningún otro género con el que fueran afines. Los estudios en los trópicos sobre estos géneros son pocos, lo que explica la falta de secuencias en las bases de datos.

Una de las secuencias provenientes de raíz amplificó un hongo de la familia Ceratobasidiaceae. Algunos miembros de la familia Ceratobasidiaceae pueden formar asociación ectomicorrízica (Tedersoo *et al.*, 2010b; Veldre *et al.*, 2013), por lo que se descargaron las secuencias de ECM y saprobios de esta familia. Se realizó un árbol de máxima verosimilitud (Apéndice III), resultando que la especie que se encontró en este trabajo, no pertenece a ninguno de los dos clados que forman simbiosis ectomicorrízica en dicha familia.

Otro de los hongos que se amplificó y no fue considerado ectomicorrizógeno, se identificó como *Tricholosporum* sp. perteneciente a la familia Tricholomataceae. En esta familia existen géneros ectomicorrizógenos sin embargo *Tricholosporum* no ha sido descrito como HECM. En el muestreo se encontró en una muestra de raíz y se encontró su basidioma. La identificación a nivel genérico está apoyada por un bajo porcentaje de similitud (<95%) (Figura 10).



**Figura 10. Esporoma identificado como *Tricholosporum* sp.** A) Basidiomas de *Tricholosporum* sp. en campo. B) Fotografía taxonómica de *Tricholosporum* sp. C) Queilocistidios de pared delgada, hialinos, subventricosos rostrados y mucronados (barra: 150 µm). D) Pleurocistidios con la misma forma que los queilocistidios (barra: 5 µm). E) Espora en vista lateral ligeramente faseoliforme y frontal romboide (barra: 5 µm).

El MOTU identificado como *Podoscypha* sp., se encontró en una muestra de raíz, además de tener la muestra de los esporomas, sin embargo no se encontró reportado como HECM. De igual forma en una raíz amplificó un hongo al cual se identificó como *Scytinopogon*. La identificación de *Scytinopogon* se basó en la recolecta del esporoma. Al no tener descripción de que este género se trate de un HECM, tampoco fue considerado como ectomicorrizógeno.

Dos de las secuencias fueron identificadas como pertenecientes al orden Agaricales, debido a la baja cobertura con la que se comparó con las secuencias del NCBI o por el porcentaje de similitud con el que se compararon varios géneros dentro del orden. Esto habla de la carencia que hay en las bases de datos moleculares para algunos grupos de hongos, o incluso de lo poco que se conoce de la diversidad de hongos en los trópicos. Para estas tres secuencias se decidió no considerarlos como HECM.

### 7.2.3 Agrupación y delimitación de las especies vegetales

La decisión de no realizar agrupaciones a diferente porcentaje de similitud con las secuencias de las plantas, se basó en la poca variabilidad que presenta la región *rbcL*, por lo que únicamente se agruparon al 100% de similitud. Los MOTUs al 100% se analizaron con Neighbour-Joining junto con secuencias descargadas de BOLD Systems que presentaron mayor porcentaje de similitud. El árbol no fue concluyente para la mayoría de los datos (Apéndice IV). De este modo, los datos de los fitobiontes se presentan hasta familia, excepto para las especies que se lograron determinar por los métodos taxonómicos tradicionales.

Los nombres dados a cada uno de los MOTUs correspondieron a la familia con la que tuvieron mayor porcentaje de similitud. También se tomó en cuenta el listado de la Flora de la EBCh (Lott, 1993) para poder delimitar a ciertos géneros dentro de la familia indicada por la comparación con BOLD Systems.

### 7.2.4 Identificación molecular del fitobionte

La recolección de hojas de los posibles hospederos tuvo el objetivo hacer ejemplares vouchers, de manera que las secuencias de las hojas identificadas pudieran ser comparadas con las de las raíces. Las muestras vegetales trataron de tomarse con flor y fruto para facilitar su reconocimiento taxonómico. Sin embargo, sólo de algunas especies se logró la determinación (las especies vegetales presentan reproducción sexual en diferentes meses del año). Las especies identificadas fueron *Achatocarpus gracilis* y *Guapira macrocarpa* (Apéndice VI), del resto de las muestras se llegó al género o quedaron sin identificar.

Cabe recordar que la amplificación de las plantas se hizo sólo de los DNAs de raíces donde se amplificaron hongos. El marcador empleado para el reconocimiento taxonómico, la región *rbcL*, no resultó ser lo suficientemente variable para determinar a nivel genérico.

Las familias identificadas fueron: Achatocarpaceae, Araliaceae, Bignoniaceae, Fabaceae subfamilia Caesalpinioideae y Papilionoideae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae, Polygonaceae, Sapindaceae, Sapotaceae y Tiliaceae. De las familias Achatocarpaceae, Fabaceae subfam. Papilionoideae, Nyctaginaceae y Polygonaceae se

obtuvieron secuencias de más de una raíz. El resto de las familias se sustentan por secuencias únicas, es decir sólo se obtuvo una raíz ectomicorrizada de cada una de las plantas.

Como se vio en los antecedentes, existen familias de plantas de los cuales ya se tenían reportes previos de su estatus ectomicorrízico. *Guapira macrocarpa* y *Coccoloba liebmanii* (Apéndice VI) al pertenecer a las familias Nyctaginaceae y Polygonaceae, respectivamente, se esperaba que fueran hospederos ectomicorrízicos. Sin embargo *Achatocarpus gracilis* (Apéndice VI) de la familia Achatocarpaceae, es la primera vez que se conoce su estatus ectomicorrízico, lo cual es uno de los aportes más importantes del presente trabajo.

### 7.3 Relación planta-hongo

Gracias a que se llevó a cabo la amplificación del DNA fúngico y vegetal, se reconoció la relación que existe entre los HECM y los hospederos de los bosques tropicales de Chamela. En el Cuadro 7 se presenta la relación de los hongos que se encuentran por cada uno de los hospederos ectomicorrízicos. En ésta se incluyeron únicamente los hongos de los cuales se conoce su fitobionte. En el Cuadro 8 se presentan los hongos que no fueron considerados HECM, algunos por falta de resolución en la identificación molecular y otros por no ser conocidos como ectomicorrizógenos.

**Cuadro 7. Interacciones ectomicorrízicas en Chamela, Jalisco.**

Hospedero		Hongos asociados	
Familia	Especie	Familia	Especie
Achatocarpaceae	<i>Achatocarpus gracilis</i>	Clavulinaceae	<i>Clavulina</i> sp.2
		Inocybaceae	<i>Inocybe</i> sp. 2
		Russulaceae	<i>Russula</i> sp.1
		Thelephoraceae	<i>Thelephora versatilis</i>
			<i>Tomentella</i> sp.1
		Sebacinaceae	<i>Tremelloscypha</i> sp.
Araliaceae	-	Thelephoraceae	<i>Thelephora versatilis</i>
Fabaceae subfamilia Caesalpinioideae	-	Thelephoraceae	<i>Tomentella</i> sp. 4
Fabaceae subfamilia Papilionoideae	-	Russulaceae	<i>Russula</i> sp.2
	-	Thelephoraceae	<i>Tomentella</i> sp. 1
	-	Thelephoraceae	<i>Tomentella</i> sp. 6



Hospedero		Hongos asociados		
Familia	Especie	Familia	Especie	
Moraceae	<i>Ficus</i> sp.	Sebacinaceae	<i>Tremelloscypha</i> sp.	
Nyctaginaceae	<i>Guapira macrocarpa</i>	Clavulinaceae	<i>Clavulina</i> sp. 1	
			<i>Clavulina</i> sp. 4	
			<i>Clavulina</i> sp. 5	
		Inocybaceae	<i>Inocybe</i> sp. 1	
		Russulaceae	<i>Russula</i> sp. 1	
		Thelephoraceae	<i>Tomentella</i> sp. 1	
			<i>Tomentella</i> sp. 2	
			<i>Tomentella</i> sp. 5	
		Sebacinaceae	<i>Tremelloscypha</i> sp.	
		-	Clavulinaceae	<i>Clavulina</i> sp. 3
				<i>Clavulina</i> sp. 1
			Thelephoraceae	<i>Tomentella</i> sp. 1
				<i>Tomentella</i> sp. 2
-	Clavulinaceae	<i>Clavulina</i> sp. 1		
-	Clavulinaceae	<i>Clavulina</i> sp. 1		
-	Clavulinaceae	<i>Clavulina</i> sp. 1		
-	Thelephoraceae	<i>Tomentella</i> sp. 1		
-	Thelephoraceae	<i>Tomentella</i> sp. 1		
-	Thelephoraceae	<i>Tomentella</i> sp. 2		
Polygonaceae		Thelephoraceae	<i>Thelephora versatilis</i>	
	-	Thelephoraceae	<i>Thelephora versatilis</i>	
	-	Thelephoraceae	<i>Tomentella</i> sp. 1	
Sapotaceae	-	Sebacinaceae	<i>Tremelloscypha</i> sp.	

Los espacios marcados con un guión corresponden a información faltante.

#### Cuadro 8. Hongos no ectomicorrizógenos amplificados de raíces de diferentes especies vegetales.

Hospedero		Hongos asociados	
Familia	Especie	Familia	Especie
Fabaceae subfamilia Caesalpinioideae	-	Schizophyllaceae	<i>Chondrostereum</i> sp.
Nyctaginaceae	<i>Guapira macrocarpa</i>	-	Agaricales sp. 2
Polygonaceae		-	Ascomycete sp.
Rubiaceae	-	-	Agaricales sp. 1
Salicaceae	-	Geastraceae	<i>Geastrum</i> sp.

Los espacios marcados con un guión corresponden a información faltante.

Como se puede apreciar en los cuadros 7 y 8, existen datos incompletos sobre las relaciones tanto de plantas como de hongos asociados. La mayoría de las familias que no habían sido previamente descritas como ectomicorrízicas, se ven sustentadas por una única secuencia, a pesar de que en el muestreo de Octubre del 2013 se intentó robustecer estos resultados.

A pesar de que *Achatocarpus gracilis* nunca había sido antes reportada como ectomicorrízica, se encontró soportada por varias secuencias de HECM. La especie *A. gracilis* se asocia con los géneros *Clavulina*, *Inocybe*, *Russula*, *Thelephora*, *Tomentella* y *Tremelloscypha*, los cuales pertenecen a cinco familias diferentes de hongos. *Tremelloscypha* se encontró colonizando abundantemente las raíces de esta planta.

Las plantas de las cuales se sospechaba su asociación ectomicorrízica, era de *Guapira* y *Coccoloba* por su estatus ectomicorrízico en otras partes del mundo. Particularmente, *Guapira* fue el hospedero que se encontró con mayor diversidad fúngica, teniendo a 10 especies asociadas de las cuales nueve son ectomicorrízogenas. En cambio se obtuvieron pocas amplificaciones de raíces de *Coccoloba* y no se pudo obtener ninguna buena secuencia de sus micobiontes.

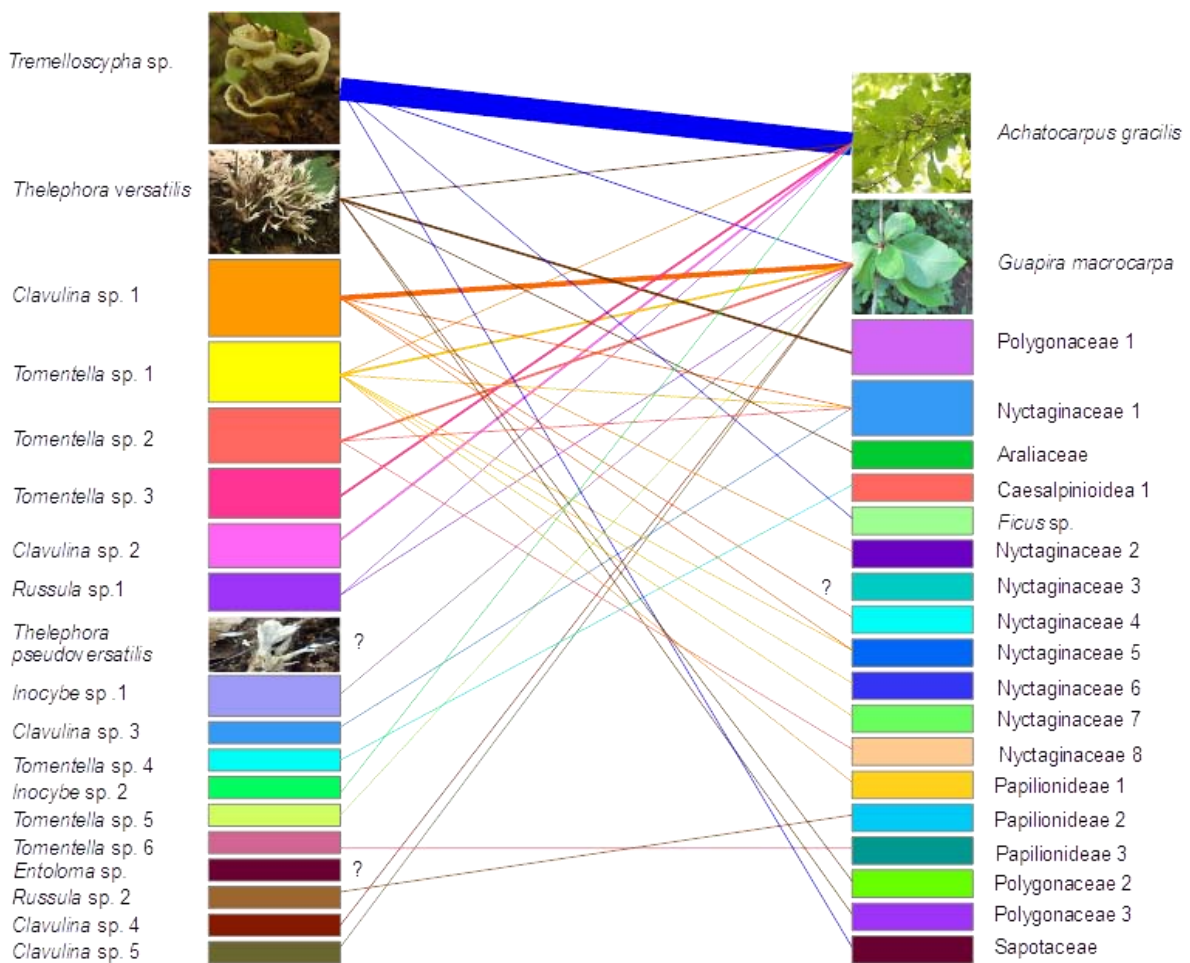
Nyctaginaceae fue la familia que presentó el mayor número de hongos amplificados en sus raíces contando a los HECM y a otros hongos. Las principales familias fúngicas asociadas a Nyctaginaceae son Clavulinaceae y Thelephoraceae. La identificación de las plantas pertenecientes a esta familia, no fue posible llegar ni a género y cuando se realizó la agrupación al 100% se generaron cinco MOTUs a los que se numeraron. El MOTU Nyctaginaceae 1 presentó relación con cuatro HECM, mientras que el resto sólo se asociaron con una especie HECM (Figura 11).

Fabaceae, la familia de la cual se hipotetizó que habría mayor asociación ectomicorrízica, sí presentó cinco especies identificadas de hongos (Figura 11). Para la subfamilia Caesalpinioideae, se encontró una *Tomentella* asociada y para Papilionoideae se encontró una *Russula* y dos especies de *Tomentella*. También se encontró a *Chondrostereum* sp. en las raíces de una Caesalpinioideae, que no fue considerado como HECM. Estos resultados ponen en evidencia que Fabaceae, a pesar de ser la familia con mayor riqueza, abundancia y que fue muestreada mayor número de veces, presentó ectomicorrizas en baja cantidad.

No existen reportes de que las familias Araliaceae, Bignoniaceae, Lauraceae, Malvaceae, Moraceae y Sapindaceae sean hospederos ectomicorrízicos. En este caso se indica que estas plantas fueron secuenciadas porque se reconocieron estructuras semejantes a ectomicorrizas en sus raíces, y donde efectivamente, se amplificaron hongos que no pudieron ser secuenciados. Por esta falta de información, las familias Bignoniaceae, Malvaceae y Sapindaceae no se encuentran reportadas en los Cuadros 7 y 8. En cambio, se obtuvieron secuencias fúngicas en Araliaceae, las cuales fueron identificadas como *T. versatilis*; las plantas pertenecientes a *Ficus* spp. (Moraceae) y Sapotaceae se encontraron

asociadas con *Tremelloscypha*, y Salicaceae con *Geastrum* (el cual no fue considerado HECM).

En la Figura 11 se pueden apreciar hongos “generalistas” y “especialistas”. Un ejemplo de generalista sería *T. versatilis*, que se relaciona con *A. gracilis*, Araliaceae, Polygonaceae 1 y 2. Otro hongo generalista que presenta el mayor número de interacciones con siete plantas distintas, es *Tomentella* sp. 1 asociado a *A. gracilis*, *G. macrocarpa*, Nyctaginaceae 1, 5, 6 y 7, y Papilionoideae 1. Por otro lado, los hongos especialistas son todos aquellos que se les encontró en una única planta. Las anteriores aseveraciones tienen que ser mejor corroboradas con mayor muestreo en los hospederos ectomicorrízicos, pero ésta es la primera aproximación a una posible red ectomicorrízica.



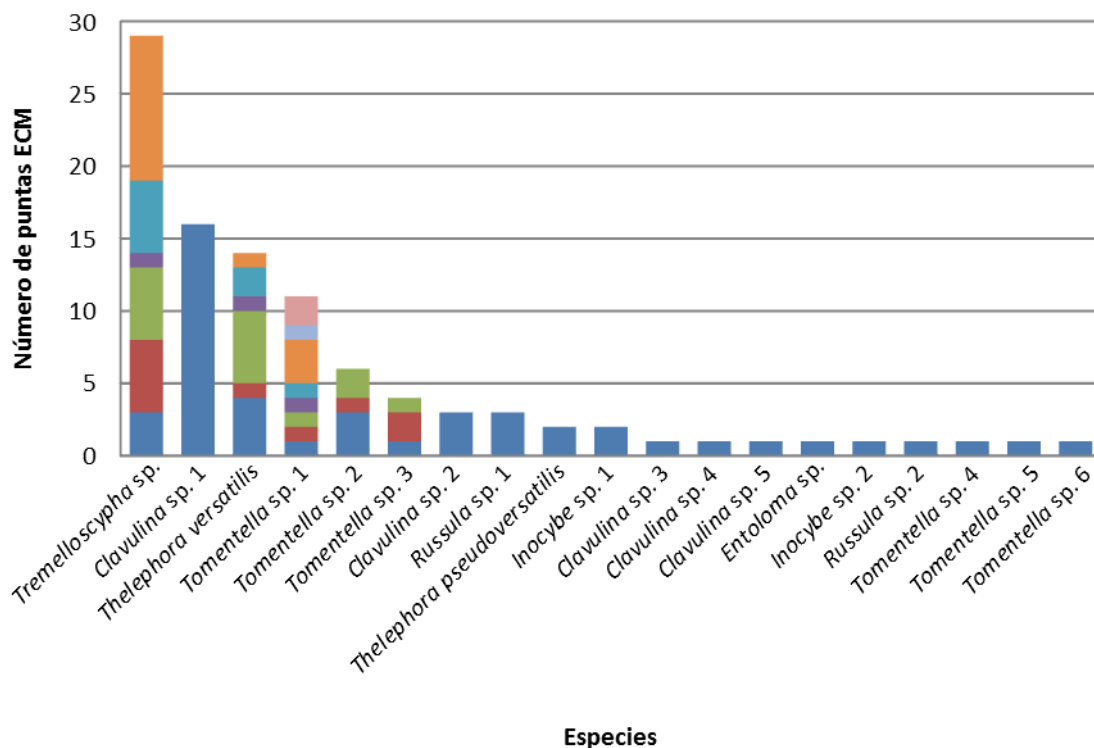
**Figura 11. Relaciones simbióticas entre hongos y plantas encontradas a través de las raíces con apariencia de ectomicorriza.** De lado izquierda se muestran todas las especies fúngicas y de lado derecho las plantas. La altura de los rectángulos representa la abundancia de sus secuencias. De igual forma los enlaces tienen un grosor de acuerdo a la frecuencia con la que se encontró la relación hongo-planta. Los signos de interrogación simbolizan el desconocimiento del fitobionte o micobionte.

## 7.4 Diversidad de hongos ectomicorrizógenos

### 7.4.1 Riqueza y abundancia de HECM

En la Estación de Biología de Chamela se obtuvo una riqueza de 19 especies de hongos ectomicorrizógenos amplificadas directamente de la raíz, y si se toma en cuenta el esporoma de *Phaeoclavulina* sp. se tiene una riqueza de 20 especies.

La familia Thelephoraceae, es decir los géneros *Thelephora* y *Tomentella*, son los que presentaron mayor riqueza, con nueve especies: dos del género *Thelephora* y seis de *Tomentella* (Figura 12). De esta familia, la especie *Thelephora versatilis* fue la más abundante, incluso el basidioma más abundante pertenece a esta especie, con 18 recolectas. Sin embargo la especie más abundante en las raíces es *Tremelloscypha* sp., la cual pertenece a la familia Sebacinaceae. *Clavulina* sp. 1 ocupó el segundo lugar en abundancia de la familia Clavulinaceae.

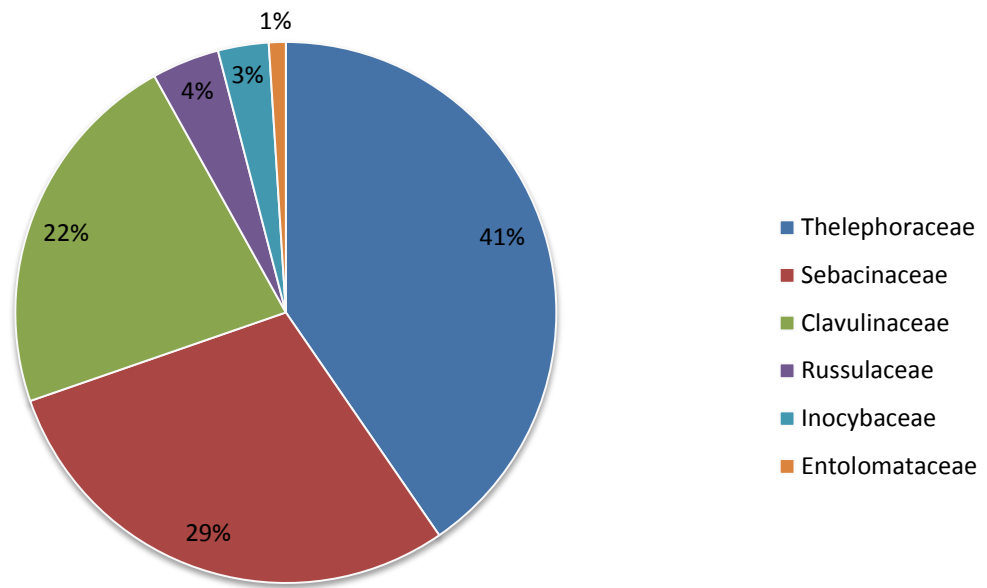


**Figura 12. Abundancia de las especies fúngicas encontradas a partir de la amplificación de las ectomicorrizas.** Los diferentes colores de las barras representan las diferentes muestras de suelo de donde se obtuvo cada ECM; el color no indica la misma muestra, sólo es para mostrar el número de muestras.

Las tres familias que tienen >90% de la abundancia son Thelephoraceae, Sebacinaceae y Clavulinaceae (Figura 13). Sin embargo Thelephoraceae y Clavulinaceae

fueron las que presentaron mayor riqueza. Mientras que Sebacinaceae sólo se encontró representada por una sola especie, *Tremelloscypha* sp.

Cabe recordar que en Chamela ya habían sido descritas dos especies del género *Clavulina* (Ramírez-López *et al.*, 2012). Gracias a la secuenciación de los materiales de Ramírez-López *et al.*, se compararon sus secuencias con las de este trabajo. Éstas no se agruparon con un porcentaje de similitud del 97% con las ECM obtenidas. Es decir, al menos existen siete especies distintas pertenecientes a la familia Clavulinaceae en el sitio de estudio; prácticamente el mismo número de especies que hay en Thelephoraceae.



**Figura 13. Abundancia de los hongos ectomicorrizógenos a nivel de familia.**

Para estimar la diversidad de los sitios de estudio, se realizó el cálculo del índice de Simpson (1-D) y el índice de Shannon ( $H$ ). El 1-D dio un valor de 0.85, donde 0.15 es el valor de dominancia de las especies. Es decir, existe poca dominancia de especies y se cuenta con una probabilidad del 85% de encontrar una nueva especie. En cada muestreo se fue incrementando la riqueza de especies, por lo que el 1-D confirma que es un sitio con alta diversidad de HECM.

El resultado que de  $H$  fue de 2.24 y el índice de homogeneidad ( $E_h$ ) de dicho índice fue de 0.49. Ambos resultados indican que las especies no se encuentran de manera homogénea en las muestras, como ya se intuía; además, se tiene una incertidumbre de casi 50%, que en el siguiente muestreo se obtenga una nueva especie. Es decir, ambos índices calculan que la EBCh presenta alta diversidad de ectomicorrizas.

La agrupación por geneto de los HECM, es decir los MOTUs al 100%, resultó en 50 genetos diferentes. Las especies que fueron más abundantes al 97% de similitud genética,

siguen siendo también las más abundantes en genetos (Cuadro 9). La especie de *Tremelloscypha* mostró gran abundancia en el geneto A, sin embargo la especie se dividió en ocho genetos. *Clavulina* sp. 1 fue algo parecido, presenta gran abundancia para el geneto A además de tener cuatro genetos más.

*Thelephora versatilis* se dividió en cinco genetos, donde el A presentó mayor abundancia, mientras que la especie *T. pseudoversatilis* fue conformada por un único geneto. *Tomentella* sp. 1 se dividió en siete genetos con baja abundancia. El resto de los theleforáceos, es decir *Tomentella* spp. resultaron tener dos genetos o menos (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Genetos de cada una de las especies de hongos ectomicorrizógenos.**

Especie de HECM	Geneto	Abundancia	Especie de HECM	Geneto	Abundancia
<i>Clavulina</i> sp. 1	A	8	<i>Tomentella</i> sp. 1	A	2
	B	5		B	2
	C	1		C	2
	D	1		D	1
	E	1		E	1
<i>Clavulina</i> sp. 2	A	1		F	1
	B	1		G	1
	C	1	<i>Tomentella</i> sp. 2	A	3
<i>Clavulina</i> sp. 3	A	1		B	1
	<i>Clavulina</i> sp. 4	A	1	<i>Tomentella</i> sp. 3	A
<i>Clavulina</i> sp. 5		A	1		B
	<i>Entoloma</i> sp.	A	1	<i>Tomentella</i> sp. 4	A
<i>Inocybe</i> sp. 1		A	1		<i>Tomentella</i> sp. 5
	B	1	<i>Tomentella</i> sp. 6	A	
<i>Inocybe</i> sp. 2	A	1		<i>Tremelloscypha</i> sp.	A
	<i>Russula</i> sp. 1	A	3		B
<i>Russula</i> sp. 2		A	1		C
	<i>Thelephora versatilis</i>	A	7		D
B		3	E		1
C		1	F		1
D		1	G		1
E		1	H		1
<i>Thelephora pseudoversatilis</i>	A	2	I	1	

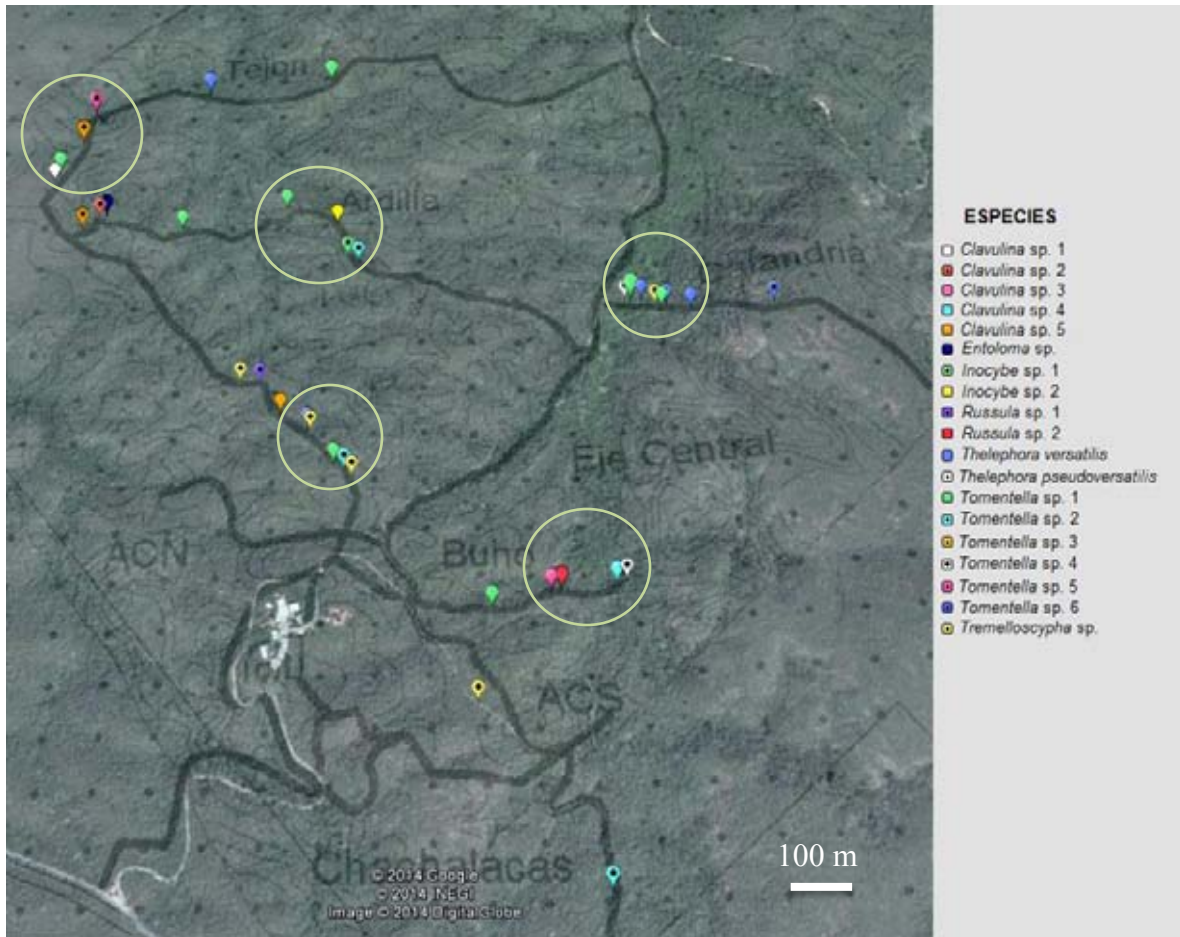
#### 7.4.2 Distribución de las ectomicorrizas

Algunos de los HECM en la EBCh presentaron una distribución agregada. Por ejemplo *Thelephora pseudoversatilis*, *T. versatilis*, *Tomentella* sp. 1 y *Tremelloscypha* sp. se encontraron distribuidas cerca del arroyo Zarco, el cual está en la vereda Calandria (Figura 14). Al estar asociadas a un arroyo, el bosque se clasifica en bosque tropical subperennifolio (BTS). De igual forma se encontró a *Phaeoclavulina* sp. asociada a este arroyo aunque no se graficó en la Figura 14 pues sólo se mapearon las secuencias de raíces. *Clavulina* sp. 5 y *Tomentella* sp. 4 también están asociados al arroyo Zarco pero del lado de la vereda Búho. De igual forma, se encontró a *Clavulina* sp. 1, *Tomentella* sp. 1, sp. 3 y sp. 5, en BTS en la vereda Tejón, cerca a la vereda Ardilla.

En el BTC de la vereda Ardilla se encontraron agrupadas a: *Clavulina* sp. 2, *Entoloma* sp., *Tomentella* sp. 3 y *Tremelloscypha* sp. También se encontró una distribución agrupada de *Tomentella* sp. 1 y sp. 2 con *Tremelloscypha* sp. en BTC de la vereda Tejón.

Por otra parte, hubo hongos que se les encontró en una única muestra de suelo; tal sería el caso de *Clavulina* sp. 1. Lo particular de esta especie es que fue encontrada colonizando abundantemente raíces de diferentes especies de plantas en un único punto. De igual forma, 14 de las 19 especies, también se amplificaron de una muestra de suelo.

Las especies de *Tremelloscypha* y *T. versatilis*, además de haber sido de los hongos más abundantes, se les encontró distribuidos en seis sitios diferentes de la EBCh; caso contrario de *Clavulina* sp. 1, el segundo hongo más abundante en las raíces, que se encontró agrupado en un solo punto (Figura 14). La especie con mayor distribución es *Tomentella* sp. 1, la cual se presentó en ocho sitios distintos de la EBCh.

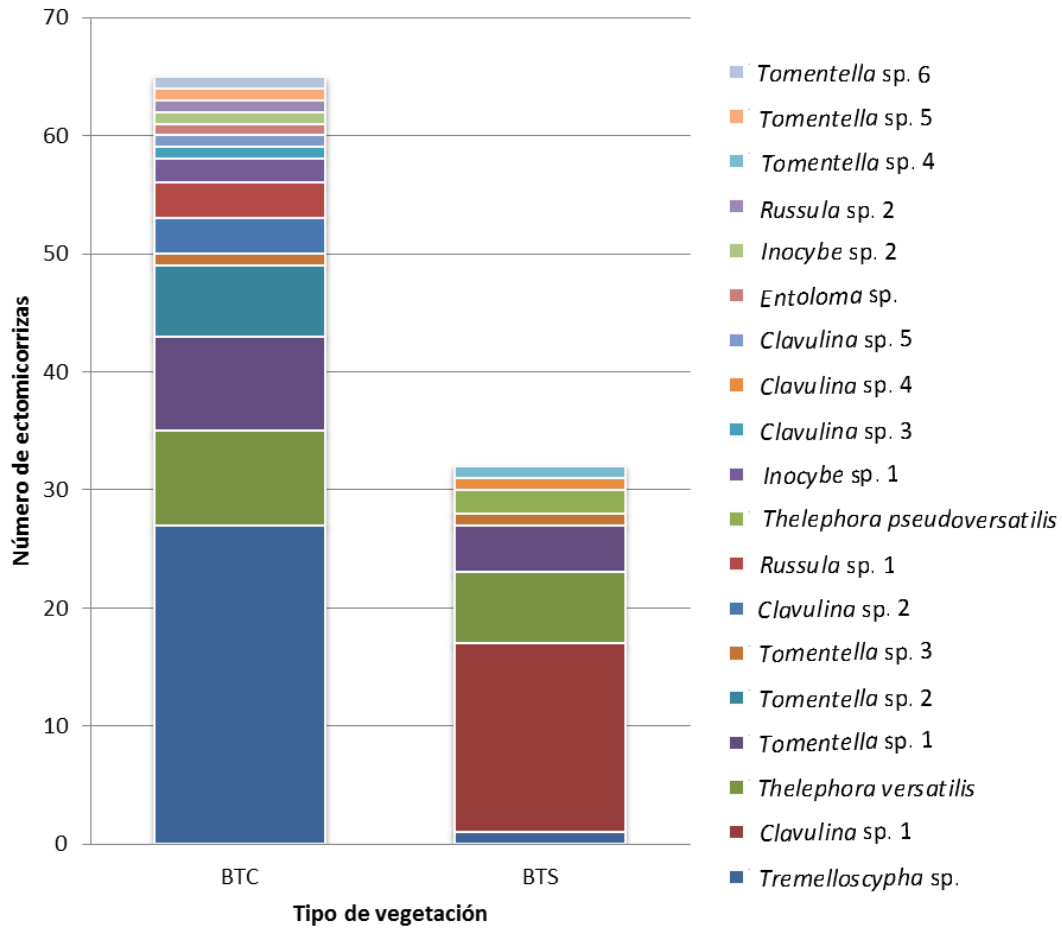


**Figura 14. Distribución de las especies de HECM en la EBCh, amplificadas a partir de las raíces. Los círculos en amarillo muestran la distribución agregada de algunas de las especies.**

La mayoría de las especies se encontraron habitando en BTC (Figura 15), pero no se puede generalizar que la riqueza HECM es mayor en este tipo de vegetación, ya que también fue el tipo de vegetación más muestreado, debido a que el BTC tiene mayor extensión en la EBCh. Recordemos que el BTS sólo se encuentra asociado a cuerpos de agua y cañadas. De hecho el 1-D es muy similar en cada vegetación. El BTC tiene  $1-D = 0.79$  y el BTS tiene  $0.71$ .

Mientras que el  $H$  por cada vegetación fue de  $2.0$  para el BTC y  $1.52$  para el BTS, los índices de homogeneidad fueron de  $0.48$  y  $0.44$ , respectivamente. Este índice nos muestra que el BTC es más diverso que el BTS, pero que ambos sitios no muestran homogeneidad de las especies.





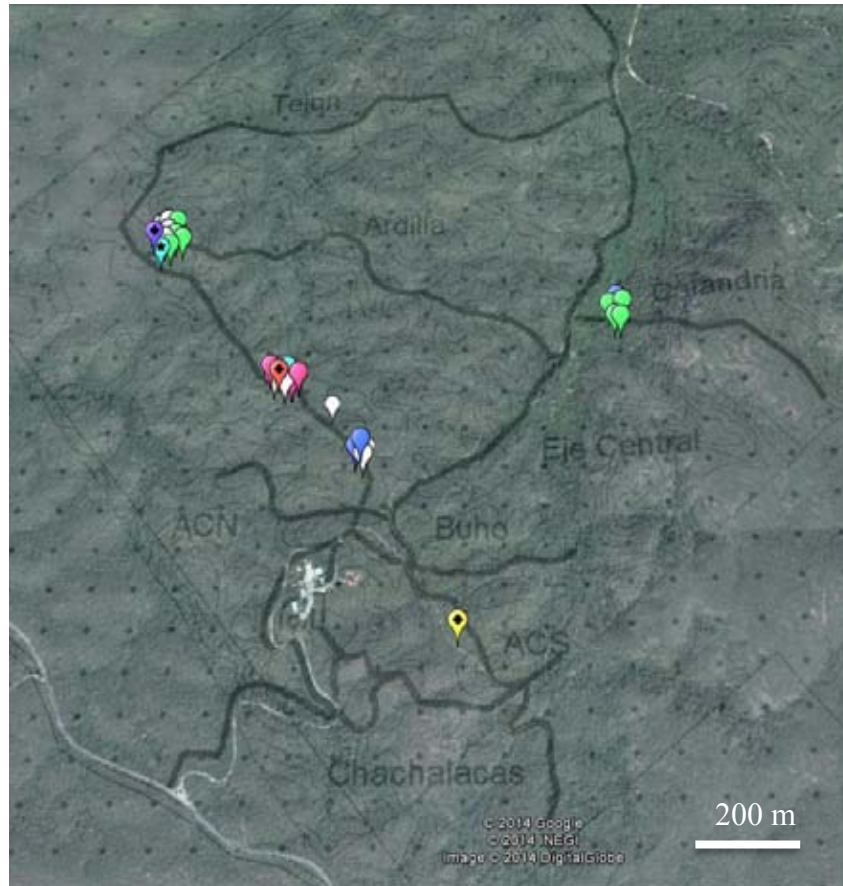
**Figura 15. Especies de HECM encontradas en los dos tipos de vegetación.** BTC: Bosque tropical caducifolio; BTS: Bosque tropical subperennifolio.

La distribución espacial de los genetos de *T. versatilis* y de *Tremelloscypha sp.* se encontró amplia en la EBCh (Figuras 16 y 17). En la Figura 16 se pueden observar la distribución de los genetos de *Tremelloscypha sp.* El geneto A, el cual presentó mayor abundancia, se encontró distribuido ampliamente en ambos tipos de vegetación. El geneto D también presenta distribución en los dos tipos de vegetación, sin ser muy abundante. El resto de los genetos se encontraron asociados únicamente a BTC. Un dato interesante es que el geneto A se encontró separado por aprox. 1000 m de distancia, en los dos tipos de vegetación.

La distribución de los genetos C y D de *T. versatilis* (Figura 17), se encuentran asociados a BTC. Por el contrario, los genetos B y E se encontraron en BTS; mientras que el geneto A se encuentra distribuido en ambos tipos de vegetación en las veredas Tejón y Calandria. Por otra parte *Tomentella sp. 1*, la cual fue la especie que se encuentra asociada a siete diferentes hospederos, se encuentra distribuida ampliamente por toda la EBCh (Figura 18). En este caso, los genetos sí se encuentran distribuidos en un tipo de vegetación

particular. Por ejemplo, los genetos A y C se encuentran únicamente en BTC, mientras que el geneto B se encuentra en BTS.

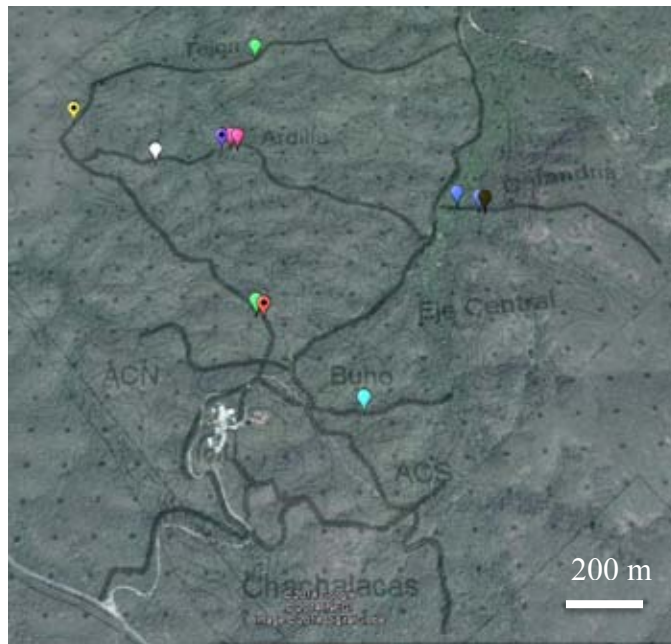
En contraste, los cinco genetos de *Clavulina* sp. 1 fueron obtenidos de una misma muestra de suelo. Este hongo se encontró asociado a BTS en la vereda Tejón (Figura 14).



**Figura 16. Distribución de los genetos de *Tremelloscypha* sp.** El geneto A se simboliza en color blanco, el geneto B se mapeó en color verde, el geneto C tiene símbolos color azul rey, el geneto D se encuentra en color rosa, el geneto E se encuentra en azul cielo, el geneto F se simbolizó en rojo con rombo, el geneto G está en morado con rombo, el geneto H se encuentra en símbolos amarillo con rombo y el geneto I se simbolizó en color azul cielo con estrella.



**Figura 17. Distribución de los genetos de *Thelephora versatilis*.** El geneto A se simbolizó en color azul cielo, el geneto B se mapeó en amarillo con rombo, el geneto C tiene símbolos color morado con rombo, el geneto D se encuentra en color rosa y el geneto E se encuentra en verde con rombo.



**Figura 18. Distribución de los genetos de *Tomentella sp. 1*.** El geneto A se muestra en color verde, el geneto B en color azul marino, el geneto C en color rosado, el geneto D en amarillo con rombo, el geneto E en blanco, el geneto F en color morado con rombo, el geneto G en color café, el geneto H en color rojo con rombo y el geneto I en azul cielo.

### 7.4.3 Comparación del muestreo de rizosfera y suelo bajo esporomas

Para hacer la comparación de los muestreos de suelo bajo esporomas y en la rizosfera de los árboles, se obtuvieron un total de 61 muestras de rizosfera: 25 individuos del género *Caesalpinia* de diferentes especies, 11 individuos de *Guapira*, 10 individuos de *Coccoloba*, 5 individuos de *Lonchocarpus*, 3 individuos de *Haematoxylum*, 1 individuo de *Acacia*, *Cynometra* y *Gliricidia*. El resto de las rizosferas muestreadas, se desconoce la identidad del individuo vegetal. Del total de muestras de rizosfera, se encontraron 38 ectomicorrizas, pertenecientes a 10 especies diferentes.

La distribución de las ECM en la rizosfera de los hospederos se encontró agregada, ya que en 49 de las 61 muestras no se encontró ninguna ECM. En cambio en una misma muestra se encontraron 17 ECM y en cuatro muestras se encontraron 28 ECM. Con la frecuencia de las ECM encontradas por número de núcleos revisados ( $244 = 35,868 \text{ cm}^3$  de suelo), se calculó que se tiene una probabilidad de 0.15 de encontrar una ECM por núcleo.

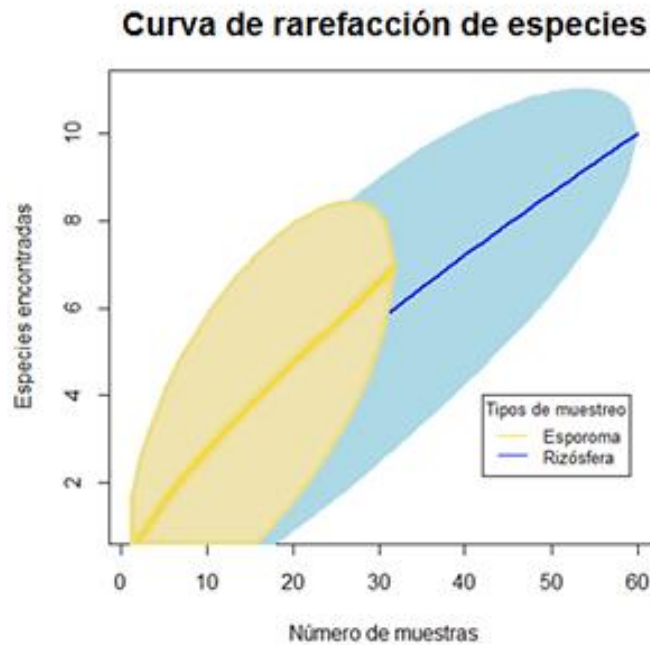
En cuanto a hongos, el esporoma más abundante perteneció a *Thelephora versatilis*, teniendo 18 recolectas de esporomas. *Tremelloscypha* sp. se recolectó dos veces, a *Phaeoclavulina* sp. y *Thelephora pseudoversatilis* una sola vez. El total de muestras de suelo recolectados bajo esporomas fue de 35 y en ellas se encontraron 31 ectomicorrizas identificadas como 7 especies distintas. El número total de muestras de suelo debajo de esporomas no correspondió al número de esporomas ectomicorrizógenos recolectado; esto se debió a que se desconocía si los esporomas pertenecían a algún grupo HECM, por lo que indistintamente se tomaron muestras de suelo debajo de ellos.

Al igual que en el muestreo de rizosfera, se encontró que las ECM se encuentran con poca frecuencia en las muestras de suelo. En 26 de las 35 muestras de suelo revisadas, no se encontró ninguna ECM. Sin embargo en una sola muestra se encontraron 14 ECM y en cuatro muestras se disectaron 26 ECM. La frecuencia de encontrarse una ECM el total de núcleos muestreados ( $140 = 20,580 \text{ cm}^3$  de suelo) es de 0.22.

Comparando la probabilidad de encontrarse una ECM en la rizosfera de hospederos contra la de muestras de suelo debajo de los esporomas, se puede apreciar que el muestreo por esporomas es más efectivo. Con la curva de rarefacción de especies construida con los datos de ambos muestreos (Figura 19), se observa que ninguna de las curvas es asintótica; esto quiere decir que el muestreo por núcleos en cualquiera de los casos, no fue eficiente para obtener la mayor parte de la diversidad de HECM.

En el caso donde se hizo un muestreo dirigido, se usó una pala y rastrillo para rastrear las raíces, en vez de utilizar núcleos. Esto hace que los resultados del tercer muestreo no sean comparables para determinar la probabilidad de encontrar ECM con los otros dos muestreos. Sin embargo, estos datos sí se tomaron para analizar la diversidad de ECM de la EBCh. Con este muestreo se encontraron ocho especies, cuatro de ellas no se

habían encontrado con los anteriores muestreos. Esas especies son *Clavulina* sp. 5, *Inocybe* sp. 1, *Russula* sp. 1 y 2.



**Figura 19.** Curva de rarefacción de especies encontradas por muestreo de rizosfera de hospederos ectomicorrízicos junto con la curva por muestreo del suelo debajo de esporomas. El polígono del mismo color de las curvas indica los intervalos de confianza al 95%.

## 7.5 Caracterización de morfotipos

Este es el primer estudio sobre ectomicorrizas en un bosque tropical caducifolio en México. Por haber sido un análisis exploratorio, se planteó como objetivo caracterizar todas aquellas raíces que tuvieran apariencia de ECM. De esta manera tendríamos completa certeza de que la interacción raíz-hongo analizada, se trataba de una verdadera ECM.

Las ECM de la EBCh resultaron ser muy pequeñas y poco abundantes en su colonización. Debido a lo anterior, se dio preferencia a obtener material para la extracción del DNA y si se contaba con suficientes ECM, se procesarían para caracterizarlas. Es por ello que no se realizó la caracterización de todas las ECM encontradas. Asociado a la escasez de puntas micorrizadas, en el muestreo de julio-agosto 2012 las muestras fueron fijadas en FAA por varios meses, lo que hizo que el tejido fúngico se dañara y destruyera parcialmente. Por otra parte, algunas muestras más se perdieron con la técnica de deshidratación o infiltración del Paraplast antes de cortar en microtomo.

Además de los cortes hechos a microtomo, en algunas ECM se realizaron cortes hechos a mano. Con los cortes hechos en microtomo de rotación se lograron las caracterizaciones de 16 muestras. Los cortes hechos a mano fueron únicamente para seis muestras. En la Figura 26 se pueden apreciar cortes de microtomo y hechos a mano: los cortes hechos a mano permiten observar turgentes a las hifas y tener mediciones más precisas y los del microtomo permite contar con facilidad las capas de hifas que conforman al manto. De los seis cortes hechos a mano se lograron fotografiar todos, sin pérdida de muestra. Inclusive, pudieron observarse con facilidad estructuras que son importantes para la caracterización de los morfotipos (cistidios, rizomorfos y micelio externo).

En total se describieron 42 ectomicorrizas morfológicamente, y de ellas, 21 muestras se caracterizaron tanto su morfología como su anatomía. A las otras 21 ECM se les realizaron descripciones únicamente morfológicas. Asimismo, gracias al uso de marcadores moleculares, se identificaron los simbiontes de los morfotipos descritos. Las especies que interactúan en cada una de las ECM descritas se resumen en el Cuadro 10.

**Cuadro 10. Micobionte y fitobionte de cada uno de los morfotipos caracterizados.**

Micobionte	Fitobionte	No. de morfotipos
<i>Clavulina</i> sp. 1	<i>Guapira macrocarpa</i>	4
<i>Clavulina</i> sp. 1	Nyctaginaceae 1	1
<i>Clavulina</i> sp. 1	Nyctaginaceae 5	1
<i>Clavulina</i> sp. 1	¿?	5
<i>Clavulina</i> sp. 4	<i>Guapira macrocarpa</i>	1
<i>Tomentella</i> sp. 1	<i>Guapira macrocarpa</i>	1
<i>Tomentella</i> sp. 1	Nyctaginaceae 1	1
<i>Tomentella</i> sp. 1	Nyctaginaceae 6	1
<i>Tomentella</i> sp. 1	Nyctaginaceae 7	1
<i>Tomentella</i> sp. 1	Polygonaceae 1	1
<i>Tomentella</i> sp. 2	<i>Guapira macrocarpa</i>	1
<i>Tomentella</i> sp. 2	Nyctaginaceae 8	1
<i>Tomentella</i> sp. 3	Sin identificar	1
<i>Thelephora versatilis</i>	<i>Achatocarpus gracilis</i>	1
<i>Thelephora versatilis</i>	Araliaceae	1
<i>Thelephora versatilis</i>	Polygonaceae 1	1
<i>Thelephora versatilis</i>	Sin identificar	4
<i>Thelephora pseudoversatilis</i>	Sin identificar	1
<i>Tremelloscypha</i> sp.	<i>Achatocarpus gracilis</i>	1
Sin identificar	<i>Guapira macrocarpa</i>	1
Sin identificar	Nyctaginaceae 3	1

Micobionte	Fitobionte	No. de morfotipos
Sin identificar	Polygonaceae 2	1
Sin identificar	Polygonaceae 3	1
Sin identificar	Polygonaceae 6	1
Sin identificar	Sin identificar	7

Las ECM que se encontraron abundantemente y se lograron caracterizar, fueron principalmente de la familia Nyctaginaceae. De esta familia se lograron describir 14 morfotipos que muestran pequeñas diferencias entre sí. Una de las observaciones importantes que se hizo de las características anatómicas correspondientes a esta familia, es que algunas de ellas presentan hifas intracelulares provenientes del mismo manto (Figuras 22, 26, 29 y 31). En este caso, encontrar hifas intracelulares no hubiera sido posible con cortes hechos a mano, y por otra parte, la técnica de microtomo permite hacer cortes más precisos y la tinción empleada ayuda a contrastar estructuras.

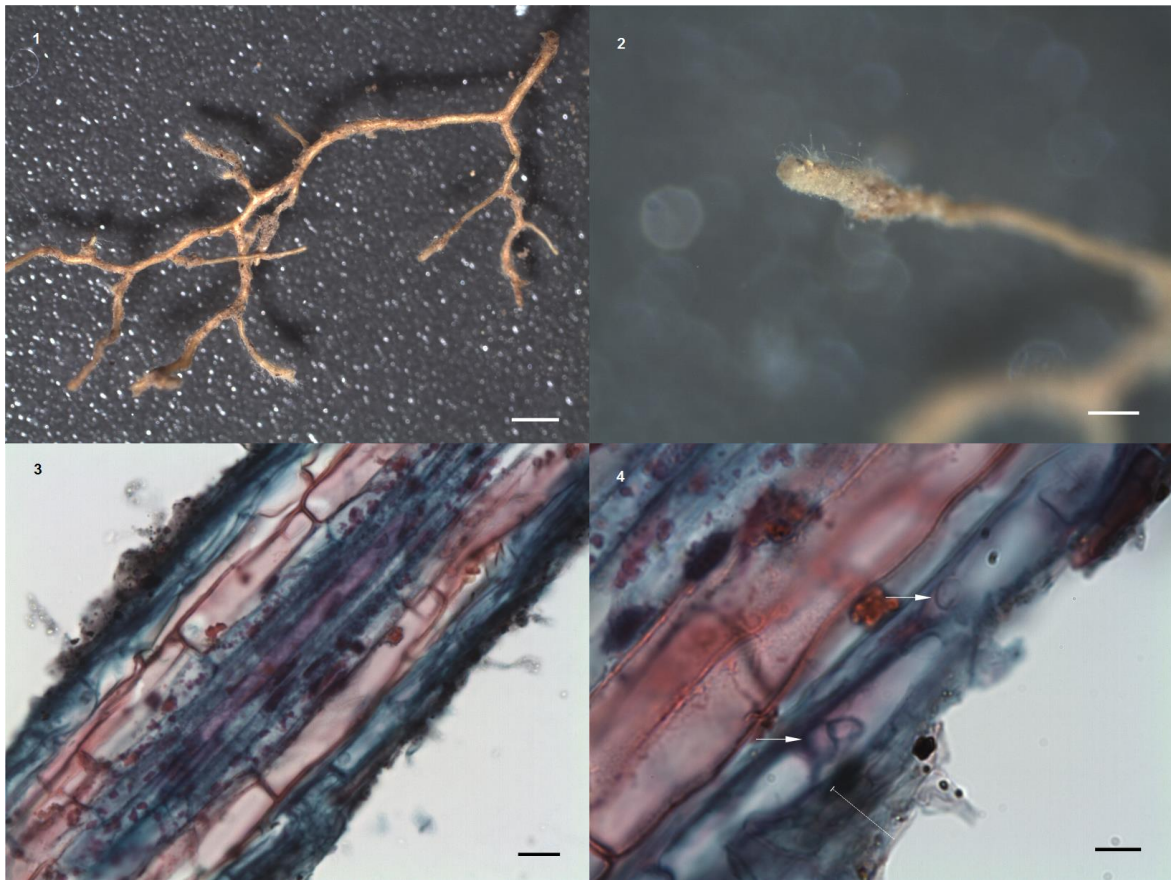
Las ECM de *Tremelloscypha* sp. con *A. gracilis* fueron muy abundantes, sin embargo sólo se obtuvo una muestra para caracterizar (Figura 20). Los cortes realizados con microtomo dejan claro que el manto es muy delgado (de apenas 3-4 capas de hifas), hialino y no se encontró una red de Hartig.

Como se vio en el apartado 8.3, hubo muestras de las cuales se sigue desconociendo el simbionte, ya sea el hongo o la planta. Sin embargo en algunas de ellas sí se encontraron estructuras propias de las ectomicorrizas, es decir manto y red de Hartig (Figuras 26-30, 38, 43, 50, 53, 57).

A continuación se presentan las caracterizaciones de todos los morfotipos, acompañadas de fotografías de sus estructuras.

7.5.1 *Tremelloscypha* sp.+ *Achatocarpus gracilis* (Morfotipo H8Snt11).....Fig. 20

**Ectomicorriza** blanquecina, color aperlado con la superficie brillante, con numerosas hifas emergentes erectas. Esta ectomicorriza es de tamaño reducido y sólo las puntas de las raíces se encuentran micorrizadas. Presenta puntas rectas, no hay ramificación ni rizomorfos. **Manto** muy delgado, apenas apreciable en corte longitudinal, conformado por 3-4 capas de hifas (7-18  $\mu\text{m}$ ). Como se trata de un manto tan delgado, no hay distinciones entre el manto interno y externo. En ciertas áreas se aprecia como un pseudoparénquima, con células epidermoides que sostienen una delicada red hifal. Se encuentran algunas hifas emergentes postradas, hialinas, de pared delgada, septadas sin fíbulas. La **red de Hartig** no es muy clara, sin embargo se encuentran algunas hifas entre los espacios intersticiales en la primera capa de células corticales.

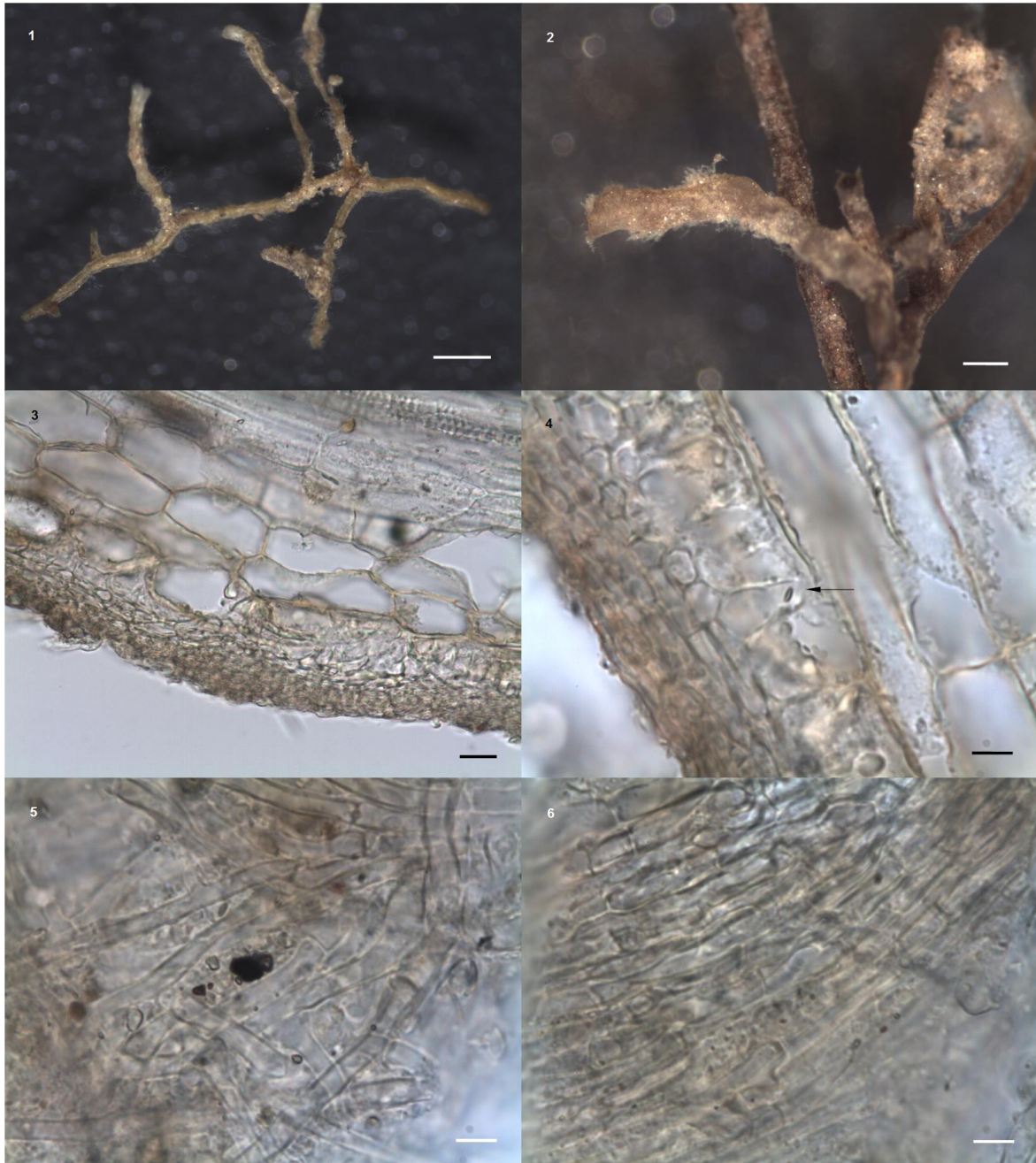


**Figura 20.** 1-2) Ectomicorriza de *Tremelloscypha* sp. asociada a *Achatocarpus gracilis*. 3) Corte longitudinal donde se aprecia que el manto está conformado por una o dos capas de hifas. 4) Acercamiento, se marca en línea punteada el grosor del manto mientras que con flechas se señalan hifas que se encuentran entre y dentro de las células corticales. Barras: 1) 1.0 mm. 2) 0.25 mm, 3) 75  $\mu\text{m}$  4) 4.5  $\mu\text{m}$ .



7.5.2 *Clavulina* sp. 4 + *Guapira macrocarpa* (Morfortipo Cresalat1).....Fig. 21

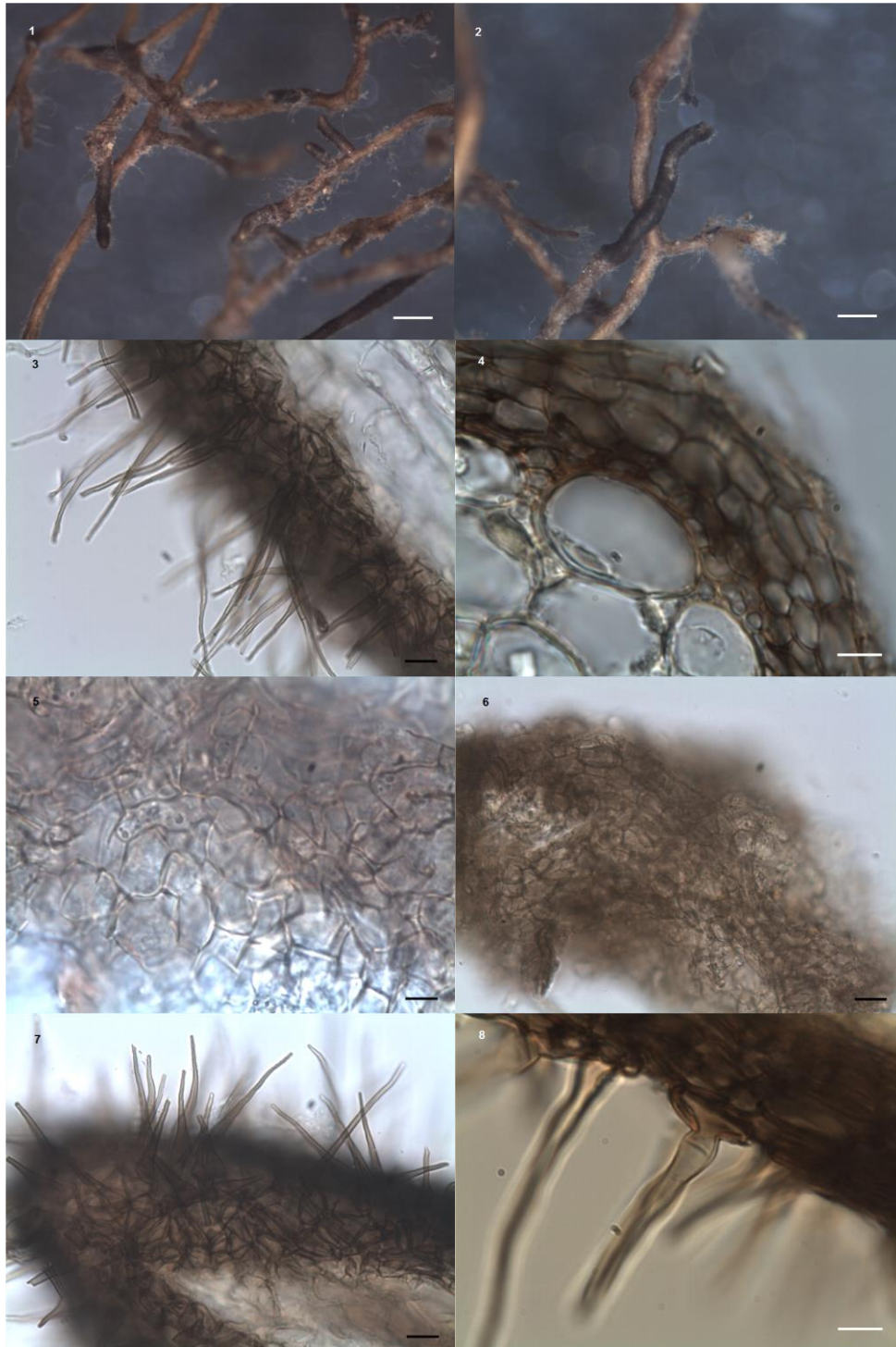
**Ectomicorriza** de manto muy hialino que presenta zonas brillosas y tiene algunas hifas emergentes. El **manto** está conformado por 10 capas de hifas (13-16  $\mu\text{m}$ ). El **manto interno** es un plecténquima con hifas cilíndricas regularmente acomodadas (4 x 10-15  $\mu\text{m}$ ). El **manto externo** es un plecténquima en forma de red (4-3 x 24-28  $\mu\text{m}$ ). Las hifas emergentes presentan incrustaciones refringentes, son fibuladas, de terminaciones redondeadas y pared gruesa (< 1  $\mu\text{m}$ ). La **red de Hartig** penetra paraepidermalmente en la primer capa de células corticales, su forma no entra en ninguno de los conceptos de infrecuentemente lobulada o palmeada.



**Figura 21. 1-2) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 4 con *Guapira macrocarpa*. 3) Corte longitudinal donde se observa el manto. 4) Acercamiento a la red de Hartig, señalada con una flecha. 5) Hifas del manto externo. 6) Arreglo del manto interno. Barras: 1). 0.5 mm, 2) 0.25 mm, 3) 75  $\mu$ m, 4-6) 4.5  $\mu$ m.**

7.5.3 *Clavulina* sp. 1+ *Guapira macrocarpa* (Morfotipo 5bA2-19).....Fig. 22

**Ectomicorriza** abundante sin ramificación, de color negra a café claro cuando jóvenes. De superficie lisa en algunos casos, otras tantas presenta numerosas hifas emergentes erectas, hialinas y cortas, la superficie es brillante, con unas cuantas hifas emergentes cortas hialinas. Las puntas son sinuosas y en algunos casos tortuosas, la parte apical se encuentra en un tono más claro y ligeramente más delgado. **Manto** conformado por 7 a 9 capas de hifas (19.53  $\mu\text{m}$ ). El **manto externo** es un plecténquima de hifas ligeramente constreñidas en el septo y más anchas entre septos (3.5-4 x 6.8-12.62  $\mu\text{m}$ ). En la parte más apical de la ectomicorriza presenta abundantes cistidios aculeados, erectos, de pared gruesa ( $< 1\mu\text{m}$ ) con la base cónica. El **manto interno** es un pseudoparénquima de hifas epidermoides (2.45-5.44  $\mu\text{m}$ ). La **red de Hartig** es paraepidermal abarcando únicamente la primera capa de células corticales, de tipo infrecuentemente lobulada.



**Figura 22.** 1-2) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 asociado a *Guapira macrocarpa*. 3) Corte longitudinal donde se observan cistidios alargados y agudos hacia la punta. 4) Corte transversal donde se aprecia la conformación del manto. 5) Manto interno pseudoparenquimatoso. 6) Manto externo plectenquimatoso. 7) Abundantes cistidios en la parte apical de la ectomicorriza. 8) Acercamiento a la base de un cistidio. Barras: 1) 0.5 mm, 2) 0.25 mm, 3) 75  $\mu$ m, 4) 6.8  $\mu$ m, 5-7) 75  $\mu$ m, 8) 6.8  $\mu$ m.

7.5.4 *Clavulina* sp. 1+ *Guapira macrocarpa* (Morfotipo 5bA2-13).....Fig. 23

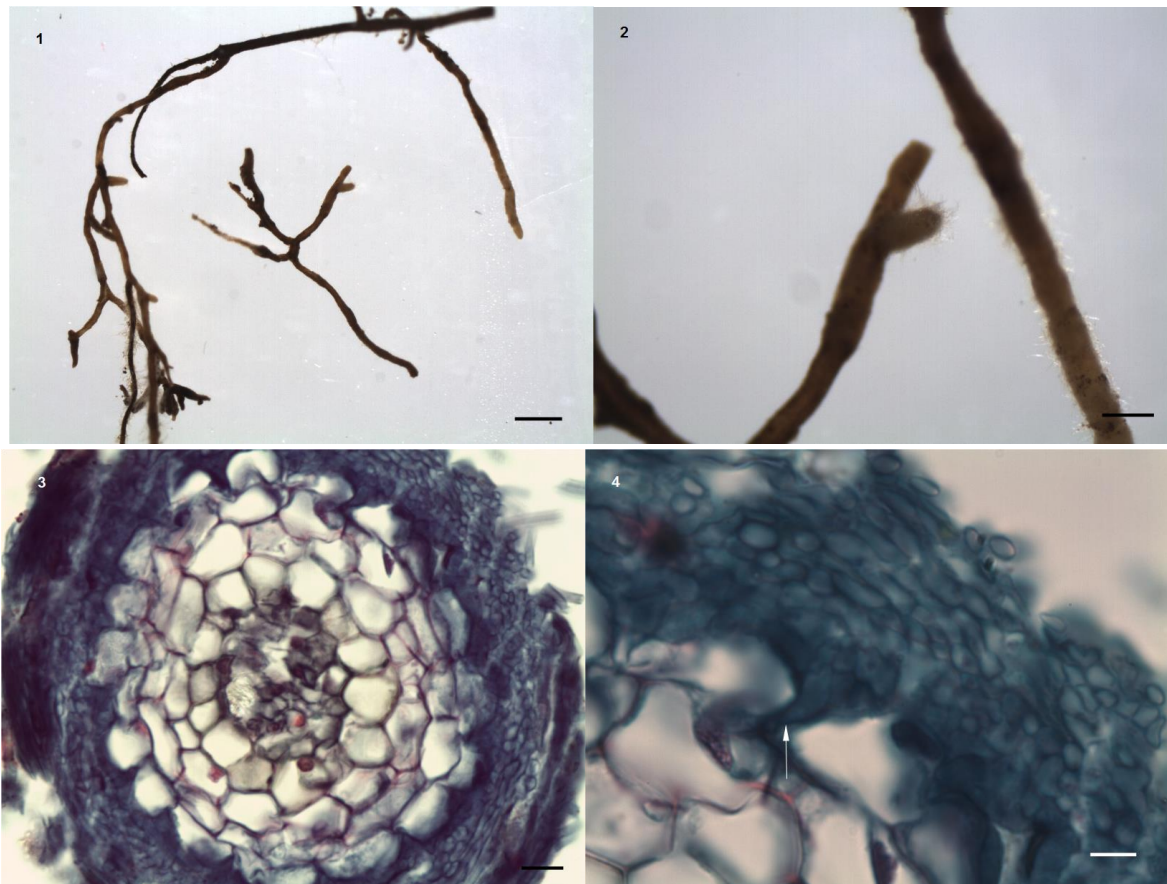
**Ectomicorrizas** muy pequeñas, poco abundantes y sin ramificación. Con un manto blanquecino o café con numerosas hifas emergentes. El manto abarca toda la punta, no hay transparencia, la superficie es entre lanosa o vilosa. Ausencia de rizomorfos. **Manto** conformado por 6-7 capas de hifas. El **manto externo** es una transición entre plecténquima y pseudoparénquima, con hifas cilíndricas de diferentes anchos, haciéndolas ver como hifas globosas. Estas hifas presentan pared gruesa ( $< 1\mu\text{m}$ ), se aprecian algunas hifas emergentes septadas sin fibulas, cortas, con igual pared gruesa y terminación redondeada. El **manto interno** es un pseudoparénquima de hifas globosas pequeñas, en comparación con las del manto externo. La **red de Hartig** abarca la primera capa de células corticales de manera paraepidermal con forma infrecuentemente lobulada.



**Figura 23.** 1-2) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 asociado a *Guapira macrocarpa*. 3) Corte longitudinal de la punta ectomicorrizada, señalando con flechas algunas hifas que se encuentran entre y dentro de las células corticales. 4) Acercamiento al manto, donde además se tiene señalada la red de Hartig con una flecha; Barras: 1) 0.5 mm, 2) 0.25 mm, 3) 75  $\mu\text{m}$ , 4) 4.5  $\mu\text{m}$ .

7.5.5 *Clavulina* sp. 1 + *Guapira macrocarpa* (Morfotipo 5bA2-9).....Fig. 24

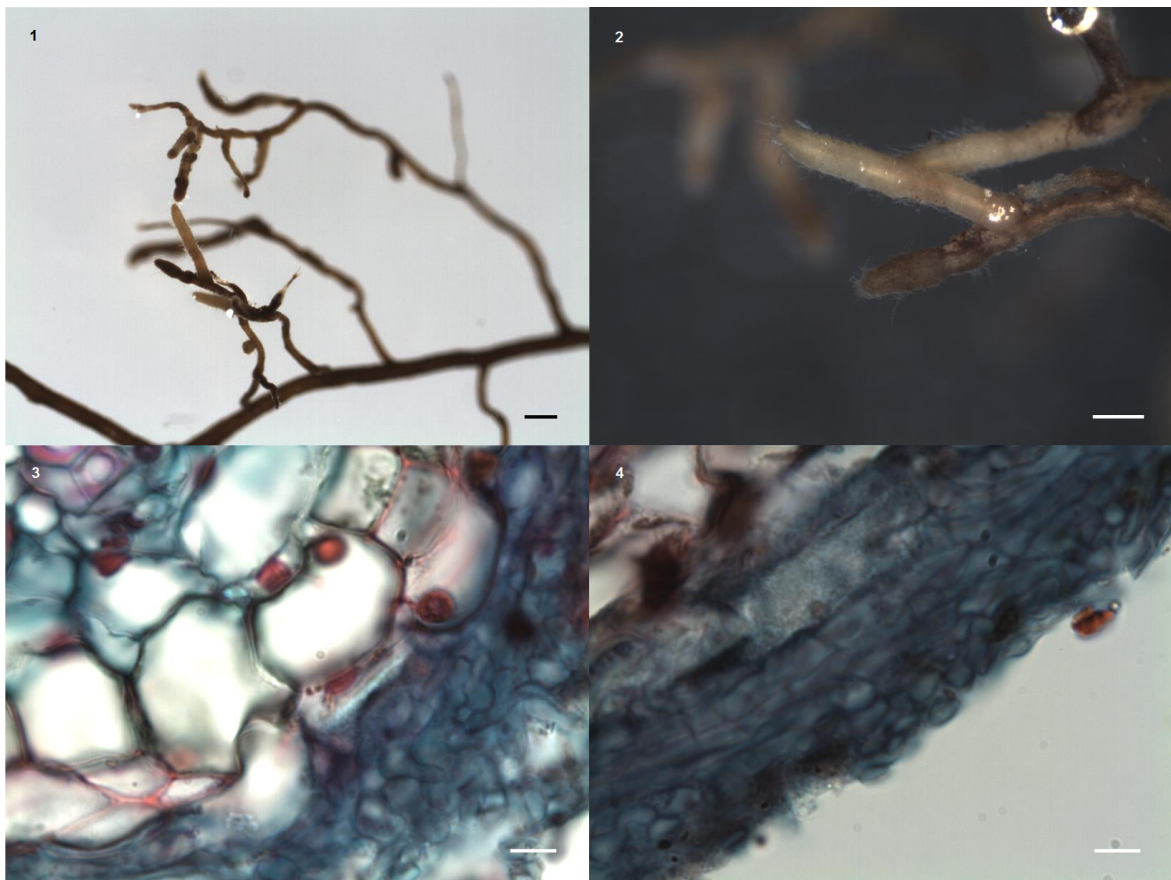
**Ectomicorriza** abundante de color blanquecino, beige y en algunos casos hasta café. El manto parece ser grueso, presenta algunas hifas emergentes cortas hialinas que da apariencia de la superficie vilosa, es ligeramente traslúcido cuando blanquecino. De ramificación ausente con las puntas ligeramente sinuosas. No presenta rizomorfos. **Manto** conformado por 7-10 capas de hifas (25.98-31.41  $\mu\text{m}$ ). El **manto externo** plectenquimatoso de hifas cilíndricas, septadas sin fibulas (4.6-10.8 x 3.7-3.8  $\mu\text{m}$ ) dispuestas en una red repetida y ramificada escuarrosamente. Presenta algunas hifas emergentes ramificadas, septadas sin fibulas. **Manto interno** pseudoparenquimatoso de hifas epidermoides de diámetros variados (3.6-7.9 x 3.9-11.11  $\mu\text{m}$ ). La **red de Hartig** penetra de manera paraepidermal con hifas septadas de color más oscuro, de diferentes tamaños.



**Figura 24.** 1-2) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 asociada a *Guapira macrocarpa*. 3) Corte transversal de la ectomicorriza. 4) Acercamiento al manto, donde se señala como las hifas penetran los espacios intersticiales, es decir la red de Hartig de manera paraepidermal. Barras 1) 1.0 mm, 2) 0.25 mm, 3) 75  $\mu\text{m}$ , 4) 4.5  $\mu\text{m}$ .

7.5.6 *Clavulina* sp. 1 + *Guapira macrocarpa* (Morfotipo 5bA2-5).....Fig. 25

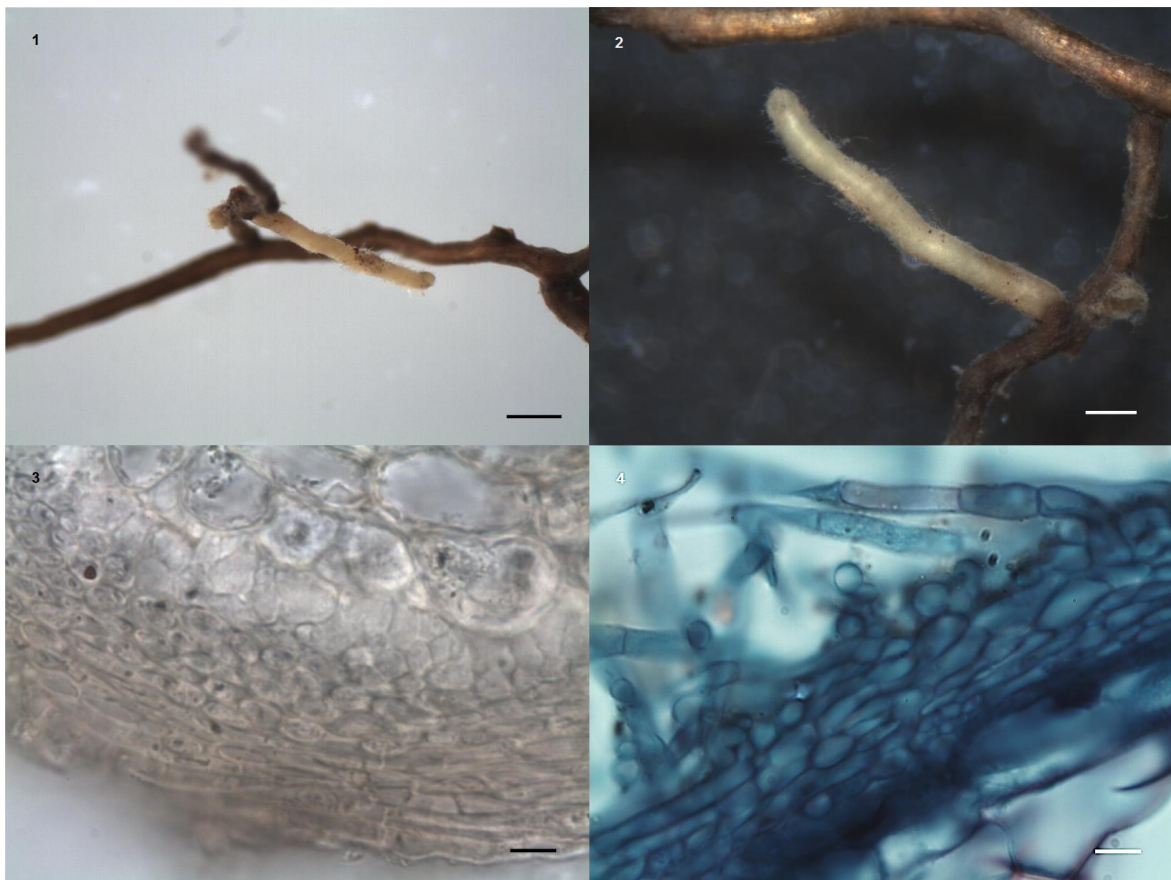
**Ectomicorriza** más o menos abundante de colores variados, va de blanquecino a café, en algunas puntas el color es café y hacia la base se pone blanquecino, mientras que en otras puntas todas son cafés o completamente blanquecinas. Presenta un manto más o menos grueso con algunas hifas emergentes en la punta radicante, el manto cubre completamente la punta, en algunas áreas es traslúcido, la superficie con algunas vellosidades pero en general tomentosa. No presenta ramificación, y la punta es recta a ligeramente sinuosa. Ausencia de rizomorfos. **Manto** compuesto por 8-12 capas de hifas. **Manto externo** plectenquimatoso de hifas cilíndricas de pared gruesa, que se ramifican repetida y escuarrosamente y se encuentran formando una red. Algunas de las hifas se encuentran emergiendo del resto del manto y presentan una pared gruesa ( $<1 \mu\text{m}$ ), septadas sin fíbulas. El **manto interno** es un plecténquima de hifas cilíndricas de menor diámetro que las del manto externo. La **red de Hartig** es paraepidermal en la primera capa de células corticales, y las hifas en los espacios intersticiales tienen formas uniformes.



**Figura 25.** 1-2) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 asociada a *Guapira macrocarpa*. 3) Corte transversal de la punta ectomicorrizada, donde se aprecia el arreglo del manto. 4) Corte longitudinal, se observan células con contenido desconocido. Barras: 1) 0.5 mm, 2) 0.25 mm, 3-4) 4.5  $\mu\text{m}$ .

7.5.7 *Clavulina* sp. 1 + Nyctaginaceae 5 (Morfotipo 5bA2-15).....Fig. 26

**Ectomicorrizas** blanquecinas, poco abundantes, de ramificación ausente, sin transparencia, la superficie es lisa ligeramente brillante y con abundantes hifas emergentes cortas. Las puntas son ligeramente sinuosas con la punta radicante con una breve curvatura sólo en un caso, el resto son jóvenes que no alcanzan cierta longitud para apreciar si son sinuosas. **Manto** conformado por 9 capas de hifas. El **manto externo** es un plecténquima de hifas cilíndricas septadas sin fibulas, de pared gruesa ( $<1 \mu\text{m}$ ). Presenta algunas hifas emergentes cilíndricas que se dicotomizan y tienen terminaciones redondeadas. Las hifas del manto externo son ligeramente más gruesas ( $17.38\text{-}19.3 \times 121.4\text{-}132.62 \mu\text{m}$ ) comparando con el **manto interno** ( $13.28\text{-}15.14 \times 113.9\text{-}115.77 \mu\text{m}$ ). No se aprecia una **red de Hartig**.

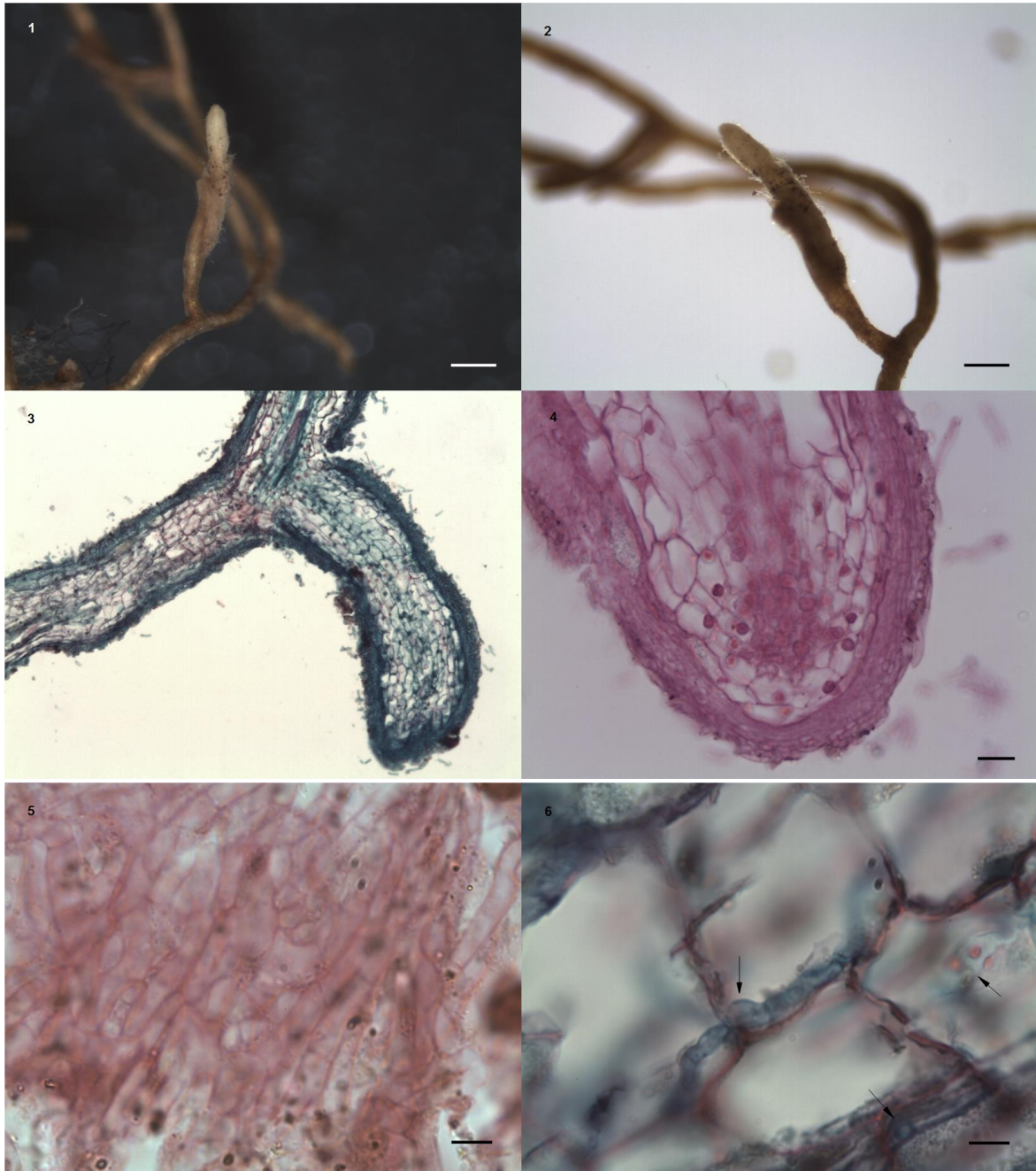


**Figura 26.** 1-2) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 asociado a Nyctaginaceae 5. 3) Corte transversal en fresco, donde se observan las diferentes capas del manto y el manto interno hialino. 4) Corte transversal después del proceso de deshidratación. Se aprecian numerosas hifas emergentes. Barras: 1) 0.33 mm, 2) 0.25 mm, 3-4) 4.5  $\mu\text{m}$ .



7.5.8 *Clavulina* sp. 1 + ¿? (Morfortipo 5bA2-6).....Fig. 27

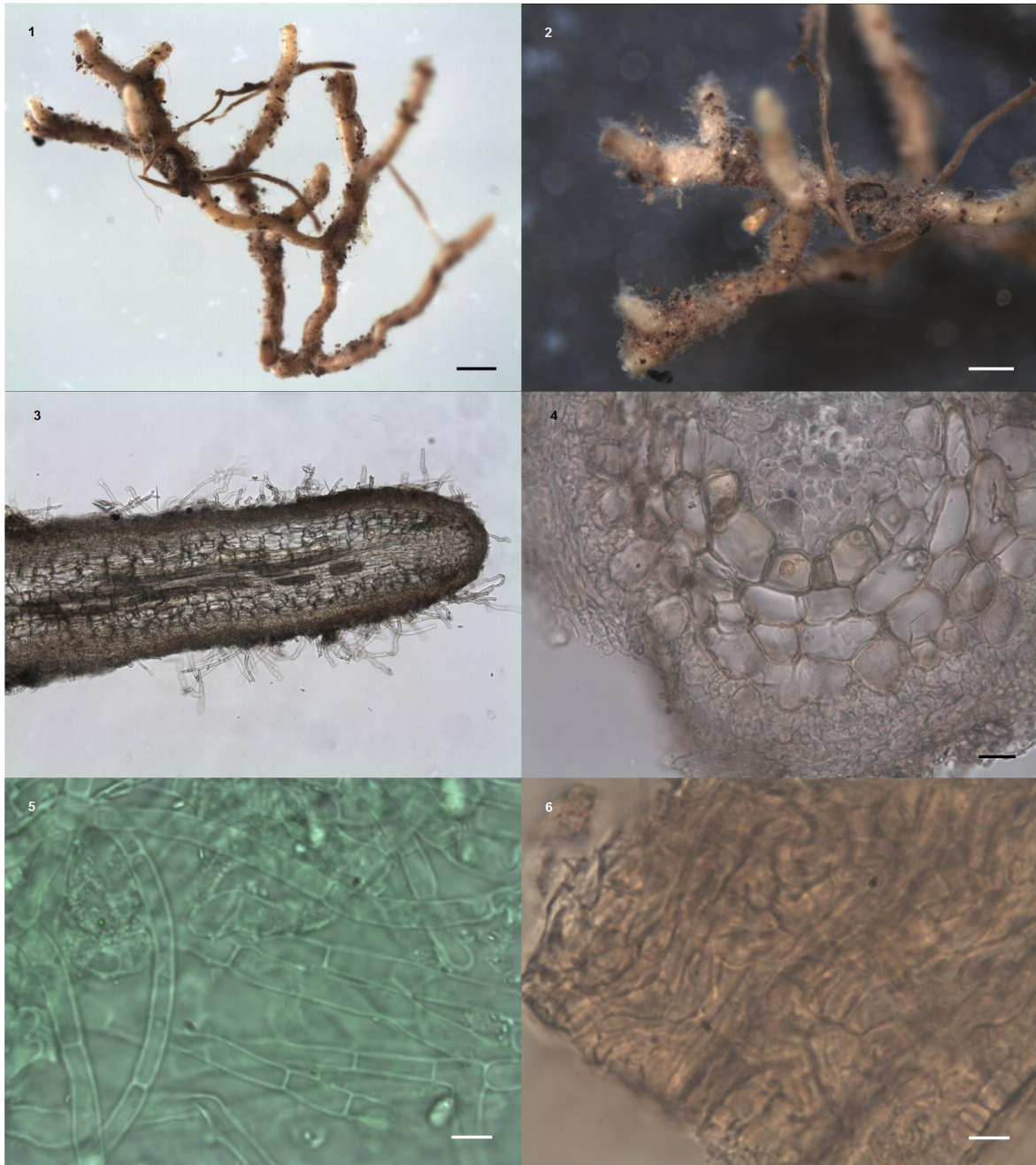
**Ectomicorriza** poco abundante, blanquecina con algunas tonalidades cafés en la base de las puntas micorrizadas. El manto es denso pero con cierta transparencia en la base de las puntas micorrizadas, abarcando toda la punta radicante. Su superficie presenta un tomento fino con algunas hifas emergentes cortas y blanquecinas. No presenta ramificación y las puntas se encuentran ligeramente sinuosas. Ausencia de rizomorfos. Presencia de algunas hifas cenocíticas. **Manto** conformado por 8 capas de hifas (117.68-122.22  $\mu\text{m}$ ). Se distinguen tres estratos bien diferenciados: el **manto externo** es un plecténquima de hifas de pared delgada, con algunas hifas emergentes (116.2-121.2 x 12-04-12.94  $\mu\text{m}$ ) con terminaciones redondeadas. El **manto medio** es un pseudoparénquima de hifas ovaladas. El **manto interno** es ligeramente hialino y es una transición entre pseudoparénquima y plecténquima (11.7-13.1 x 18.1-19.6  $\mu\text{m}$ ). No se aprecia una **red de Hartig**, y se observan algunas células corticales con contenido con apariencia de lípidos. Entre **otras observaciones**, hay múltiples hifas septadas que se encuentran dentro de las células corticales, sin aparente formación de arbusculos o vesículas.



**Figura 27.** 1-2) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 asociado a una planta desconocida. 3) Corte longitudinal al 10x, donde se aprecia una punta bifurcada. 4) Acercamiento de la punta ectomicorrizada, se aprecia la conformación del manto. 5) Manto externo plectenquimatoso. 6) Hifas que se encuentran penetrando células corticales. Barras: 1) 0.33 mm, 2) 0.25 mm, 5-6) 4.5  $\mu$ m

7.5.9 *Clavulina* sp. 1 + ¿? (Morfotipo 5bA2-10).....Fig. 28

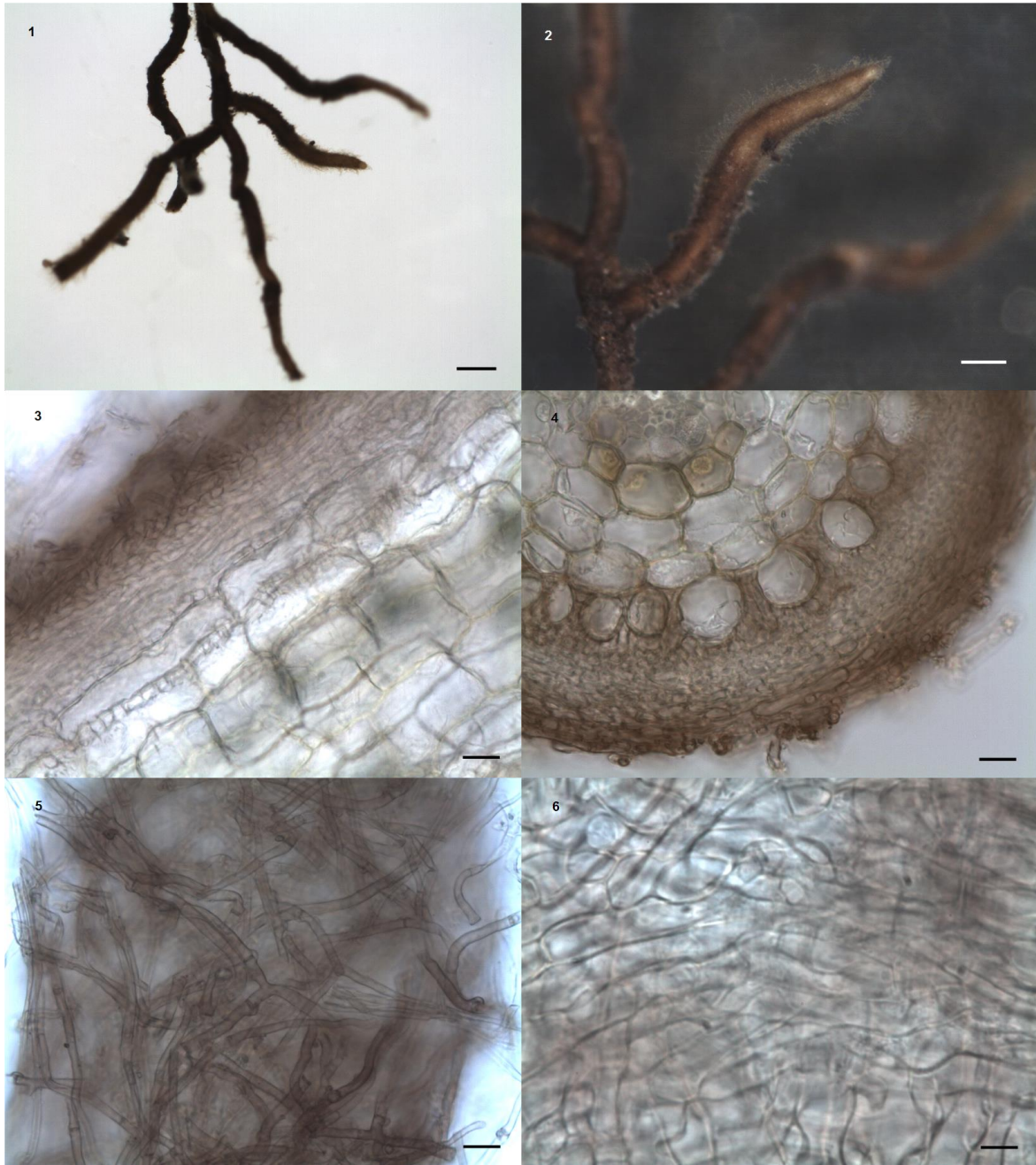
**Ectomicorriza** ramificada irregularmente pinnada con apariencia dicotómica, presenta un manto grueso con cierto brillo, no es traslúcido, de color amarillento-blanquecino a beige. Presenta abundantes hifas emergentes hialinas y cortas. Las puntas son sinuosas con la punta radicante levemente más angosta que el resto. Aparentemente sin rizomorfos aunque presenta una estructura muy delgada y larga saliendo de en medio del manto, como una raíz muy fina, color café claro. Debido a las numerosas hifas emergentes tiene mucho suelo adherido. **Manto** conformado por 9-13 capas de hifas (28  $\mu\text{m}$ ). El **manto externo** es un plecténquima de hifas ramificadas repetidamente de forma escuarrosa, formando una red presenta algunas hifas erectas (2.69-3.75 x 11-30.72  $\mu\text{m}$ ). Estas hifas erectas son cortas, de pared gruesa (< 1 $\mu\text{m}$ ), septadas sin fíbulas, sinuosas con punta roma. El **manto interno** es un pseudoparénquima de hifas epidermoides. La **red de Hartig** es paraepidermal penetrando apenas en la primer capa de células corticales, de tipo palmeada.



**Figura 28.** 1-2) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 asociado a una planta desconocida. 3) Corte longitudinal en el cual se observan numerosas hifas emergentes (10x). 4) Corte transversal donde se puede apreciar con mayor claridad el manto. 5) Hifas del manto externo de hifas cilíndricas. 6) Manto interno con células epidermoides. Barras: 1) 0.5 mm, 2) 0.25 mm, 4) 75  $\mu$ m, 5-6) 4.5  $\mu$ m.

7.5.10 *Clavulina* sp. 1 + ¿? (Morfotipo 5bA2-17).....Fig. 29

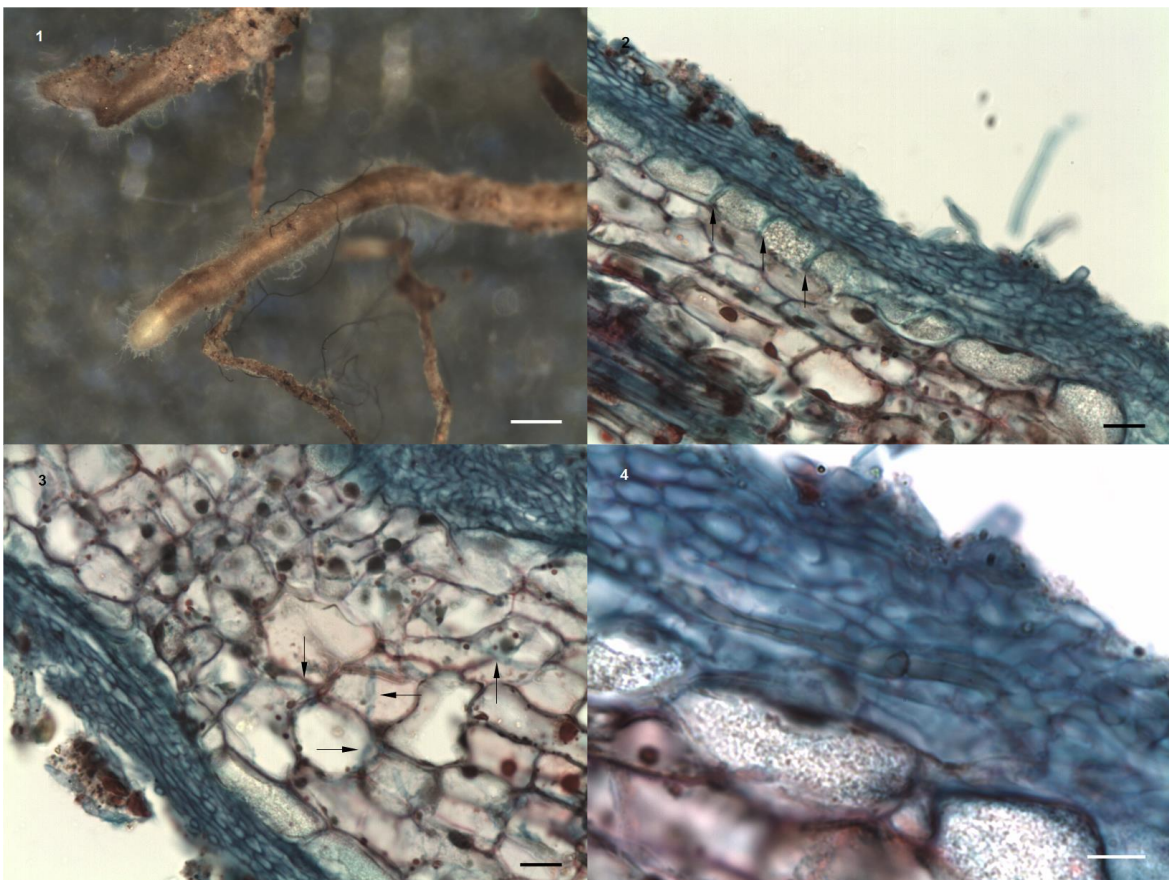
**Ectomicorriza** color café con algunas tonalidades de café amarillento, de ramificación ausente. El manto tiene áreas de superficie ligeramente tomentosa con cierto brillo, mientras que otras partes son gruesas con apariencia flocosa con numerosas hifas emergentes. Este no cubre la punta radicante dejándola expuesta y haciéndola ver más angosta, además de que las puntas son sinuosas. Ausencia de rizomorfos. **Manto** conformado por 10 a 12 capas de hifas (31.62-40.49  $\mu\text{m}$ ). **Manto externo** plectenquimatoso de hifas cilíndricas ligeramente más gruesas que el manto interno (4.76 x 4.96-9.4  $\mu\text{m}$ ). Algunas de las hifas del manto externo se encuentran emergentes conformando un plecténquima laxo. Estas hifas se encuentran septadas con fíbulas, de pared gruesa ( $< 1 \mu\text{m}$ ) y de color melanizado. El **manto interno** es un plecténquima de hifas de menor diámetro (2.45-3.69 x 8.8  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 29.** 1-2) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 asociado a una planta desconocida. 3) Corte longitudinal donde se aprecia claramente el manto y red de Hartig. 4) Corte transversal donde se observa la red de Hartig paraepidermal. 5) manto externo plectenquimatoso. 6) manto interno plectenquimatoso. Barras: 1) 0.5 mm, 2) 0.25 mm, 3-6) 75  $\mu$ m.

7.5.11 *Clavulina* sp. 1 + secuencia de doble banda (Morfotipo 5bA2-2).....Fig. 30

**Ectomicorriza** sin ramificación de color café oscuro a bronce con las puntas blanquecinas. El manto presenta cierto brillo y algunas hifas emergentes principalmente en medio del manto pero se pueden encontrar a todo lo largo del manto. La parte del manto de color bronce parece constreñir ligeramente en la parte donde el manto se vuelve blanco. **Manto** conformado por 11-16 capas de hifas. El **manto externo** plectenquimatoso con arreglo de red. Presenta algunas hifas laxas emergentes cilíndricas, septadas sin fibulas: algunas se encuentran de forma sinuosa mientras que otras se aprecian bifurcándose entre las partes medias de las hifas. El **manto interno** es una transición entre pseudoparenquima y plecténquima. La **red de Hartig** penetra paraepidermal, con una forma infrecuentemente lobulada y las hifas son septadas. Además hay hifas del manto que penetran las células corticales, sin formar otra estructura aparente. También se encuentran hifas de otro hongo de pared gruesa y melanizada dentro de las células corticales.



**Figura 30.** 1) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 asociada a una planta desconocida. 2) Corte longitudinal donde se aprecia el manto. 3) Con flechas negras se señalan las numerosas hifas que se encuentran dentro de las células corticales. 4) Acercamiento al manto donde se aprecia una hifa de color oscuro. Barras: 1) 0.25 mm, 2-3) 75  $\mu$ m, 4) 6.8  $\mu$ m.

7.5.12 *Clavulina* sp. 1+ Nyctaginaceae 1 (Morfortipo 5bA2-16)

**Ectomicorriza** blanquecina con un manto con hifas emergentes abundantes y cortas, hialinas, de superficie levemente brillante, y que presenta cierta traslucidez el manto, con puntas sinuosas sin adelgazamiento en la parte apical. Ausencia de rizomorfos. **Manto** conformado por 8-10 capas de hifas (21.14-30.02  $\mu\text{m}$ ). **Manto externo** plectenquimatoso con un arreglo de conexiones hifales de apariencia de anillo, septadas sin fibulas. Presenta algunas hifas emergentes erectas, septadas sin fibulas. Se aprecia un **manto medio** plectenquimatoso muy ordenado de hifas cilíndricas. El **manto interno** es una transición entre pseudoparénquima y plectéquima, con formas irregulares formando una red de malla gruesa. La **red de Hartig** penetra de manera periepidermal hasta la segunda capa de células corticales, con hifas redondeadas en los espacios intersticiales. En algunas células corticales se parecían hifas dentro de las células corticales, que provienen desde el manto y que no se encuentran formando ninguna estructura pero sí se ramifican.

7.5.13 *Clavulina* sp. 1 + ¿? (Morfortipo 5bA2-4).....Fig. 31

**Ectomicorriza** de color café chocolate con manto opaco, de apariencia lisa con unas cuantas hifas emergentes inclinadas. No se encuentra ramificada. La punta se encuentra ligeramente adelgazada pero con terminación redondeada. **Manto** compuesto por 7 capas de hifas. **Manto externo** es un pseudoparénquima con hifas relativamente delgadas. El **manto interno** igualmente se aprecia como un pseudoparénquima. No se aprecia con claridad una **red de Hartig** sin embargo se observan algunas hifas dentro de las células corticales.

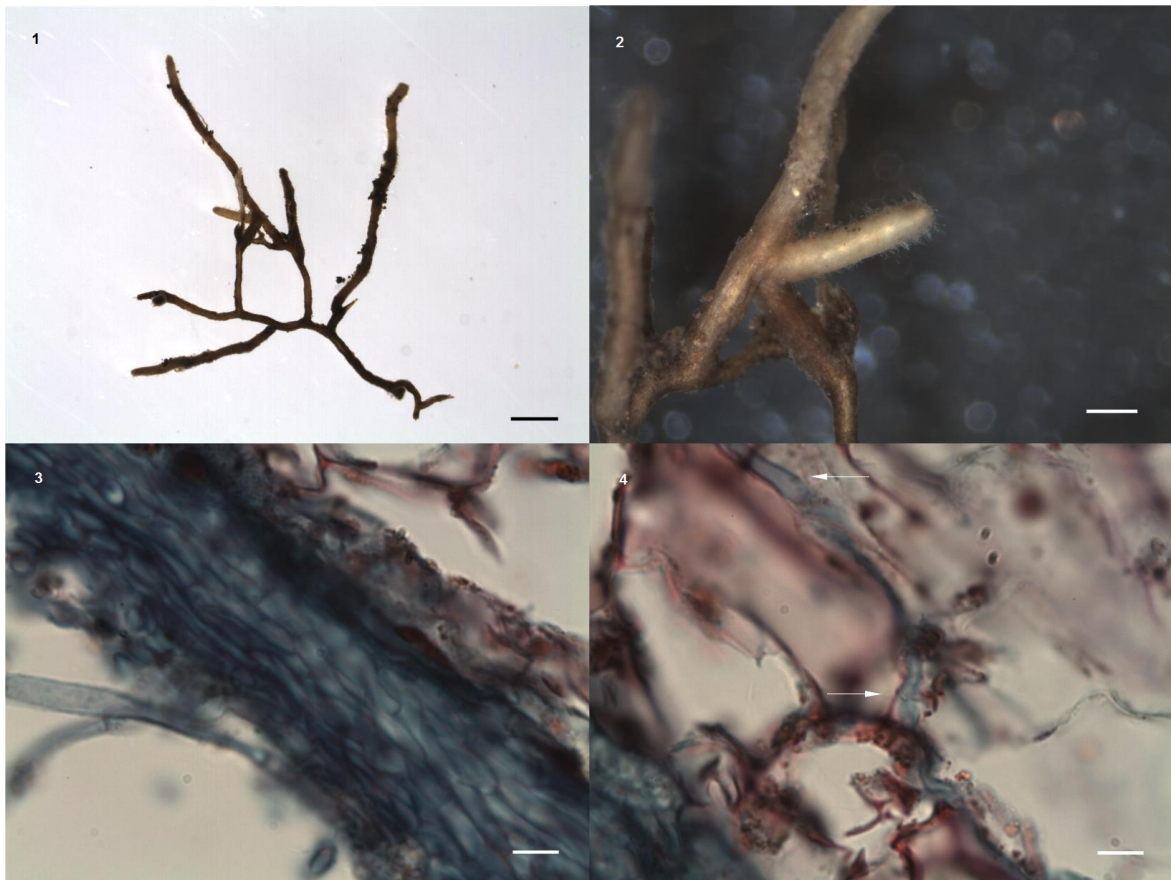


**Figura 31.** 1) Ectomicorriza de *Clavulina* sp. 1 con planta desconocida. Barras 1) 0.25 mm, 2) 75  $\mu\text{m}$ .



7.5.14 *Tomentella* sp. 1 + Nyctaginaceae 6 (Morfotipo 5bA2-18).....Fig. 32

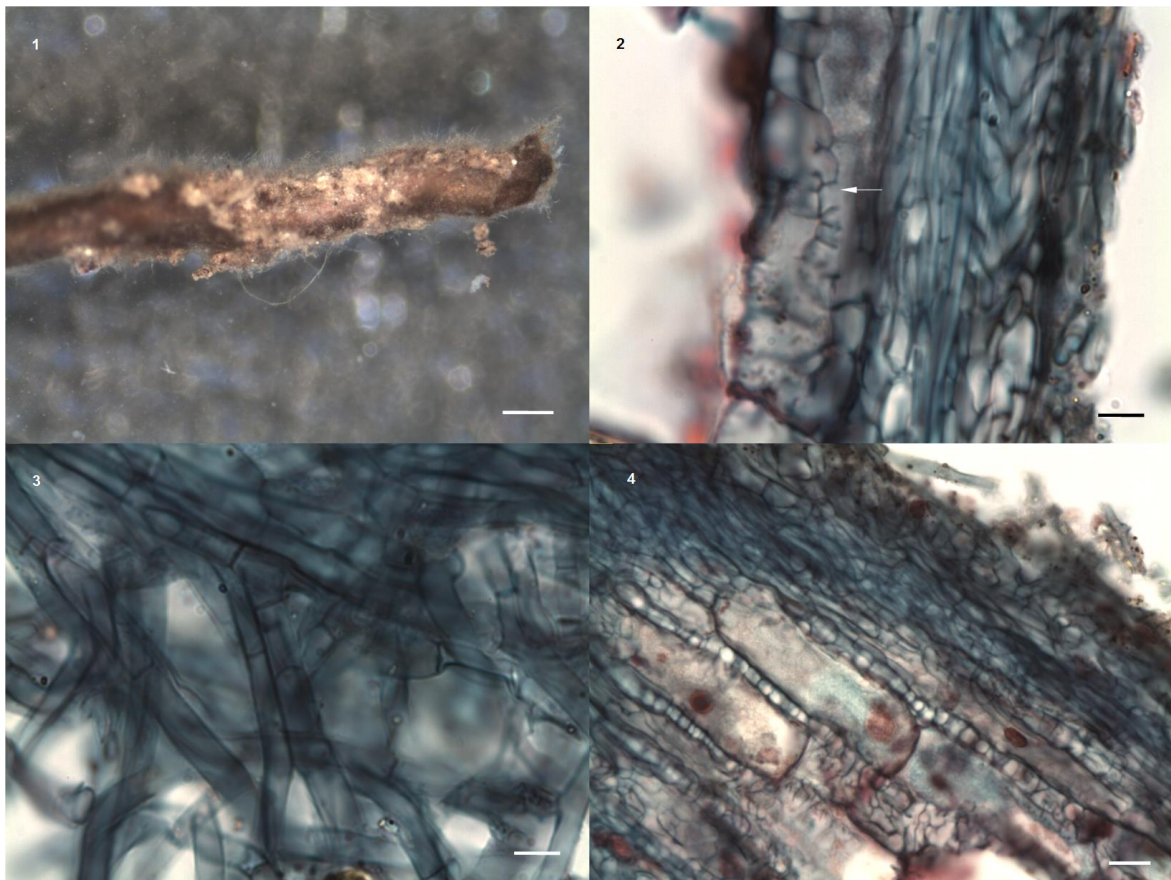
**Ectomicorriza** con colores cafés muy claros cuando jóvenes y café más oscuro cuando maduro. La ramificación es ausente y la superficie es tomentosa con numerosas hifas emergentes cortas, hialinas y erectas. El manto es delgado y se logra ver cómo las hifas se entrelazan para formarlo. Las puntas son completamente rectas sin adelgazamiento en la parte apical. Ausencia de rizomorfos. **Manto** compuesto por 9-13 capas de hifas (28.88-36.9  $\mu\text{m}$ ). Todo el manto es un plecténquima, pero el manto externo es una transición entre un plecténquima y pseudoparénquima. Las hifas del **manto externo** son gruesas comparadas con las del manto interno. Las hifas emergentes son poco abundantes, tienen pared gruesa ( $<1 \mu\text{m}$ ) y son septadas sin fibulas. Presenta **manto medio** conformado por 2 capas, una plectenquimatosa de hifas cilíndricas (10.0-15.2 x 2.1-4.2  $\mu\text{m}$ ) y la segunda más pegada al manto interno, es un pseudoparénquima de hifas redondeadas (3.0-5.36 x 2.7-5.64  $\mu\text{m}$ ). El **manto interno** es muy hialino, pseudoparenquimatoso de células angulares (4.00-5.24 x 3.45-5.41  $\mu\text{m}$ ). La **red de Hartig** es difícil de apreciar.



**Figura 32.** 1-2) Ectomicorriza de *Tomentella* sp.1 con Nyctaginaceae 6. 3) Corte longitudinal donde se aprecian las capas del manto y algunas hifas emergentes. 4) Acercamiento de una hifa que se encuentra penetrando las células corticales. Barras: 1) 1.0 mm, 2) 0.25 mm, 3-4) 4.5  $\mu\text{m}$ .

7.5.15 *Tomentella* sp. 1 + Nyctaginaceae 1 (Morfotipo 15bA1-1).....Fig. 33

**Ectomicorriza** poco convencional, donde el manto no cubre las partes más apicales de la raíz, sino que se encuentra envolviendo la parte media de la raíz. El **manto externo** es oscuro y grueso con abundantes hifas emergentes erectas, laxas conformando una red de hifas septadas con fibulas. Tiene 12 capas de hifas compactas en el manto (42  $\mu$ m). El **manto medio** es un plecténquima de hifas cilíndricas ordenadas, con una transición en algunas zonas a pseudoparénquima. De igual manera las hifas del **manto interno** es una transición entre un pseudoparénquima y plecténquima. La **red de Hartig** es conspicua, penetrando periepidermalmente, con grandes lóbulos intrecuentemente ramificada y de hifas septadas.



**Figura 33.** 1) Ectomicorriza de *Tomentella* sp. 1 asociado a Nyctaginaceae 1. 2) Corte longitudinal donde se observan todas las capas de hifas que conforman el manto y la red de Hartig, señalada con flecha. 3) Hifas emergentes del manto externo, algunas con fibulas. 4) Ampliación del corte longitudinal donde se observan las hifas en los espacios intersticiales. Barras: 1) 0.25 mm, 2-3) 4.5  $\mu$ m, 4) 75  $\mu$ m.

7.5.16 *Tomentella* sp. 1 + *Guapira macrocarpa* (Morfotipo 09A1-1).....Fig. 34

**Ectomicorriza** poco abundante de color amarillo a ligeramente café, ramificación ausente, con puntas distales infladas a ligeramente clavadas. Superficie del manto algodonosa con algunas hifas emergentes hialinas y cortas.

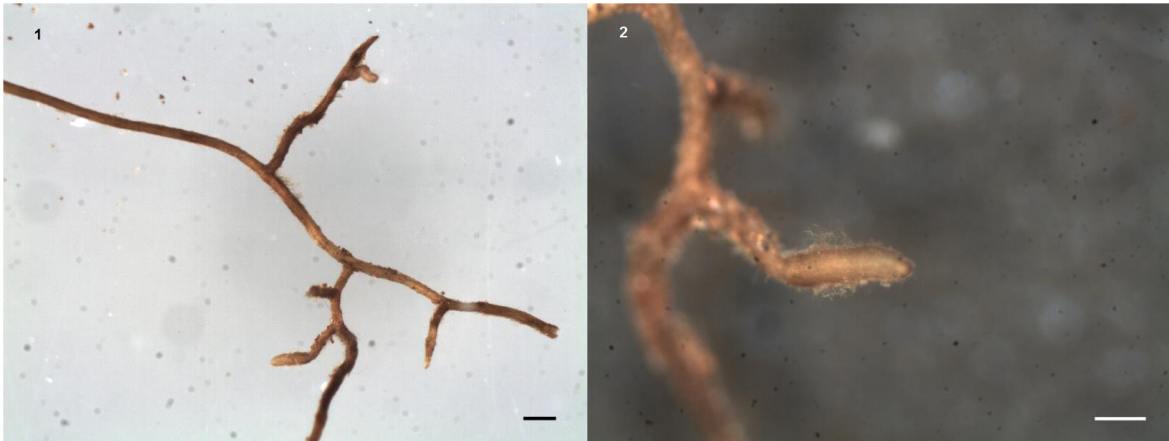


Figura 34. 1-2) Ectomicorriza de *Tomentella* sp. 1 asociado a *Guapira macrocarpa*. Barras: 1)1 mm, 2) 0.25 mm.

7.5.17 *Tomentella* sp. 1 + Polygonaceae 1 (Morfotipo 09A1-3).....Fig. 35

**Ectomicorriza** poco abundante de color bronce con ramificación ausente, con puntas rectas con algunas formas sinuosas. El manto presenta micelio externo hialino de hifas cortas encima de la superficie bronceada.

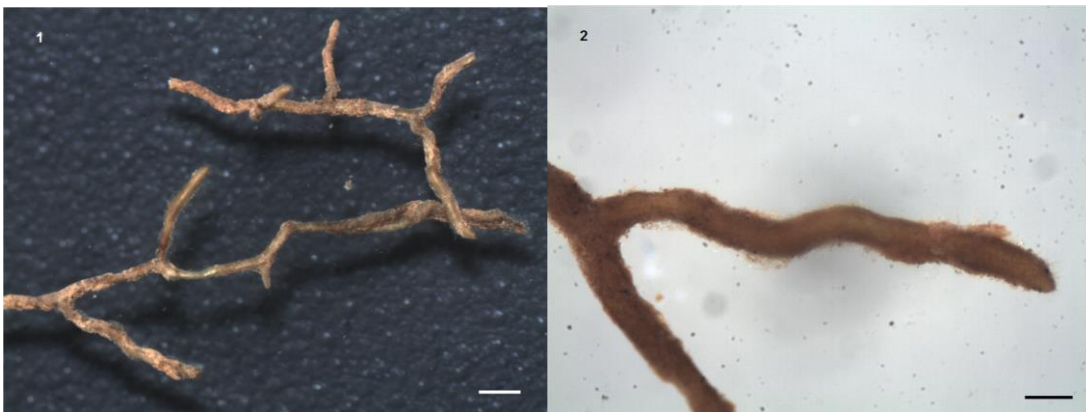


Figura 35. 1-2) Ectomicorriza de *Tomentella* sp. 1 con Polygonaceae 1. Barras: 1) 1mm, 2) 0.25 mm.

7.5.18 *Tomentella* sp. 1+ Nyctaginaceae 7 (Morfotipo 09A1-6).....Fig. 36

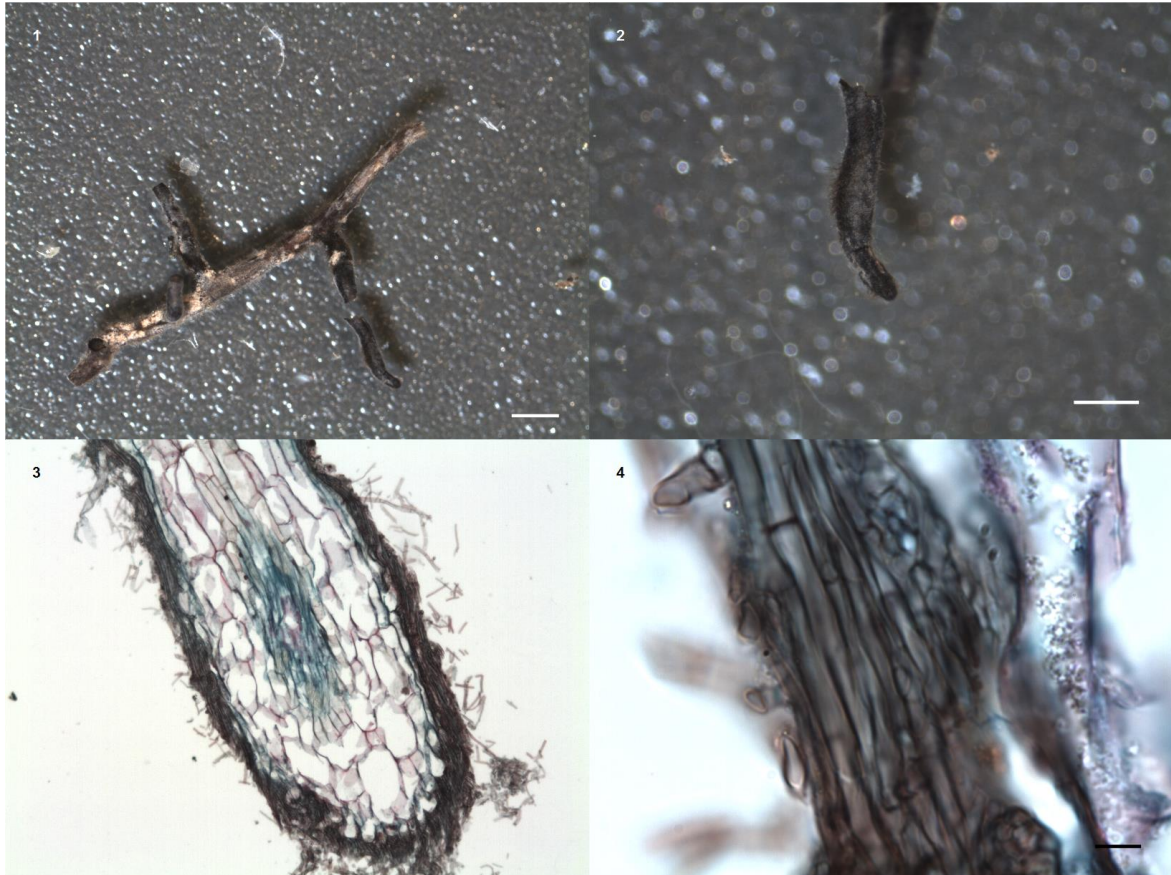
**Ectomicorriza** poco abundante de color dorado opaco, sin ramificación, de superficie lisa brillante. Las puntas distales son cilíndricas y no infladas, con algunas hifas emergentes concentradas en las puntas distales. El manto no abarca desde la base de la ramificación de la raíz. Ausencia de rizomorfos.



**Figura 36.** 1-2) Ectomicorriza de *Tomentella* sp.1 asociado a Nyctaginaceae 7. Barras: 1) 0.5 mm, 2) 0.25 mm.

7.5.19 *Tomentella* sp. 2 + Nyctaginaceae 8 (Morfotipo 9bA1-5).....Fig. 37

**Ectomicorriza** de gran tamaño en comparación con las anteriormente descritas, de color negro con superficie tomentosa-granulosa con algunas hifas emergentes de color oscuro, más abundantes y largas en la base de la ectomicorriza, aparentemente sin ramificación aunque las puntas se encuentran sinuosas, el manto parece ser grueso, no presenta transparencia. **Manto** conformado por 10-17 capas de hifas (46.23-71.59  $\mu\text{m}$ ). La conformación del manto recuerda a una trama divergente. El **manto externo** plectenquimatoso, tiene hifas emergentes cilíndricas, rectas, septadas con fibulas de color café oscuro (2.16-3.85x7.41-19.06  $\mu\text{m}$ ), de pared gruesa (<1  $\mu\text{m}$ ). El **manto medio** es una transición entre pseudoparénquima y plecténquima con hifas ovaladas (6.2-9.7x 2.7-5.8  $\mu\text{m}$ ). El **manto interno** es más hialino con hifas epidermoides de menor tamaño (3.7-8.1 x 3.0-6.9  $\mu\text{m}$ ). La **red de Hartig** es hialina, infrecuentemente lobulada, que penetra de manera periepidermal, más de una capa de células corticales.



**Figura 37.** 1-2) Ectomicorriza de *Tomentella* sp. 2 asociado a Nyctaginaceae 8. 3) Corte transversal de la punta ectomicorrizada (10x). 4) Acercamiento del manto melanizado. Barras: 1) 1.0 mm, 2) 0.5 mm, 4) 4.5  $\mu\text{m}$

7.5.20 *Tomentella* sp. 2 + *Guapira macrocarpa* (Morfortipo 14bA2-1).....Fig. 38

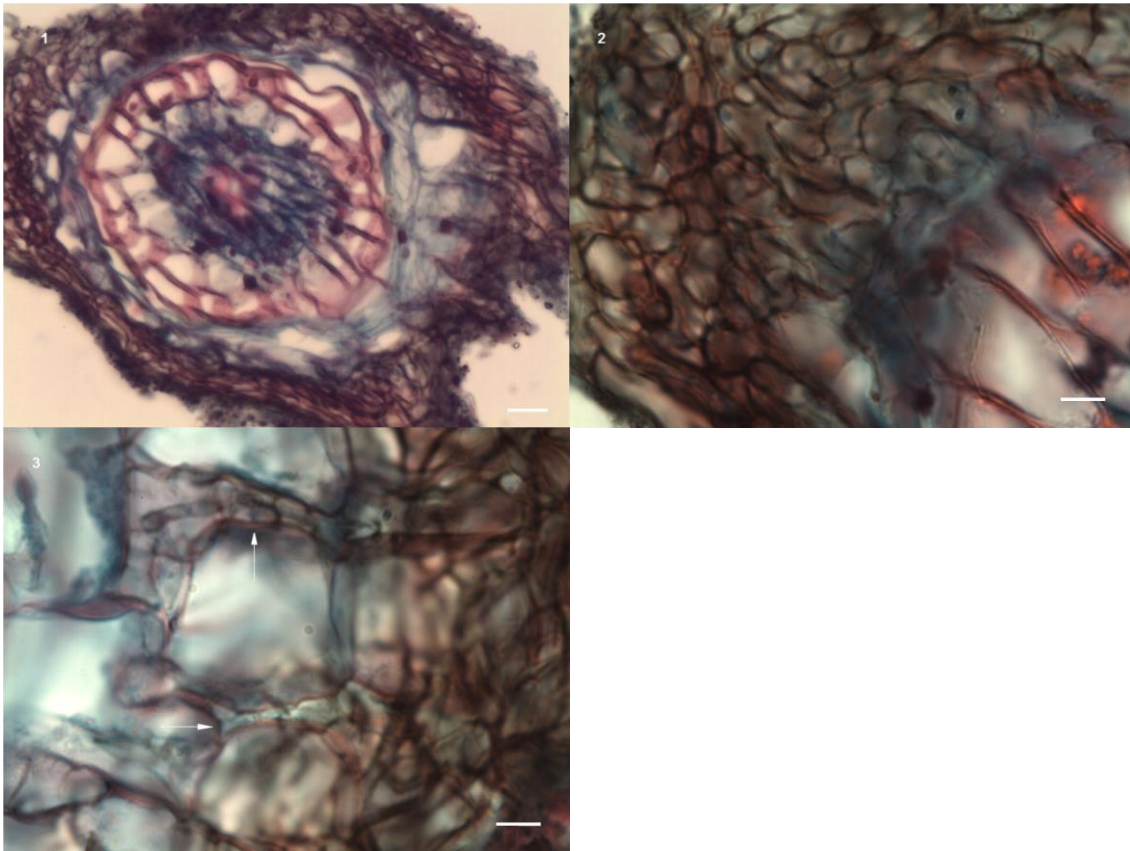
**Ectomicorriza** sin ramificación, de manto completamente negro con algunas hifas emergentes a todo lo largo. Estas hifas emergentes también se aprecian de un color muy melanizado y erectas. El manto presenta cierto brillo a pesar de ser tan ópaco. La estructura de la ECM se encuentra de manera sinuosa y la parte apical termina de manera redondeada. **Manto** grueso conformado por 12-16 capas de hifas, donde se pueden apreciar 3 conformaciones estructurales diferentes: **manto interno** pseudoparenquimatoso de hifas más claras que el resto del manto, con apariencia epidermoides o formas irregulares de diferentes diámetros (4-11 x 4-13  $\mu\text{m}$ ); el **manto medio** se aprecia como una transición entre pseudoparenquima y plecténquima, donde se encuentran hifas cilíndricas y otras de formas variadas; el **manto externo** es melanizado, presenta hifas emergentes de pared gruesa (>1  $\mu\text{m}$ ) septadas con fibulas, de terminaciones redondeadas. También se encuentran otras hifas de mayor grosor que se ramifican repetida y escuarrosamente, formando una red plectenquimatoso. Las hifas más gruesas son las que se encuentran adheridas al resto del manto compacto sobre la raíz. La **red de Hartig** es prominente, abarcando dos capas de células corticales, periepidermal, en algunas zonas se alcanza hasta la tercer capa de células corticales paraepidermalmente, y es de tipo infrecuentemente lobulada.



**Figura 38.** 1-2) Ectomicorriza de *Tomentella* sp. 2 asociado a *Guapira macrocarpa*. 3) Corte longitudinal de la punta ectomicorrizada donde se observan las capas de hifas que conforman el manto y la red de Hartig periepidermal. 4) Acercamiento de la red de Hartig y de células corticales con contenido lipídico. Barras: 1) 0.5 mm, 2) 0.25 mm, 3) 75  $\mu\text{m}$ , 4) 4.5  $\mu\text{m}$ .

7.5.21 *Tomentella* sp. 3 + ¿? (Morfortipo H8Snt9).....Fig. 39

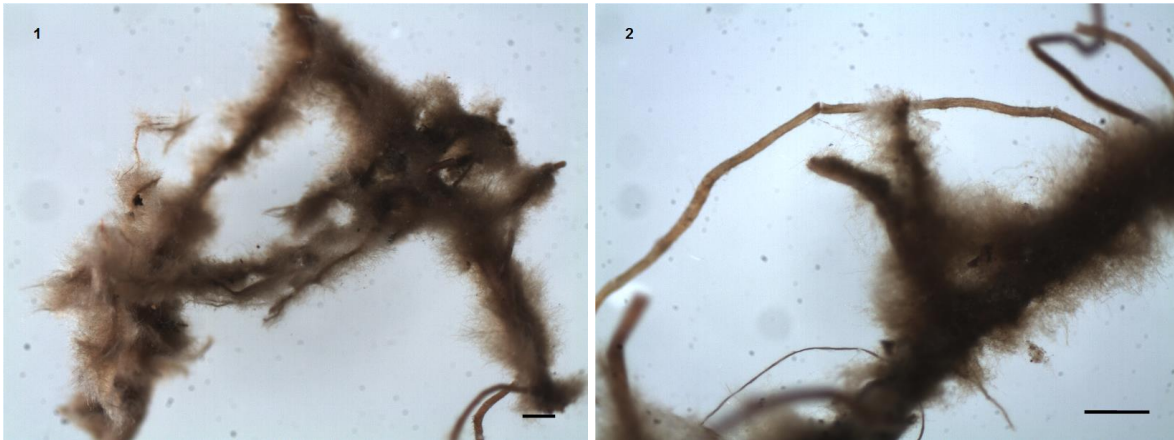
**Ectomicorriza** de manto oscuro y grueso conformado por 5 a 9 capas de hifas (102.12-127.72  $\mu\text{m}$ ). El **manto** está compuesto por tejido pseudoparenquimatoso, y el **manto externo** presenta hifas irregulares conformando una red de malla gruesa, irregulares (tipo H). Mientras que el **manto interno** presenta células epidermoides de diferentes anchos (12.08-13.9 x 11.46-15.23  $\mu\text{m}$ ). La **red de Hartig** en algunas zonas es periepidermal cubriendo la primera capa de células corticales, del tipo infrecuentemente lobulada. En los espacios intersticiales se aprecian hifas anchas infrecuentemente lobuladas (11.86-13.91 x 14.16-16.45  $\mu\text{m}$ ). Hay algunas hifas melanizadas que se encuentran dentro de las células corticales.



**Figura 39.** 1) Corte transversal de la punta ectomicorrizada de *Tomentella* sp. 3 asociada a una planta desconocida. 2) Acercamiento a las hifas que conforman el manto. 3) Acercamiento a la red de Hartig, señalada con flechas. Barras: 2-3) 4.5  $\mu\text{m}$ .

7.5.22 *Thelephora versatilis* + Polygonaceae 1 (Morfotipo 02H1-10).....Fig. 40

**Ectomicorriza** de color café verdoso, de ramificación pinnada con apariencia dicotómica, manto lanoso con abundante micelio externo. Presenta rizomorfos que están conectados a la mitad de la ectomicorriza que son envueltos densamente en hifas, estos son cilíndricos igualmente lanosos. Además hay raicillas no ectomicorrizadas que se ramifican de donde se aprecia el manto.

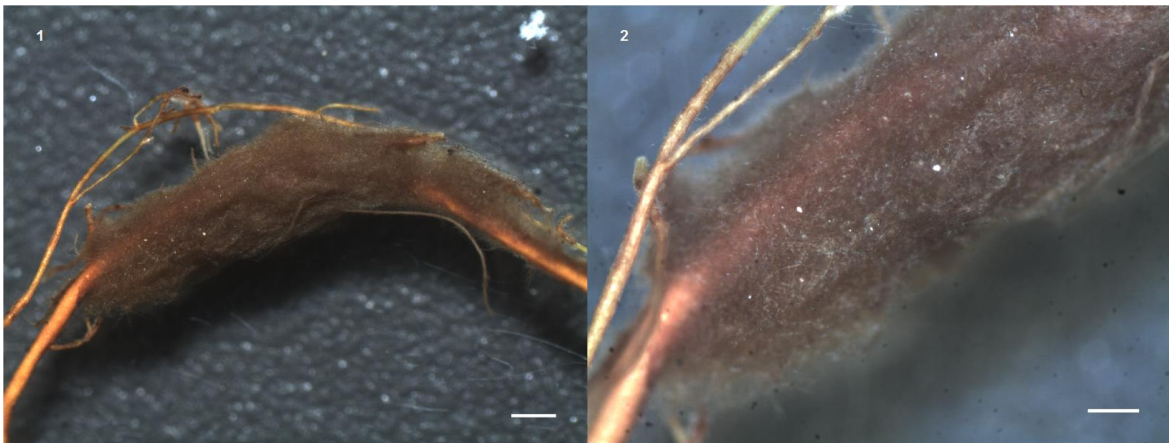


**Figura 40.** 1-2) Morfotipo de ectomicorriza de *Thelephora versatilis* asociada a Polygonaceae 1. Barras: 1-2) 0.5 mm.



7.5.23 *Thelephora versatilis* + *Achatocarpus gracilis* (Morfotipo ThSnt1).....Fig. 41

**Ectomicorriza** de color café ligeramente oliváceo, manto densamente algodonoso que no cubre las puntas distales aunque hay algunos rizomorfos que cubren el resto de la raíz que hace que se observen numerosas hifas emergentes sobre la raíz. No hay ramificación en las puntas micorrizadas. Los rizomorfos son vilosos con algunas áreas lanosas de conexión oblicua al manto, emergen de la parte media de la ectomicorriza, presentan el mismo color del manto con zonas más oscurecidas. Al poner en contacto con alcohol ésta se decoloró dejando un color amarillo.



**Figura 41.** 1-2) Ectomicorriza de *Thelephora versatilis* asociado a *Achatocarpus gracilis*. Barras: 1) 1 mm, 2) 0.25 mm

7.5.24 *Thelephora versatilis* + Araliaceae (Morfotipo 11H3-3).....Fig. 42

**Ectomicorriza** de color café-grisáceo con rizomorfos largos emergentes de la raíz y envueltos densamente en hifas.

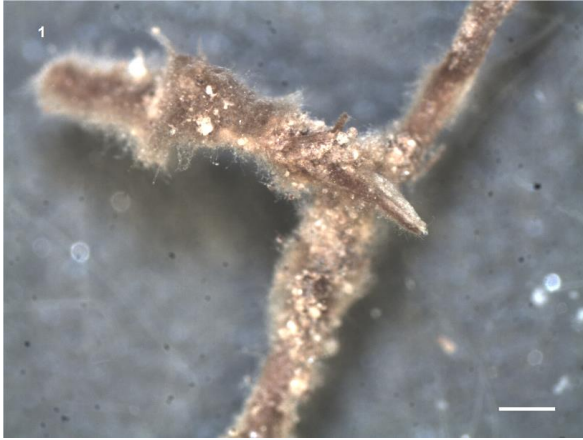


Figura 42. 1-2) Ectomicorriza de *Thelephora versatilis* asociado a Araliaceae. Barra: 1) 0.5 mm

7.5.25 *Thelephora versatilis* + ¿? (Morfotipo 11H3-1).....Fig. 43

**Ectomicorriza** abundante de color café-grisáceo densamente algodonosa, donde se impide ver la ramificación y las puntas pero es posible que tenga ramificación coraloides. Presenta rizomorfos del mismo color del manto cilíndricos con hábito en forma de abanico con crecimiento ocasional sobre la raíz y se conectan al manto de manera oblicua.

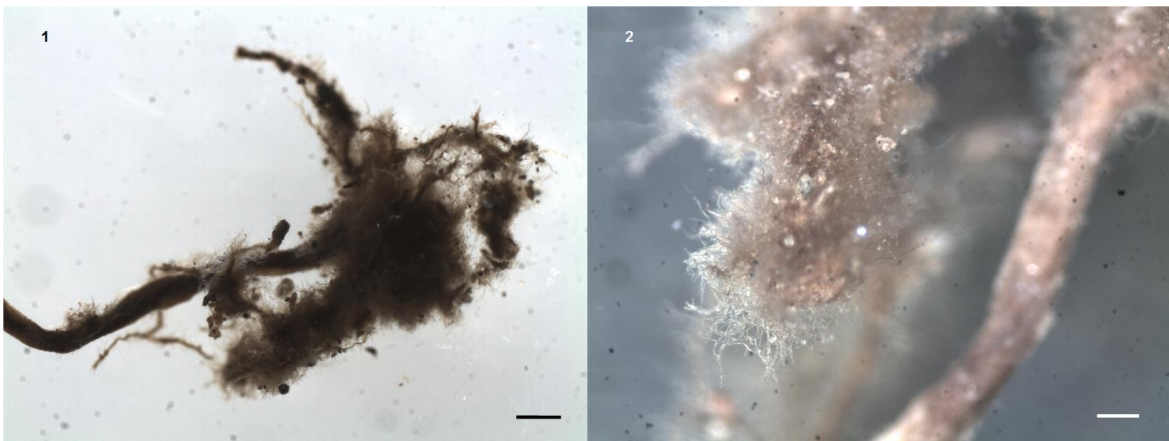
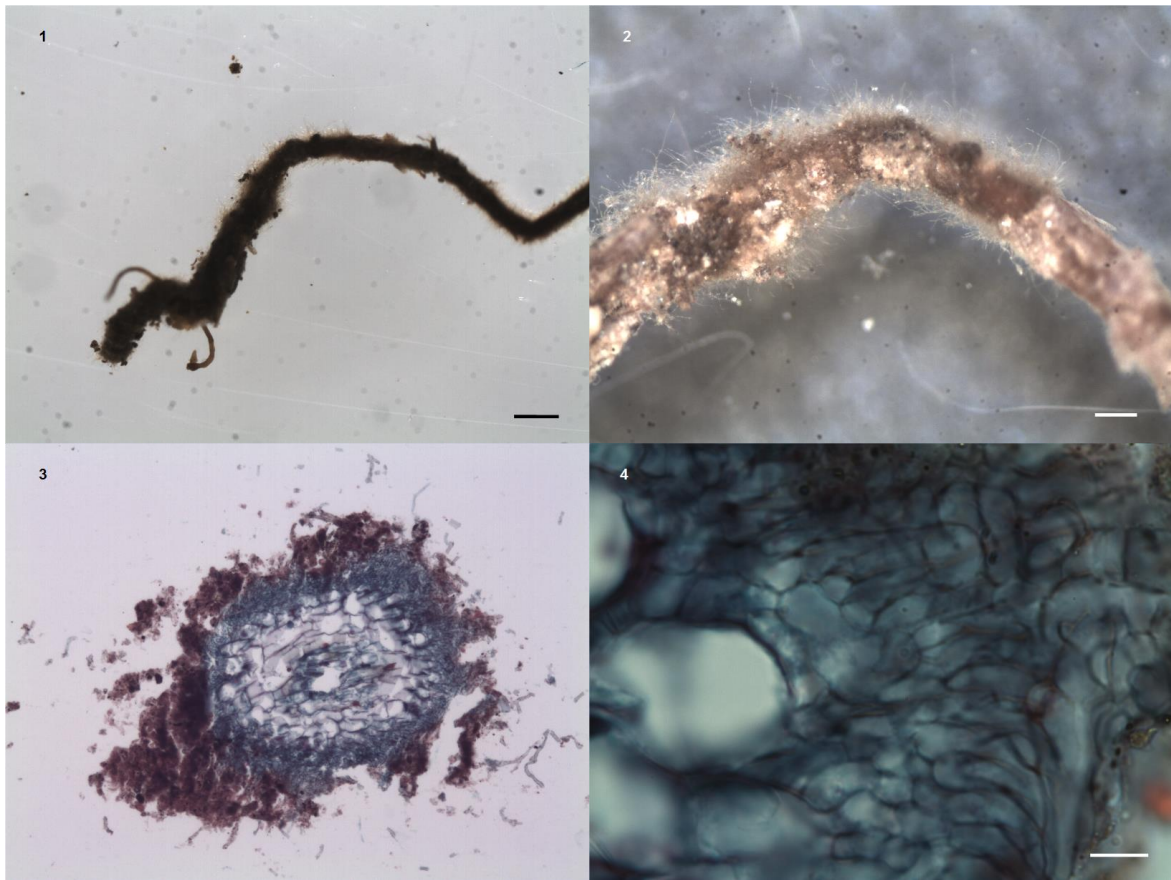


Figura 43. 1-2) Ectomicorriza de *Thelephora versatilis* asociado a una planta desconocida. Barras: 1) 1 mm, 2) 0.25 mm.

7.5.26 *Thelephora versatilis* + ¿? (Morfotipo 11H3-4).....Fig. 44

**Ectomicorriza** conformada por un manto grueso que no se encuentra cubriendo la parte apical de raíz, sino que rodea únicamente la parte medio de la raíz. El **manto** es oscuro con abundantes hifas emergentes erectas; no hay ningún tipo de ramificación. Está conformado por 11-31 capas de hifas. El **manto externo** es pseudoparenquimatoso con hifas ramificadas repetida y escuarrosamente, conformando una red. Las hifas emergentes tienen diferentes grosores, algunas de las hifas presentan pared igual a  $1\ \mu\text{m}$ . El **manto interno** es un plecténquima de hifas cilíndricas de diferentes grosores, septadas sin fíbulas. La **red de Hartig** es infrecuentemente lobulada, septada, llega hasta la segunda o tercera capa de células corticales. Las hifas que se aprecian penetrando entre los espacios intersticiales son gruesas  $3-6 \times 3-6\ \mu\text{m}$ .



**Figura 44.** 1-2) Ectomicorriza de *Thelephora versatilis* asociado a una planta desconocida. 3) Corte transversal de la punta ectomicorrizada, donde se aprecia un manto denso y materia orgánica agregada en la periferia. 4) Acercamiento a las numerosas capas de hifas del manto. También se observa parte de la red de Hartig de lado izquierdo. Barras: 1) 1 mm, 2) 0.25 mm, 4)  $6.8\ \mu\text{m}$ .

7.5.27 *Thelephora versatilis* + ¿? (Morfotipo Theleph snt2) .....Fig. 45

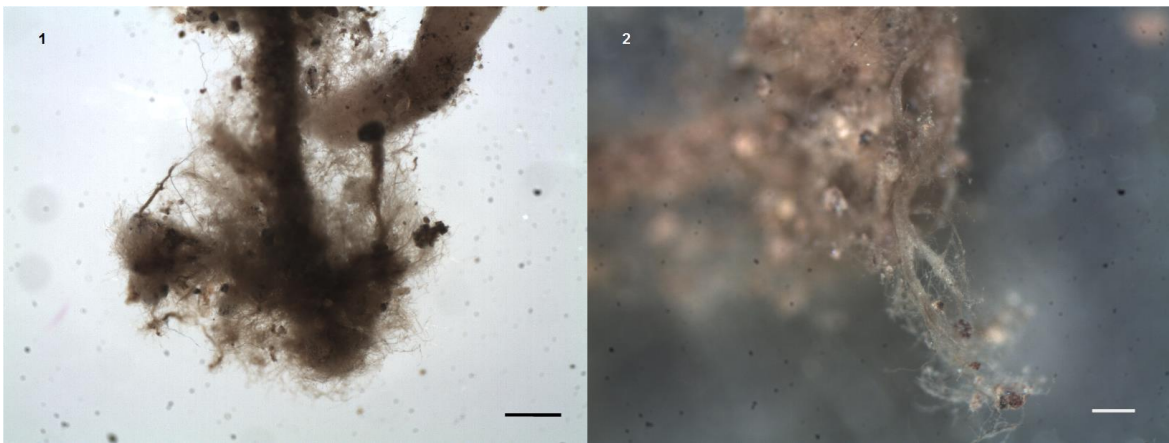
**Ectomicorriza** poco abundante de color anaranjado a café grisáceo cuando madura, con manto densamente algodonoso, ramificación ausente. Las puntas distales son cilíndricas no infladas. Presenta frecuentes rizomorfos cilíndricos agrupados por zonas, con diferente grosor, envueltos densamente en hifas con las puntas roma. La conexión de los rizomorfos con el manto es clara y emergen de la parte media del manto, se encuentran ocasionalmente creciendo a lo largo de las raíces.



**Figura 45. 1-4) Ectomicorriza de *Thelephora versatilis* se asociada a una planta desconocida. Barras: 1) 1 mm, 2) 0.25 mm, 3-4) 0.5 mm.**

7.5.28 *Thelephora versatilis* + ¿? (Morfortipo 11H3-6).....Fig. 46

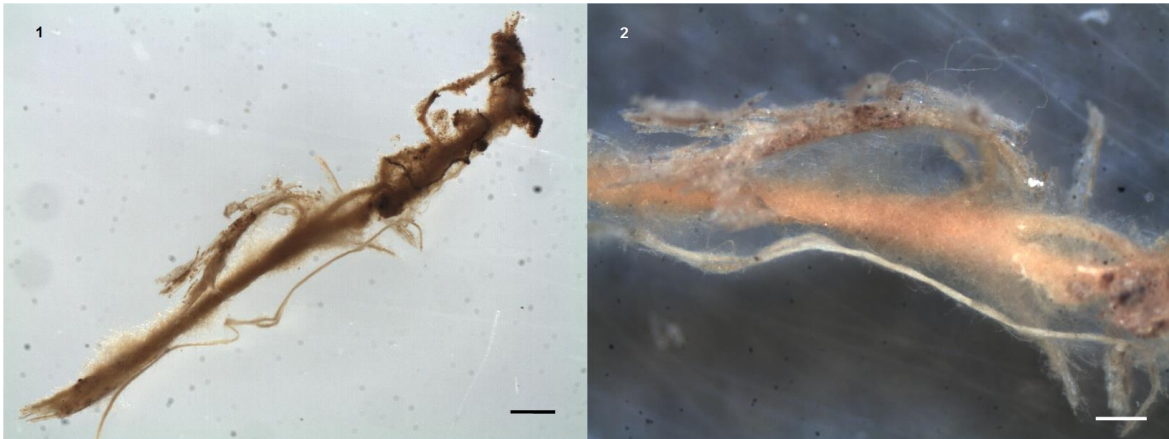
**Ectomicorriza** poco abundante de color café ligeramente amarillento, de manto densamente algodonosa lo que impide ver ramificación pero la forma parece ser coraloide. No se logran ver las puntas debido a lo denso del manto. Presenta numerosos rizomorfos del mismo color que el manto, que van desde aplanados a cilíndricos, ramificados dicotómicamente; los rizomorfos aplanados tienen apariencia lisa con algunas hifas emergentes, mientras que los cilíndricos están envueltos densamente en hifas. Estos rizomorfos se conectan de manera oblicua con el manto y no específico, ocasionalmente se encuentran sobre la raíz.



**Figura 46.** 1) Ectomicorriza de *Thelephora versatilis* asociada a una planta no reconocida. 2) Aumento en rizomorfo. Barras: 1) 1 mm, 2) 0.25 mm.

7.5.29 *Thelephora pseudoversatilis* + ¿? (Morfotipo 11H2-2).....Fig. 47

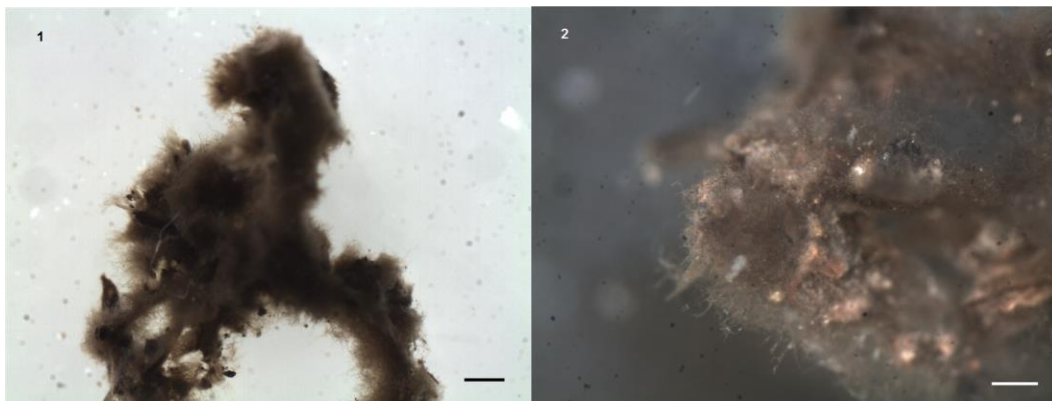
**Ectomicorriza** de color amarillo-anaranjado manto densamente algodonoso, sin ramificación. Es visible la raíz a pesar del manto denso. Presenta rizomorfos cilíndricos de colores claros, vilosos a ligeramente lanudos por zonas, son poco frecuentes, algunos saliendo de la parte media del manto de manera oblicua. Hay presencia de esporas de hongos micorrízico arbusculares color café.



**Figura 47. 1-2) Ectomicorriza de *Thelephora pseudoversatilis* asociado a una planta desconocida. Barras: 1) 1mm, 2) 0.25 mm.**

7.5.30 ¿? + Sapotaceae (Morfotipo 02H1-4).....Fig. 48

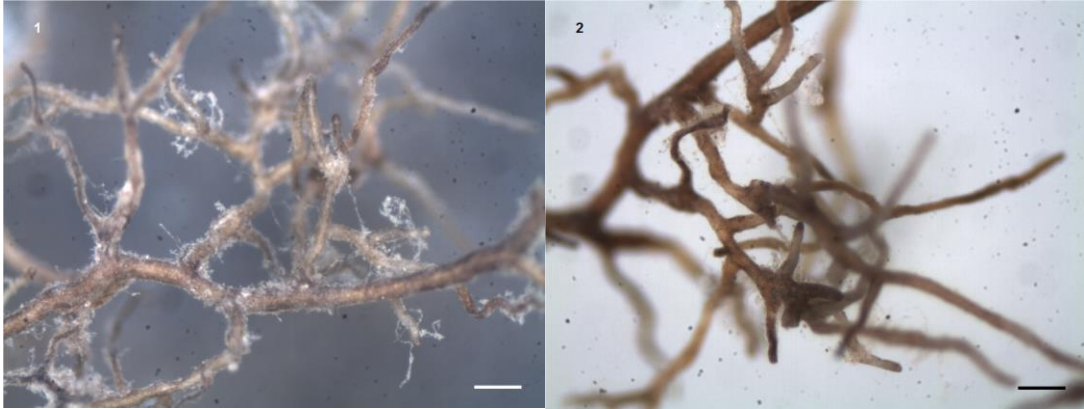
**Ectomicorriza** color café verdosa irregularmente pinnada de apariencia dicotómica con abundante micelio externo de tal manera que se ve lanosa la superficie. No presenta rizomorfos.



**Figura 48. 1) Ectomicorriza de hongo desconocido asociado a una planta de la familia Sapotaceae. Barras: 1) 1 mm, 2) 0.25 mm.**

7.5.31 ¿? + Polygonaceae 2 (Morfotipo 02H1-11).....Fig. 49

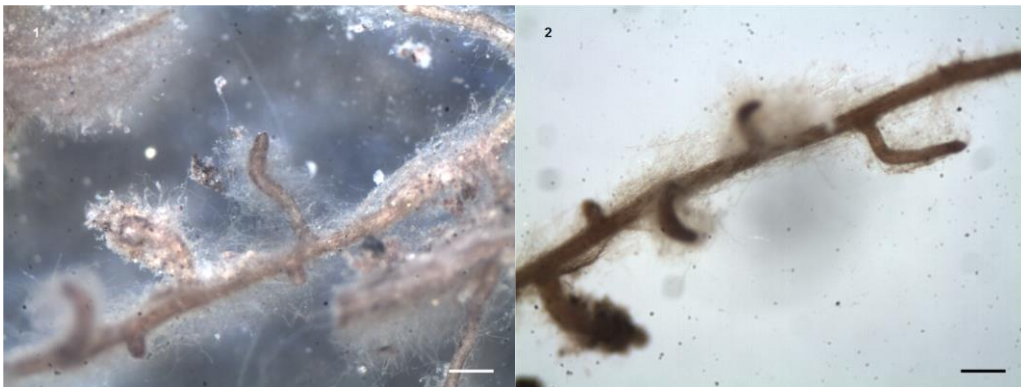
**Ectomicorriza** muy fina de diversos colores: blanquecino que va de café a grisáceo. Con ramificaciones irregularmente pinnadas con apariencia dicotómica, ligeramente sinuosa. Las puntas distales se adelgazan desde la base de la ramificación. Superficie lisa aunque hay algunas hifas emergentes hialinas.



**Figura 49.** 1-2) Ectomicorriza de hongo desconocido asociado a Polygonaceae 2. Barras: 1-2) 0.25 mm.

7.5.32 ¿? + Polygonaceae 6 (Morfotipo 02H1-12).....Fig. 50

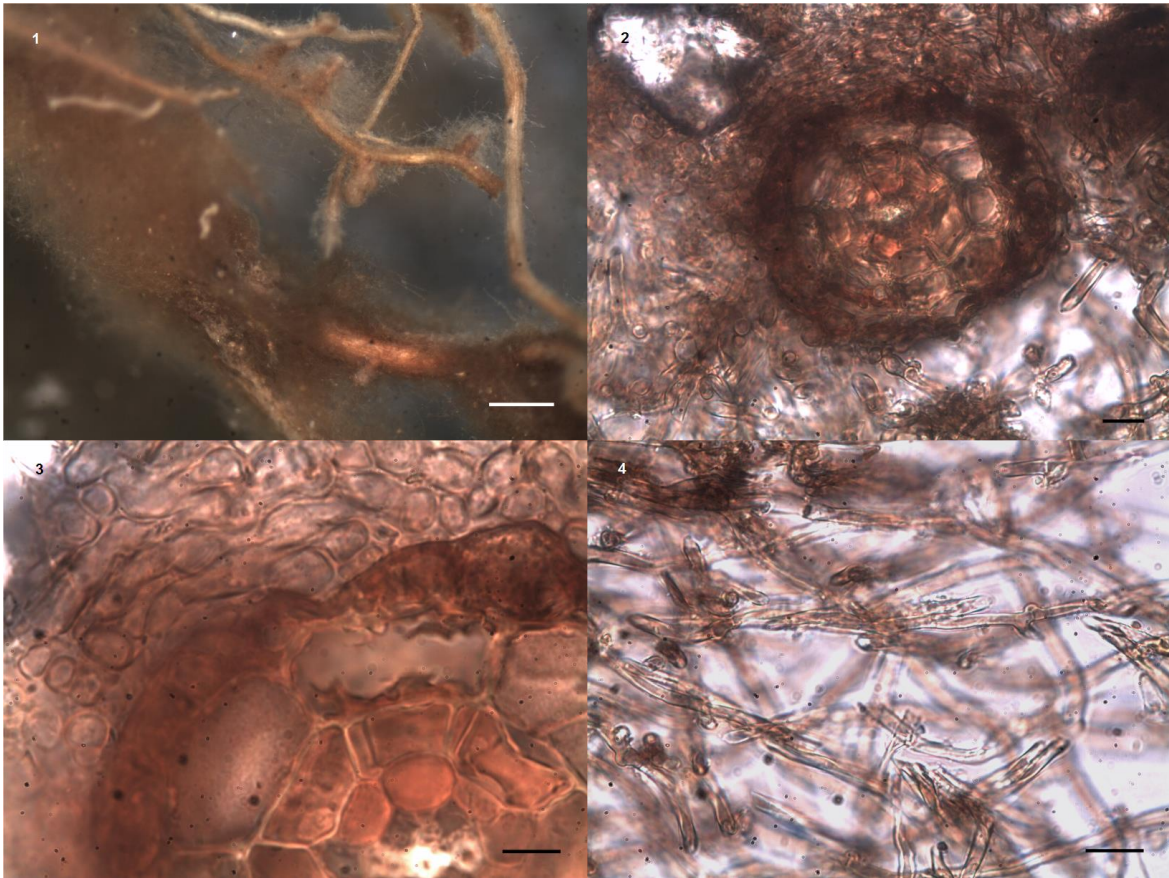
**Ectomicorriza** de color café claro con tonalidades amarillentas, de ramificación monopodial pinnada, con las puntas distales curvadas y agudas de color café más oscuro que el resto. Presenta abundante micelio externo abundante de color blanquecino de hifas largas.



**Figura 50.** 1-2) Ectomicorriza de hongo desconocido asociado a una planta de la familia Polygonaceae 6. Barras: 1-2) 0.25 mm

7.5.33 ¿? + Polygonaceae 3 (Morfotipo 02H1-5).....Fig. 51

**Ectomicorriza** color café verdoso, de manto lanoso con varios rizomorfos que son igualmente lanosos de colores más claros o del mismo tono, no ramificada. Presenta un **manto** sumamente grueso de incontables capas de hifas, sin embargo hay una parte del manto que se encuentra más compacta conforme envuelve a la raíz, y el resto se trata de hifas emergentes muy largas. **manto interno** compacto de color café oscuro plectenquimatoso conformado por 2 a 3 capas de hifas mientras que el **manto externo** es un plecténquima de color más claro, conformado por 6 capas de hifas cilíndricas de pared gruesa, septadas y con fibulas muy evidentes. La **red de Hartig** es epidermal, no se aprecia la forma (palmeada o lobulada).



**Figura 51.** 1) Morfotipo de hongo desconocido asociado a Polygonaceae 3. 2) Corte transversal a 40x de la ectomicorriza, se aprecia manto abundante. 3) Corte transversal acercamiento, se aprecia la red de Hartig entre los espacios intersticiales. 4) Vista de las numerosas hifas del manto externo. Barras: 1) 1 mm, 2) 75  $\mu\text{m}$ , 3-4) 6.8  $\mu\text{m}$ .

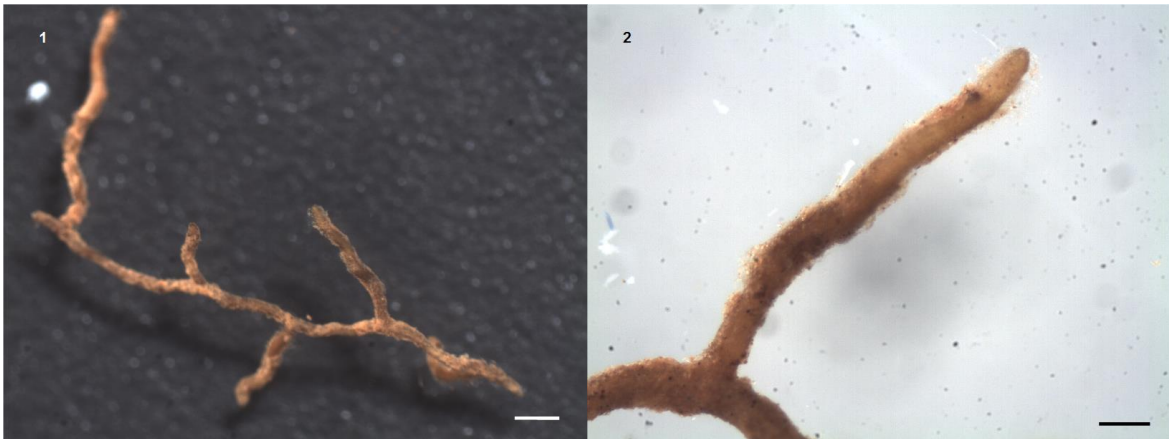


7.5.34 ¿? + Nyctaginaceae 3 (Morfotipo 5bA2-8)

**Ectomicorriza** abundante de color blanquecino cuando joven, más café cuando madura, no presenta ramificación pero tiene puntas ligeramente sinuosas, con una superficie vilosa con hifas emergentes cortas e hialinas. El manto llega a ser un poco translúcido a todo lo largo y abarca toda la punta de la raíz. No presenta rizomorfos.

7.5.35 ¿? (Morfotipo 09A1-4).....Fig. 52

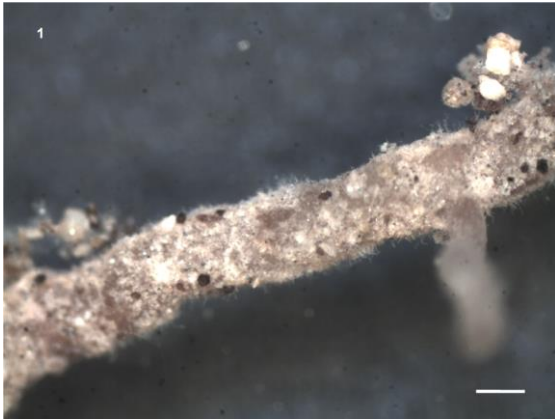
**Ectomicorriza** poco abundante de color amarillo ocre a café amarillento, sin ramificación. El manto es brillante lo que hace que su color sea dorado, encima de la superficie se divide un micelio hialino fino y en algunas puntas se encuentran hifas emergentes en la parte distal, de forma cilíndrica no inflada.



**Figura 52. 1-2) Morfotipo no identificado.** Barras: 1) 1 mm, 2) 0.25 mm.

7.5.36 ¿? (Morfotipo 11H3-7).....Fig. 53

**Ectomicorriza** poco abundante de color blanquecino a beige muy claro de superficie granulosa con algunas hifas emergentes cortas y erectas, manto muy delgado, con ramificación ausente.



**Figura 53. 1) Morfotipo no identificado.** Barra: 1) 0.25 mm

7.5.37 Secuencia amplificada débilmente (Morfotipo 15H6-8).....Fig. 54

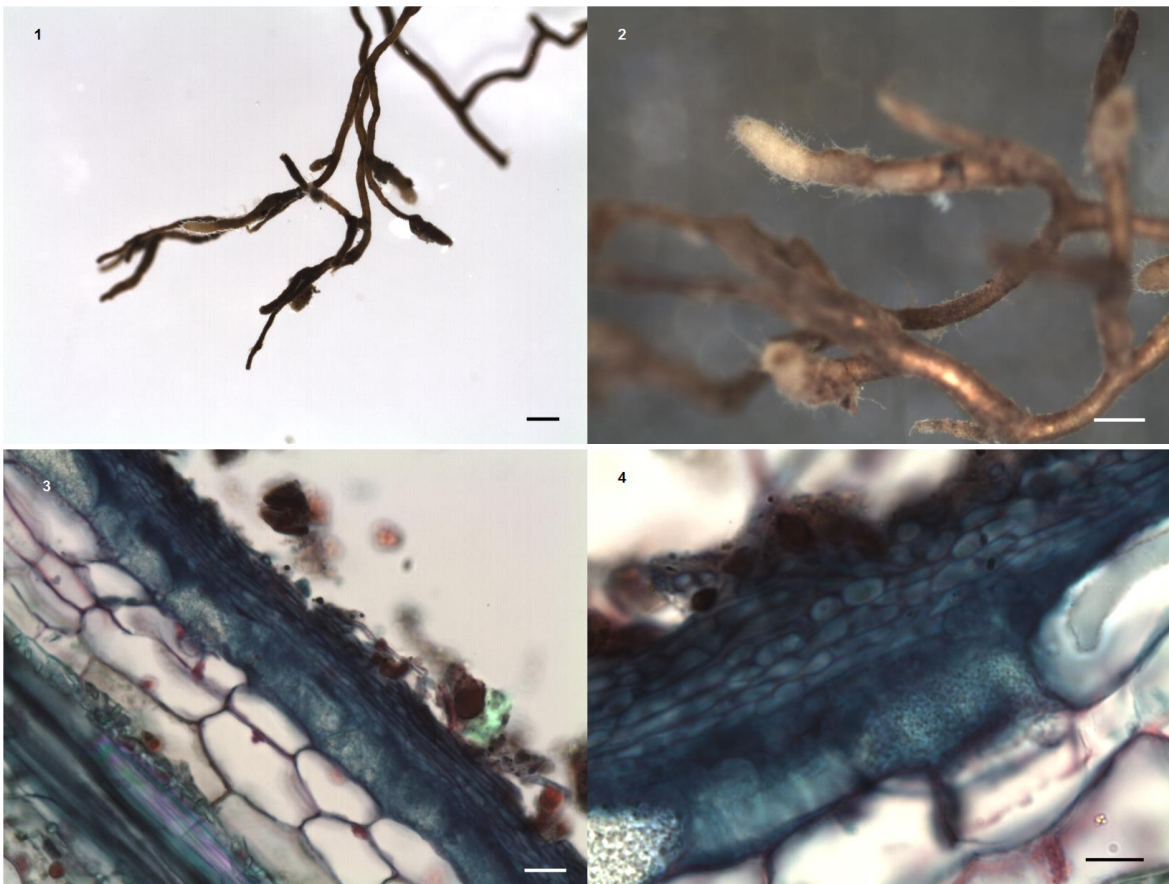
**Ectomicorriza** color amarillo-anaranjado, presenta brillo y transparencia en las puntas, de forma recta a ligeramente sinuosas, no infladas a ligeramente clavadas. Ramificación irregular pinnada, con apariencia dicotómica. Superficie levemente tomentosa.



**Figura 54. 1) Morfotipo no identificado.** Barra: 1) 0.5 mm

7.5.38 Secuencia con doble banda + *Guapira macrocarpa* (Morfotipo 5bA2-3).....Fig. 55

**Ectomicorriza** abundante de manto blanquecino a café chocolate. En la parte más apical se encuentra el color blanquecino, mientras que el resto es de color café. No se encuentran ramificadas pero su formación es ligeramente sinuosa. Se encuentran en estado relativamente abundante. El manto presenta algunas hifas emergentes erectas y hialinas a todo lo largo de la ectomicorriza. El manto está conformado por 9 capas de hifas. El **manto externo** es una transición entre pseudoparénquima y plecténquima, con hifas cilíndricas de pared gruesa ( $<1 \mu\text{m}$ ) de medidas  $129.61\text{-}158.76 \times 194.15\text{-}1176.94 \mu\text{m}$ , y células globosas a irregulares ( $139.44\text{-}186.82 \times 138.15\text{-}188.48 \mu\text{m}$ ). El **manto interno** es pseudoparenquimatoso con células globosas de diámetros menores a las del manto externo ( $118.63\text{-}140.16 \times 138.82\text{-}156.1 \mu\text{m}$ ). La **red de Hartig** es apenas apreciable, de tipo paraepidermal con hifas muy delgadas, en algunos sitios no se logra apreciar las hifas en los espacios intersticiales. Su forma es palmeada con hifas cortas y anchas.



**Figura 55.** 1-2) Hongo desconocido asociado a *Guapira macrocarpa*. 3) Corte longitudinal de la punta ectomicorrizada. 4) Acercamiento al manto, donde también se aprecia una célula con contenido. Barras: 1) 0.5 mm, 2) 0.25 mm, 3)  $75 \mu\text{m}$ , 4)  $6.8 \mu\text{m}$ .

7.5.39 Secuencia con doble banda + ¿? (Morfotipo 09A1-9).....Fig. 56

**Ectomicorriza** poco abundante de color café claro a anaranjado, sin ramificación con puntas distales cilíndricas no infladas. El manto deja visible la punta de la raíz y presenta algunas emergentes.



**Figura 56. 1-2) Morfotipo no identificado.** Barra: 1) 0.5 mm

7.5.40 Secuencia con doble banda+ ¿? (Morfotipo 6bH1-1).....Fig. 57

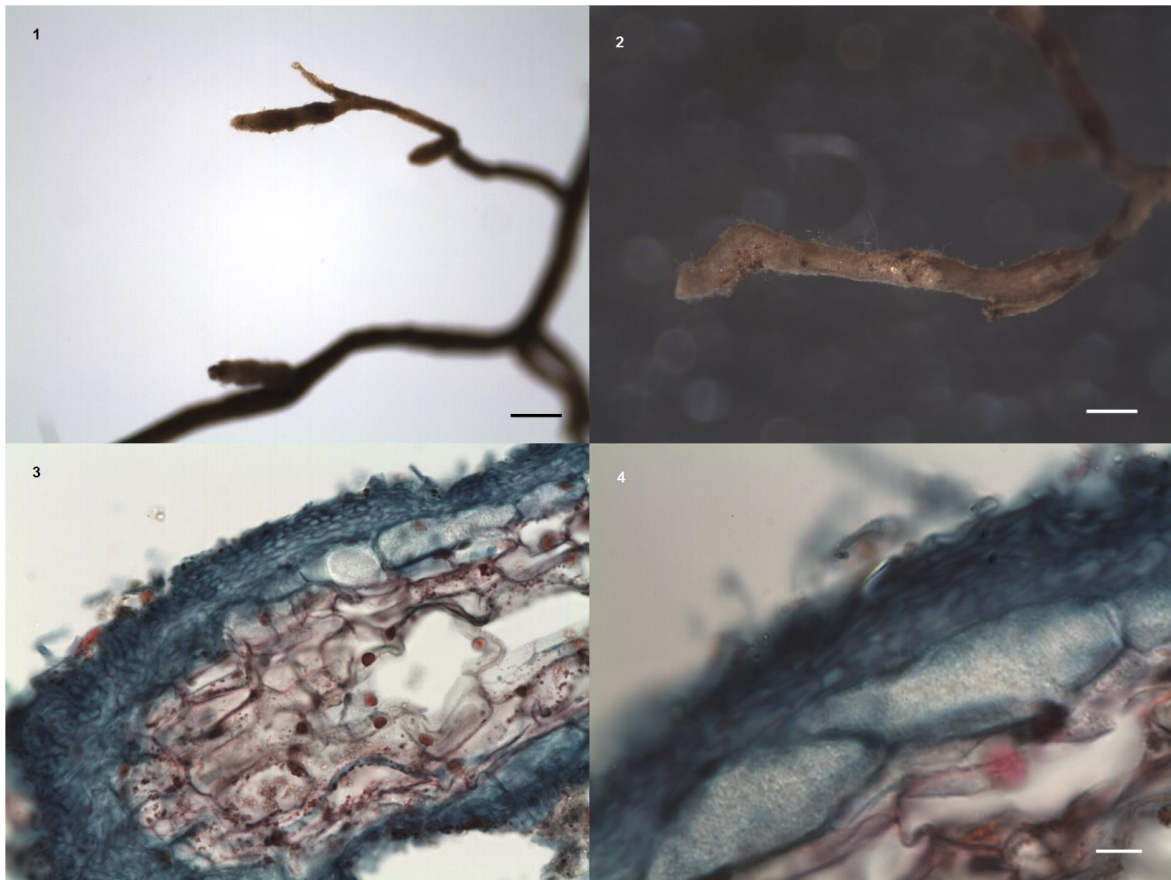
**Ectomicorriza** de color café chocolate, ligeramente brillante, con la superficie tomentosa, el manto parece ser grueso y tiene bastantes hifas emergentes blanquecinas que hacen que tenga suelo adherido. Se ramifica dicotómicamente, las puntas se encuentran de manera sinuosa. No presenta rizomorfos.



**Figura 57. 1) Ectomicorriza no identificada.** Barra: 1) 0.5 mm.

7.5.41 Secuencia con doble banda (Morfotipo 5bA2-7).....Fig. 58

**Ectomicorriza** poco abundante sin ramificación con un manto de tonalidades café y otras más claras como beige, ligeramente translúcido, con poco micelio externo vegetativo (unas cuantas hifas cortas), el manto cubre completamente la punta y su superficie es tomentosa. No presenta rizomorfos. **Manto** conformado por 7 a 9 capas de hifas. El **manto externo** es una transición entre pseudoparénquima y plecténquima con formas irregulares de las hifas formando una red guesa. En algunas zonas presenta hifas emergentes, septadas sin fíbulas, de pared delgada. El **manto interno** es de igual forma una transición. La **red de Hartig** perentra paraepidermalmente, pero no es muy apreciable. Hay otras hifas que se encuentran penetrando las células corticales pero no se observa que estas hifas provengan del manto.



**Figura 58. 1-2) Ectomicorriza no identificada. 3) Corte transversal de la punta. 4) Acercamiento al manto y las células corticales con contenido lipídico. Barras: 1) 0.33 mm, 2) 0.25 mm, 4) 4.5  $\mu$ m**

## 8. Discusión

### 8.1 Identificación molecular de especies

#### 8.1.1 Identificación molecular de especies fúngicas

Gracias a los muestreos por esporomas, se sabía que algunos grupos de ectomicorrizógenos presentes en los bosques templados también se encuentran en bosques tropicales. Tal sería el caso de *Amanita*, Boletaceae, *Cantharellus*, *Clavulina*, Inocybaceae, Russulaceae y *Scleroderma* (Buyck *et al.*, 1996; Henkel *et al.*, 2002; Kennedy *et al.*, 2012; Moyersoen, 2012).

De igual forma, se han llevado a cabo muestreos de esporomas en la Estación Biológica de Chamela, donde se encontraron esporomas de *Clavulina*, *Thelephora* (Ramírez-López *et al.*, 2012), *Tremelloscypha* y *Phaeoclavulina* (en este estudio), todos ellos pertenecientes a géneros ectomicorrizógenos. En los muestreos que llevamos a cabo no se encontró ningún esporoma de *Clavulina*, pero sí de *Thelephora*. En este trabajo fue evidente que la diversidad que nos arrojan los muestreos de cuerpos fructíferos, no revela la diversidad de hongos asociados en las raíces, con lo cual se corrobora que la diversidad encontrada por esporocarpos, es menor comparada contra la diversidad de las ectomicorrizas. Este mismo resultado es de lo más esperado, pues prácticamente todos los trabajos de ecología de comunidades de HECM demuestran este mismo patrón (Tedersoo *et al.*, 2010b). Las razones son diversas, van desde la falta de muestreo de esporomas, la fenología de aparición de estas estructuras, la naturaleza efímera de los esporocarpos, hasta ausencia de reproducción sexual de muchas especies.

Dos de las especies de las cuales se recolectaron esporomas pertenecen al género *Thelephora*. En un principio se consideró que se trataba de una sola especie, pero ahora se sabe que *T. versatilis* (*sensu* Ramírez-López *et al.*, 2013), son dos especies crípticas con una morfología similar. Con la colaboración de la Dra. Villegas Ríos y su grupo de trabajo, se definió que se trata de dos especies: *T. versatilis* y *T. pseudoversatilis* (Ramírez-López *et al.*, en proceso). La separación de estas especies se definió con base en análisis filogenéticos, caracteres micromorfológicos y ultraestructurales. Sin embargo, de no haber realizado la secuenciación del material recolectado, no se hubiera puesto atención que se trataba de especies crípticas.

El consenso universal para la separación de especies con criterios moleculares ha sido una discusión permanente. En hongos, el marcador empleado es la región ITS del rDNA, la cual está conformada por dos regiones no codificantes (ITS1, ITS2) y una región conservada codificante (5.8s). Con la intención de identificar hongos rápidamente con marcadores moleculares, se propuso la región ITS (White *et al.*, 1990; Bruns *et al.*, 1991). Uno de los objetivos de tener marcadores moleculares para el reconocimiento de especies,

es principalmente para estudios ecológicos. En este tipo de estudios se obtienen diversas muestras ambientales, las cuales pueden ser identificadas molecularmente. Es por ello que es de amplio interés la discusión del porcentaje de similitud con el que se delimitan las especies.

El porcentaje de similitud ha sido tema de diversos trabajos, donde han usado diferentes porcentajes de similitud (Weiß *et al.*, 2004; El Karkouri *et al.*, 2007; Ryberg *et al.*, 2008; Bonito *et al.*, 2010, y otros) y las implicaciones que tiene el variar este porcentaje se ve reflejado en la sub- o sobrestimación de la diversidad fúngica (Kjõljalg *et al.*, 2013). No obstante, en la mayoría de los trabajos se ha usado el 97% de similitud como criterio para identificar especies. Por ejemplo en la familia Sebacinaceae se ha determinado que es el mejor porcentaje para ello (Weiß *et al.*, 2004). Una sugerencia emanada de estos trabajos es que el porcentaje de similitud para definir especies, tendría que ser revisado por cada uno de los especialistas en los diferentes grupos de hongos.

En este trabajo se decidió tomar el 97% de similitud como criterio para identificar especies debido a los criterios reportados por trabajos previos (Smith *et al.*, 2007b). El análisis donde se formaron agrupaciones del 100 al 95% de similitud, mostró que el grupo *Tomentella-Thelephora*, se crearon diferentes MOTUs. Conforme el porcentaje de similitud era menor, el número de grupos iba disminuyendo. El resto de los géneros se logró separar adecuadamente desde el 98%, sin embargo algunas secuencias de *tomentella-thelephora* se reagrupan en MOTUs conforme es menor el porcentaje de similitud. El NJ de la familia Thelephoraceae (Figura 8) apoya la separación en especies, como lo había definido el 97% de similitud. Hasta el momento no existe un criterio experto en cuanto a porcentaje de similitud, en la familia Thelephoraceae para separar especies, pero el 97% funcionó adecuadamente en este caso.

El criterio del 97% también ayudó a definir que los esporomas de *Thelephora*, se trataban de dos especies con morfología similar (*T. versatilis* y *T. pseudoversatilis*), aspecto corroborado con la revisión exhaustiva de la morfología de los esporomas. Las especies *Thelephora* y en general la familia Thelephoraceae, presentan una alta riqueza de especies en el área de estudio. Algunas especies resultaron ser muy abundantes además de tener un amplio rango de distribución en la zona. La variación genética puede ser explicada por sus preferencias ecológicas o rango de tolerancia ecológica (Stebbins, 2013), en este caso podría deberse a especificidad con sus hospederos.

Los estudios a nivel global demuestran que el grupo *tomentella-thelephora* se encuentra ampliamente distribuido, tanto en bosques templados como en los tropicales (Horton & Bruns, 2001; Tedersoo *et al.*, 2010a, b, 2012b). En Ecuador se han llevado a cabo dos estudios de comunidades de HECM, uno de esos trabajos reporta la especificidad de la familia Thelephoraceae con Nyctaginaceae (Haug *et al.*, 2005), sin embargo el otro trabajo no encuentra esta misma especificidad entre ambas familias (Tedersoo *et al.*, 2010b).

Ahora bien, la especificidad de las especies fúngicas se ha visto en diversos trabajos de bosques templados (Richard *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2009; Tedersoo *et al.*, 2009; Pöhlme *et al.*, 2013). Por lo que se propone la hipótesis de que la familia Thelephoraceae en la zona de estudio, tenga algunas especies generalistas como *Tomentella* sp. 1 la cual se encontró asociada a siete plantas diferentes, pero que la mayoría sean especialistas como *Tomentella* sp. 3, 4, 5 y 6. Al respecto, podría resultar interesante hacer en el futuro un análisis de tasa de diversificación, tomando a todos los representantes que se tienen en la EBCh para esta familia, lo cual nos podría dar un panorama de por qué existe esta riqueza.

Otro de los hongos que encontramos formando ECM y esporomas, fue *Tremelloscypha*. De este género sólo se han descrito dos especies: *T. australiensis* y *T. gelatinosa*. *T. gelatinosa* fue sinonimizada con *Tremellostereum* y *Sebacina amesii*, cambiando su nombre a *Tremelloscypha dichroa* (Oberwinkler *et al.*, 2014). Lo que se conocía como *T. gelatinosa* había sido reportada en Jamaica y Florida, EU (Wells & Oberwinkler, 1982), donde se le encontró creciendo en madera putrefacta. En México, *T. gelatinosa* ha sido reportada en Campeche (Sierra *et al.*, 2012), Chiapas (Bandala *et al.*, 2012, 2014) y la Península de Yucatán (Guzmán, 2004). En Chiapas se reportó que forma ectomicorrizas con *Gymnopodium floribundum* (Polygonaceae), sin embargo este dato no ha sido corroborado con secuencias de la raíz (Bandala *et al.*, 2012).

Las características macroscópicas de los esporomas de *Tremelloscypha* recolectados en este trabajo, coinciden con la descripción de *T. dichroa* y las secuencias se comparan en >97% de similitud. Las secuencias de *Tremellosycpha* también tuvieron un 98% de similitud con *Sebacina pileata* Roberts (2008) pero 82.5% de cobertura. Esta especie fue descrita para Belice. La caracterización de esta especie concuerda con la descripción de *Tremelloscypha*, sin embargo sería necesaria la revisión del tipo de *S. pileata*, y sería de utilidad conocer el tipo de vegetación donde se recolectó. Es por ello que las secuencias identificadas como *Tremelloscypha* sólo se dejaron como pertenecientes al género.

Del total de las secuencias que fueron comparadas con las bases de datos moleculares, se obtuvo que sólo tres de las muestras secuenciadas, tenían un porcentaje de similitud mayor o igual al 97%. Esto no quiere decir que se traten forzosamente de especies nuevas, pero pone al descubierto la carencia de ciertos grupos de hongos en las bases de datos moleculares. La secuenciación de los especímenes de herbario, sería un progreso importante para ayudar a la identificación con muestras ambientales.

### 8.1.2 Determinación de especies vegetales

El proyecto de código de barras ha sido adoptado para varios grupos de organismos, entre ellos las plantas (CBOL Plant Working Group, 2009). El principal objetivo de esta iniciativa es la identificación de plantas a través de marcadores moleculares “universales”



(Tarbelet *et al.*, 1991), es decir que los mismos marcadores puedan usarse en todos los grupos taxonómicos. Las regiones para el código de barras de plantas han sido principalmente regiones del plástido (Haider, 2011).

Esto se debe a la herencia clonal de los plástidos, a la nula heterocigocidad (Maruyama & Birky Jr., 1991) y que el genoma del plástido tiene menor tasa de mutación que el genoma nuclear (Wolfe *et al.*, 1987). Aunque no es una regla, puesto que hay ejemplos como *Olea europaea*, donde se encontrado altas tasas de varación en regiones no codificantes del DNA de cloroplasto (Besnard *et al.*, 2007).

Las dos regiones que el *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) ha propuesto son la ribulosa-1,5-bifosfato (*rbcL*) y maturasa K (*matK*) (CBOL Plant Working Group, 2009). Estas dos regiones fueron elegidas por su eficiencia para obtener secuencias de calidad y tener un alto poder de discriminación entre especies (Burgess *et al.*, 2011). Estas fueron las razones por las que se eligió amplificar el marcador *rbcL* para identificar las raíces micorrizadas de este trabajo. No obstante, la ribulosa-1,5-bifosfato es una región altamente conservada, que ayudó a aproximarse a nivel de familia, a todas las raíces amplificadas, pero debido a que es una región codificante conservada, no dio poder resolutivo para la identificación de especies.

La región *matK* muestra altos niveles de variación y ayuda a la mejor discriminación de especies (Chase *et al.*, 2007). Además de asegurar la amplificación exitosa en un 70% en angiospermas (Hollingsworth *et al.*, 2011). Existen múltiples estudios donde ponen a prueba los marcadores moleculares que se deberían usar por grupos de plantas. Burgess *et al.* (2011) mencionan que *rbcL + matK* fueron suficientes para delimitar a nivel específico, en gimnospermas pero no para angiospermas. Las raíces recolectadas en la EBCh, todas corresponden a angiospermas.

Ante la situación de la no “universalidad” de las regiones que propone el CBOL (Hollingsworth *et al.*, 2009), se ha hecho uso de otros marcadores moleculares que pueden ser empleados para diferentes familias de plantas. Todas ellas son regiones del plástido *i.e.* *rpoCl*, *rpoB*, *trnL*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI* (Chase *et al.*, 2007; Kress & Erickson, 2007).

La región espaciadora *psbA-trnH*, es una de las regiones no codificantes más variables en el plastoma de angiospermas (Shaw *et al.*, 2007). Al haber esta variación, ofrece gran poder resolutivo para la discriminación entre especies (Kress *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2007). Sin embargo, presenta problemas para alinearse por su alta tasa de inserciones y deleciones; incluso entre taxa relacionados existen grandes diferencias (Chase *et al.*, 2007).

Para el caso de la región *trnL* (RNA de transferencia de Leucina), que también ha sido sugerida para el código de barras, presenta muy poca resolución. Esta región se trata de una región no codificante que es altamente conservada (Shaw *et al.*, 2005), que además presenta estructura secundaria conservada (Chase *et al.*, 2007). En otros trabajos se

menciona que la estructura *stem-loop* (*loop* P6, área conservada de 10-143 pb) dentro del intrón le da poder resolutivo (Tarbelet *et al.*, 2007). Esta región ha sido ampliamente usada para estudios ecológicos, ya que funciona bien incluso con DNA degradado y usado con secuenciación de nueva generación para evaluar diversidad (Valentini *et al.*, 2009).

Los espaciadores intergénicos *atpF-atpH* y *psbK-psbI* no han sido ampliamente usados en la sistemática ni filogenia de plantas. El CBOL (2009) obtuvo que *psbK-psbI* tiene un gran poder de discriminación entre especies pero baja calidad de secuenciación y universalidad; así mismo *atpF-atpH* es moderadamente bueno para separar entre especies, tiene calidad regular de secuenciación y universalidad.

Las regiones *rpoCl* y *rpoB* son también parte de los marcadores que tienen poca variación, aunque también se han propuesto para el código de barras. Chase *et al.* (2007) han reconocido que presenta limitaciones para la amplificación de la PCR, pero afirman que funciona bien para discriminar entre especies.

La región espaciadora interna transcrita (ITS) del DNA nuclear, ha sido empleada como marcador filogenético en grupos de plantas con flor (Baldwin, 1992). Esta región, en comparación con el resto, presenta 2-4 veces más sitios variables que han evolucionado más rápidamente (van den Berg *et al.*, 2000). No obstante, la región ITS en algunos grupos de plantas terrestres, presenta múltiples copias divergentes (Chase *et al.*, 2007).

Pero a pesar de los esfuerzos por encontrar la combinación ideal de marcadores, se reconoce que para el código de barras presentan limitaciones las diferentes propuestas (Hollingsworth *et al.*, 2011). Hollingsworth *et al.* (2011) mencionaron que el aumento en el número de marcadores moleculares para la delimitación de especies es ilusorio. Siempre habrá especies que se puedan delimitar mejor con diferentes combinaciones de marcadores moleculares (Fazekas *et al.*, 2008), y se ha propuesto el uso de la secuenciación de nueva generación para el genoma del plástido (Hollingsworth *et al.*, 2011).

Por lo que se comentó anteriormente, es evidente que se tendrá que usar diferentes marcadores moleculares por cada una de las familias que se encontró amplificada. Las raíces secuenciadas fueron solo delimitadas como: Achatocarpaceae, Araliaceae, Bignoniaceae, Fabaceae con las subfamilias Caesalpinioideae y Papilionoideae, Lauraceae, Malvaceae, Moraceae, Nyctaginaceae, Polygonaceae, Tiliaceae, Salicaceae, Sapindaceae y Sapotaceae.

En el caso de la familia Achatocarpaceae, se recolectaron exitosamente varias muestras vegetales con frutos, por lo que se identificó como *Achatocarpus gracilis*. Sus secuencias fueron buenas y al ser comparadas con las secuencias de las raíces, tuvimos una similitud del 100% con las raíces. Este también fue el caso de *Guapira macrocarpa*, (Nyctaginaceae) y de *Coccoloba liebmanii* (Polygonaceae). Para el resto de las plantas, aunque se trató de tener el voucher del material vegetal (es decir, hojas con flor y/o fruto) no se consiguió muestrear en campo. La identificación de las raíces se basó únicamente en la secuencia de *rbcL*.

A pesar de que reconocemos que cada familia representa un reto distinto para su identificación, se decidió acotar el trabajo sólo a la región *rbcL*. Posteriormente se hará la amplificación de diferentes regiones para poder llegar a determinar a los hospederos por lo menos a nivel genérico.

Para el caso de la familia Fabaceae, que es de gran interés para esta tesis, se han empleado diferentes combinaciones de *primers* que ayudan a delimitar especies (Aïnouche & Bayer, 1999; Hu *et al.*, 2000; Bruneau *et al.*, 2001; Sotuyo *et al.*, 2007). La Dra. Solange Sotuyo, especialista en el grupo, ha recomendado amplificar la región ITS con *primers* específicos para leguminosas (ITS-Leu (5'-GTCCACGAACCTTATCATTAGA-3') e ITS-Phas (5'-GCCGTTACTAAGGGAAT-CCTTGTTAG-3') (Delgado-Salinas *et al.*, 2006)) papilionadas, puesto que para Caesalpinioideae muchos taxa presentan múltiples copias de esta región. En el resto de las familias se amplificará más adelante la región *matK* junto con algún otro marcador como *trnL*.

### 8.1.3 Relación hongo-planta

La densidad de hospederos es uno de los factores más importantes que dan lugar a la diversidad de ECM. En la Estación de Biología de Chamela, se desconoce si existen hospederos que se encuentren formando grandes parches dominantes, por ello y de manera general puede ser comparado con un estudio realizado en Ecuador (Tedersoo *et al.*, 2010b). Aunque no se trata del mismo ecosistema tropical, este último también es un sitio donde los hospederos no se encuentran formando bosques monodominantes. No obstante, únicamente reportan dos familias de hospederos ectomicorrízicos, mientras que la presente tesis reporta 14 familias diferentes, donde nueve efectivamente forman ectomicorrizas. Dícese “efectivamente” ya que además de haber amplificado un hongo del cual se conoce su identidad ectomicorrizógena, esas familias habían sido reportadas previamente como ectomicorrízicas.

En los antecedentes se enlistaron todas las familias de angiospermas tropicales de las cuales se ha reportado alguna vez su estatus ectomicorrízico (Cuadro. 1). Esta asociación ectomicorrízica se presenta en diferentes angiospermas, donde no todas las especies o géneros de una misma familia presenta esta interacción (Wang & Qiu, 2006; Smith *et al.*, 2011). Aunque se ha dicho que dentro de algunas tribus de plantas como la tribu Pisoniae de la familia Nyctaginaceae, Coccolobaeae de Polygonaceae (Tedersoo *et al.*, 2010b; Moyersoen 2012), y la tribu Amherstaeae de Fabaceae, existe esta asociación (Tedersoo *et al.*, 2010b; Tedersoo & Nara, 2010).

Un ejemplo claro de lo anterior, es la familia Fabaceae, que se encuentra dividida en tres subfamilias: Mimosoideae, Papilionoideae y Caesalpinioideae. Para la subfamilia Mimosoidea se conoce que *Acacia* es ectomicorrízico, de Papilionoideae se sabe del género

*Aldina*, y de Caesalpinioideae 19 géneros dentro de los que destaca *Dicymbe*. Estas especies no se encuentran en un mismo grupo de las leguminosas, lo que habla de la aparición de esta simbiosis, en varios eventos evolutivos diferentes (Wang & Qiu, 2006; Smith *et al.*, 2011).

Con este conocimiento sobre las leguminosas, aunado a la abundancia y riqueza de esta familia en la EBCh, se consideró que la mayoría de los hospederos pertenecerían a esta familia. El muestreo se vio inclinado hacia el grupo Caesalpinioideae, habiendo muestreado a *Caesalpinia* spp., *Cynomentra oaxacana*, *Haematoxylum brasiletto* (Caesalpinioideae) y en menor grado a Papilionoideae *Gliricidia sepium* e *Inga eriocarpa*; sin embargo, sólo se encontraron dos ECM pertenecientes a este grupo. También se obtuvo tres HECM de leguminosas papilionadas.

En el listado florístico de Lott (1993) para Chamela, todos los árboles pertenecientes a Papilionoideae pertenecen a 17 géneros distintos (Apéndice I), donde el género *Lonchocarpus* es el género que presenta mayor número de especies, por lo que hay gran probabilidad que las secuencias encontradas se traten de este género. El resto de las plantas en la EBCh que pertenecen a esta familia no pueden ser descartas como posibles hospederos ectomicorrízicos, incluyendo herbáceas de esta familia.

Frioni *et al.* (1999) describieron que en Uruguay se encontraron ECM asociadas a *Lonchocarpus*, sin embargo la evidencia es poco contundente ya que se hizo por rastreo de raíces sin comprobación molecular. Baeza *et al.* (2006) mencionaron que dentro de los principales tipos de vegetación en Uruguay se encuentran las padreras, el cual podría ser el sitio de estudio de donde se dieron a conocer las leguminosas ectomicorrízicas. Los géneros *Acacia*, *Calliandra*, *Lonchocarpus* y *Prosopis* que reportan Frioni *et al.*, son géneros que de igual forma se encuentran en el BTC que se estudió en esta tesis.

No se demeritan los estudios realizados con el rastreo de raíces, sino que por experiencia propia se sabe que obtener la raíz del individuo vegetal deseado bajo esta metodología, es un trabajo difícil y no del todo certero. Al haber secuenciado una raíz de la familia Bignoniaceae, se pretendió obtener las raíces de *Crescentia alata* con el rastreo de raíces a partir del tronco. Bajo el microscopio estereoscópico comprobamos la existencia de ECM y se secuenciaron tanto hongo como planta, para determinarlos a especie. La raíz resultó ser de *Guapira macrocarpa* con una especie de *Clavulina*, por lo que se hace constar que es difícil afirmar tener la raíz de la planta deseada.

Este trabajo tuvo la comprobación de que las raíces estudiadas se trataban de algunas de nuestras plantas de interés, gracias a herramientas moleculares. Aunque ya se comentó la limitación que se tuvo con la amplificación de la región *rbcL*, se determinaron taxonómicamente la mayoría de las plantas a nivel de familia. Las plantas que se determinaron a género o especie, fue gracias a la identificación del material herborizado de donde se extrajo la secuencia y que esta secuencia fue idéntica a la secuencia de raíz.

La hipótesis de la familia Fabaceae se rechaza al encontrar a esta familia teniendo baja frecuencia de ectomicorrizas en sus raíces, a pesar del esfuerzo de muestreo. Además de Fabaceae, se tenía el conocimiento de que algunos miembros de la familia Nyctaginaceae y Polygonaceae, era muy probable encontrarlos formando ectomicorrizas. Los resultados lo confirman: *Guapira* es un género de la familia Nyctaginaceae, del cual se tenía el reporte en algunos sitios del mundo (Moyersoen, 1993; Tedersoo *et al.*, 2010b). *Guapira macrocarpa* con nueve especies de HECM, fue la planta con mayor diversidad asociada a sus raíces. Sin embargo también se obtuvieron la secuencia de nueve plantas diferentes de la familia Nyctaginaceae, de las cuales se desconoce el género. En el listado florístico de Chamela, existen más géneros de esta familia que podrían corresponder a las otras secuencias encontradas. Los géneros son: *Abromia*, *Boerhavia*, *Commicarpus*, *Miranda*, *Mirabilis*, *Okenia*, *Pisonia* y *Salpianthus*. De ellos sólo se conoce el estatus ectomicorrízico de *Pisonia* (Ashford & Allaway, 1985; Haug *et al.*, 2005, 2014; Suvi *et al.*, 2010), del resto no existen reportes. Para poder llegar a saber el género de las plantas restantes, falta secuenciar otra región del DNA de las raíces.

En caso de la familia Polygonaceae, el género *Coccoloba* es el único género que ha sido comprobado como ectomicorrízico (Kreisel, 1971; Pegler, 1983; Moyersoen, 1993; Béreau *et al.*, 1997; Reid, 1977; Miller *et al.*, 2000; Landim de Souza, 2003; Ortiz-Santana *et al.*, 2007; Tedersoo *et al.* 2010b; Alvarez-Manjarrez, 2012) y del cual también obtuvimos ECM. Además de *Coccoloba*, se secuenciaron tres plantas de Polygonaceae que no se delimitaron hasta género. La lista de géneros de esta familia en la EBCh, además de *Coccoloba*, es: *Antigonon*, *Podopterus*, *Polygonum* y *Ruprechtia*. El único género conocido como ectomicorrízico es *Polygonum*, el cual no se incluyó en la lista de angiospermas de los antecedentes porque sólo se reporta para bosques alpinos (Taylor & Alexander, 2005).

El resto de las plantas amplificadas fueron identificadas como: *Achatocarpus gracilis* (Achatocarpaceae), Araliaceae, Bignoniaceae, Lauraceae, Malvaceae, Moraceae, Rubiaceae, Salicaceae, Sapotaceae y Tiliaceae. Es necesario reiterar que sólo se amplificaron las raíces de donde se obtuvieron amplificaciones de hongos, aunque no se lograra tener la secuencia.

Toju *et al.* (2014) muestrearon rizosferas al azar en un bosque secundario subtropical, amplificando tanto hongos como plantas, encontrando plantas de las que no hay reporte previo de su estatus ectomicorrízico. Para ese trabajo emplearon secuenciación de nueva generación con los mismos marcadores moleculares que se usaron en esta tesis. Obtuvieron alta abundancia de HECM en plantas no reportadas previamente como hospederos ectomicorrízicos. Por ejemplo la familia Moraceae, Styracaceae y Vitaceae presentaron abundantes HECM en sus rizosferas. Pero al no secuenciar hongos directamente de las raíces, no se corrobora que estas plantas tengan asociación con los ectomicorrizógenos. En cambio en la presente tesis, se hizo la disección de las raíces, sólo tomando las estructuras como apariencia de ECM. Por ello se considera que los hongos

encontrados en esta tesis, tienen mayor probabilidad de ser verdaderas ectomicorrizas, y no de hongos que sólo se encontraban próximos a la rizosfera.

Existen distintos trabajos donde han sido documentadas las familias que se secuenciaron para esta tesis, *e.g.* la familia Tiliaceae, a pesar de que no se encuentra reportada para los trópicos como hospedero ectomicorrízico; Selosse *et al.* (2002) mencionaron haber encontrado ECM de sebacinoides en *Tilia cordata*. De igual modo Trappe (1962) describió el estatus ectomicorrízico de esta familia, y Carrasco-Hernández *et al.* (2010) dicen que *Laccaria* forma ECM con miembros de esta familia.

Otra de las familias amplificadas y de las cuales poco se sabe es la familia Rubiaceae. El trabajo de Moyersoen *et al.* (2001). Reporta haber encontrado ectomicorrizas en una planta de esta familia, sin embargo no hay otro trabajo que lo sustente.

Araliaceae y Bignoniaceae habían sido reportadas como posibles hospederos por Béreau *et al.*, (1997) quién hizo la revisión de las raíces bajo el microscopio estereoscópico de raíces en Guyana Francesa. También está en duda la formación de ECM en Bignoniaceae, como lo menciona Brundrett (2009). De igual forma, Béreau *et al.* reportan a *Brosimum* (Moraceae), *Coccoloba* (Polygonaceae), *Neea* (Nyctaginaceae), *Chrysophyllum* y *Pouteria* (Sapotaceae). Además que Sapotaceae en otros trabajos ha sido reportada como ectomicorrízica (Moyersoen, 2006; Bâ *et al.*, 2012), al igual que Salicaceae (Becerra & Zak, 2011).

La única planta de la que no se tenía conocimiento previo de su relación simbiótica con hongos es *Achatocarpus gracilis*, de la familia Achatocarpaceae. Esta planta fue identificada gracias a la recolecta de ejemplares con frutos y la secuencia originada a partir del DNA foliar correspondió en un 100% con DNA de 39 raíces.

La familia Achatocarpaceae en la EBCh sólo presenta a la especie *A. gracilis*. Esta familia es endémica del Neotrópico, conformada por los géneros *Achatocarpus* y *Phaulothamnus*, con alrededor de 10-16 especies (Zappi, 2009; Medina Lemos, 2009), de las cuales 5 especies se encuentran en México (Medina-Lemos, 2009). El género *Achatocarpus* se encuentra presente como parte de la vegetación de los BTC y vegetación sometida a estrés hídrico en general (Zappi, 2009). El género se encuentra distribuido desde Texas hasta Sudamérica (Martínez-García, 1985), principalmente en Centroamérica (Zappi, 2009). En México existen cuatro especies de *Achatocarpus*:

- 1) *Achatocarpus gracilis* se encuentra distribuido en Colima (Padilla-Velarde *et al.*, 2006), Jalisco (Lott, 1985), Guerrero, Michoacán, (Bortenschlager *et al.*, 1972), Oaxaca (Salas-Morales, 2007), Sinaloa (Vega Aviña, 2001) y Veracruz (Martínez-García, 1985); se considera como una especie presente prácticamente en todos los BTC de América.
- 2) La especie *A. oaxacanus* (Salas-Morales, 2007) es una especie endémica de Oaxaca.

- 3) *A. mexicanus* es conocida para Oaxaca (Gordon *et al.*, 2004) y Tamaulipas (Bortenschlager *et al.*, 1972).
- 4) *A. nigricans* es una especie que se encuentra distribuida tanto en bosque tropical perennifolio (BTP), BTC, matorral y en sitios *riparios*. Se encuentra en el sureste mexicano: Chiapas, Oaxaca (Salas-Morales, 2007), Tamaulipas (Bortenschlager *et al.*, 1972) y Veracruz (Martínez-García, 1985).

*A. gracilis* se encuentra en todas las etapas de sucesión del BTC de Chamela. (Alvarez-Añorve *et al.*, 2012). Además de ser un arbusto abundante en la Estación de Biología de Chamela (Durán *et al.*, 2002). De igual forma, *A. nigricans* se encuentra distribuida en estados sucesionales de BTP y BTC (Salas-Morales, 2007).

El descubrimiento de *Achatocarpus* como hospedero ectomicorrízico se ve fuertemente sustentado por haber encontrado siete especies de diferentes linajes de hongos asociados, principalmente *Tremelloscypha* sp.

La distancia filogenética entre hospederos, explica el 75% de la variación de la riqueza de especies de HECM y 20% de la variación de la composición de la comunidad (Tedersoo *et al.*, 2014). Prácticamente no existe relación filogenética entre las diferentes familias que se encontraron formando ectomicorrizas en la EBCh. Se encontró que la familia Achatocarpaceae, Nyctaginaceae y Polygonaceae, son familias del orden Caryophyllales, pero no son grupos hermanos (Figura 59). En Fabaceae se encontró que existen ectomicorrizas en las subfamilias Caesalpinioideae y Papilionoideae, las cuales también son distantes filogenéticamente hablando.



**Figura 59. Análisis bayesiano del orden Caryophyllales con la región *rbcL*.** Los recuadros en azul remarcan las familias donde se han reportado hospederos ectomicorrízicos.

Las comunidades de hongos ectomicorrizógenos se encuentran en función al hospedero (Ishida *et al.*, 2007), es decir que existe cierta especificidad. Los resultados obtenidos en esta tesis nunca tuvieron como objetivo corroborar la hipótesis de la especificidad de hongos con respecto al hospedero. Sin embargo, se encontró una alta diversidad de hospederos y baja riqueza de hongos, donde la mayoría de los hongos encontrados son especies con baja abundancia (en ocasiones encontradas en una sola raíz), y por lo tanto sólo se presentaron en una sola planta muestreada. Esto podría ser



interpretado como especificidad de los hongos con respecto a sus hospederos. Para poder confirmar esta última afirmación, es necesario incrementar el muestreo en las plantas donde se encontró un solo hongo asociado.

La literatura sobre la especificidad que existe entre micobionte y fitobionte en los bosques tropicales es casi inexistente. El único trabajo al respecto fue hecho con *Pisonia*, género perteneciente a la familia Nyctaginaceae, donde se encontró alta especificidad con Thelephoraceae y Russulaceae (Haug *et al.*, 2004). Sin embargo Tedersoo *et al.* (2010b) no encontraron esta misma relación específica de esa planta.

La especificidad genera nichos ecológicos (Dickie 2007): la especie de las plantas hospederas afecta directa o indirectamente la comunidad de HECM, a través de la modificación del suelo, sugiriendo la importancia genética, fisiológica de los hongos, así como los mecanismos ambientales que desarrollan el nicho (Morris *et al.*, 2008). De manera que las plantas están en función del suelo, a su vez ellas modifican la composición de este y los hongos están en función de ambos factores (Tedersoo *et al.*, 2014).

## **8.2 Diversidad fúngica ectomicorrizógena en los trópicos**

La incursión en los trópicos en busca de los ectomicorrizógenos no es novedosa, su estudio empezó desde los años 50's, cuando se documentaron las primeras angiospermas ectomicorrizicas tropicales. El uso de las herramientas moleculares en este campo de estudio abrió la puerta al conocimiento de la diversidad de HECM, en las diferentes latitudes (Wolfe *et al.*, 2009).

Ha sido propuesto que la diversidad de ectomicorrizógenos en los trópicos es menor comparada con los bosques templados (Tedersoo & Nara, 2010). Esto se reconoce que puede estar relacionado a factores bióticos y abióticos, como la homogeneidad del suelo, la especificidad micobionte-fítobionte y la densidad de hospederos (Tedersoo *et al.*, 2012a; Kennedy *et al.*, 2012; Bahram *et al.*, 2013).

Extrapolando estos factores a la EBCh, la matriz de suelo encontrada en los bosques de Chamela es completamente heterogénea. Un estudio realizado en Borneo, en suelos heterogéneos arenosos de bosque tropical perennifolio, encontró gran diversidad de HECM en comparación con bosques de suelos arcillosos con baja heterogeneidad (Peay *et al.*, 2010). Por lo que la composición de la misma unidad edáfica no es un factor determinante, que explique del todo la diversidad de HECM en los trópicos (Hayward & Horton, 2012; Bahram *et al.*, 2013). Sin embargo, el suelo sí puede estar determinando la composición vegetal (Wassen *et al.*, 2005; Chapman *et al.*, 2006; Lambers *et al.*, 2008).

Otro argumento que explica la diversidad de HECM es que si existe una baja riqueza de hospederos, habrá una alta diversidad de micobiontes a nivel local y mundial (Tedersoo *et al.*, 2012a). El más reciente trabajo que abarcó varios sitios alrededor del

mundo, reportó alta especificidad de HECM con su hospedero, en ecosistemas tropicales y templados, pero no hongos generalistas (Bahram *et al.*, 2014). En un bosque subtropical mixto, compuesto por ocho especies de hospederos de tres familias, se encontraron que las comunidades de HECM variaban según el hospedero. En sus datos sólo encontraron 29.8% especies fúngicas compartidas entre las tres familias de los hospederos (Ishida *et al.*, 2007).

La densidad de hospederos es uno de los factores más importantes que se encuentra determinando la comunidad de HECM en los bosques tropicales (Bahram *et al.*, 2013). En bosques de Guyana y Venezuela existe la formación de grandes parches de hospederos ectomicorrízicos, donde se encuentra una gran diversidad de hongos asociados (Moyersoen; 2006; Henkel 2003; Henkel *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2011, 2013). En el bosque tropical caducifolio de Chamela, se desconoce si existe alguna planta ectomicorrízica que sea dominante en el área. La familia Fabaceae se encuentra abarcando prácticamente todo el sitio pero como se vio en los resultados, no fue predominantemente ectomicorrízica.

Haciendo un contraste, Phosri *et al.* (2012) encontraron 69 especies que pertenecen a 17 linajes filogenéticos. Este estudio se realizó en un bosque tropical caducifolio, sin embargo es importante remarcar que se trata de un bosque ectomicorrízico monodominante de la familia Dipterocarpaceae, la cual no se distribuye en México. Las especies dominantes del trabajo de Phosri *et al.* son: *Shorea obtusa*, *S. siamensis*, *Dipterocarpus obtusifolius* y *D. tuberculatus*, que abarcan >90% del área basal (Panwittayakul & Srikampol, 2006).

### 8.2.1 Distribución de los HECM en la EBCh

La mayor parte del área de Chamela, se encuentra cubierta por vegetación que forma micorriza arbuscular. Es por ello que la distribución de los hongos que encontramos en la EBCh, puede ser comparada con el patrón encontrado por Tedersoo *et al.* (2010b), donde los ectomicorrízicos no se encontraban distribuidos de manera homogénea en la amazonia ecuatoriana. Ambos estudios pueden ser analizados desde la teoría de biogeografía de islas (MacArthur & Wilson, 1967), donde los árboles ectomicorrízicos pueden ser considerados las islas (Peay *et al.*, 2007) y el resto de las plantas con asociación arbuscular, son limitantes para la colonización y establecimiento de estos hongos. La teoría tiene algunos factores que se deben tomar en cuenta:

- a) La distancia que existe entre las islas, se ve reflejada en la probabilidad de colonización. Si la distancia es menor hay mayor probabilidad de colonizar.
- b) Entre más grande sea la isla, hay mayor capacidad para que más especies se establezcan.

- c) El aislamiento geográfico reduce el flujo génico entre poblaciones, y pasado el tiempo, aumenta la divergencia genética entre poblaciones debido a selección natural, mutación y/o deriva génica.

Prácticamente la distribución de los HECM está en función de sus hospederos, su capacidad para dispersarse (ya sea vía micelial o con formación de esporas) y su capacidad para colonizar las raíces. Particularmente en Chamela, aunque es un análisis exploratorio y nunca fue un objetivo analizar alguna hipótesis referente a la biogeografía de islas, se observan distribuciones agrupadas (Figura 14). La mayoría de las especies se encontraron en un punto específico, y dos de las más abundantes se encontraron ampliamente distribuidas (*Tremelloscypha* sp. y *Thelephora versatilis*). Aunque claro está que en este sitio no se puede hablar de un aislamiento geográfico, se puede ver por el lado de la especificidad con su hospedero.

Hablando de la ecología de los HECM en Chamela, se trata de organismos cuya distribución se encuentra restringida a sus hospederos. La dispersión de las esporas es otro de los filtros que los hongos deben pasar para colonizar nuevos hospederos. Debe tomarse en cuenta que los HECM presentan cierto grado de especificidad (Bahram *et al.*, 2014), por lo que los hongos deben encontrar a sus principales hospederos. Sin embargo, los HECM pueden llegar a ser oportunistas, *e.g.* *Tremelloscypha* que se encuentra asociado principalmente con *Achatocarpus*, y en menor proporción con *Ficus*, *Guapira* y una Sapotaceae.

Aquellos hongos que no desarrollan una forma de dispersión por aire o por animales, su alcance de colonización se ve restringido a la periferia por colonización micelial. Aunado a otros factores bióticos y abióticos, como competencia entre otros HECM o tipo de suelo. Lo anterior nos remite a la tercera hipótesis, donde se planteó que los HECM del sitio de estudio podrían presentar reproducción asexual o esporomas inconspicuos. Únicamente se recolectaron esporomas de tres especies que se encontraron asociadas a raíces: *Tremelloscypha* sp., *Thelephora versatilis* y *T. pseudoversatilis*. Los esporomas de las otras especies no fueron recolectados, ya sea porque no se les encontró o no tenían en ese momento reproducción sexual.

Por ejemplo la familia Clavulinaceae, que fue el tercer lugar en abundancia para este estudio, sus cuerpos fructíferos presentaron formas desde clavarioides (Ramírez-López *et al.*, 2012), cratereloides (Thacker & Henkel, 2004) hasta resupinadas (Uehling *et al.*, 2012). Al ser los esporomas resupinados, dificulta su visibilidad y recolección; y se sabe que la dispersión de sus esporas podría ser mediante invertebrados (Lilleskov & Bruns, 2005).

La secuencia de *Clavulina* sp. 1 que se encontró en gran abundancia, se tuvo una similitud de 88% con *Membranomyces spurius*, el cual forma esporomas resupinados. También se comparó con *Clavulina cinerea* al 82% con mayor cobertura que con

*Membranomyces*. De esta muestra no se logró encontrar esporoma pero cabe la posibilidad de considerar que se tratara de un esporoma resupinado.

Ramírez-López *et al.* (2012) encontraron dos especies de *Clavulina* con formas clavarioides en la EBCh. De sus muestras se obtuvieron secuencias que fueron comparadas con las secuencias obtenidas de las raíces. Estas secuencias de los esporomas no se agruparon al 97% de similitud, con ninguna de las *Clavulina* spp. encontradas en ECM. Aunque sí se logró determinar el género de las micorrizas, sigue la interrogante de la forma de sus estructuras de reproducción sexual, si es que la tienen.

La diversidad genética dentro de una misma especie, se puede inferir de los MOTUs agrupados al 100% para el caso de los hongos. Como resultados se obtuvieron varios genets que presentan amplia distribución, y que corresponden a las especies de las cuales se encontró sus esporomas, es decir *Thelephora versatilis* y *Tremelloscypha* sp. La reproducción sexual con esporomas conspicuos podrían explicar la distribución. Aunque no se conozcan los mecanismos de dispersión de *T. versatilis* y *Tremelloscypha* sp., puede suponerse que se lleva a cabo por aire o por zoocoria (Lilleskov & Bruns, 2005).

En la literatura se reporta que *Tremelloscypha dichroa* es un hongo comestible (Bandala *et al.*, 2014) por lo que los mamíferos podrían ser dispersores de la especie que se encuentra en Chamela. De *T. versatilis* no se cuenta con ninguna información al respecto, sin embargo se ha reportado que las especies de *Thelephora* presentan esporas efectivas para la colonización, por lo que su distribución puede llegar a ser amplia (Peay *et al.*, 2007).

### 8.2.2 Riqueza y abundancia de los HECM en la EBCh

La familia más abundante y con mayor riqueza de especies en las raíces de diversos hospederos, fue Thelephoraceae con ocho de las 19 especies encontradas. Previamente ha sido reportado que esta familia se encuentra prácticamente en todos los sitios donde se ha muestreado (Lilleskov & Bruns, 2005; Tedersoo *et al.*, 2010b). Sin embargo es de especial atención que las especies únicas estén relacionadas con *Achatocarpus*, Caesalpinioideae 2, *Guapira* y Papilionoideae 3; donde *Achatocarpus* y *Guapira* son hospederos colonizados por las especies más abundantes, *i.e.* *Tomentella* sp. 1 y *Thelephora versatilis*. Esto indica la especificidad que presentan *Tomentella* sp. 3, 4, 5 y 6 con los hospederos previamente mencionados.

La segunda familia con mayor riqueza es Clavulinaceae, con cinco especies y una de ellas muy abundante. *Clavulina* sp. 1, la especie más abundante, se encontró colonizando sólo especies de la familia Nyctaginaceae. De hecho casi todas las especies se encuentran asociadas a esta familia, exceptuando a *Clavulina* sp. 2 que está asociada a *Achatocarpus gracilis*. El género *Clavulina* está mayormente representado en los trópicos

que en los bosques templados, ya que éste es ancestralmente tropical (Kennedy *et al.*, 2012), por lo que era esperado que esta familia se encontrara en la EBCh.

La familia Sebacinaceae se encontró con gran abundancia y frecuencia pero baja riqueza. La única especie representada para esta familia fue *Tremelloscypha* sp. la cual se encontró ampliamente distribuida y con cuatro diferentes hospederos, pero principalmente con *Achatocarpus gracilis*. Los otros tres hospederos *i.e.* *Ficus* sp. (Moraceae), *Guapira macrocarpa* (Nyctaginaceae) y Sapotaceae sp. 3, exceptuando a *Guapira*, son poco comunes en la literatura. Probablemente es un hongo generalista con mayor inclinación hacia *Achatocarpus* y de manera oportunista se le encontró formando ECM con el resto de hospederos.

El resto de las familias encontradas: Entolomataceae, Inocybaceae y Russulaceae ya habían sido documentadas para los trópicos por medio de esporomas (Buyck *et al.*, 1996; Henkel *et al.*, 2011; Moyersoen, 2012). Según la hipótesis de Matheny *et al.* (2009) el género *Inocybe* tiene un origen paleotropical, que migró de África y Norte América hacia el neotrópico, y nuestra especie de *Inocybe* presenta similitud <90% de similitud con hongos provenientes de Estados Unidos. Se desconoce el origen de las secuencias con las que se identificó a *Entoloma*; y de Russulaceae hay <90% de similitud con secuencias de diversas partes del mundo.

Además de los ectomicorrizógenos amplificados, también se amplificaron 13 hongos que se encontraban en interacción con las raíces. Siete de ellos no se logró especificar el género al que pertenecían. Sin embargo, hubo algunos de ellos que resultan interesantes, *i.e.* *Podoscypha*, del cual se encontraron frecuentemente esporomas en varias veredas de la estación. Una secuencia de los esporomas se agrupó con solo una secuencia proveniente de raíz. Este hongo ha sido reportado como parásito de raíces de *Quercus* y *Fagus* (Overall & Mottram, 2006), los cuales son especies ectomicorrízicas. No se ha indagado más del asunto, pero tendrían que hacerse caracterizaciones morfológicas de las raíces donde se encuentra asociado este hongo, para determinar el tipo de asociación.

Otro de los hongos amplificados fue *Tricholosporum*, del cual también se obtuvieron esporomas. Por la morfología es afín a *Tricholosporum tropicalis*, el cual se reportó creciendo directamente del suelo en Tapachula, Chiapas (Guzmán *et al.*, 1994). La mayoría de las especies pertenecientes al género han sido reportadas para bosques ectomicorrízicos, como *Quercus* (Guzmán *et al.*, 1994). La secuencia de una raíz se agrupó con las secuencias de los esporomas de *Tricholosporum*, por lo que también sería interesante verificar la asociación.

*Ceratobasidium*, otro hongo amplificado de las raíces, se tenía la duda de su interacción con las raíces. Sin embargo con la publicación de Veldre *et al.*, (2013), ahora se conocen los grupos de *Ceratobasidium* que forman ectomicorrizas. El análisis de verosimilitud (Apéndice III) mostró que la secuencia que nosotros obtuvimos, no pertenece a ninguno de los dos grupos, por lo que se descartó que se tratara de un HECM.

Otro de los resultados que llama la atención es una secuencia que es identificada como *Auricularia nigricans* al 99.7%. Sobre todo porque la secuencia obtenida fue a partir de un muestreo directamente sobre la raíz de *Guapira*, sin embargo el material no era suficiente para poderle hacer la caracterización morfoanatómica. Garibay-Orijel (com. pers.) mencionó haber encontrado en secuencias de ectomicorrizas, resultados similares. De igual forma *Geastrum* es encontrado con regularidad asociado a rizosfera (Toju *et al.*, 2014) pero hasta el momento no se ha confirmado que se trate de un HECM.

Los valores de los dos índices calculados, 1-D y *H*, estimaron que la diversidad en el sitio de estudio es alta. El 1-D da valor a las especies únicas y/o raras mostrando la probabilidad que dos individuos tomados al azar correspondan a una especie distinta; mientras que el *H* asume que todas las especies están representadas en las muestras e indica qué tan uniformes están representadas (Villarreal *et al.*, 2006). Nueve de las 19 especies encontradas fueron únicas, es decir casi el 50% de los datos y conforme el muestreo incrementó, se encontraron especies que no habían sido muestreadas anteriormente.

Los índices de diversidad también fueron calculados por tipo de vegetación, encontrando que el BTC (1-D = 0.79; *H* = 2.0) tiene mayor diversidad que el BTS (1-D = 0.71; *H* = 1.52). Esto podría ser explicado por el esfuerzo de muestreo, ya que la mayoría de los transectos muestreados correspondieron a vegetación caducifolia. Pero también puede deberse a la biología de los hospederos, por ejemplo *Achatocarpus* es una planta asociada al estrés hídrico (Zappi, 2009) y *Guapira macrocarpa* se encuentra principalmente en BTC (Durán, 2002). La mayoría de los hongos amplificadas pertenecieron a estas dos especies, por lo que en el BTC se encontró más diversidad.

### 8.2.3 Comparación entre muestreos

El cálculo de los dos índices se hizo con los datos de todos los muestreos realizados, mientras que las curvas de rarefacción y la comparación entre muestreos, sólo se hicieron con los datos tomados con núcleos. Las curvas calculadas por cada muestreo no fueron asintóticas. Tampoco es posible afirmar que alguno de los dos muestreos haya resultado mejor, sin embargo si se compara el número de muestras revisadas por cada muestreo, puede considerarse que es más probable encontrar ECM bajo esporomas. Con este resultado se puede ver claramente con la probabilidad calculada por cada tipo de muestreo (P en rizosfera = 0.15; P bajo esporomas = 0.22).

También debe tomarse en cuenta que los HECM no siempre presentan reproducción sexual, como el caso de *Cenococcum geophyllum* (Ishida *et al.*, 2007), o que puede no encontrarse la fase sexual del organismo. Por lo que podría explicarse por qué en la rizosfera se encontraron más especies (10 spp.) que bajo los esporomas (siete especies);

pero el esfuerzo de muestreo fue mayor en la rizosfera. Obtener la fructificación del hongo, indica que hay micelio, lo cual aumenta la probabilidad de que el hongo esté colonizando raíces.

En este estudio se analizaron 384 núcleos de suelo, equivalentes a 91 muestras. Cada núcleo de suelo recolecta aprox. 147 cm<sup>3</sup> de suelo, es decir que cada muestra de suelo contenía aproximadamente 588 cm<sup>3</sup> de suelo. Con las 91 muestras (56448 cm<sup>3</sup> de suelo), se encontraron 163 raíces con apariencia de ECM, pertenecientes a 14 especies (diez especies en la rizosfera de hospederos y siete especies bajo esporomas; tres de ellas se encontraron en los dos muestreos). Comparando esta misma metodología pero con bosques monodominantes de hospederos ectomicorrízicos, se encuentra mayor diversidad con menor número de núcleos. Por ejemplo, Moyersoen (2012) muestreó en un bosque de Dipterocarpaceae, 60 núcleos de 125 cm<sup>3</sup> de suelo c/u (es decir 7500 cm<sup>3</sup> de suelo), encontrado 150 ECM de 27 especies diferentes. De igual forma, Argüelles-Moyao (2013) recolectó 63 núcleos de 147 cm<sup>3</sup> (9261 cm<sup>3</sup> de suelo), en bosque de *Abies religiosa*, encontrando 856 ECM pertenecientes a 87 especies distintas.

Moyersoen (2012) y McGuire *et al.* (2013) utilizaron núcleos de suelo para el muestreo de bosques tropicales en Venezuela y Guyana, respectivamente en un bosque monodominante de *Pakaraima* y *Dicymbe*. Por tener estas características el bosque puede ser comparado con cualquier bosque templado donde prácticamente toda el área está cubierta por hospederos ectomicorrízicos. El tener esta densidad de hospederos garantiza que cualquier muestra extraída, contenga ECM.

En el 2013 se hizo un muestreo para tener más evidencias de algunos de los resultados del 2012, así como el hacer recolecta de materiales que ayudaran a llenar la falta de información en casos particulares. El muestreo dirigido se hizo cavando cerca al tronco de las plantas de interés, rastreando las raíces hasta obtener raíces terciarias. De igual manera se recolectó ~10 cm<sup>3</sup> de suelo debajo de esporomas que se pensó que eran ectomicorrizógenos. Estas dos metodologías son lo que se han empleado en el resto de los estudios de ectomicorrizas tropicales. Con esta metodología se revisaron 26 rizosferas, encontrando 13 ECM pertenecientes a siete especies diferentes. Cinco de estas especies no habían sido recolectadas con el muestreo por núcleos de suelo. Esta metodología representa menor esfuerzo de muestreo y se encontró prácticamente la misma riqueza que con núcleos.

El resultado fue obtener especies no encontradas en el 2012, y ya que el muestreo se hizo sólo durante una semana de Octubre, las muestras tomadas fueron pocas. Es decir que el muestreo dirigido a las raíces junto con la toma de suelo con pala, es un muestreo efectivo sin el esfuerzo que implica revisar muchas muestras. Desde luego que el muestreo dirigido no pudo haberse llevado a cabo de no haber sido por la información encontrada en los primeros muestreos, pero queda como experiencia para posteriores estudios.

### 8.3 Morfotipos de ectomicorrizas

Las primeras aproximaciones que se tuvieron de las ectomicorrizas, se basaron en las diferencias morfológicas que se apreciaron con ayuda de una lupa o microscopio (Frank 1885). A partir de ello se determinaron ciertas características que pueden ser variables en las ectomicorrizas (Agerer, 1991; Agerer & Rambold, 2004–2014), a lo que se conoce como morfotipos. La morfología de las ECM varía conforme a la asociación del hongo con la planta (Halling, 2001), así como con la edad que presente la estructura.

Uno de los objetivos del trabajo, fue dar a conocer la morfología de las ectomicorrizas encontradas en la EBCh. Para ello no se hizo distinción entre morfotipos, en la secuenciación, sino que todo fue incluido. De esta misma manera, se intentó caracterizar cada uno de las ectomicorrizas muestreadas. Prácticamente se dependía de que el material recolectado fuera suficiente para la extracción de DNA y la caracterización morfológica.

Todas las raíces muestreadas fueron observadas con el microscopio estereoscópico, seleccionando todas las raíces que presentaran estructuras parecidas a manto. El total de muestras obtenidas fueron 205, sin embargo se tuvo material suficiente para caracterización, únicamente de 42 ectomicorrizas. Tal como se describió en la metodología, se fijaron las primeras muestras con FAA (Formaldehído-Acético-Alcohol). Los químicos que componen el FAA, son fijadores por excelencia que puede llegar a dañar o endurecer los tejidos con el tiempo (Sandoval-Zapotitla, 2005). Las primeras muestras se dejaron fijando en FAA cerca de seis meses por lo que el tejido antes de ser deshidratado, ya se encontraba colapsado. Del primer muestreo se obtuvieron 20 muestras para caracterizar, de las cuales sólo de una se obtuvo la caracterización anatómica con la metodología del microtomo de rotación.

En el segundo muestreo se cambió tanto el fijador como el tiempo en el que se mantuvo la muestra fijando. El fijador usado para el segundo muestreo fue Navashin, en el cual se dejaron las raíces 24 h, se lavaron con agua corriente y permanecieron en alcohol al 70% hasta su posterior tratamiento. De ese segundo muestreo se fotografiaron 21 morfotipos, de los cuales 15 de ellos pudieron caracterizarse con cortes al microtomo.

Como se mencionó en la metodología, la descripción anatómica se llevó a cabo con cortes hechos con microtomo de rotación. Para ello se modificaron algunos protocolos de deshidratación, parafinación y cortes de Sandoval-Zapotitla (2005). Sin embargo esta técnica no fue lo apropiada para obtener cortes que permitieran describir la anatomía de 21 muestras. El morfotipo 5bA2-15 (Figura 25) del cual se tuvo material para hacer cortes a mano y con microtomo, se aprecia que en los cortes con microtomo el tejido fúngico colapsó lo que imposibilita observar las mismas características que con cortes hechos a mano. Es por esto que se recomienda realizar cortes manuales o con otras herramientas, como el ultramicrotomo para la caracterización anatómica.



Para este trabajo las muestras no fueron discriminadas por morfotipos, no importando la apariencia de la ECM todo se procedió a describir, es decir aunque las ECM que tuvieran la misma apariencia, se tomaron como muestras individuales. Las ECM del BTC no presentaron ramificación y la mayoría son del tipo de “exploración de contacto”, es decir forman mantos delgados con hifas emergentes poco evidentes o nulas. Este tipo es predominantemente hidrofílica y el sustrato orgánico e inorgánico puede estar directamente en contacto (Agerer *et al.*, 2012).

En una conversación personal con el Dr. Matthew Smith de la Universidad de Florida, se discutió brevemente acerca de sus observaciones de las ectomicorrizas tropicales. Mencionó que las ectomicorrizas de *Dicymbe* son apreciables a simple vista, con mantos evidentes y ramificación abundante; a diferencia de lo que se encontró de las ECM de Chamela, las cuales se observan con dificultad, pues son de reducido tamaño y de manto no conspicuo. Al respecto mencionó que la disponibilidad de agua parece hacer variar el tamaño de las puntas ectomicorrizadas.

Los resultados moleculares mostraron que 11 de las 42 ECM descritas pertenecieron a *Clavulina* sp. 1. Esta misma especie, se encontró asociada con *Guapira macrocarpa*, Nyctaginaceae 1 y 5, y cuatro especies desconocidas. Las ectomicorrizas de esta especie presentan diferentes morfologías, incluso en el mismo hospedero. Por ejemplo los morfotipos encontrados en *G. macrocarpa* van desde un manto blanquecino sin micelio externo (morfotipos 5bA2-5,-9,-13), hasta manto negro con cistidios aculeados (morfotipo 5bA2-19). Este mismo hongo con un hospedero diferente (morfotipo 5bA2-10) presentó un manto blanquecino con abundantes hifas emergentes y presenta ramificación irregularmente pinnada. Otro ejemplo son los morfotipos de *Tomentella* sp. 1. Este hongo se encontró asociado a *G. macrocarpa*, Nyctaginaceae 1, 6 y 7, y Polygonaceae 1. Los colores del manto son en general oscuros color bronce aunque pueden llegar a ser blanquecinos cuando la ECM es reciente (morfotipo 5bA2-18).

Lo anterior sugiere que una especie fúngica puede presentar diferente morfología colonizando al mismo hospedero. Esto podría deberse a la cantidad de nutrientes en la ectomicorrizosfera a nivel de micro-escala, o alguna particularidad de la raíz o suelo que haga al hongo modificar la estructura de la ECM. Por lo que diferentes morfologías en las ectomicorrizas de los BTC no forzosamente se tratan de diferentes especies, se puede mostrar una variedad de colores y ramificaciones de un mismo hongo con una misma especie vegetal.

Las ECM formadas por la familia Thelephoraceae presentaron características en común, *i.e.* la coloración es parda a completamente negra, el manto grueso lanoso y presentaron rizomorfos. En algunos morfotipos, el manto no se encontró envolviendo la parte más apical de las raíces terciarias, sino se presentó a lo largo de éstas, siendo una característica muy poco común en las ectomicorrizas. Los caracteres mencionados se mantienen a pesar de que la misma especie de hongo esté micorrizando a varios

hospederos. Incluso en los morfotipos de *Tomentella* asociada a *Dicymbe* que proporcionó el Dr. Matthew Smith, se puede generalizar que las ECM de /*tomentella-thelephora* presentaron manto oscuro grueso, con algunas hifas emergentes y rizomorfos. Ninguna ECM de otra familia presenta estas características por lo que se puede generalizar que las ECM de Thelephoraceae en el BTC siempre las presenten. Cuando se presentan caracteres únicos de algún grupo de hongo no importando el hospedero, es posible la identificación del micobionte únicamente con la morfología (sin la necesidad de usar biología molecular para cada cosa). Por ejemplo, los morfotipos 2H1-4 y -5 que no se pudo definir los micobiontes con la secuenciación, podría inferirse que se trata de un miembro de la familia Thelephoraceae.

El morfotipo que difiere de la descripción de la ECM convencional, es el de *Tremelloscypha* sp. con *Achatocarpus gracilis*. Este morfotipo presentó un manto sumamente delgado, de color blanquecino a hialino apenas perceptible en el microscopio estereoscópico y sin red de Hartig aparente. Con las observaciones de las ECM de *Dicymbe* proporcionadas por el Dr. Smith, se encontró un parecido de las ECM de *Sebacina* TH37. Cabe recordar que *Sebacina* y *Tremelloscypha* pertenecen a la familia Sebacinaceae. Tanto *Sebacina* como *Tremelloscypha* presentan manto conformado de 1-3 capas de hifas hialinas, sin embargo *Sebacina* sí presenta una red de Hartig periepidermal del tipo palmeada hasta la segunda capa de células corticales.

Los morfotipos de *Guapira macrocarpa* (Nyctaginaceae) se observaron hifas intracelulares que no formaban estructuras características de la micorriza arbuscular. En caracterizaciones previas de ECM de Nyctaginaceae del Ecuador, encontraron esta misma forma de crecimiento de las hifas dentro de las células corticales (Haug *et al.*, 2005), por lo que podría tratarse como una característica de esta familia de plantas. Aunque ellos encontraron hifas intracelulares además de manto y red de Hartig, la abundancia de las hifas intracelulares es mucho mayor a lo que se encontró para *Guapira* en esta tesis. Para proponer una variación a las características de las ectomicorrizas, hace falta hacer una revisión extensiva de morfotipos de la familia Nyctaginaceae para ver si se trata de un tipo de micorriza particular, morfológicamente hablando.

Sin embargo también se ha encontrado que existe colonización de ectomicorrizas y con otro tipo de micorriza (*e.g.* micorriza arbuscular en las especies de *Dicymbe* (McGuire *et al.*, 2008), también en *Gilbertiodendron* y *Julbernardia* subfam. Caesalpinioideae (Torti & Coley, 1999) y *Uapaca* (Phyllantaceae) (Ramanankierana *et al.*, 2007)). Por lo que es probable que una misma planta forme diferentes interacciones micorrízicas; en este caso podría tratarse de un tipo de ectendomicorriza.

Siendo de esta manera, es posible que los árboles en los bosques tropicales, puedan tener diferentes tipos de interacciones micorrízicas, además de la ECM y la micorriza arbuscular. De manera que se pudiera estar conformando una red micorrízica entre diversos hongos. No existe ninguna información al respecto en bosques tropicales.

## 9. Conclusiones

Esta tesis es el primer estudio de ectomicorrizas en bosques tropicales de México, al tratarse del primer análisis exploratorio en Chamela. Logramos identificar que efectivamente hay interacción ectomicorrízica entre 19 especies de HECM.

Con la secuenciación directa de la ECM se conoció que existen siete familias de fitobiontes ectomicorrízicos en la EBCh. Estas familias son Achatocarpaceae, Araliaceae, Fabaceae, Moraceae, Nyctaginaceae, Polygonaceae y Sapotaceae. Comparado con los estudios que se han realizado en otras partes del mundo, se cuenta con una gran diversidad de hospederos y unas cuantas especies de hongos ectomicorrizógenos.

Se detectó que *Guapira macrocarpa* (Nyctaginaceae) y *Achatocarpus gracilis* (Achatocarpaceae) son los principales hospederos ectomicorrízicos. En *Guapira* se encontraron asociados nueve HECM y a *Achatocarpus* con siete HECM. Esto fue contrario nuestra segunda hipótesis donde se planteó que Fabaceae sería la principal familia ectomicorrízica.

Identificamos que los hongos más abundantes en las micorrizas fueron *Tremelloscypha* sp. con 29 ECM, *Clavulina* sp. 1 con 16 ECM, *Thelephora versatilis* con 13 ECM, y *Tomentella* sp. 1 con 10 ECM. El hongo con mayor número de hospederos fue *Tomentella* sp. 1, que se encontró asociado a siete plantas diferentes. La ectomicorriza más abundante fue la de *Tremelloscypha* sp. con *Achatocarpus gracilis*.

Únicamente de *T. versatilis*, *T. pseudoversatilis* y *Tremelloscypha*, se logró encontrar sus esporomas. Del resto de las ECM aun desconocemos si llegan a culminar su proceso de formación de esporomas (reproducción sexual) y qué formas presentan.

Los índices de diversidad calculados indicaron que es probable seguir encontrando especies no reportadas por este trabajo, conforme se va aumentando el muestreo. La diversidad encontrada con el muestreo con núcleos indicó que es más probable encontrar una ECM bajo esporomas que buscando hospederos. Sin embargo se sugiere un hacer rastreo de raíces de las plantas de interés y después hacer su reconocimiento molecular.

Otro de los problemas que resolvió esta tesis fue el reconocimiento de las ECM del bosque tropical de Chamela, Jalisco. Por ello se realizaron caracterizaciones de las ECM. La caracterización se hizo de 42 muestras, aunque sólo de la mitad se obtuvieron cortes que permitieron la descripción anatómica.

Esta primera aproximación a conocer la diversidad de ECM de los bosques tropicales, esclareció la mejor forma para recolectar ECM. También deja en claro lo que falta por conocer de la diversidad de los HECM de la EBCh. Ahora se conocen los principales hospederos ectomicorrízicos y algunas de sus interacciones con HECM.

## 10. Perspectivas

El estudio fue exitoso como primer análisis exploratorio puesto que ahora conocemos un poco de la diversidad de HECM. Sin embargo este estudio abrió las puertas a muchas más preguntas al respecto.

Por ejemplo, la distribución de los HECM está en función de sus hospederos. Los resultados nos indicaron que algunos hongos presentan especificidad a su hospedero. Es por ello que se encontraron ECM de manera agregada sólo en algunas muestras de suelo. La literatura reporta que la densidad de hospederos afecta la diversidad de HECM. Hasta el momento se desconoce si existe dominancia de alguna de las plantas ectomicorrízicas de la EBCh. Este dato es de especial interés para poder explicar la diversidad que encontramos de los HECM.

Otra de las preguntas es sobre la especificidad de los hongos a sus hospederos. Como se mencionó en las conclusiones, se cuenta con una gran diversidad de hospederos y pocos hongos asociados. Se tendría que intensificar el muestreo en estos hospederos para ver si en verdad hay alta especificidad de los hongos o hay varias especies que se compartan entre varios de ellos.

Esto último nos remite a cuestionarnos de la existencia de una red micorrízica, ya sea únicamente entre HECM o HECM con otro tipo de micorrizas. Para ello todavía falta ampliar más nuestro conocimiento sobre esta simbiosis.

## 11. Literatura citada

**Abdo Z, Golding GB. 2007.** A step toward barcoding life: a model-based, decision-theoretic method to assign genes to preexisting species groups. *Systematic biology* **56**: 44–56.

**Agerer R. 1991.** Characterization of ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology* **23**: 25-73.

**Agerer R, Rambold G. 2004-2014.** Determination of Ectomycorrhizae (DEEMY). Ludwin-Maximilians-Universität München, Dept. Biologie I- Systematische Mykologie. <http://www.deemy.de>; última consulta en: 15/10/2014

**Agerer R, Hartmann A, Pritsch K, Raidl S, Schloter M, Verma R, Weight R. 2012.** Plants and their ectomycorrhizosphere: cost and benefit of symbiotic soil organisms. In: Matussek R, Schnyder H, Oßwald W, Ernst D, Munch JC, Pretzsch H, eds. *Ecological Studies. Growth and Defence in Plants, Ecological Studies 220*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 213–242.

**Aïnouche A-K, Bayer R. 1999.** Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* **86**: 590–607.

**Alexander I. 2006.** Ectomycorrhizas – out of Africa? *New Phytologist* **172**: 589–591.

**Alexander I, Högberg P. 1986.** Ectomycorrhizas of tropical angiospermous trees. *New Phytologist* **102**: 541–549.

**Alexander I, Lee S. 2005.** Mycorrhizas and ecosystem processes in tropical rain forest: implications for diversity. In: Burslem D, Pinard M, Hartley S, eds. *Biotic interactions in the tropics*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 165-203.

**Alvarez-Añorve MY, Quesada M, Sánchez-Azofeifa GA, Avila-Cavadilla LD, Gamon JA. 2012.** Functional regeneration and spectral reflectance of trees during succession in a highly diverse tropical dry forest ecosystem. *American Journal of Botany* **99**: 816-826.

**Alvarez-Manjarrez J. 2012.** Caracterización morfológica de dos ectomicorrizas asociadas a *Coccoloba uvifera* L. e identificación del micobionte con base en la región ITS del DNAr, en una población de la comunidad La Ribera, Tampico Alto, Veracruz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología campus Xalapa, Universidad Veracruzana, México.

**Álvarez-Santiago SA. 2002.** Efecto de la perturbación en la interacción micorrízica vesículo-arbuscular en un ecosistema tropical estacional. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México.

**Argüelles-Moyao A. 2013.** Efecto del suelo del bosque de *Abies religiosa* en la comunidad de hongos ectomicorrízicos en el Zarco, San Pedro Atlapulco, Estado de México. Tesis de Maestría, Instituto de Biología, UNAM, México.

**Arnold AE, Lutzoni F. 2007.** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* **88**: 541–549.

**Ashford A, Allaway W. 1982.** A sheathing mycorrhiza on *Pisonia grandis* R. Br. (Nyctaginaceae) with development of transfer cells rather than a Hartig net. *New Phytologist* **90**: 511–519.

**Ashford A, Allaway W. 1985.** Transfer cells and Hartig net in the root epidermis of the sheathing mycorrhiza of *Pisonia grandis* R. Br. from Seychelles. *New Phytologist* **100**: 595–612.

**Bâ AM, Duponnois R, Moyersoén B, Diédhiou AG. 2012.** Ectomycorrhizal symbiosis of tropical African trees. *Mycorrhiza* **22**: 1–29.

**Baeza S, Paruelo JM, Altesor A. 2006.** Caracterización funcional de la vegetación del Uruguay mediante el uso de sensores remotos. *Interciencia* **31**: 382–388.

**Bahram M, Kõljalg U, Courty P-E, Diédhiou AG, Kjõller R, Põlme S, Ryberg M, Veldre V, Tedersoo L. 2013.** The distance decay of similarity in communities of ectomycorrhizal fungi in different ecosystems and scales. *Journal of Ecology* **101**: 1335–1344.

**Bahram M, Harend H, Tedersoo L. 2014.** Network perspectives of ectomycorrhizal associations. *Fungal Ecology* **7**: 70–77.

**Bais HP, Park S-W, Weir TL, Callaway RM, Vivanco JM. 2004.** How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in plant science* **9**: 26–32.

**Bakarr MI, Janos PJ. 1996.** Mycorrhizal associations of tropical legume trees in Sierra Leone, West Africa. *Ecology Management* **89**: 89–92.

**Baldwin B. 1992.** Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular phylogenetics and evolution* **1**: 3–16.

**Balvanera P, Lott E, Segura G, Seibe C, Islas A. 2002.** Patterns of beta diversity in a Mexican tropical dry forest. *Journal of Vegetation Science* **13**: 145–158.

**Bandala V, Montoya L, Villegas R. 2012.** *Tremelloscypha gelatinosa* (Sebacinales) from tropical deciduous *Gymnopodium* forests in southern Mexico. *Mycotaxon* **118**: 147–157.

- Bandala V, Montoya L, Villegas R, Cabrera T, Gutiérrez M, Acero T. 2014.** “Nangañaña” (*Tremelloscypha gelatinosa*, Sebacinaceae), hongo silvestre comestible del bosque tropical deciduo en la depresión central de Chiapas. *Acta Botánica Mexicana* **106**: 149–159.
- Bandou E, Lebailly F, Muller F, Dulormne M, Toribio A, Chabrol J, Courtecuisse R, Plenchette C, Prin Y, Duponnois R, et al. 2006.** The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. *Mycorrhiza* **16**: 559–65.
- Barajas-Morales J, Pérez-Jiménez L. 1990.** Manual de identificación de árboles de selva mediante cortezas. Instituto de Biología, UNAM, México, DF.
- Becerra AG, Nouhra ER, Silva MP, McKay D. 2009.** Ectomycorrhizae, arbuscular mycorrhizae, and dark-septate fungi on *Salix humboldtiana* in two riparian populations from central Argentina. *Mycoscience* **50**: 343–352.
- Becerra AG, Zak MR. 2011.** The ectomycorrhizal symbiosis in South America: morphology, colonization, and diversity. In: Rai M, Varma A, eds. *Soil Biology 25. Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 19–41.
- Bechem EET, Alexander IJ. 2012.** Mycorrhiza status of *Gnetum* spp. in Cameroon: evaluating diversity with a view to ameliorating domestication efforts. *Mycorrhiza* **22**: 99–108.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. 2006.** Ecology: From individuals to ecosystems. Blackwell Publishing, Fourth edition, 471–473.
- Béreau M, Gazel M, Garbaye J. 1997.** Les symbioses mycorrhiziennes des arbres de la forêt tropicale humide de Guyane française. *Canadian Journal of Botany* **75**: 711–716.
- Besnard G, Rubio de Casas R, Vargas P. 2007.** Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*). *Journal of Biogeography* **34**: 736–752.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. 2007.** Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution* **22**: 148–55.
- Blackwell M. 2011.** The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* **98**: 426–38.
- Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abebe E. 2005.** Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **360**: 1935–1943.

- Bonito GM, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R. 2010.** A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Molecular Ecology* **19**: 4994–5008.
- Bortenschlager S, Auinger A, Blaha J, Simonsberger P. 1972.** Pollen morphology of the Achatocarpaceae (Centrospermae). *Berichte Naturwissenschaftlich-Medizinischer Vereins Innsbruck* **59**: 7-14.
- Brearley FQ. 2012.** Ectomycorrhizal associations of the Dipterocarpaceae. *Biotropica* **44**: 637–648.
- Bréda N, Maillard P, Montpied P, Bréchet C, Garbaye J, Courty P-E. 2013.** Isotopic evidence in adult oak trees of a mixotrophic lifestyle during spring reactivation. *Soil Biology and Biochemistry* **58**: 136–139.
- Brundrett MC, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996.** Working with mycorrhizas in forestry and agriculture.
- Brundrett MC. 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.
- Bruneau A, Forest F, Herendeen P. 2001.** Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Fabaceae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Systematic Botany* **26**: 487–514.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW. 1991.** Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **22**: 525–564.
- Bullock SH. 1986.** Climate of Chamela, Jalisco, and trends in the south coastal region of Mexico. *Archives for Meteorology, Geophysics and Bioclimatic, Serie B* **36**: 297–316.
- Bullock S, Solís-Magallanes J. 1990.** Phenology of canopy trees of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* **22**: 22–35.
- Burgess KS, Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Graham SW, Husband BC, Newmaster SG, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SCH. 2011.** Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcL+matK* DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution* **2**: 333–340.
- Buyck B, Thoen D, Watling R. 1996.** Ectomycorrhizal fungi of the Guinea–Congo Region. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B. Biological Sciences* **104**: 313–333.
- Campo-Alves J. 2003.** Disponibilidad y flujos de nutrientes en una toposecuencia con bosque tropical seco en México. *Agrociencia* **37**: 211–219.



**Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Espinosa-Hernández V, Almaraz-Suárez J, Quintero-Lizaola R, Torres-Aquino M. 2010.** Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* **1**: 567–577.

**Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Espinosa-Hernández V, Almaraz-Suárez JJ, Quintero-Lizaola R, Torres Aquino M. 2011.** Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural* **84**: 83–96.

**Castellanos Albores J. 1998.** Efecto de la roza, tumba y quema sobre la dinámica de las raíces finas de una selva baja caducifolia. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. México.

**CBOL Plant Working Group. 2009.** A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 12794–7.

**Ceccon E. 2013.** Restauración en bosques tropicales: fundamentos ecológicos, prácticos y teóricos. Editorial Centro Regional de Investigaciones Interdisciplinarias, Universidad Nacional Autónoma de México y Díaz de Santos. México.

**Chapman SK, Langley JA, Hart SC, Koch GW. 2006.** Plants actively control nitrogen cycling: uncorking the microbial bottleneck. *New Phytologist* **169**: 27–34.

**Chase M, Cowan R, Hollingsworth PM, van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jorgensen T, Cameron K, Carine M, et al. 2007.** A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* **56**: 295–299.

**Chuyong G, Newbery D, Songwe N. 2000.** Litter nutrients and retranslocation in a central African rain forest dominated by ectomycorrhizal trees. *New Phytologist* **148**: 493–510.

**Cornelissen J, Aerts R, Cerabolini B, Werger M, van der Heijden M. 2001.** Carbon cycling traits of plant species are linked with mycorrhizal strategy. *Oecologia* **129**: 611–9.

**Cotler H, Durán E, Siebe C. 2002.** Caracterización morfo-edafológica y calidad de sitio de un bosque tropical caducifolio. In: Noguera FA, Vega Rivera JH, García Aldrete AN, Quesada Avendaño M. Historia Natural de Chamela. Instituto de Biología, UNAM. México. p. 17–79.

**Cox B. 2001.** The biogeographic regions reconsidered. *Journal of Biogeography* **28**: 511–523.

**Cuevas E. 1995.** Biology of the belowground system of tropical dry forests. In: Bullock SH, Mooney HA, Medina E. Seasonally dry tropical forests. Cambridge University Press, Great Britain.

**Del-Prado R, Cubas P, Lumbsch HT, Divakar PK, Blanco O, de Paz GA, Molina MC, Crespo A. 2010.** Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of Parmeliaceae (Ascomycota) as a tool for taxon delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**: 125–33.

**Dell B, Sanmee R, Lumyong P, Lumyong S. 2005.** Ectomycorrhizal fungi in dry and wet dipterocarp forests in northern Thailand—diversity and use as food. *Proceeding of the 8th Round-Table Conference on Dipterocarps. Ho Chi Minh City, Vietnam*: 1–11.

**Delgado-Salinas A, Bibler R, Lavin M. 2006.** Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Fabaceae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany* **31**: 779–791.

**Diédhiou AG, Selosse M-A, Galiana A, Diabaté M, Dreyfus B, Bâ AM, De Faria SM, Béna G. 2010.** Multi-host ectomycorrhizal fungi are predominant in a Guinean tropical rainforest and shared between canopy trees and seedlings. *Environmental microbiology* **12**: 2219–32.

**Dirzo R, Raven PH. 2003.** Global state of Biodiversity and loss. *Annual Review of Environment and Resources* **28**: 137–167.

**Dirzo R, Young HS, Mooney HA, Ceballos G. 2011.** Seasonally Dry Tropical Forests: ecology and conservation. Island Press

**Ducouso M, Ramanankierana H, Duponnois R, Rabévohitra R, Randrihasipara L, Vincelette M, Deyfrus B, Prin Y. 2008.** Mycorrhizal status of native trees and shrubs from eastern Madagascar littoral forests with special emphasis on one new ectomycorrhizal endemic family, the Asteropeiaceae. *New Phytologist* **178**: 233–238.

**Durán E, Balvanera P, Lott E, Segura G, Pérez-Jiménez A, Islas A, Franco M. 2002.** Estructura, composición y dinámica de la vegetación. In: Noguera FA, Vega Rivera JH, García Aldrete AN, Quesada Avendaño M. Historia Natural de Chamela. Instituto de Biología, UNAM. México. p. 443–472.

**El Karkouri K, Murat C, Zampieri E, Bonfante P. 2007.** Identification of internal transcribed spacer sequence motifs in truffles: a first step toward their DNA bar coding. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5320–30.

**Fassi B. 1957.** Ectomycorhize chez le *Gnetum africanum* Welw. due à *Scleroderma* sp. *Bulletin de la Société Mycologique de France* **73**: 280–285.

**Fassi B, 1960.** The distribution of ectotrophic mycorrhizae in the litter and upper soil layer of *Gilbertiodendron dewevrei* (Caesalpinaceae) forest in the Congo. In: Mycorrhizae, Internationales Mykorrhizas symposium., pp 297–302.

**Fassi B, Fontana A. 1961.** Le micorrize ectotrofiche di *Julbernardia seretii*, Caesalpiniaceae del Congo. *Allionia* **7**: 131–157.

**Fassi B, Fontana A. 1962.** Mycorrhize ectotrofiche di *Brachystegia laurentii* e di alcune altre di Caesalpiniaceae minori del Congo. *Allionia* **8**: 121–131.

**Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SCH. 2008.** Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PloS one* **3**: e2802.

**Flores-Pastor T. 2000.** Disponibilidad de nutrimentos, diseño funcional de raíces y tasa de crecimiento en 39 especies de plántulas de la selva baja caducifolia de Chamela, Jalisco, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México.

**Frank A. 2005.** On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* **15**: 267–75.

**Frioni L, Minasian H, Volfovicz R. 1999.** Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. *Forest ecology and management* **115**: 41–47.

**Fulgenzi TD, Henkel TW, Halling RE. 2007.** *Tylopilus orsonianus* sp. nov. and *Tylopilus eximius* from Guyana. *Mycologia* **99**: 622–7.

**Fulgenzi TD, Halling RE, Henkel TW. 2010.** *Fistulinella cinereoalba* sp. nov. and new distribution records for *Austroboletus* from Guyana. *Mycologia* **102**: 224–232.

**Garibay-Orijel R, Morales-Marañón E, Domínguez-Gutiérrez M, Flores-García A. 2013.** Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **84**: 153–169.

**García-Guzmán OM. 2014.** Estudio de la diversidad genética de comunidades de hongos ectomicorrízicos asociados a encinos en la Cuenca de Cuitzeo, Michoacán. Tesis de Maestría. Instituto de Biología UNAM, México, D.F.

**García-Méndez G, Maass JM, Matson PA, Vitousek PM. 1995.** Nitrogen transformations and nitrous oxide flux in a tropical deciduoud forest in Mexico. *Oecologia* **88**: 362–366.

**García-Oliva F, Maass JM, Galicia L. 1995.** Rainstorm analysis and rainfall of a seasonal tropical region with a strong cyclonic influence on the Pacific Coast of Mexico. *Journal of Applied Meteorology* **34**: 2491–98.

**García-Oliva F, Camou A, Maas JM. 2002.** El clima de la región central de la costa del Pacífico mexicano. *In:* Noguera FA, Vega Rivera JH, García Aldrete AN, Quesada Avendaño M. Historia Natural de Chamela. Instituto de Biología, UNAM. México. p. 3–10.

**Gardes M, Bruns T. 1993.** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**: 113–118.

**Gentry AH. 1988.** Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographic gradients. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **75**: 1–34.

**Gordon JE, Hawthorne WD, Reyes-García A, Sandoval G, Barrance AJ. 2004.** Assessing landscapes: a case of study of tree and shrub diversity in the seasonally dry tropical forests of Oaxaca, Mexico and southern Honduras. *Biological Conservation* **117**: 429–442.

**Gotelli N, Colwell R. 2001.** Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology letters* **4**: 379–391.

**Green JJ, Newbery DM. 2002.** Reproductive investment and seedling survival of the mast-fruiting rain forest tree, *Microberlinia bisulcata* A. chev. *Plant Ecology* **162**: 169–183.

**Guzmán G. 2004.** Los hongos de la Península de Yucatán (México). V. Nuevas observaciones y nuevos registros. *Revista Mexicana de Micología* **18**: 7–12.

**Guzmán G, Bandala V, Montoya L. 1994.** *Tricholosporum* in Mexico and description of a new species. *Mycotaxon* **50**: 355–363.

**Haider N. 2011.** Chloroplast-specific universal primers and their uses in plant studies. *Biologia Plantarum* **55**: 225–236.

**Halling RE. 2001.** Ectomycorrhizae: co-evolution, significance and biogeography. *Annals-Missouri Botanical Garden* **88**: 5-13.

**Hartshorn GS. 1988.** Tropical and subtropical vegetation of Meso-America. *In:* Barbour MG, Billings WD. North American terrestrial vegetation. Cambridge University Press, Great Britain.

**Hasselquist NJ, Douhan GW, Allen MF. 2011.** First report of the ectomycorrhizal status of boletes on the Northern Yucatan Peninsula, Mexico determined using isotopic methods. *Mycorrhiza* **21**: 465–71.

**Haug I, Lempe J, Homeier J. 2004.** *Graffenrieda emarginata* (Melastomataceae) forms mycorrhizas with *Glomeromycota* and with a member of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate in the organic soil of. *Canadian Journal of Botany/Journal of Botany* **82**: 340–356.

**Haug I, Weiss M, Homeier J, Oberwinkler F, Kottke I. 2005.** Russulaceae and Thelephoraceae form ectomycorrhizas with members of the Nyctaginaceae (Caryophyllales) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. *New phytologist* **165**: 923–36.

**Haug I, Kottke I, Suárez JP. 2014.** Ectomycorrhizas of tree species of Nyctaginaceae in the tropical mountain rain forest of South Ecuador. *En: Bâ AM, McGuire KL, Diédhiou AG. Ectomycorrhizal symbioses in Tropical and Neotropical Forests.* CRC Press, Taylor & Francis Group.

**Hayward JA, Horton TR. 2012.** Edaphic factors do not govern the ectomycorrhizal specificity of *Pisonia grandis* (Nyctaginaceae). *Mycorrhiza* **22**: 647–52.

**Henkel TW, Terborgh J, Vilgalys RJ. 2002.** Ectomycorrhizal fungi and their leguminous hosts in the Pakaraima Mountains of Guyana. *Mycological Research* **106**: 515–531.

**Henkel TW. 2003.** Monodominance in the ectomycorrhizal *Dicymbe corymbosa* (Caesalpiniaceae) from Guyana. *Journal of Tropical Ecology* **19**: 417–437.

**Henkel TW, Mayor JR, Woolley LP. 2005.** Mast fruiting and seedling survival of the ectomycorrhizal, monodominant *Dicymbe corymbosa* (Caesalpiniaceae) in Guyana. *New Phytologist* **167**: 543–56.

**Henkel TW, James TY, Miller SL, Aime MC, Miller OK. 2006a.** The mycorrhizal status of *Pseudotulostoma volvata* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota). *Mycorrhiza* **16**: 241–244.

**Henkel TW, Aime MC, Mehl H, Miller SL. 2006b.** *Cantharellus pleurotoides*, a new and unusual basidiomycete from Guyana. *Mycological research* **110**: 1409–12.

**Henkel TW, Aime MC, Chin MML, Miller SL, Vilgalys R, Smith ME. 2011.** Ectomycorrhizal fungal sporocarp diversity and discovery of new taxa in *Dicymbe* monodominant forests of the Guiana Shield. *Biodiversity and Conservation* **21**: 2195–2220.

**Hernández-Cuevas L, Castillo-Agüero S, Guadarrama-Chávez P, Martínez-Orea Y, Romero-Romero MA, Sánchez Gallén I. 2003.** Hongos micorrizógenos arbusculares del Pedregal de San Ángel. Facultad de Ciencias, UNAM.

**Hibbett DS, Taylor JW. 2013.** Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? *Nature reviews. Microbiology* **11**: 129–133.

**Hillebrand H. 2004.** On the generality of the latitudinal diversity gradient. *The American Naturalist* **163**: 192–211.

**Houghton RA, Lefkowitz DS, Skole DL. 1991.** Changes in the landscape of Latin America between 1850 and 1985. I. Progressive loss of forest. *Forest Ecology and Management* **38**: 143–172.

**Högberg P. 1982.** Root symbioses of trees in African dry tropical forests. *Journal of Vegetation Science* **3**: 393–400.

**Högberg P, Pearce G. 1986.** Mycorrhizas in Zambian trees in relation to host taxonomy, vegetation type and successional patterns. *Journal of Ecology* **74**: 775–785.

**Holbrook NM, Whitbeck JL, Mooney HA. 1995.** Drought responses of Neotropical dry forest trees. *In*: Bullock SH, Mooney HA, Medina E. Seasonally dry tropical forests. Cambridge University Press, Great Britain.

**Hollingsworth ML, Andra Clark A, Forrest LL, Richardson J, Pennington RT, Long DG, Cowan R, Chase MW, Gaudeul M, Hollingsworth PM. 2009.** Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources* **9**: 439–57.

**Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. 2011.** Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS one* **6**: e19254.

**Horton TR, Bruns TD. 2001.** The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular ecology* **10**: 1855–71.

**Hu JM, Lavin M, Wojciechowski MF, Sanderson MJ. 2000.** Phylogenetic systematics of the tribe Millettieae (Fabaceae) based on chloroplast *trnK/matK* sequences and its implications for evolutionary patterns in Papilionoideae. *American journal of botany* **87**: 418–30.

**Ishida TA, Nara K, Hogetsu T. 2007.** Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytologist* **174**: 430–40.

**Janos D. 1980.** Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica* **12**: 56–64.

**Jaramillo JV, Sanford RL Jr. 1995.** Nutrient cycling in tropical deciduous forests. *In*: Bullock SH, Mooney HA, Medina E. Seasonally dry tropical forests. Cambridge University Press, Great Britain.

**Kennedy PG, Matheny PB, Ryberg KM, Henkel TW, Uehling JK, Smith ME. 2012.** Scaling up: examining the macroecology of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* **21**: 4151–4.

**Kõljalg U, Larsson K-H, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjoller R, Larsson E, *et al.* 2005.** UNITE: a database providing

web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **166**: 1063–8.

**Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, et al. 2013.** Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* **22**: 5271–7.

**Kottke I, Haug I. 2004.** The significance of mycorrhizal diversity of trees in the tropical mountain forest of southern Ecuador. *Lyonia* **7**: 49–56.

**Kreisel K. 1971.** Clave para la identificación de los macromicetos de Cuba. La Habana: Ser. A, Ciencias Biológicas 16, Universidad de la Habana, p. 101.

**Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer E a, Weigt L a, Janzen DH. 2005.** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8369–74.

**Kress WJ, Erickson DL. 2007.** A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PloS one* **2**: e508.

**Lal CB, Annapurna C, Raghubanshi AS, Singh JS. 2001.** Foliar demand and resource economy of nutrients in dry tropical forests species. *Journal of Vegetation Science* **12**: 5–14.

**Lambers H, Chapin III FS, Pons TL. 2008a.** Plant Physiological Ecology. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer Verlag.

**Lambers H, Raven JA, Shaver GR, Smith SE. 2008b.** Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in ecology & evolution* **23**: 95–103.

**Lambert JDH, Arnason JT, Gale JL. 1980.** Leaf-litter and changing nutrient levels in a seasonally dry tropical hardwood forest, Belize, C.A. *Plant and Soil* **55**: 429–433.

**Lamus V, Montoya L, Aguilar CJ, Bandala VM, Ramos D. 2012.** Ectomycorrhizal association of three *Lactarius* species with *Carpinus* and *Quercus* trees in a Mexican montane cloud forest. *Mycologia* **6**: 1261-1266.

**Landim de Souza M. 2003.** Brazilian Atlantic Rainforest Remnants and Mycorrhizal Symbiosis–Implications for Reforestation A case study in Sergipe, Northeast Brazil. Tesis doctoral. Bremen, Alemania.

**Lentendu G, Zinger L, Manel S, Coissac E, Choler P, Geremia RA, Melodelima C. 2011.** Assessment of soil fungal diversity in different alpine tundra habitats by means of pyrosequencing. *Fungal Diversity* **49**: 113–123.

- Lilleskov EA, Bruns TD. 2005.** Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs. *Mycologia* **97**: 762–9.
- Lott EJ, Atkinson TH. 2002.** Biodiversidad y fitogeografía de Chamela-Cuixmala, Jalisco. In: Noguera FA, Vega Rivera JH, García Aldrete AN, Quesada Avendaño M. Historia Natural de Chamela. Instituto de Biología, UNAM. México. p. 83–97.
- Lott EJ. 1993.** Annotated checklist of the vascular flora of the Chamela Bay region. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences* **148**: 1–60.
- Lott EJ. 1985.** Listados Florísticos de México. III. La Estación de Biología Chamela, Jalisco. Instituto de Biología, UNAM.
- Lott EJ, Bullock SH, Solís Magallanes JA. 1987.** Floristic diversity and structure of upland and arroyo forests of coastal Jalisco. *Biotropica* **19**: 228–235.
- Lunt PH, Hedger JN. 1996.** A survey of mycorrhizal infection of trees in the terra firme rainforest, Cuyabeno, Ecuador. *Mycologist* **10**: 161–165.
- MacArthur RH, Wilson EO. 1967.** The theory of island biogeography. Princeton University Press.
- Maddison WP, Maddison DR. 2008.** Mesquite: a modelar system for evolutionary analysis. Version 2.71 <http://mesquiteproject.org>; último acceso en: 15/10/2014
- Mangan SA, Schnitzer SA, Herre EA, Mack KM, Valencia MC, Sánchez EI, Bever JD. 2010.** Negative plant-soil feedback predicts tree-species relative abundance in a tropical forest. *Nature* **466**: 752–755.
- Martínez-García J. 1985.** Achatocarpaceae. En: Flora de Veracruz, Fascículo 45. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Xalapa, Veracruz, México.
- Martínez-Trinidad S, Cotler H, Etchevers-Barra JD, Ordaz-Chaparro VM, De León-González F. 2008.** Efecto del manejo en la agregación del suelo en un ecosistema tropical seco. *Terra Latinoamericana* **26**: 299–307.
- Martínez-Yrizar A, Sarukhán J. 1990.** Litterfall patterns on a tropical deciduous forest in Mexico over a dive year period. *Journal of Tropical Ecology* **6**: 433–444.
- Martínez-Yrizar A, Sarukhán J. 1993.** Cambios estacionales del mantillo en el suelo de un bosque tropical caducifolio y subcaducifolio en Chamela, Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana* **21**: 1–6.
- Matheny PB, Aime MC, Bougher NL, Buyck B, Desjardin DE, Horak E, Kropp BR, Lodge DJ, Soyong K, Trappe JM, et al. 2009.** Out of the Palaeotropics? Historical



biogeography and diversification of the cosmopolitan ectomycorrhizal mushroom family Inocybaceae. *Journal of Biogeography* **36**: 577–592.

**Maruyama T, Birky Jr. C. 1991.** Effects of periodic selection on gene diversity in organelle genomes and other systems without recombination. *Genetics* **127**: 449–451.

**Matz M V, Nielsen R. 2005.** A likelihood ratio test for species membership based on DNA sequence data. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **360**: 1969–74.

**McGuire K. 2007.** Common ectomycorrhizal networks may maintain monodominance in a tropical rain forest. *Ecology* **88**: 567–574.

**McGuire KL, Henkel TW, Granzow de la Cerda I, Villa G, Edmund F, Andrew C. 2008.** Dual mycorrhizal colonization of forest-dominating tropical trees and the mycorrhizal status of non-dominant tree and liana species. *Mycorrhiza* **18**: 217–222.

**McGuire KL, Allison SD, Fierer N, Treseder KK. 2013.** Ectomycorrhizal-dominated boreal and tropical forests have distinct fungal communities, but analogous spatial patterns across soil horizons. *PloS one* **8**: e68278.

**Medina Lemos R. 2009.** Achatocarpaceae. En: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Fascículo 73. Instituto de Biología, Departamento de Botánica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

**Méndez-Neri M, Pérez-Moreno J, Quintero-Lizaola, Hernández-Acosta E, Lara-Herrera A. 2011.** Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana* **29**: 73–81.

**Miles L, Newton AC, DeFries RS, Ravilious C, May I, Blith S, Kapos V, Gordon JE. 2006.** A global overview of the conservation status of tropical dry forest. *Journal of Biogeography* **33**: 491–505.

**Miller OK, Lodge DJ, Baroni TJ. 2000.** New and interesting ectomycorrhizal fungi from Puerto Rico, Mona, and Guana Islands. *Mycologia* **92**: 558–570.

**Miller OK, Henkel TW, James TY, Miller SL. 2001.** *Pseudotulostoma*, a remarkable new volvate genus in the Elaphomycetaceae from Guyana *Mycological Research* **105**: 1268–1272.

**Miller OK, Lodge DJ, Baroni TJ, Jun NM. 2007.** New and interesting ectomycorrhizal fungi from Puerto Rico, Mona, and Guana Islands. *Mycologia* **92**: 558–570.

**Morris MH, Smith ME, Rizzo DM, Rejmánek M, Bledsoe CS. 2008.** Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. *New Phytologist* **178**: 167–76.

- Morris MH, Pérez-Pérez MA, Smith ME, Bledsoe CS. 2009.** Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a tropical cloud forest. *FEMS Microbiology Ecology* **69**: 274–287.
- Moyersoen B. 1993.** Ectomicorrizas y micorrizas vesículo-arbusculares en Caatinga Amazonica del Sur de Venezuela. *Scientia Guianae* **31**: 1–82.
- Moyersoen B. 2006.** *Pakaraimaea dipterocarpacea* is ectomycorrhizal, indicating an ancient Gondwanaland origin for the ectomycorrhizal habit in Dipterocarpaceae. *New Phytologist* **172**: 753–62.
- Moyersoen B. 2012.** Dispersion, an Important Radiation Mechanism for Ectomycorrhizal Fungi in Neotropical Lowland Forests? *In*: Sudarshana P. Tropical Forests. InTech.
- Moyersoen B, Becker P, Alexander I. 2001.** Are ectomycorrhizas more abundant than arbuscular mycorrhizas in tropical heath forests? *New Phytologist* **150**: 591–599.
- Murphy PG, Lugo AE. 1986.** Ecology of tropical dry forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**: 67–88.
- Newbery D, Alexander I. 1988.** Ectomycorrhizal rainforest legumes and soil phosphorus in Korup National Park, Cameroon. *New Phytologist* **109**: 433–450.
- Newbery D, Alexander I, Rother J. 2000.** Does proximity to conspecific adults influence the establishment of ectomycorrhizal trees in rain forest? *New Phytologist* **147**: 401–409.
- Nilsson R, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H. 2008.** Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* **4**: 193–201.
- Noguera FA, Vega Rivera JH, García Aldrete AN. 2002.** Introducción. *In*: Noguera FA, Vega Rivera JH, García Aldrete AN, Quesada Avendaño M. Historia Natural de Chamela. UNAM, México D.F.
- Oberwinkler F, Riess K, Bauer R, Garnica S. 2014.** Morphology and molecules: the Sebaciniales, a case study. *Mycological Progress* **13**: 445–470.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R. 2012.** Vegan: Community ecology package. <http://veganr-forgerproject.org/>; ultimo acceso en: 15/10/2014.
- Onguene N, Kuyper T. 2001.** Mycorrhizal associations in the rain forest of South Cameroon. *Forest Ecology and Management* **140**: 277–287.
- Ortiz-Santana B, Lodge DJ, Baroni TJ, Both EE. 2007.** Boletes from Belize and the Dominican Republic. *Fungal Diversity* **27**: 247–416.

- Overall A, Mottram K. 2006.** *Podoscypha multizonata*. *Field Mycology* 7: 82–84.
- Pagel M, Meade A. 2006.** Bayesian analysis of correlated evolution of discrete characters by reversible-jump Markov chain Monte Carlo. *The American Naturalist* 167: 808–25.
- Padilla-Velarde E, Cuevas-Guzmán R, Ibarra-Manríquez G, Moreno-Gómez S. 2006.** Riqueza y biogeografía de la flora arbórea del estado de Colima, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77: 271-295.
- Panwittayakul C, Srikampol Y. 2006.** Taxonomy study of family Rubiaceae at Phitsanulok wildlife development and extensive conservation station. Dissertation, Naresuan University.
- Peay KG, Bruns TD, Kennedy PG, Bergemann SE, Garbelotto M. 2007.** A strong species-area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecology letters* 10: 470–480.
- Peay KG, Kennedy PG, Davies SJ, Tan S, Bruns TD. 2010.** Potential link between plant and fungal distributions in a dipterocarp rainforest: community and phylogenetic structure of tropical ectomycorrhizal fungi across a plant and soil ecotone. *New Phytologist* 185: 529–542.
- Pegler DN. 1983.** Agaric flora of the Lesser Antilles. *Kew Bulletin Additional Series* 9: 575–576.
- Perea-Estrada VM, Pérez-Moreno J, Villarreal Ruiz L, Trinidad Santos A, de Bauer ML, Cetina Aclacá VM, Tijerina Chávez L. 2009.** Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 32: 93–102.
- Peterson RL, Massicote HB, Melville LH. 2004.** Mycorrhizas: anatomy and cell biology. NRC Research Press, Ottawa, Canada.
- Phosri C, Pölme S, Taylor AFS, Kõljalg U, Suwannasai N, Tedersoo L. 2012.** Diversity and community composition of ectomycorrhizal fungi in a dry deciduous dipterocarp forest in Thailand. *Biodiversity and Conservation* 21: 2287–2298.
- Pölme S, Bahram M, Yamanaka T, Nara K, Dai YC, Grebenc T, Kraigher H, Toivonen M, Wang P-H, Matsuda Y, et al. 2013.** Biogeography of ectomycorrhizal fungi associated with alders (*Alnus* spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global scale. *New Phytologist* 198: 1239–1249.
- Quesada M, Sanchez-Azofeifa GA, Alvarez-Añorve M, Stoner KE, Avila-Cabadilla L, Calvo-Alvarado J, Castillo A, Espírito-Santo MM, Fagundes M, Fernandes GW, et al. 2009.** Succession and management of tropical dry forests in the Americas: Review and new perspectives. *Forest Ecology and Management* 258: 1014–1024.

**R Core Development Team. 2007.** R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna

**Ramanankierana N, Ducouso M, Rakotoarimanga N, Prin Y, Thioulouse J, Randrianjohany E, Ramaroson L, Kisa M, Galiana A, Duponnois R. 2007.** Arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas of *Uapaca bojeri* L. (Euphorbiaceae): sporophore diversity, patterns of root colonization, and effects on seedling growth and soil microbial catabolic diversity. *Mycorrhiza* **17**: 195–208.

**Ramírez-López I, Villegas-Ríos M, Cano-Santana Z. 2012.** Diversidad de Agaricomycetes clavarioides en la Estación de Biología de Chamela, Jalisco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **83**: 1084–1095.

**Ramírez-López I, Villegas-Ríos M, Cano-Santana Z. 2013.** Phenotypic plasticity of the basidiomata of *Thelephora* sp. (Thelephoraceae) in tropical forest habitats. *Revista de Biología Tropical* **61**: 343–350.

**Ramírez-López I, Villegas-Ríos M, Salas-Lizana R, Garibay-Orijel R, Alvarez-Manjarrez J.** en proceso. *Thelephora versatilis* and *Thelephora pseudoversatilis*: two new cryptic species with polymorphic basidiomes inhabiting tropical deciduous and sub-perennial forests of the Mexican Pacific coast.

**Raspor P, Zupan J. 2006.** Yeasts in extreme environments. In: Rosa CA, Péter G. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

**Redhead JF. 1968.** Mycorrhizal associations in some Nigerian forest trees. *Transactions of the British Mycological Society* **51**: 377–387.

**Reid DA. 1977.** Some Gasteromycetes from Trinidad and Tobago. *Kew Bull* **31**: 657–690.

**Reverchon F, Ortega-Larrocea MDP, Pérez-Moreno J, Peña-Ramírez VM, Siebe C. 2010.** Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, Mexico. *Canadian Journal of Forest Research* **40**: 1165–1174.

**Richard F, Millot S, Gardes M, Selosse M. 2005.** Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* **166**: 1011–23.

**Rincón E, Huante P. 1994.** Influence of mineral nutrient availability on growth of tree seedlings from the tropical deciduous forest. *Structure and Function* **9**: 93–97.

**Riviere T, Diedhiou A, Diabate M. 2007.** Genetic diversity of ectomycorrhizal Basidiomycetes from African and Indian tropical rain forests. *Mycorrhiza* **17**: 415–428.

**Rinaldi A, Comandini O, Kuyper T. 2008.** Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* **33**: 1–45.

**Roberts P. 2008.** Heterobasidiomycetes from Belize. *Kew Bulletin* **63**: 87–99.

**Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.

**Ryberg M, Nilsson RH, Kristiansson E, Töpel M, Jacobsson S, Larsson E. 2008.** Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: a case study in *Inocybe* (Basidiomycota). *BMC Evolutionary Biology* **8**: 50.

**Rzedowski J. 1973.** Geographical relationships of the flora of Mexican dry regions. *In*: Graham A. Vegetation and vegetational history of northern Latin America. Elsevier, New York.

**Rzedowski J. 1978.** Vegetación de México. Ed. Limusa, México.

**Rzedowski J. 1991.** Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica* **14**: 3–21.

**Rzedowski J, Calderón de Rzedowski G. 2013.** Datos para la apreciación de la flora fanerogámica del bosque tropical caducifolio de México. *Acta Botánica Mexicana* **102**: 1–23.

**Salas-Morales SH, Schibli L, Nava-Zafra A, Saynes-Vásquez A. 2007.** Flora de la costa de Oaxaca, México (2): Lista florística comentada del Parque Nacional de Huatulco. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **81**: 101-130.

**Sandoval-Zapotitla E. 2005.** Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38. Instituto de Biología, UNAM, México.

**Sanon K, Bâ A, Dexheimer J. 1997.** Mycorrhizal status of some fungi fruiting beneath indigenous trees in Burkina Faso. *Forest Ecology and Management* **98**: 61–69.

**Sanon A, Andrianjaka ZN, Prin Y, Bally R, Thioulouse J, Comte G, Duponnois R. 2009.** Rhizosphere microbiota interferes with plant-plant interactions. *Plant and Soil* **321**: 259–278.

**Schaaf P. 2002.** Geología y geofísica de la costa de Jalisco. *In*: Noguera FA, Vega Rivera JH, García Aldrete AN, Quesada Avendaño M. Historia Natural de Chamela. UNAM, México D.F. p. 11–16.

**Scotland R, Wortley A. 2003.** How many species of seed plants are there? *Taxon*: 101–104.

**Selosse M-A, Bauer R, Moyersoén B. 2002.** Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. *New Phytologist* **155**: 183–195.

**Setaro SD, Garnica S, Herrera PI, Suárez JP, Göker M. 2011.** A clustering optimization strategy to estimate species richness of *Sebacinales* in the tropical Andes based on molecular sequences from distinct DNA regions. *Biodiversity and Conservation* **21**: 2269–2285.

**Shaw J, Lickey E, Beck J, Farmer S, Liu W, Miller J, Siripun K, Winder C, Schilling E, Small R. 2005.** The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **92**: 142–166.

**Shaw J, Lickey E, Schilling E, Small R. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* **94**: 275–288.

**Sierra S, Rodríguez-Gutiérrez I, Izquierdo-San Agustín L, Castro-Santiuste S, Cifuentes J, Pérez-Ramírez L. 2012.** Hongos tremeloides (Heterobasidiomycetes) de la Reserva de la Biosfera de Calakmul, Campeche, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **83**: 23–30.

**Singer R. 1953.** Four years of mycological work in southern South America. *Mycologia* **45**: 865–891.

**Singer R, Araujo IJS. 1979.** Litter decomposition and ectomycorrhiza in Amazonian forests I. A comparison of litter decomposing and ectomycorrhizal Basidiomycetes in latosol-terra-firme rain forest and white podzol campinarana. *Acta Amazonica* **9**: 25–41.

**Singh JS, Raghubanshi AS, Singh RS, Srivastava SC. 1989.** Microbial biomass acts as a source of plant nutrients in dry tropical forest and savanna. *Nature* **338**: 499–500.

**Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM. 2007a.** Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist* **174**: 847–63.

**Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM. 2007b.** Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus* woodland. *Mycorrhiza* **18**: 15–22.

**Smith ME, Douhan GW, Fremier AK, Rizzo DM. 2009.** Are true multihost fungi the exception or the rule? Dominant ectomycorrhizal fungi on *Pinus sabiniana* differ from those on co-occurring *Quercus* species. *New Phytologist* **182**: 295–9.

**Smith ME, Pfister DH. 2009.** Tuberculate ectomycorrhizae of angiosperms: the interaction between *Boletus rubropunctus* (Boletaceae) and *Quercus* species (Fagaceae) in the United States and Mexico. *American Journal of Botany* **96**: 1665–1675.

**Smith ME, Henkel TW, Catherine Aime M, Fremier AK, Vilgalys R. 2011.** Ectomycorrhizal fungal diversity and community structure on three co-occurring leguminous canopy tree species in a Neotropical rainforest. *New Phytologist* **192**: 699–712.

**Smith ME, Henkel TW, Uehling JK, Fremier AK, Clarke HD, Vilgalys R. 2013.** The ectomycorrhizal fungal community in a neotropical forest dominated by the endemic dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PloS one* **8**: e5516

**Smith SE, Read DJ. 1997.** Mycorrhizal symbiosis. 2<sup>nd</sup> edition. Academic press.

**Smith SE, Read DJ. 2008.** Mycorrhizal symbiosis. 3<sup>rd</sup> edition. Academic press.

**Solís E. 1993.** Características físico-químicas de un suelo en un ecosistema tropical estacional. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F.

**Sotuyo S, Delgado-Salinas A, Chase MW, Lewis GP, Oyama K. 2007.** Cryptic speciation in the *Caesalpinia hintonii* complex (Fabaceae: Caesalpinioideae) in a seasonally dry Mexican forest. *Annals of Botany* **100**: 1307–14.

**St John TV. 1980.** A survey of mycorrhizal infection in an Amazonian rain forest. *Acta Amazonica* **10**: 527–533.

**Stebbins GL. 2013.** The Genetic Approach to Problems of Rare and Endemic Species. *Madroño* **60**: 302–319.

**Suvi T, Tedersoo L, Abarenkov K, Beaver K, Gerlach J, Koljalg U. 2010.** Mycorrhizal symbionts of *Pisonia grandis* and *P. sechellarum* in Seychelles: identification of mycorrhizal fungi and description of new *Tomentella* species. *Mycologia* **102**: 522–533.

**Swofford DL. 2003.** PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

**Tarbelet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105–9.

**Tarbelet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermet T, Corthier G, Brochmann C, Willerslev E. 2007.** Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic acids research* **35**: e14.

**Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, evolutionary

distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.

**Taylor A, Alexander I. 2005.** The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* **19**: 102–112.

**Tedersoo L, Hansen K, Perry B a, Kjølner R. 2006.** Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* **170**: 581–96.

**Tedersoo L, Suvi T, Beaver K, Koljalg U. 2007.** Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and hosts shifts from the native *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpinioideae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). *New Phytologist* **175**: 321–333.

**Tedersoo L, Suvi T, Jairus T, Ostonen I, Põlme S. 2009.** Revisiting ectomycorrhizal fungi of the genus *Alnus*: differential host specificity, diversity and determinants of the fungal community. *New Phytologist* **182**: 727–35.

**Tedersoo L, Nara K. 2010.** General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **185**: 351–354.

**Tedersoo L, May TW, Smith ME. 2010a.** Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* **20**: 217–63.

**Tedersoo L, Sadam A, Zambrano M, Valencia R, Bahram M. 2010b.** Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in Western Amazonia, a neotropical biodiversity hotspot. *The ISME Journal* **4**: 465–471.

**Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diédhiou AG, Henkel TW, Kjølner R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KG, et al. 2012a.** Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* **21**: 4160–70.

**Tedersoo L, Naadel T, Bahram M, Pritsch K, Buegger F, Leal M, Kõljalg U, Põldmaa K. 2012b.** Enzymatic activities and stable isotope patterns of ectomycorrhizal fungi in relation to phylogeny and exploration types in an afro-tropical rain forest. *New Phytologist* **195**: 832–43.

**Tedersoo L, Põlme S. 2012.** Infrageneric variation in partner specificity: multiple ectomycorrhizal symbionts associate with *Gnetum gnemon* (Gnetophyta) in Papua New Guinea. *Mycorrhiza* **22**: 663–8.

**Tedersoo L, Bahram M, Dickie IA. 2014.** Does host plant richness explain diversity of ectomycorrhizal fungi? Re-evaluation of Gao *et al.* (2013) data sets reveals sampling effects. *Molecular Ecology* **23**: 992–5.



**Thacker J, Henkel T. 2004.** New species of *Clavulina* from Guyana. *Mycologia* **96**: 650–657.

**Toju H, Sato H, Tanabe AS. 2014.** Diversity and spatial structure of belowground plant-fungal symbiosis in a mixed subtropical forest of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal plants. *PLoS one* **9**: e86566.

**Torti D, Coley PD. 1999.** Tropical Monodominance: A Preliminary Test of the Ectomycorrhizal Hypothesis. *Biotropica* **31**: 220–228.

**Trappe J. 1962.** Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Botanical Review* **28**: 538–606.

**Trappe JM. 2005.** A.B. Frank and mycorrhizae: is the challenge to evolutionary and ecology theory. *Mycorrhiza* **15**: 277–281.

**Trejo IV. 1998.** Distribución y diversidad de selvas bajas de México; relaciones con el clima y el suelo. Tesis Doctoral, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

**Trejo I, Dirzo R. 2000.** Deforestación of a seasonally dry tropical dry forests: a national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation* **94**: 133–142.

**Uehling JK, Henkel TW, Aime MC, Vilgalys R, Smith ME. 2012.** New species of *Clavulina* (Cantharellales, Basidiomycota) with resupinate and effused basidiomata from the Guiana Shield. *Mycologia* **104**: 547–56.

**Valdés M, Asbjornsen H, Gómez-Cárdenas M, Juárez M, Vogt KA. 2006.** Drought effects on fine-root and ectomycorrhizal–root biomass in managed *Pinus oaxacana* Mirov stands in Oaxaca, Mexico. *Mycorrhiza* **16**: 117–124.

**Valentini A, Miquel C, Nawaz MA, Bellemain E, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Cruaud C, Nascetti G, Wincker P, et al. 2009.** New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Molecular Ecology resources* **9**: 51–60.

**Van den Berg C, Higgins W, Dressler R, Whitten W, Soto Arenas M, Culham A, Chase M. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96–114.

**Veldre V, Abarenkov K, Bahram M, Martos F, Selosse M-A, Tamm H, Kõljalg U, Tedersoo L. 2013.** Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Ecology* **6**: 256–268.

**Vega Aviña R. 2001.** Catálogo y base de datos preliminar de la flora de Sinaloa. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agronomía.

**Villarreal H, Álvarez M, Córdoba S, Escobar F, Fagua G, Gast F, Umaña AM. 2006.** Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. *In: Álvarez M, Córdoba S, Escobar F, Fagua G, Mendonza H, Ospina M, Umaña, AM, Villarreal H. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. pp. 185–226.*

**Villaseñor JL, Ibarra G. 1998.** La riqueza arbórea de México. *Boletín del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara. Epoca 3:* 95–106.

**Vitousek PM, Sanford RL Jr. 1986.** Nutrient cycling in moist tropical forest. *Annual Review of Ecology and Systematics 17:* 137–167.

**Vogt KA, Grier CC, Vogt DJ. 1986.** Production, turnover, and nutrient dynamics of above- and belowground detritus of world forests. *Advances in Ecological Research 15:* 303–377.

**Wang B, Qiu Y-L. 2006.** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza 16:* 299–363.

**Wassen MJ, Venterink HO, Lapshina ED, Tanneberger F. 2005.** Endangered plants persist under phosphorus limitation. *Nature 437:* 547–50.

**Weiß M, Oberwinkler F. 2001.** Phylogenetic relationships in *Auriculariales* and related groups—hypotheses derived from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycological Research 105:* 403–415.

**Weiß M, Selosse M-A, Rexer K-H, Urban A, Oberwinkler F. 2004.** Sebaciales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research 108:* 1003–1010.

**Wells K, Oberwinkler F. 1982.** *Tremelloscypha gelatinosa*, a species of a new family Sebacinaceae. *Mycologia 74:* 325–331.

**White TJ, Bruns T, Lee SJ, Taylor JW. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications 18:* 315–322.

**Wolfe KH, Li WH, Sharp PM. 1987.** Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84:* 9054–8.

**Wolfe B, Parrent J, Koch A, Sikes B, Gardes M, Klironomos J. 2009.** Spatial heterogeneity in mycorrhizal populations and communities: scales and mechanisms. *In:*

Azcón-Aguilar C, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. Mycorrhizas-Functional Processes and Ecological Impact. 167–185.

**Yorou N, Kõljalg U, Sinsin B, Agerer R. 2007.** Studies in African telephoroid fungi: 1. *Tomentella capitata* and *Tomentella brunneocystidia*, two new species from Benin (West Africa) with capitate cystidia. *Mycological Progress* **6**: 7–18.

**Zappi D. 2009.** Neotropical Achatocarpaceae. *In*: Milliken W, Klitgard B, Bacarat A. Neotropikey-Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics.

<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Achatocarpaceae.htm>; último acceso en: 15/10/2014.

## APÉNDICES

**Apéndice I. Lista de especies que se consideraron como posibles hospederos ectomicorrizicos para la EBCh. Tomada de Lott 1983.**

**Fabaceae**

**Papilionoideae**

*Apoplanesia paniculata*  
*Cynometra oaxacana*  
*Gliricidia sepium*  
*Dalbergia congestiflora*  
*Erythrina lanata* var. *occidentalis*  
*Lonchocarpus caudatus*  
*Lonchocarpus cochleatus*  
*Lonchocarpus constrictus*  
*Lonchocarpus eriocarinalis*  
*Lonchocarpus guatemalensis*  
*Lonchocarpus hintonii*  
*Lonchocarpus lanceolatus*  
*Lonchocarpus longipedicellatus*  
*Lonchocarpus magallanesii*  
*Lonchocarpus minor*  
*Lonchocarpus mutans*  
*Lonchocarpus sinaloensis*  
*Machaerium salvadorensis*  
*Macroptilium atropurpureum*  
*Nissolia fruticosa*  
*Nissolia leiogyne*  
*Piptadenia flava*  
*Piscidia carthagenensis*  
*Platymiscium lasiocarpum*  
*Poiretia punctata*  
*Pterocarpus orbiculatus*  
*Styphnolobium* sp.  
*Tephrosia leiocarpa*

*Tephrosia multifolia*

*Tephrosia vicioides*

*Willardia mexicana*

**Caesalpinioideae**

*Bauhinia divaricata*  
*Bauhinia pauletia*  
*Bauhinia subrotundifolia*  
*Bauhinia unguolata*  
*Caesalpinia bonduc*  
*Caesalpinia cacalaco*  
*Caesalpinia caladenia*  
*Caesalpinia coriaria*  
*Caesalpinia eriostachys*  
*Caesalpinia platyloba*  
*Caesalpinia pulcherrima*  
*Caesalpinia sclerocarpa*  
*Cassia hintonii*  
*Conzattia multiflora*  
*Haematoxylum brasiletto*  
*Inga eriocarpa*  
*Poeppigia procera*  
*Senna atomaria*  
*Senna fruticosa*  
*Senna mollissima* var. *glabrata*  
*Senna nicaraguensis*  
*Senna obtusifolia*  
*Senna occidentalis*  
*Senna pallida* var. *geminiflora*  
*Senna pendula* var. *advena*  
*Senna quinquangulata* var. *quinquangulata*  
*Senna uniflora*

*Tamarindus indica*

**Nyctaginaceae**

*Guapira* cf. *macrocarpa*

*Mirabilis longiflora*

*Pisonia aculeata*

*Pisonia macranthocarpa*

**Polygonaceae**

*Antigonon flavescens*

*Antigonon* cf. *leptopus*

*Coccoloba barbadensis*

*Coccoloba liebmannii*

*Coccoloba venosa*

*Coccoloba* aff. *acuminata*

*Polygonum punctatum*

*Polygonum* sp. 1

*Polygonum* sp. 2

*Ruprechtia fusca*

*Ruprechtia pallida*

Apéndice II. Comparación de agrupaciones formadas por los diferentes porcentajes de similitud.

100% de similitud de las agrupaciones			99% de similitud de las agrupaciones			98% de similitud de las agrupaciones		
Reconocimiento taxonómico	No. de secuencias que conforman cada grupo		Reconocimiento taxonómico	No. de secuencias que conforman cada grupo		Reconocimiento taxonómico	No. de secuencias que conforman cada grupo	
<i>Tremelloscypha</i> 1	1	10	<i>Tremelloscypha</i> sp.	1	29	<i>Tremelloscypha</i> sp.	1	29
<i>Thelephora versatilis</i> 1	2	7	<i>Thelephora versatilis</i>	2	13	<i>Thelephora versatilis</i>	2	13
<i>Tremelloscypha</i> 2	3	8	<i>Clavulinaceae</i> sp. 1	3	16	<i>Clavulinaceae</i> sp. 1	3	16
<i>Clavulinaceae</i> 1	4	8	<i>Tomentella</i> sp. 1	4	11	<i>Tomentella</i> sp. 1	4	11
<i>Clavulinaceae</i> 2	5	5	<i>Tomentella</i> sp. 2	5	4	<i>Tomentella</i> sp. 2	5	6
<i>Thelephora versatilis</i> 2	6	3	<i>Tomentella</i> sp. 3	6	4	<i>Tomentella</i> sp. 3	6	4
<i>Russula</i> 1	7	3	<i>Clavulina</i> sp. 1	7	3	<i>Clavulina</i> sp. 1	7	3
<i>Tomentella</i> 1	8	3	<i>Russula</i> sp. 1	8	3	<i>Russula</i> sp. 1	8	3
<i>Tomentella</i> 2	9	3	<i>Thelephora pseudoversatilis</i>	9	2	<i>Thelephora pseudoversatilis</i>	9	2
<i>Thelephora pseudoversatilis</i>	10	2	<i>Inocybe</i> sp. 1	10	2	<i>Inocybe</i> sp. 1	10	2
<i>Tremelloscypha</i> 3	11	3	<i>Clavulina</i> sp. 2	-	1	<i>Clavulina</i> sp. 2	-	1
<i>Tremelloscypha</i> 4	12	3	<i>Clavulina</i> sp. 3	-	1	<i>Clavulina</i> sp. 3	-	1
<i>Tomentella</i> 3	13	2	<i>Clavulina</i> sp. 4	-	1	<i>Clavulina</i> sp. 4	-	1
<i>Tomentella</i> 4	14	2	<i>Entoloma</i> sp.	-	1	<i>Entoloma</i> sp.	-	1
<i>Tomentella</i> 5	15	2	<i>Inocybe</i> sp.2	-	1	<i>Inocybe</i> sp.2	-	1
<i>Clavulina</i> 1	-	1	<i>Russula</i> sp. 2	-	1	<i>Russula</i> sp. 2	-	1
<i>Clavulina</i> 2	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 4	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 4	-	1
<i>Clavulina</i> 3	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 5	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 5	-	1
<i>Clavulina</i> 4	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 6	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 6	-	1
<i>Clavulina</i> 5	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 7	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 7	-	1
<i>Clavulinaceae</i> 3	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 8	-	1			
<i>Clavulinaceae</i> 4	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 9	-	1			
<i>Clavulinaceae</i> 5	-	1						
<i>Entoloma</i> 1	-	1						
<i>Inocybe</i> 1	-	1						
<i>Inocybe</i> 2	-	1						
<i>Inocybe</i> 3	-	1						
<i>Russula</i> 2	-	1						
<i>Thelephoraceae</i>	-	1						
<i>Tomentella</i> 6	-	1						
<i>Tomentella</i> 7	-	1						
<i>Tomentella</i> 8	-	1						

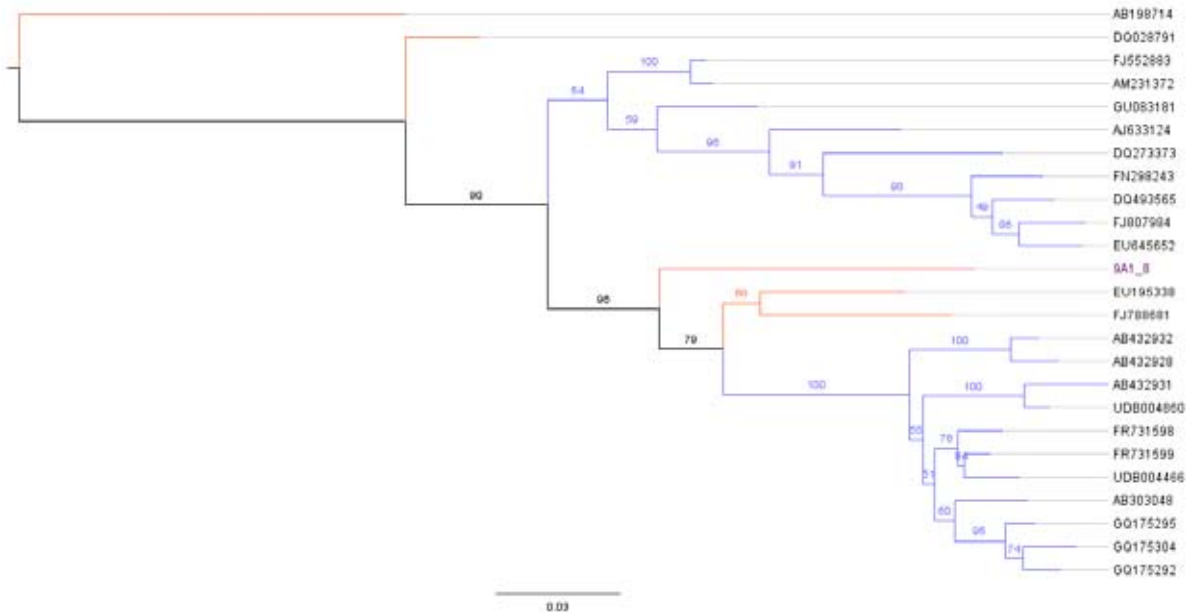
<i>Tomentella</i> 9	-	1
<i>Tomentella</i> 10	-	1
<i>Tomentella</i> 11	-	1
<i>Tomentella</i> 12	-	1
<i>Tomentella</i> 13	-	1
<i>Tomentella</i> 14	-	1
<i>Tomentella</i> 15	-	1
<i>Tomentella</i> 16	-	1
<i>Tomentella</i> 17	-	1
<i>Tomentella</i> 18	-	1
<i>Tomentella</i> 19	-	1
<i>Tomentella</i> 20	-	1
<i>Tremelloscypha</i> 5	-	1
<i>Tremelloscypha</i> 6	-	1
<i>Tremelloscypha</i> 7	-	1
<i>Tremelloscypha</i> 8	-	1

97% de similitud de las agrupaciones			96% de similitud de las agrupaciones			95% de similitud de las agrupaciones		
Reconocimiento taxonómico	No. de secuencias que conforman cada grupo		Reconocimiento taxonómico	No. de secuencias que conforman cada grupo		Reconocimiento taxonómico	No. de secuencias que conforman cada grupo	
<i>Tremelloscypha</i> sp.	1	29	<i>Tremelloscypha</i> sp.	1	29	<i>Tremelloscypha</i> sp.	1	29
<i>Thelephora versatilis</i>	2	13	<i>Thelephora versatilis</i>	2	13	<i>Thelephora</i> cf. <i>versatilis</i> sp. 1	2	13
<i>Clavulinaceae</i> sp. 1	3	16	<i>Clavulinaceae</i> sp. 1	3	16	<i>Clavulinaceae</i> sp. 1	3	16
<i>Tomentella</i> sp. 1	4	12	<i>Tomentella</i> sp. 1	4	12	<i>Tomentella</i> sp. 1	4	12
<i>Tomentella</i> sp. 2	5	6	<i>Tomentella</i> sp. 2	5	6	<i>Tomentella</i> sp. 2	5	7
<i>Tomentella</i> sp. 3	6	4	<i>Tomentella</i> sp. 3	6	4	<i>Tomentella</i> sp. 3	6	4
<i>Clavulina</i> sp. 1	7	3	<i>Clavulina</i> sp. 1	7	3	<i>Clavulina</i> sp. 1	7	3
<i>Russula</i> sp. 1	8	3	<i>Russula</i> sp. 1	8	3	<i>Russula</i> sp. 1	8	3
<i>Thelephora pseudoversatilis</i>	9	2	<i>Thelephora pseudoversatilis</i>	9	2	<i>Thelephora</i> cf. <i>versatilis</i> sp. 2	9	2
<i>Inocybe</i> sp. 1	10	2	<i>Inocybe</i> sp. 1	10	2	<i>Inocybe</i> sp. 1	10	2
<i>Clavulina</i> sp. 2	-	1	<i>Clavulina</i> sp. 2	-	1	<i>Clavulina</i> sp. 2	-	1
<i>Clavulina</i> sp. 3	-	1	<i>Clavulina</i> sp. 3	-	1	<i>Clavulina</i> sp. 3	-	1
<i>Clavulina</i> sp. 4	-	1	<i>Clavulina</i> sp. 4	-	1	<i>Clavulina</i> sp. 4	-	1
<i>Entoloma</i> sp.	-	1	<i>Entoloma</i> sp.	-	1	<i>Entoloma</i> sp.	-	1
<i>Inocybe</i> sp.2	-	1	<i>Inocybe</i> sp.2	-	1	<i>Inocybe</i> sp.2	-	1
<i>Russula</i> sp. 2	-	1	<i>Russula</i> sp.2	-	1	<i>Russula</i> sp.2	-	1

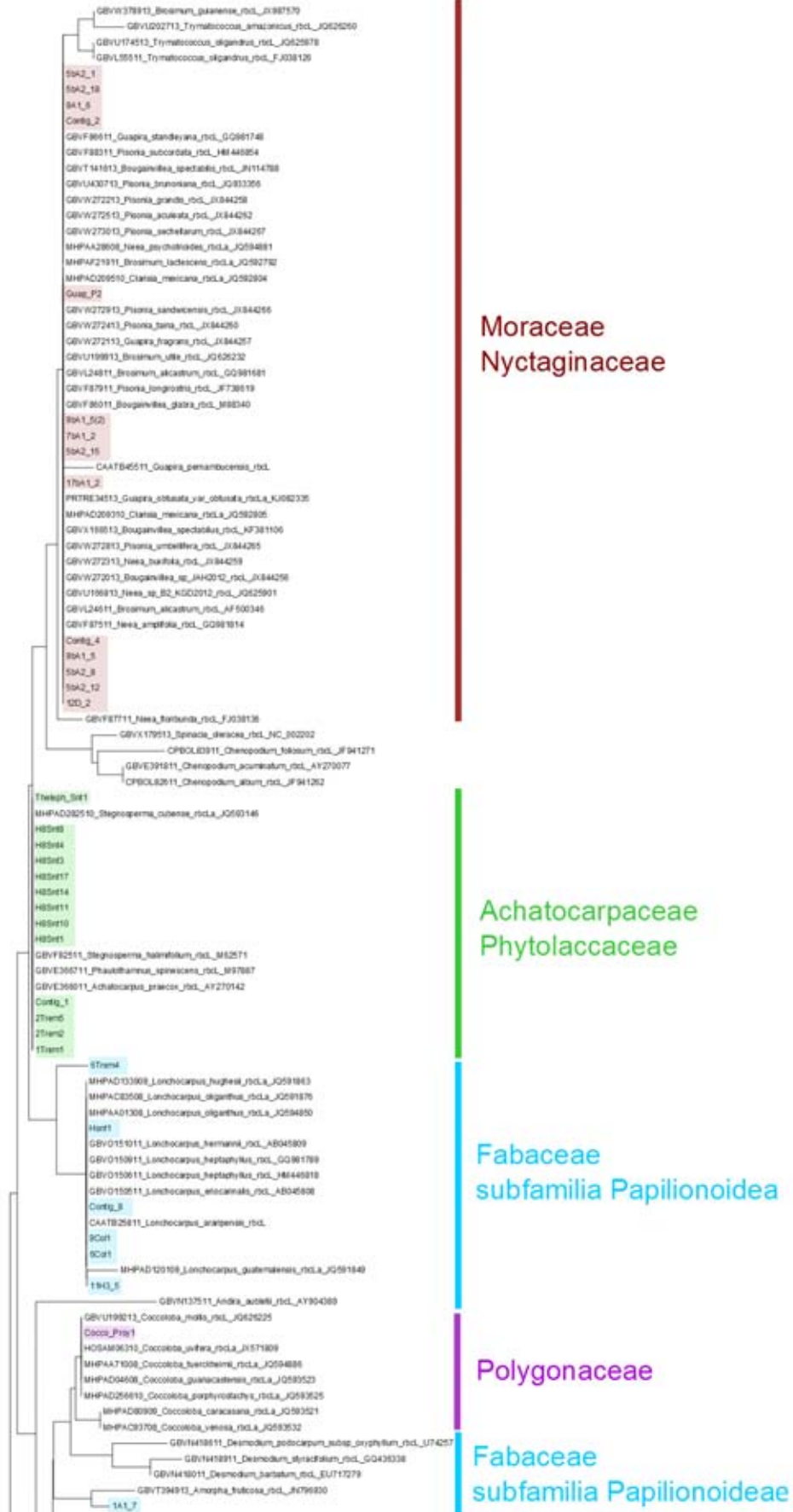


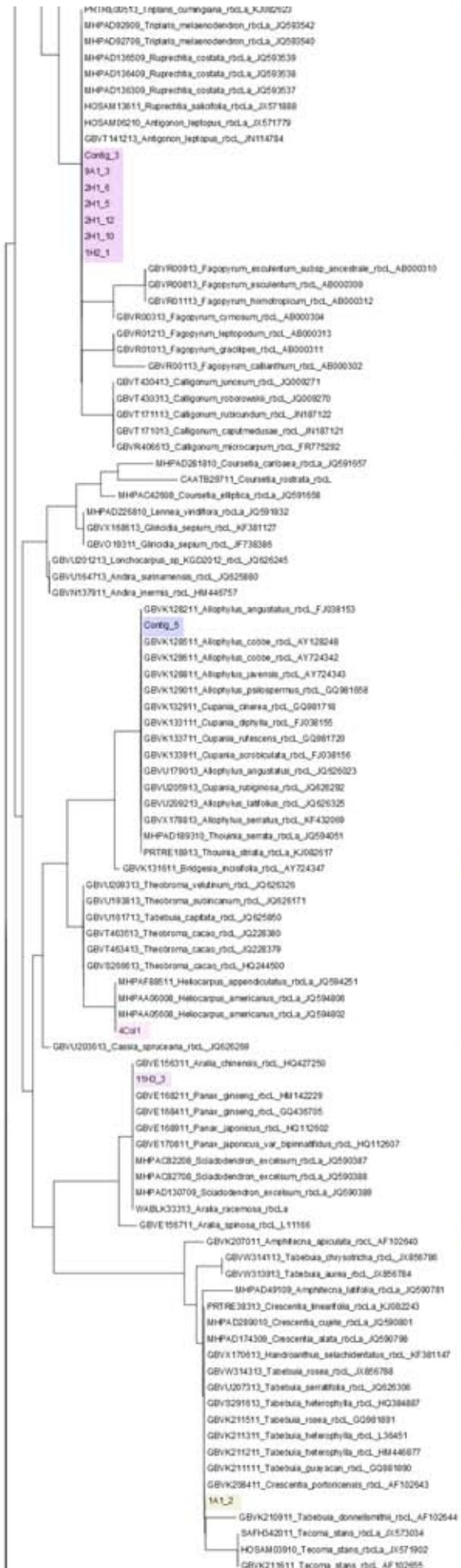
<i>Tomentella</i> sp. 4	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 4	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 4	-	1
<i>Tomentella</i> sp. 5	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 5	-	1	<i>Tomentella</i> sp. 5	-	1
<i>Tomentella</i> sp. 6	-	1	<i>Tomentella</i> sp.6	-	1			

**Apéndice III. Análisis de máxima verosimilitud de la familia Ceratobasidiaceae hecho en RAxML (modelo GTR+I+Γ).** Los clados remarcados en azul corresponden a los ectomicorrízicos, mientras que los remarcados en anaranjado tienen otras formas de nutrición. El taxón en color morado es la secuencia que se amplificó de las raíces en la EBCh, las demás secuencias fueron tomadas de Veldre *et al.* (2013).



**Apéndice IV. Análisis de NJ de todas las familias de plantas amplificadas a partir de las raíces.** Los nombres de las secuencias que son más cortos y se encuentran subrayados con diferentes colores, pertenecen a las secuencias de las raíces.





Polygonaceae

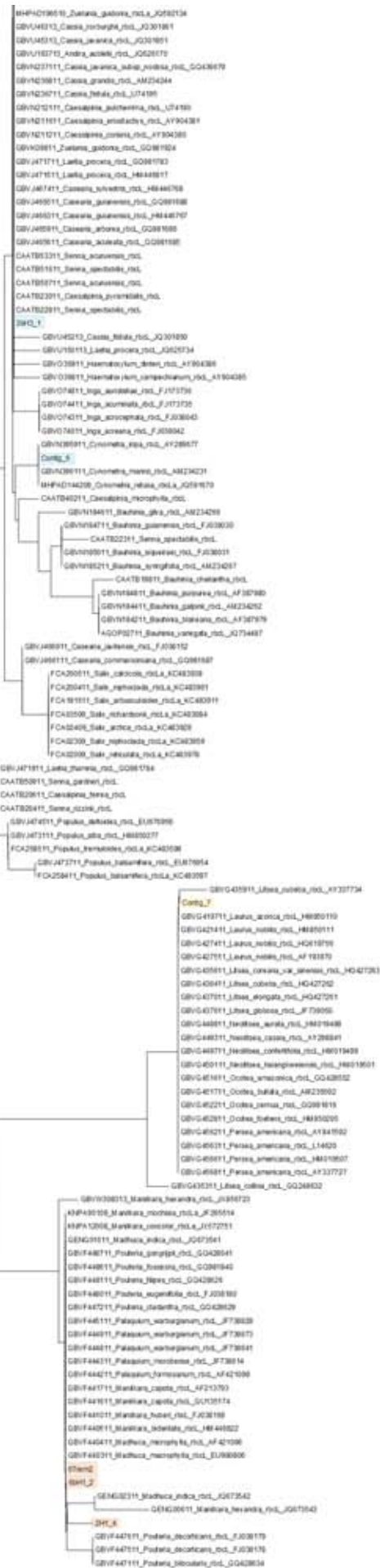
Fabaceae  
subfamilia Papilionoideae

Sapindaceae

Malvaceae

Araliaceae

Bignoniaceae



Fabaceae  
subfamilia Caesalpinioideae

Salicaceae

Lauraceae

Sapotaceae

Apéndice V. Genetos de todas las especies de HECM encontrados a través de la amplificación de las ectomicorrizas.

Gpo/ uni	No. seq	ECM <sup>2</sup>	Espo <sup>3</sup>	Identificación propia	Identificación usando NCBI	Similitud	Cobertura	No. Acceso NCBI	Lugar de origen de la muestra
1	12	10	2	<i>Tremelloscypha</i> sp. 1a	<i>Sebacina pileata</i>	97.8%	82.54%	KF307630	Belice (¿)
2	9	7	2	<i>Thelephora versatilis</i> 1a	Uncultured Basidiomycota	94.5%	100%	AY833051	Francia
3	9	8	1	<i>Tremelloscypha</i> sp. 1b	<i>Sebacina pileata</i>	97.8%	82.54%	KF307630	Belice (¿)
4	8	8	0	<i>Clavulina</i> sp. 1a	<i>Membranomyces spurius</i>	88.0%	55.39%	KF218966	Suecia
5	5	5	0	<i>Clavulina</i> sp. 1b	<i>Membranomyces spurius</i>	88.0%	55.39%	KF218966	Suecia
6	4	3	1	<i>Thelephora versatilis</i> 1b	Uncultured Basidiomycota	94.3%	99.85%	AY833051	Francia
7	3	3	0	<i>Russula</i> sp. 1a	<i>Russula subnigricans</i>	85.3%	95.85%	EF534351	China (?)
8	3	3	0	<i>Tomentella</i> sp. 2a	<i>Tomentella sublilacina</i>	90.6%	96.04%	HM190006	Alemania (?)
9	3	3	0	<i>Tomentella</i> sp. 3a	Uncultured <i>Tomentella</i>	93.0%	100%	EU625861	USA
10	3	2	1	<i>Thelephora pseudoversatilis</i> 1a	<i>Thelephora</i> sp.	99.4%	95.68%	JX075890	Jalisco, México
11	3	3	0	<i>Tremelloscypha</i> sp. 1c	<i>Sebacina pileata</i>	97.8%	83.92%	KF307630	Belice (¿)
12	3	3	0	<i>Tremelloscypha</i> sp. 1d	<i>Sebacina pileata</i>	97.8%	85.34%	KF307630	Belice (¿)
13	2	2	0	<i>Tomentella</i> sp. 1a	<i>Tomentella ellisii</i>	93.4%	89.94%	HQ406823	-
14	2	2	0	<i>Tomentella</i> sp. 1b	Uncultured <i>Tomentella</i>	94.1%	95.04%	HQ204732	Montpellier, Francia
15	2	2	0	<i>Tomentella</i> sp. 2b	Uncultured Thelephoraceae	93.6%	92.22%	KF836012	-
16	2	1	1	<i>Tremelloscypha</i> sp. 1e	<i>Sebacina pileata</i>	97.8%	83.92%	KF307630	Belice (¿)
17	2	2	0	<i>Tomentella</i> sp. 1c	<i>Tomentella</i> cf.	93.5%	97.59%	KC782507	Argentina
18	2	0	2	<i>Thelephora versatilis</i> 1g	Uncultured <i>Tomentella</i>	94.0%	95.18%	HQ204732	Francia
U1	1	1	0	<i>Tomentella</i> sp. 3b	<i>Tomentella</i> cf.	93.5%	97.07%	KC782505	Argentina
U2	1	1	0	<i>Tomentella</i> sp. 1d	Uncultured <i>Tomentella</i>	94.0%	99.07%	FJ210774	Italia
U3	1	1	0	<i>Clavulina</i> sp. 2a	<i>Clavulina</i> sp.	92.2%	97.20%	AJ534709	Estonia
U4	1	1	0	<i>Tomentella</i> sp. 4a	<i>Tomentella</i> sp.	97.6%	96.6%	KF472143	Guadalupe
U5	1	1	0	<i>Inocybe</i> sp. 2a	<i>Inocybe</i> cf. <i>grammata</i>	83.5%	59.28%	HQ604454	EU
U6	1	1	0	<i>Tomentella</i> sp. 2b	Uncultured Thelephoraceae	96.3%	92.42%	JX548248	Dominica
U7	1	1	0	<i>Thelephora versatilis</i> 1d	Uncultured <i>Tomentella</i>	94.1%	99.02%	FR852155	Irán
U8	1	1	0	<i>Thelephora versatilis</i> 1e	Uncultured Basidiomycota	94.8%	97.56%	AY833056	-
U9	1	1	0	<i>Tomentella</i> sp. 5a	<i>Tomentella ellisii</i>	95.2%	89.62%	AB634268	China
U10	1	1	0	<i>Tomentella</i> sp. 3b	Uncultured Thelephoraceae	92%	97.67%	JF748068	China
U11	1	1	0	<i>Clavulina</i> sp. 1c	<i>Membranomyces spurius</i>	88%	56.72%	KF218966	Suecia

U12	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 1e</b>	<i>Tomentella pisoniae</i>	93%	95.87%	FM244908	Seychelles
U13	1	1	0	<b><i>Clavulina</i> sp. 1d</b>	<i>Membranomyces spurius</i>	88%	55.77%	KF218966	Suecia
U14	1	1	0	<b><i>Clavulina</i> sp. 1e</b>	<i>Membranomyces spurius</i>	88%	55.93%	KF218966	Suecia
U15	1	1	0	<b><i>Entoloma</i> sp. 1a</b>	<i>Entoloma cuspidiferum</i>	88.3%	98.72%	EU784218	-
U16	1	1	0	<b><i>Russula</i> sp. 2a</b>	Uncultured <i>Russula</i>	90.3%	93.94%	FR852101	Irán
U17	1	1	0	<b><i>Tremelloscypha</i> sp. 1g</b>	<i>Sebacina pileata</i>	97.8%	83.66%	KF307630	Belice (¿)
U18	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 1f</b>	<i>Tomentella</i> cf. <i>ellisii</i>	93.5%	97.75%	KC782507	Argentina
U19	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 1g</b>	Uncultured <i>Tomentella</i>	93%	93.39%	JX316824	EU
U20	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 2c</b>	Uncultured Thelephoraceae	96.6%	92.61%	JX548248	Dominica
U21	1	1	0	<b><i>Inocybe</i> sp. 2a</b>	<i>Inocybe lanuginosa</i>	85.1%	66.76%	JQ888172	Inglaterra
U22	1	1	0	<b><i>Inocybe</i> sp. 1b</b>	<i>Inocybe lacera</i> var. <i>lacera</i>	80.4%	100%	HQ604446	EU
U23	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 2d</b>	Uncultured Thelephoraceae	97%	91.82%	JX548248	Dominica
U24	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 6a</b>	Uncultured Thelephoraceae	95.1%	88.40%	JX548266	Puerto Rico
U25	1	0	1	<b><i>Thelephora versatilis</i> 1h</b>	Uncultured <i>Tomentella</i>	94.5%	94.01%	JX474806	Italia
U26	1	0	1	<b><i>Thelephora versatilis</i> 1i</b>	Uncultured <i>Tomentella</i>	93.9%	100%	JX898972	Hawaii
U27	1	0	1	<b><i>Phaeoclavulina</i> sp. 1a</b>	<i>Ramaria formosa</i>	99.4%	25.54%	DQ365648	EU
U28	1	0	1	<b><i>Thelephora versatilis</i> 1j</b>	Uncultured ectomycorrhizal fungi	93.5%	94.95%	FJ946929	España
U29	1	0	1	<b><i>Tremelloscypha</i> sp. 1j</b>	<i>Sebacina pileata</i>	97.8%	85.74%	KF307630	-
U30	1	0	1	<b><i>Thelephora versatilis</i> 1k</b>	<i>Thelephora</i> sp.	93.1%	99.35%	FR682091	-
U31	1	0	1	<b><i>Phaeoclavulina</i> sp. 1b</b>	<i>Ramaria formosa</i>	99.1%	24.78%	DQ365648	EU
U32	1	0	1	<b><i>Thelephora versatilis</i> 1l</b>	<i>Thelephora</i> sp.	93.4%	90.6%	FR682091	-
U33	1	1	0	<b><i>Clavulina</i> sp. 3a</b>	<i>Clavulina</i> sp.	93.3%	100%	JX287358	Belice
U34	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 1h</b>	<i>Tomentella ellisii</i>	93.2%	87.89%	HQ406823	Lituania
U35	1	1	0	<b><i>Clavulina</i> sp. 4a</b>	Uncultured ectomycorrhizal fungi	90.2%	87.02%	DQ233737	Noruega
U36	1	1	0	<b><i>Tremelloscypha</i> sp. 1f</b>	<i>Sebacina pileata</i>	95.7%	75.34%	KF307630	Belice (¿)
U37	1	1	0	<b><i>Clavulina</i> sp. 2a</b>	Uncultured <i>Clavulina</i>	91.7%	99.69%	JF519083	Austria
					Uncultured <i>Clavulina</i>	92.5%	91.86%	JX630959	Canadá
U38	1	1	0	<b><i>Clavulina</i> sp. 2b</b>	Uncultured fungus	92.6%	99.29%	HM164622	Alaska
					Uncultured <i>Clavulina</i>	93.1%	88.14%	FJ197924	Austria
					<i>Clavulina</i> sp.	92.5%	100%	JX287358	Belice
U39	1	1	0	<b><i>Tremelloscypha</i> sp. 1h</b>	<i>Sebacina pileata</i>	97.8%	82.54%	KF307630	Belice (¿)
U40	1	1	0	<b><i>Clavulina</i> sp. 2c</b>	<i>Clavulina</i> cf. <i>rugosa</i>	92.2%	87.84%	DQ974712	-
U41	1	1	0	<b><i>Tremelloscypha</i> sp. 1i</b>	<i>Sebacina pileata</i>	97.7%	89.12%	KF307630	Belice (¿)
U42	1	1	0	<b><i>Tomentella</i> sp. 1i</b>	Uncultured <i>Tomentella</i>	93.7%	97.65%	FJ210774	Italia

Apéndice VI. Fotografías de esporomas y especies vegetales de importancia para esta tesis.



Esporoma de *Phaeoclavulina* sp.



Esporoma de *Thelephora versatilis*





Esporoma de *Tremelloscypha* sp.



Rama de *Achatocarpus gracilis* con frutos inmaduros



Rama estéril de *Guapira macrocarpa*



Rama de *Coccoloba liebmanii* floreciendo