



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

PATRONES DE DIVERSIDAD ESPACIAL DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS EN
UN BOSQUE TEMPLADO DE MICHOACÁN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RICARDO LEYVA MORALES

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. MAYRA ELENA GAVITO PARDO, INSTITUTO
DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD.

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL, INSTITUTO DE BIOLOGÍA.
DR. DIEGO R. PÉREZ SALICRUP, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD.

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO, 2017.



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.



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

Por medio de la presente me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**, al alumno, **LEYVA MORALES RICARDO**, con número de cuenta **515015665**, con la tesis titulada, "**PATRONES DE DIVERSIDAD ESPACIAL DE HONGOS ECTOMICORRIZÍCOS EN UN BOSQUE TEMPLADO DE MICHOACAN**", bajo la dirección de la **Dra. Mayra Elena Gavito Pardo**. Tutor principal.

Presidente: Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez
Vocal: Dr. Guillermo Ibarra Manríquez
Secretario: Dr. Roberto Garibay Orijel
Suplente: Dr. Joaquín Cifuentes Blanco
Suplente: Dr. Diego Rafael Pérez Salicrup.

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 30 de enero de 2017


Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas y a la UNAM por haber apoyado la realización de mi proyecto de Maestría y por la educación recibida

Al CONACYT por la beca 385717 otorgada durante la realización del presente proyecto de maestría y a su apoyo con el otorgamiento de la beca mixta para la realización de la estancia en Tartu, Estonia.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM para la estancia de tres meses en la Universidad de Tartu, Estonia. Al PAPIIT IN203414 “Diversidad espacial y funcional de hongos micorrízicos arbusculares y cambio de uso de suelo” de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

AI INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD.

A mi tutora la Dra. Mayra Elena Gavito Pardo por las enseñanzas y apoyo durante estos años para que cada paso se hiciera de la mejor forma y por enriquecer y ayudar a mejorar mis cualidades como persona y estudiante.

Al Dr. Roberto Garibay Orijel por la aceptación en su laboratorio de trabajo y la realización de una estancia académica, así como también por sus consejos como parte del comité tutorial.

Al Dr. Diego Pérez Salicrup por sus consejos sobre cuestiones estadísticas y sobre diseño experimental, así como por su apoyo formando parte del comité tutorial.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Maarja Õpik por la aceptación en el laboratorio Plant Ecology en la Universidad de Tartu, así como por su apoyo, consejos y ayuda para la elaboración de la parte de biología molecular y secuenciación.

A la M. en C. Ana Lidia Sandoval Pérez por su ayuda y consejos en las salidas al campo, recolecta de muestras y en el procesamiento de las mismas, así como en las facilidades para utilizar el laboratorio y su equipo.

A la M. en C. Maribel Nava Mendoza por su apoyo y disposición en los análisis químicos de suelo.

A Teele Jaius técnica del laboratorio plant ecology de la universidad de Tartu, por su ayuda y disposición en el procesamiento de las muestras para la biología molecular.

A la M. en C. Guadalupe Cornejo Tenorio y al Dr. Guillermo Ibarra Manríquez por su apoyo en la identificación taxonómica de la vegetación.

Al Dr. Ernesto V. Vega Peña por su apoyo para la realización de los análisis estadísticos.

Al Dr Francisco Javier alvaréz Sánchez y el Dr Joaquín Cifuentes Blanco por su atención y aportaciones durante las correcciones de la tesis presentada.

A mis amigos y compañeros del laboratorio suelos sustentables Teresita, Margarita y Antonio por su ayuda durante el proyecto de maestría y consejos.

De igual forma a mis amigos y compañeros del Posgrado en Ciencias Biológicas y del laboratorio de Agroecología por su ayuda en clases, campo y laboratorio.

Dedicatoria

A mis padres por el apoyo durante todos mis estudios y mi desarrollo personal del cual cada logro obtenido es gracias a ustedes, así como a mis hermanos con los cuales he crecido y nos apoyamos a pesar de nuestras diferencias, que el amor que nos tenemos sea más fuerte a cada paso y a cada dificultad que se nos presente.

También a mi familia, tíos y primos que me apoya y reconocen mis logros de los cuales se alegran al igual que yo de los suyos y siempre ha existido un apoyo para cada situación.

A la Dra Mayra por el apoyo tanto académico como personal, gracias a el se logro la realización de mi posgrado y mi crecimiento como persona.

A ana, teresita, margarita y toño por su apoyo en campo, laboratorio, consejos y convivencia en el laboratorio. A mis amigos del posgrado en Ciencias biológicas con los cuales compartimos nuestras alegrías y estrés que nos da la oportunidad de seguir estudiando.

A mis amigos ya de tantos años Tania, David, lothar y yasid con los que he encontrado un apoyo y desahogo a mis problemas a pesar de mi difícil forma en ocasiones de ser de la cual son pacientes. A mis amigos de la prepa y aquellos que se nos han unido con los cuales seguimos conviviendo y se han vuelto una familia la cual sigue a pesar de que nuestras vidas han cambiado tanto.

A cada persona con la cual e compartido tan valiosos momentos durante estos dos años de maestría en CU, como en el Iles, Morelia y en Tartu, Estonia donde he conocido amigos increíbles que me han hecho crecer y que me ofecieron su tiempo para conocerlos y seguirlos manteniendo en mi vida.

“El secreto de mi éxito fue rodearme de personas mejores que yo”

Andrew Carnegie

INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
Los hongos ectomicorrízicos como parte de la biodiversidad de los bosques	2
Identificación de los hongos ectomicorrízicos	4
Distribución de los hongos ectomicorrízicos y factores que la afectan	6
Problemas actuales del estudio de la distribución de bosques y hongos ectomicorrízicos	10
OBJETIVOS	13
HIPÓTESIS	13
METODOLOGIA.....	14
Área de estudio.....	14
Diseño experimental	15
Variables y Muestreo	17
Medición de humedad de suelo	18
Medición de pH	18
Medición de Contenido de Materia Orgánica	18
Extracción de nitrógeno disponible en suelo.....	19
Muestreo de la vegetación	19
Extracción de ADN del suelo, amplificación y secuenciación.	20
Bioinformática	23
Análisis de datos	26
RESULTADOS	27
Composición de la comunidad ectomicorrízica	27
Relaciones espaciales de la comunidad ectomicorrízica	35
Relación entre la distribución de los hongos ectomicorrízicos y los factores bióticos y abióticos.....	40
DISCUSIÓN	54
Riqueza de la comunidad de HECM	54

Relación entre la comunidad ectomicorrízica y el espacio.....	57
Relación entre los hongos ectomicorrízicos y los factores bióticos y abióticos..	59
CONCLUSIÓN	62
PERSPECTIVAS.....	63
LITERATURA CITADA.....	64
ANEXOS	75
Anexos 1. Nombre de las muestras con las concentraciones de ADN en la PCR index.	75
Anexos 2. Electroforesis de los amplicones obtenidos.	78
Anexos 3. Concentraciones de ADN.....	79
Anexos 4. Número se secuencias por especie y presencia de cada especie por muestra.....	81

FIGURAS

Figura 1. Localización del sitio de estudio	15
Figura 2. Esquema de muestreo en cuadrados anidados	16
Figura 3. Disposición de los tres cuadros en diagonal con un total de 96 cuadros muestreados.	17
Figura 4. Composición taxonómica de las especies a nivel de phylum.	27
Figura 5. Curva de acumulación de especies de hongos ectomicorrízicos para cada uno de los cuadros A0 y para el total de muestras.	29
Figura 6. Cuadro con el número de especies ectomicorrízicos que se encontraron en cada cuadro muestreado de 100 m ²	32
Figura 7. Frecuencias de distribución de las especies en cada cuadro de 100 m ² para los tres cuadros muestreados.....	33
Figura 8. Diagrama de Venn con el número de especies ectomicorrízicas únicas y compartidas encontrados en cada cuadro A0 de muestreo.....	34
Figura 9. Curva de acumulación de especies del cuadro de inicio	35
Figura 10. Curva de acumulación de especies del área más pequeña (100 m ²) al área más grande (12800 m ²).....	36

Figura 11. Número de especies distintas que pueden ser encontradas en función de la escala espacial para los tres cuadros A0.	37
Figura 12. Logaritmo de la riqueza de especies C1-C2 y C2-C3.	38
Figura 13. Relación entre efecto de la distancia entre puntos de muestreo en la similitud en la composición de especies.	39
Figura 14. Efecto del tamaño del área de muestreo en la similitud de la composición de especies.	40
Figura 15. Distribución de la vegetación leñosa Cuadro 1.	41
Figura 16. Distribución de la vegetación leñosa Cuadro 2.	42
Figura 17. Distribución de la vegetación leñosa del Cuadro 3.	43
Figura 18. Riqueza de árboles que forman ectomicorriza en cada cuadro A3.	44
Figura 19. Análisis de correspondencia canónica de la relación entre las especies de hongos y los árboles ectomicorrízicos.	46
Figura 20. Variación espacial en la humedad del suelo.	47
Figura 21. Variación espacial en el pH del suelo.	48
Figura 22. Variación espacial en el porcentaje de materia orgánica del suelo.	49
Figura 23. Variación en el contenido de amonio (NH ₄ ⁺) en el suelo.	50
Figura 24. Variación en el contenido de nitrato (NO ₃ ⁻) en el suelo.	51
Figura 25. Análisis de correspondencia canónica de las variables ambientales, de vegetación y las especies de hongos.	53

TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los primers usados, nombre y dirección.....	22
Tabla 2. Programa de ciclos y condiciones que se usaron para las amplificaciones en el termociclador.....	23
Tabla 3. Número de secuencias obtenidas por Phylum en total y para cada cuadro.....	28
Tabla 4. Número de especies ectomicorrízicos encontrados de cada género.....	30
Tabla 5. Número de secuencias de cada género encontrado por cuadro.....	31
Tabla 6. Especies vegetales leñosas encontradas en los tres cuadros.....	41
Tabla 7. Valor de Importancia Relativa de las tres especies de árboles más abundantes de cada cuadro.....	45

RESUMEN

La mayoría de los estudios biogeográficos en hongos, realizados a escalas de paisaje o regiones señalan que las barreras geográficas y climáticas suelen ser las causas principales de la selección de especies, pero a las escalas regional y local cobran importancia los factores abióticos y bióticos locales. El presente estudio buscó determinar la escala espacial a la que cambian las comunidades de hongos ectomicorrízicos (HECM) en un bosque de pino-encino del municipio de Uruapan, Michoacán así como los factores bióticos y abióticos que determinan su distribución espacial a escala local.

El estudio se realizó en un bosque de pino-encino de 170 hectáreas que no presenta ningún tipo de manejo actual. Se usó un diseño de muestreo de cuadros anidado con de 80 por 80 m, divididos en 64 subcuadros de 10 por 10m y con tres repeticiones de estos cuadros de muestreo. Este diseño permite un escalamiento del área más pequeña a la más grande, conservando la misma representatividad porque se muestrea la mitad del total de cuadros de 10 por 10. Se muestreó el suelo y censó la vegetación de 32 de los 64 cuadros de cada cuadrícula. Se determinó las especies arbóreas, su cobertura y DAP (10cm) en todo el cuadro. El pH, porcentaje de materia orgánica, el N disponible, la humedad y la comunidad de hongos ectomicorrízicos (HECM) se analizó a partir de una muestra de suelo obtenida del centro de cada cuadro. Se extrajo el ADN, se amplificó usando la región ITS2 y se secuenció en la plataforma Illumina. Después del procesamiento bioinformático, las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) resultantes se procesaron con el software FUNGuild para separar las especies ectomicorrízicas. Se hicieron análisis de diversidad y estadísticos uni-, bi- y multivariados para explorar los patrones espaciales y los factores asociados con la distribución de los hongos ectomicorrízicos.

Se encontró que del total de las secuencias encontradas (18 226 423), de las cuales se obtuvieron 10 378 OTUs, 41 por ciento fueron especies pertenecientes al phylum Ascomycota, a 28 por ciento Basidiomycota y 27 por ciento son hongos sin identificar a nivel de phyla, como grupos principales. De estas especies encontradas, 674 fueron asignadas a hongos ectomicorrízicos. La diversidad fue alta, 65 OTUs de HECM en promedio por punto de muestreo. La riqueza de especies aumentó exponencialmente con la distancia lineal hasta los 80 m y con el área hasta los 400 metros cuadrados, y continuó aumentado de manera menos pronunciada hasta el punto más distante (350 m) y el área más grande (12 800

metros cuadrados), sin alcanzar la asíntota. Las frecuencias de las especies raras mostraron una clara predominancia de especies presentes en solo de 2-4 cuadros y pocas especies estuvieron presentes en la mayoría de los cuadros. El análisis de similitud (1-Bray Curtis) reveló 21 por ciento de similitud entre los dos cuadros más distantes, separados linealmente por sólo 340 m. Las comunidades de HECM de las tres cuadrículas compartieron, sin embargo, casi la mitad de las especies totales. El análisis de diversidad espacial mostró que los cambios más grandes ocurrieron entre los 400 y los 1600 metros cuadrados y que los coeficientes de diversidad beta fueron altos (cerca de dos), indicando un recambio de especies alto. Como se esperaba, los HECM tuvieron una fuerte asociación con los árboles hospederos, especialmente *Pinus pseudostrobus*, *P. ayacahuite* y *Quercus subspathulata*. Las propiedades del suelo y de la vegetación, así como la riqueza de especies, cobertura y número de individuos explicaron muy poco de la variación. Sólo el pH del suelo y la cobertura arbórea mostraron resultados significativos en las comunidades de HECM.

Este estudio reveló una diversidad alta de HECM en un fragmento pequeño de bosque de pino-encino y comunidades muy estructuradas en distancias y áreas pequeñas. Esto sugiere que se puede mantener una gran diversidad de HECM en áreas como esta que han estado presionadas por el cambio de uso de suelo y que deberían de promoverse para la conservación de fragmentos de bosque en áreas transformadas.

ABSTRACT

According to most biogeographical studies in fungi, climatic and geographical barriers are often the main causes of species selection and the definition of community composition at the large scale whereas, at the regional and local levels, the specific environmental conditions and biotic factors become more important. This study sought to determine the spatial patterns and scales at which ectomycorrhizal fungi (EMF) communities change in a pine-oak forest fragment in Uruapan, Michoacán, and how the biotic and abiotic factors determine their spatial distribution at the local scale.

This study was made in 170 hectare forest fragment. We used a nested square sampling design with three 80×80 m replicate gridlines divided into 64 (10×10 m) squares. This design allows scaling up from the smallest to the largest area with the same representativeness because half of the resulting 10×10 squares are sampled in the same way. Soil and vegetation were sampled in 32 of the 64 squares in each grid. Tree species, cover and DAP were measured in the full square. Soil pH, % organic matter, available N and EMF communities were analyzed from a soil sample taken at the center of each square. DNA was extracted, amplified using the ITS2 region and sequenced using the Illumina platform. After bioinformatics processing, the resulting Operational Taxonomic Units (OTUs) were processed using FUNGuild software to separate the ectomycorrhizal species. Diversity, uni-, bi- and multivariate analysis were used to explore the spatial patterns and factors associated with the distribution of EMF.

We found a total of 18 226 423 sequence and 10 378 OTUs. From those 41% of the species were Ascomycota, 28% Basidiomycota, and 27% unidentified fungi, as main groups. From the total OTU's, 674 were assigned to EMF. Diversity was high, an average 65 species of EMF per 10×10 square. Species richness increased exponentially to 80 m in linear distance and to 400 m² in an area basis, and continued a less pronounced increase to the largest point in distance (350 m) and in area (12,800 m²) without reaching an asymptote. Species frequencies showed a clear predominance of species present in 2-4 squares and few species were present in many squares. Similarity analysis (1-Bray Curtis) revealed only 21% similarity between the two most distant grids, separated by only 340 m, linearly. The communities of the three large gridlines shared, nevertheless, almost half of their species. Spatial diversity analysis showed that the largest changes occurred between 400 and 1600 m² and that beta diversity coefficients were high (close to 2), indicating a large species turnover. As predicted, EMF showed a strong association to their host plant species, especially to the presence of *Pinus pseudostrobus*, *P. ayacahuite* and *Quercus subspathulata*. The soil properties and vegetation variables

examined explained. However, very little of the variation. From these, only soil pH and tree cover reached significance in a canonical correspondence analysis.

This study showed a high diversity of EMF in a small fragment of pine-oak forest and highly structured communities EMF in small distances and area. This suggests that small forest fragment can maintain high EMF diversity in areas that are under land-use change and that conservation of small forest fragments should be encouraged in transformed areas.

INTRODUCCIÓN

Las comunidades biológicas puede definirse como los conjuntos de organismos que coexisten en un espacio definido (Ricklefs & Miller 2000). Este concepto fue establecido para facilitar su estudio, ya que en la naturaleza generalmente la composición y estructura de las comunidades forman gradientes que no se delimitan claramente y que ocasionalmente muestra límites discretos. Las comunidades biológicas son influenciadas por múltiples factores bióticos y abióticos que interactúan permanentemente; su composición es uno de los aspectos de estudio que han generado mayor interés y se refiere al agrupamiento de las especies bajo condiciones bióticas y abióticas específicas (Begon et al. 2006).

La estructura de una comunidad puede ser alterada cuando alguno de los factores mencionados es intervenido, ya que las alteraciones entre ambos están relacionadas. Con la intervención humana en los ecosistemas las alteraciones se han incrementado, por lo que el conocimiento de la estructura de la comunidad es importante para revertir el daño causado por éstas (Ellner et al. 2001). Aunque la propuesta anterior está basada en modelos realizados con el estudio de plantas, se relaciona directamente con los hongos ectomicorrízicos ya que estos hongos dependen de ellas para su establecimiento, pero se desconoce si esto aplica en las especies de hongos. Se ha observado que debido a su fuerte correlación, la afectación de las especies de plantas o de hongos se verá reflejada en alguno de ellos (Peay et al. 2013).

El estudio de la distribución espacial, así como los cambios en la escala espacial que tienen las especies en los ecosistemas, son un tema central en la ecología. A medida que se avanza a través de los ecosistemas la estructura física (factores abióticos) y biológica (factores bióticos) de las comunidades varían. Dependiendo de la distancia que se recorre estos cambios se vuelven más visibles (Smith & Smith 2007). La composición local de las especies en la comunidad es reflejo de procesos evolutivos y ecológicos tales como la especiación, la vicarianza

y la dispersión, que operan de manera a través del tiempo (Futuyma 2005). Cuando se afecta el hábitat, éste se ve reducido y genera acumulación espacial y competencia entre las especies (Ricklefs & Schluter 1993). Las zonas que quedan aisladas del hábitat original pueden no ser capaces de soportar a muchas de sus especies originales y se produce extinción gradual local. Conforme el hábitat se torna más fragmentado y se reducen los hábitats por debajo del tamaño crítico, hasta llegar a ser más pequeñas y aisladas, por lo que la relación entre la diversidad de especies y el tamaño de fragmento o área original toma importancia crucial en la conservación de la diversidad biológica (Tabolt et al. 2014).

Los hongos ectomicorrízicos como parte de la biodiversidad de los bosques

Los hongos ectomicorrízicos (HECM) son organismos mutualistas que forman una relación con las plantas. La diversidad que existe de ellos es muy alta y desconocida, Schmit & Muller (2007) sugieren que existen 712,000 especies como mínimo, mientras que Blackwell (2011) estima que existen alrededor de 5.1 millones de especies de hongos, mientras que en el trabajo de Bass & Richards (2011) suponen también una riqueza que alcanza el número estimado de especies sea de siete dígitos, pero el gran desconocimiento y los problemas para la identificación correcta de taxa impiden llegar a un acuerdo actualmente. Claramente los hongos son de los organismos desconocidos. Se han descrito más de 6000 especies de HECM, principalmente de los Phyla Ascomycota y Basidiomycota (Tedersoo et al. 2010). La riqueza de especies de hongos es variable dependiendo del tipo de bosque, porque a mayor diversidad de especies de plantas mayor diversidad de especies de hongos (Kennedy et al. 2003; Smith et al. 2007). La gran diversidad de géneros de HECM es aún difícil de estimar y los cálculos sobre el número de especies también varían dependiendo del estudio. Rinaldi et al. (2008) sugiere que con base en la literatura y algunos criterios de identificación (morfológica, molecular, de cultivo, isotópica y filogenética), existen 343 géneros identificados de HECM, de los cuales 84 son Ascomycota, 252 Basidiomycota, cinco Zygomycota y dos Incerta

sedis, y que el avance en las herramientas de biología molecular incrementará el número rápidamente.

Las plantas que se conocen forman esta relación simbiótica con los HECM pertenecen principalmente a las familias Betulaceae, Dipterocarpaceae, Fabaceae, Fagaceae, Pinaceae y Salicaceae (Brundett 2009). Esta relación ocurre en las raíces de la planta, que al ser colonizada son recubiertas por las hifas del hongo que envuelven a las raíces y que a su vez se extienden en el suelo. Las hifas rodean las células de la epidermis y el córtex de la raíz y forman la red de Hartig, que es en donde ocurre la transferencia de nutrientes y agua desde el hongo hacia la planta y de azúcares de la planta hacia el hongo (Smith & Read 2008). Los hongos micorrízicos son simbioses obligados de plantas, sobre todo de especies arbóreas (Ashkannejhad & Horton 2006, Halling et al. 2008), lo que limita su establecimiento y presencia a los ecosistemas donde están sus hospederos. De igual manera su huésped están sujetas a la presencia de su hospedero para poder desarrollarse (John & Coleman 1983).

Los HECM han formado parte fundamental y paralela del desarrollo y evolución de las plantas con las que se asocian. Se han encontrado fósiles de raíces de pino que fueron colonizadas por *Rhizopogon* con una antigüedad aproximada de 130 millones de años (Lepage et al. 1997). Estudios relacionados con el origen de la relación entre las plantas y los HECM detectaron registros en especies de la familia Fagaceae, la cual tuvo su origen en el antiguo continente conocido como Gondwana y que se encuentra ampliamente distribuida hoy en día; en esta familia se encuentran los géneros *Fagus* y *Quercus*, bien conocidos por ser hospederos de HECM (Smith & Read 2008). La diversidad de hongos está afectada directamente por la presencia de las plantas con las que se asocian, existen casos en los que se presenta alta especificidad entre planta y hongo, o combinaciones de ambos que pueden deberse a la selección de un hongo o un hospedero que proporcione mejores beneficios y por consecuencia ayude en la competencia contra otras especies (Bruns et al. 2002).

La diversidad de hongos también puede ser afectada por múltiples factores abióticos (Peay et al. 2013). A nivel de grandes áreas, las barreras geográficas y climáticas son las principales causas de la selección de las especies que viven en los ecosistemas, pero a nivel de escala regional lo son las condiciones ambientales más específicas, así como factores bióticos (Fukami 2010). Las diferencias en las habilidades de dispersión y establecimiento entre especies de hongos ectomicorrízicos está relacionada con los tipos de especies vegetales que se encuentran en un ecosistema, ya que como se mencionó anteriormente estos hongos sólo se asocian a familias de plantas específicas lo cual limita su establecimiento a donde se encuentren dichas plantas; esto confirma la teoría de biogeografía de islas y las teorías ecológicas de dispersión que relacionan a los hongos ectomicorrízicos (Peay et al. 2012). Con base en ello se puede valorizar lo importante que es conocer la distribución espacial de las especies de hongos ectomicorrízicos en los bosques, así como conocer las escalas en las cuales existe un mayor recambio de las especies.

Identificación de los hongos ectomicorrízicos

Anteriormente los hongos ectomicorrízicos se estudiaban usando los esporomas para detectar las especies *in situ*, pero esto limitaba considerablemente el alcance de los estudios por la aleatoriedad en la producción de los esporomas. Otra forma muy usada para identificar y caracterizar a las comunidades fue mediante el uso de las puntas ectomicorrizadas extraídas del suelo, que permitía relacionar al hongo con la planta directamente; sin embargo existe desconocimiento y confusión para la identificación de los hongos mediante este proceso y se limita el número de especies que se encuentran porque se requiere revisar una gran cantidad de puntas para abarcar a la comunidad (Kennedy et al. 2003). Hoy en día se cuenta con herramientas de biología molecular, las cuales no dependen de que se pueda aislar a las especies o encontrar los esporomas (Peay et al. 2008). Por lo tanto, se vuelve muy relevante iniciar estudios de distribución espacial que permitan,

a través de un diseño apropiado, resolver preguntas de escala y recambio espacial de especies, y no sólo mapear la distribución sino comprender los factores que controlan y afectan la distribución de las especies (Gardes & Bruns 1993), aunque esto sea siempre tomando en cuenta la escala a la cual se realiza el estudio de interés.

La región de los espaciadores internos (ITS), situada entre los genes 18S, 5.8 Y 25S del ARN ribosomal (rRNA) es la región del ADN nuclear que más se utiliza para la identificación genética de hongos. Es de fácil amplificación y alta variación interespecífica presenta ventajas para la clasificación e identificación taxonómica en los hongos y se ha usado para obtener un gran número de las secuencias presentes en bases de datos como GenBank y UNITE (Kõljalg et al. 2005). Esta región presenta tres características que la hacen tener ventajas sobre otras regiones en el ADN: 1) es un región multicopia, por lo que se necesita poco ADN para su amplificación, 2) actualmente existen muchas bases de datos con secuencias obtenidas de dicha región, y 3) se relaciona con la separación morfológica entre las especies ya clasificadas actualmente (Peay et al. 2008). Por ello, se eligió recientemente como la región ideal para usarse como código de barras genético en la investigación e identificación de hongos (Schoch et al. 2012).

No obstante, aún existen problemas para la identificación correcta de las secuencias que se obtienen. Se calcula que, de las 300 000 secuencias que se tienen identificadas, sólo la mitad están a nivel de especie y eso podría corresponder sólo al 4.5% del total de especies de hongos estimadas (0.5-10 millones, Blackwell 2011). Existe, por lo tanto, una gran deficiencia en la identificación de especies, que dificulta el trabajo taxonómico en los hongos ya que determinar la identidad de las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) no va a la par con el reconocimiento y la clasificación de las especies, especialmente ahora con el desarrollo de las nuevas plataformas de secuenciación como pirosecuenciación 454, Illumina y Ion Torrent, con las cuales se pueden obtener millones de secuencias en pocos días. Así se sabe que existen muchas especies pero en muchos casos no se puede hacer una asignación taxonómica (Koljalg et al. 2013). Otro problema mencionado en la

literatura con relación a la identificación de especies mediante las secuencias, es la variación intraespecífica en especies del mismo género. Como ejemplo se encuentra la especie *Tricholoma populinum* y *Tricholoma scalpturatum*, que presentan variación entre el 1% y el 15%, debido a su gran plasticidad. Otro ejemplo es el género *Hebeloma*, que se encuentra bien diferenciado morfológicamente pero al usar la región ITS para la separación de especies existe confusión entre ellas y no se delimitan, probablemente debido a su radiación evolutiva reciente que no ha producido diferenciación en la región (Buscot et al. 2000). Peter et al. (2001) recomiendan seguir usando los métodos de identificación tradicionales basados en la taxonomía morfológica y conjuntarlos con los grandes avances en la biología molecular y bioinformática.

Distribución de los hongos ectomicorrízicos y factores que la afectan

A nivel mundial existen pocos estudios de biogeografía de hongos y en particular de hongos que forman simbiosis micorrízica, por la complejidad para detectarlos y por la fuerte relación que establecen con sus plantas hospederas (Smith & Read 2008). Los estudios sobre la distribución espacial-temporal de los hongos ectomicorrízicos son escasos y se empiezan a realizar a partir de la última década, en el trabajo de Bahram et al. (2015) podemos darnos cuenta que existen hasta ese momento solo 29 trabajos que se enfoquen en estudiar la relación espacio-temporal de los hongos ectomicorrízicos desde distintas perspectivas. Algunos de estos trabajos cobran mucha importancia para ir entendiendo tan complejos procesos. Para poder estudiar su distribución geográfica se usa la presencia de las especies vegetales, pero existen errores en cuanto a la identificación de las familias y géneros de plantas que presentan la asociación micorrízica, porque la presencia del hongo en la raíz no implica necesariamente el intercambio de nutrientes, aunque la mayoría de los errores son en las plantas que se asocian con los hongos micorrízicos arbusculares y no tanto con los ectomicorrízicos (Brundett 2009).

Las redes de HECM son muy complejas, y los patrones de distribución que muestran no son al azar, ya que se ha demostrado que existe estructura con respecto al espacio que ocupan las especies (Bahram et al. 2014). Peay et al. (2008) sugieren que dentro de los puntos más importantes para el avance de la ecología de hongos destacan 1) entender cómo es que se da la selección del nicho ecológico por las especies de hongos, 2) conocer los patrones de distribución en la escala espacial de los hongos y su relación con factores ecológicos, 3) determinar cuáles son los factores que influyen en la variación espacial en áreas pequeñas y 4) desarrollar mejores bases de datos para la identificación de hongos y herramientas bioinformáticas para facilitar el procesamiento de la información. Se plantea que se necesita investigar las dinámicas que presentan las poblaciones que conforman las comunidades ectomicorrízicas a escala regional para conocer los procesos de dispersión y establecimiento de los hongos, que por consecuencia influyen en la estructuración de los bosques Dahlberg (2001). Además realizar estudios que nos permitan conocer los patrones biogeográficos de los hongos micorrízicos a través de escalas espaciales que permitan identificar su distribución y los factores que controlan la diversidad fúngica. Ciertos procesos ecológicos como la sucesión y la pérdida de especies se aprecian sólo al cambiar de escala, por lo que el entendimiento a escalas múltiples es trascendental para comprender y generar hipótesis sobre la variación en las comunidades Peay et al. (2010).

Los HECM son parte fundamental de los ciclos biogeoquímicos, ya que se ha observado que existe diferenciación en las especies micorrízicas en cuanto a las capacidades para degradar materia orgánica, solubilizar algunas formas de nutrientes y adquirirlos (Brandes et al. 1998; Nannipieri et al. 2003). La gran red de micelio que se forma en el suelo forma parte del almacén de C en el suelo también (Clemmensen et al. 2015). Asimismo se ha demostrado que su presencia aumenta la absorción de fósforo y nitrógeno del suelo y el crecimiento en las plantas hospedadoras (van der Heijden et al. 2006) y esto se refleja en el funcionamiento del ecosistema.

Los propiedades físico y químicas del suelo (pH, nutrientes) tienen una gran influencia en los hongos ectomicorrízicos a escala local (Talbot et al. 2014), mientras que a escala global la distribución y riqueza de las especies de HECM se relaciona con la cercanía al ecuador y con la precipitación (Tedersoo et al. 2014). En México existen estudios de inventario que documentan la presencia de especies de ectomicorrizas en distintos contextos ecológicos pero la información es aislada y con frecuencia se han usado diferentes métodos, lo cual dificulta el uso de estos datos para integrar patrones de distribución y riqueza (Guzmán 2008). Kennedy et al. (2011) observaron que los bosques en México cuentan con muchas especies de HECM únicas debido a algunas condiciones geográficas y ambientales que no se encuentran en otras partes del mundo. Cada estudio realizado en los bosques de México sigue arrojando nuevas especies, algunas con cualidades idóneas para proyectos de restauración ecológica de los bosques de México con especies locales que favorecen su conservación (Garibay-Orijel et al. 2013). Con estudios como estos se resalta la importancia de conocer la distribución de las especies, así como su escala espacial, para poder usarlas de manera sustentable y conservarlas.

Posiblemente, al igual que en las bacterias, los HECM no son insensibles a las condiciones del medio y la variación en su ambiente puede generar la selección de nichos particulares y comunidades muy estructuradas (Noguez et al. 2005). Ya en hongos micorrízicos arbusculares se ha demostrado que los cambios en la estructura de la vegetación así como la variación en nutrientes que se encuentran en el suelo como el nitrógeno y el fósforo influyen sobre las especies que se encuentran (Cuevas-Villalobos 2016). Antes se pensaba que los microorganismos presentaban una distribución cosmopolita debido a sus características reproductivas y de dispersión, que se basan en estrategias de tipo R, pero algunos estudios recientes muestran que existen patrones espaciales en la distribución de los microorganismos que generan incluso endemismos de algunas especies (Locey & Lennon 2015). Se ha encontrado, específicamente en los HECM tienen variación horizontal y vertical en términos del perfil del suelo que habitan, y cambios en la composición de las especies en tan sólo 50 cm de longitud entre muestras

(Tedersoo et al. 2003). Existen cambios en las especies de las comunidades de ectomicorrizas relacionados con los factores abióticos que van cambiando dependiendo de la estación climática; esto quiere decir que la detección de ciertas especies en la comunidad cambia dependiendo de cuando se realiza el muestreo. Dichas variaciones producen cambios fisiológicos en las comunidades que se reflejan en las actividades enzimáticas que llevan a cabo y que por consecuencia afectan los ciclos biogeoquímicos (Voriskova et al. 2013).

¿Cómo cambia la diversidad a distinta escala? ¿Qué tamaño de hábitat puede mantener la mayor diversidad de especies? ¿Cómo influye el tamaño del hábitat o fragmento de hábitat en la presencia o ausencia de determinadas especies? Estas son preguntas de mucha importancia en el contexto de la selección de áreas para la conservación de la biodiversidad y para el manejo sustentable de los bosques. Los criterios utilizados, como la riqueza de especies y su distribución, son sensibles a la escala a la que se propone estudiarlos, por lo que la falta de conocimiento sobre las características y factores que influyen en la distribución de los organismos limitan los criterios de selección de una reserva (Kark et al. 2001). Por lo tanto, el rango de distribución y los efectos ecológicos en los que influye la presencia de las especies son importantes para establecer áreas para la conservación y, por consecuencia, la escala se torna fundamental para la definición de una reserva o área protegida (Williams & Araújo 2000).

Se ha reportado que un solo árbol puede albergar cientos de especies de hongos que se ven influenciadas por el hospedero más próximo y su entorno (Bahram et al. 2011), y que la variación puede depender también del horizonte del suelo en el que se tomen las muestras (Tedersoo et al. 2003). El hábitat que ocupan los hongos micorrízicos y los saprótrofos está en parte determinado por la división en los sustratos u horizontes del suelo en que se encuentran en el bosque, y que principalmente se relacionan a la proporción de C:N (Lindahl et al. 2007). Los hongos saprótrofos se encuentran en la parte superior del suelo generalmente, donde la materia orgánica es más disponible, y los hongos micorrízicos en la parte mineral del suelo donde los nutrientes cambian en disponibilidad y tienen acceso a

las raíces de las plantas con las que se relacionan, aunque no se cumple siempre este patrón (Conn & Dighton 2000). Antes de dichos trabajos ya se había encontrado que para hallar y describir de mejor forma a las comunidades de hongos HECM se tiene que tomar en cuenta la parte mineral del suelo, ya que muchas de las especies no son detectadas al menos que se llegue a esa sección (Rosling et al. 2003).

Bahram et al. (2014) demostraron la importancia del estudio de la diversidad de los HECM a gran escala y cómo se ve influenciada por los diversos climas a escala global. En contraste, Izzo et al. (2005), demostraron que hay diferenciación en las especies encontradas tomando muestras con diferencia espacio-temporal de solo 5 cm de distancia entre puntos y de una estación a otra, por lo que la escala de medición puede revelar distintas dominancias. La presencia de las especies de hongos se encuentra cambiando constantemente, aunque no se sabe cuáles son las razones. Koide et al. (2007) suponen que pueden ser factores como la interacción entre las especies, tolerancias fisiológicas, variación en el ambiente, patrones de producción temporal de raíces y el ciclo de vida de los mismos hongos, por lo que es importante no solo estudiar a la comunidad sino de igual forma a los factores bióticos y abióticos que la afectan.

Problemas actuales del estudio de la distribución de bosques y hongos ectomicorrízicos

Se ha observado en estudios como el de Peay et al. (2012), que las comunidades de HECM siguen patrones de distribución parecidos a los de la teoría de biogeografía de islas porque su distribución está limitada por la presencia de los hospederos. Esta limitante de solo desarrollarse cuando se encuentra la planta hospedera pone en riesgo la diversidad de los HECM ya que la rápida degradación de los ecosistemas donde estos hongos habitan puede llevar a la desaparición de las especies y por consecuencia de todos los beneficios ecológicos, económicos y sociales que proporcionan.

Los bosques húmedos montañosos de tierras bajas (basados en la clasificación de Holdridge 2000), son un ecosistema muy relevante desde el punto de vista ecológico y económico. Las comunidades que se encuentran dentro de este sistema albergan gran cantidad de diversidad de especies que son explotadas y forman parte de las necesidades sociales, por lo que su conservación y manejo son de suma importancia (Scherer-Lorenzen et al. 2005). Los bosques ayudan a la captación de agua, controlan la erosión de los ríos y el deslave del suelo, evitando desastres y permitiendo el desarrollo de aquellas comunidades que habitan cerca (Challenger 1998). También funcionan como centros de captura de carbono y generan beneficios económicos sin necesidad de ser explotados o talados de manera intensiva (Mayrs 1998). La falta de estrategias de manejo orilla a las sociedades que habitan dentro o cerca de los bosques templados a explotar de manera no sustentable sus recursos (Bocco et al. 2000). Por ello es necesario crear e involucrar a la sociedad en programas redituables para ellos en los cuales vaya implícita la conservación y el manejo del bosque templado (Klooster & Mansera 2000). El cambio en el uso del suelo trae problemas que provocan la pérdida de la biodiversidad, efectos como la reducción de la humedad, la entrada de mayor cantidad de luz y cambios en la temperatura. Esto genera a su vez cambios biogeoquímicos en el suelo, con lo que se pierde la estabilidad y las especies se adaptan o desaparecen localmente (Smith & Smith 2007). Con la pérdida de la diversidad local también se expone al sistema a la entrada de especies exóticas que modifican las cadenas tróficas y pueden desplazar a las especies nativas que ya se encuentran vulnerables (Williams et al. 2002).

Los efectos provocados por el cambio de uso de suelo se perciben de manera distinta dependiendo de la escala a la cual se miden, por consecuencia el tamaño de área estudiada juega un papel importante en las decisiones que se tomen a futuro con respecto al manejo sustentable del bosque y la selección de áreas para la conservación (Saunders et al. 1991). Hansen et al. (2013) percibieron con base en imágenes satelitales el gran avance de la deforestación a nivel global principalmente en países de Sudamérica y el sur de Asia, mientras que el

crecimiento de la cobertura de los bosques se ha incrementado muy poco y esto continua de manera acelerada. Es importante señalar la situación actual, ya que la mayoría de los bosques en México y el mundo se encuentran fragmentados, y este es el caso de los bosques en la zona aguacatera de Michoacán. Inicialmente el cultivo de aguacate, que detonó en la década 1970, se expandió sobre parcelas agrícolas y ganaderas activas o abandonadas, pero ya en este siglo su rentabilidad ha incrementado la superficie a más de 100 000 ha y reemplazando zonas que eran boscosas (Morales-Manilla & Cuevas, 2011; 2012). Hoy las imágenes satelitales de esta región muestran pocas áreas boscosas grandes y muchos fragmentos de distintos tamaños inmersos en matrices muy transformadas por cambio de uso de suelo (<http://www.greenpeace.org/mexico/es/Campanas/Bosques/Geografia-de-la-deforestacion/Michoacan>) (Greenpeace / Gustavo Graf).

La pérdida de los bosques templados por cambio de uso de suelo asociado principalmente al incremento de los huertos de aguacate tiene consecuencias importantes, tales como la fragmentación y la disminución de la estabilidad ambiental que impacta en la diversidad biológica. Por ello se hacen necesarios estudios que auxilien en la implementación de estrategias de conservación y manejo sustentable de áreas cultivadas y boscosas basándose en la presencia de sus simbiontes los hongos ectomicorrízicos. Al conocer los patrones de la distribución espacial de los HECM y los factores a los que se asocian, se pondrá conocer cómo promover la conservación del bosque y de los mismos hongos en el escenario de cambio constante de uso de suelo.

Este estudio se diseñó para entender los factores que determinan la distribución espacial de los HECM en una zona de bosques templados de Michoacán a nivel local. Estos bosques que están en constante transformación por el cambio de uso de suelo y es necesario entender los factores que controlan la distribución espacial de los HECM en el bosque o fragmentos de bosque que coexistan con tierras de uso agrícola, ganadero y el constante cambio de usos del suelo.

OBJETIVOS

1. Analizar los patrones espaciales de la comunidad de HECM en un bosque de pino-encino.
2. Evaluar cómo cambian la riqueza y distribución de las especies de HECM presentes en el bosque de pino-encino en función de la escala espacial.
3. Explorar los factores que potencialmente controlan la distribución espacial de los hongos ECM en el bosque de pino-encino.

HIPÓTESIS

La distribución espacial de las especies HECM en las zonas de bosques de pino-encino está relacionada principalmente con la composición estructura de las especies arbóreas que forman ectomicorrizas, así como con la disponibilidad de recursos (nutrientes) y las condiciones ambientales (pH, humedad).

METODOLOGIA

Área de estudio

El estudio se realizó en un bosque de pino-encino que no ha experimentado cambio de uso de suelo y que está localizado dentro de una huerta de aguacate en las afueras de la ciudad Uruapan, Michoacán (19° 29' 01.24" Norte y 102° 00' 22.50" Oeste). La zona que se seleccionó se encuentra en clima semicálido húmedo con precipitaciones medias de 1200 a 1500 mm, temperaturas promedio de 16 a 20 °C y suelos tipo andosol, condiciones que se consideran ideales para el cultivo del aguacate (Gutiérrez-Contreras et al. 2010). Se escogió trabajar en una sola área de bosque para definir con mayor facilidad la escala espacial a la que cambian las comunidades de HECM de manera continua. Dicha zona se encuentra en una montaña y comprende 170 hectáreas conservadas a pesar de encontrarse completamente rodeadas por huertas de aguacate y otros cultivos anuales.

En la siguiente figura se muestra una imagen satelital en dirección Norte tomada en el 2014 a 3.61km de altura a una elevación de 2063msnm de google earth donde se encuentra la localización de los cuadros de muestreo. La línea roja muestra la distancia del punto de inicio al cuadro más lejano siendo 340m en línea recta.



Figura 1. Localización del sitio de estudio

Diseño experimental

Se estableció un sistema de cuadrados anidados a escala, propuesto por Arita & Rodríguez (2002), que ha sido utilizado para hacer un escalamiento espacial en organismos tan disímiles como mamíferos y bacterias del suelo (Noguez et al. 2005). El esquema consiste en cuatro escalas espaciales (A0, A1, A2, A3). La principal es A0, que se conforma por el área de un cuadro de 80 × 80m (6400m²). Las tres escalas siguientes se integran por divisiones de A0 en cuatro cuadros A1 1600m² con 8 cuadros cada uno, 16 cuadros de A2 400m² de dos cuadros cada uno y 64 cuadros de A3 100m². En este esquema se muestrean siempre la mitad de los cuadros de la escala más pequeña (A3=32) de cada cuadro para mantener la misma representatividad en el muestreo a todas las escalas superiores (Figura 2).

Se trazaron los tres cuadros de muestreo colocándolos en diagonal con la esquina superior derecha del primero (Figura 1) para poder realizar el escalamiento de los datos a una escala más grande. Al unir los cuadros C1-C2, y C2-C3, se puede obtener un área de 12 800 m² que mantiene la misma representatividad en el muestreo (Figura 3). Así mismo, se alcanza una distancia lineal de 340 m entre los dos puntos más distantes de muestreo. Cada uno de los cuadros fue delimitado con rafia.

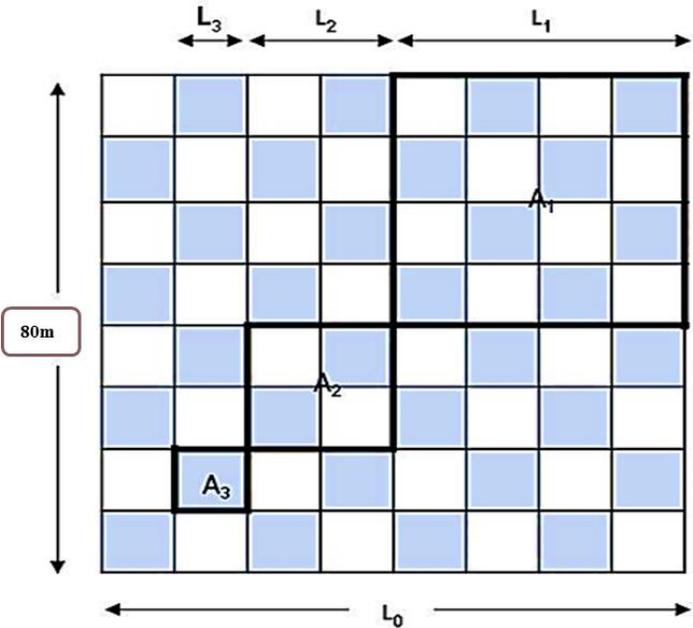


Figura 2. Esquema de muestreo en cuadrados anidados, con las áreas que se incrementan exponencialmente del área A3 al área A0 (todo el cuadro). Se muestrean todos los cuadros sombreados.

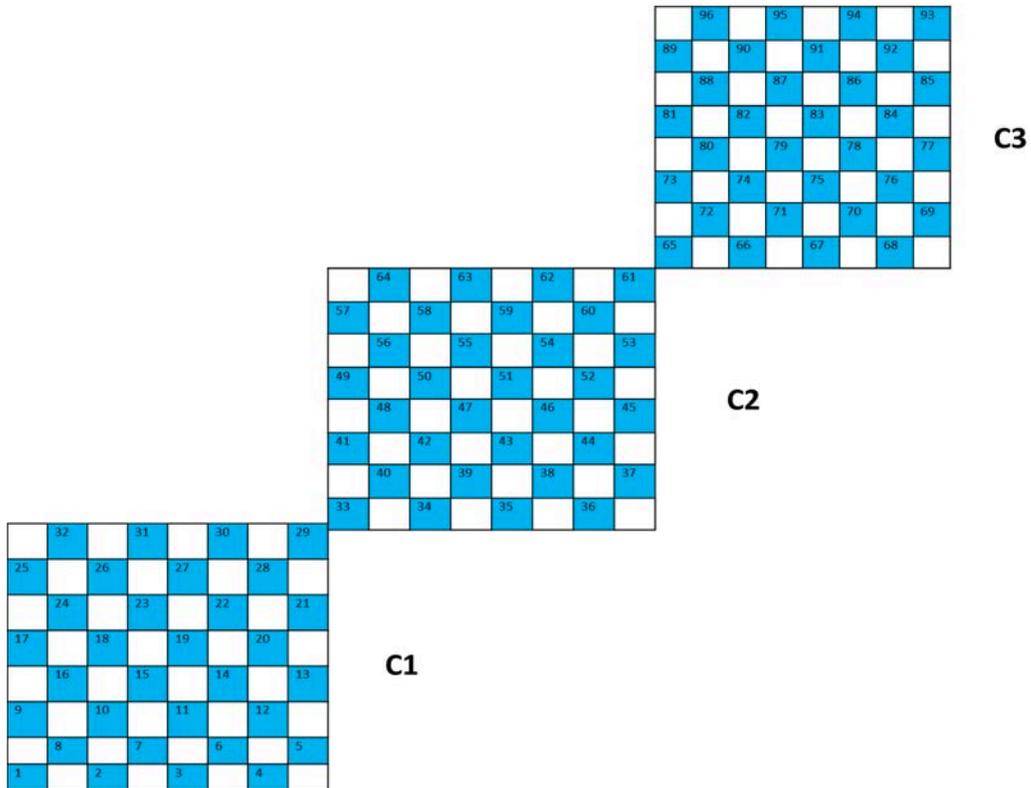


Figura 3. Disposición de los tres cuadros en diagonal con un total de 96 cuadros muestreados.

En cada cuadro A3 (100 m²) se obtuvieron datos de la comunidad de HECM presentes en el suelo (ADN-secuencias-OTUs), la vegetación arbórea (especies, número de individuos, cobertura arbórea y diámetro a la altura del pecho (DAP)), y del suelo (contenido de humedad, pH, % materia orgánica, nitrato y amonio).

Variables y Muestreo

Para el análisis de los factores abióticos y las comunidades de hongos ectomicorrízicos se tomaron las muestras de la parte central de cada cuadro de 100m² de primeros 10 cm de profundidad del suelo mineral. Se tomó una sola muestra en la parte media con un recipiente limpio y guantes para evitar contaminación de ADN entre las muestras. Estas muestras se separaron en dos

partes, una para los análisis edáficos y la otra mitad para la extracción de ADN. Las muestras para análisis de suelo se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio. Las muestras para ADN se colocaron en bolsas de plástico y se secaron al aire por 48 horas, luego se colocaron 15 g del suelo en bolsas de papel dentro de bolsas herméticas con gel de silica para ser transportadas a Tartu, Estonia en donde se realizó la parte de biología molecular y bioinformática. Las muestras fueron obtenidas del 17 al 21 de agosto en el 2015.

Medición de humedad de suelo

Se pesaron 5 g de suelo de cada muestra en una charola anotando el peso específico de cada una. Se secaron en el horno a 150°C y se volvieron a pesar hasta llegar a peso constante. Con ambos datos se calculó el contenido gravimétrico de humedad en porcentaje mediante la siguiente formula:

$$\frac{((\text{Peso húmedo-charola}) - (\text{peso seco}))}{\text{peso seco}} * 100$$

Medición de pH

Para la estimación del pH de cada muestra se pesaron 5 g de suelo, y se colocaron en un vial con 50 ml de agua. Se pusieron a agitar a 200 rpm durante 30 minutos. Se midió el pH de cada muestra con un potenciómetro Basic Accumet AB15 pH Meter FisherScientific.

Medición de Contenido de Materia Orgánica

Para la estimación del porcentaje de materia orgánica del suelo se molió hasta convertir en un polvo fino y se utilizó el método de Walkley & Black (1946), el cual se basa en la oxidación de las formas activas de carbono orgánico del suelo.

Extracción de nitrógeno disponible en suelo Método de Robertson et al. (1999)

Se pesaron 10 g de suelo y se agregaron 50 ml de KCl 2N. Se pusieron a agitar 30 minutos, después se filtró el contenido a través de filtros Whatman N°1 y se recuperó el contenido en viales de plástico que se congelaron hasta que se realizaron las lecturas en un autoanalizador Bran-Luebbe.

Muestreo de la vegetación

La vegetación se muestreó recorriendo todo el cuadro y numerando cada árbol con DAP mayor a 10 cm y mapeando su ubicación en los tres cuadros. Se midió la cobertura de cada árbol con una cinta métrica y se dibujó la posición de cada árbol y el DAP. Se muestreó el primer cuadro en el mes de abril del 2015 y los otros dos durante el mes de enero del 2016. Se identificaron las especies vegetales leñosas con la ayuda de la M. en C. Ma. Guadalupe Cornejo Tenorio y el Dr. Guillermo Ibarra Manríquez. Se obtuvo la frecuencia, dominancia y densidad de cada (Cobertura) especie vegetal leñosa para obtener el valor de importancia relativa de cada especie.

Formulas usadas:

Frecuencia relativa.

$$Fi = (mi / M) \times 100$$

mi = unidades en las que aparece la especie M = total de unidades muestreadas.

Densidad relativa.

$$D = ni / A \times 100$$

n_i = total de individuos contados de una especie. A = total de área muestreada

$$\text{Cobertura} = \{D1 + D2 / 4\}^2 \times \pi$$

$D1$ es el diámetro mayor de la copa. $D2$ es el diámetro más grande perpendicular a éste.

$$\text{Área basal } AB = \pi r^2 \text{ donde } r = \text{DAP} / 2$$

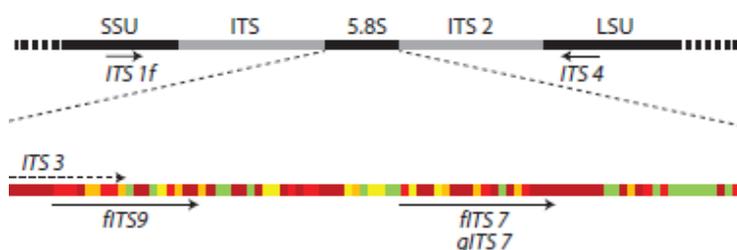
VIR. La suma de las frecuencias relativa (Fr), la densidad relativa (Dr) y la dominancia relativa (área basal Abr o cobertura Cr) de cada especie. Su valor máximo es de 300.

$$\text{VIR} = Fr + Dr + Cr$$

Extracción de ADN del suelo, amplificación y secuenciación.

Para la extracción de ADN se pesaron 5 g de suelo de cada muestra y se colocaron en tubos de 50 ml hasta la extracción del ADN. Se separaron las muestras en grupos de seis para poder trabajar de manera más eficiente. Se inició con la extracción de ADN en base a la metodología de Öpik et al. (2013) usando el kit de extracción Power MAX Soil ADN extraction y las instrucciones del producto.

Se escogieron los primers de la región ITS2 (Tabla 1) que, de acuerdo con Terdersoo et al. (2015), funciona mejor para la descripción de las comunidades fúngicas en comparación con la amplificación realizada con otros primers utilizados y mencionados en la literatura.



La Región ITS en donde la conformación de los primers ILLu_fITS7, ILLu_gITS7 (Foward) y ILLu_ITS4 (Reverse) cubren la región ITS2 que de acuerdo con Ihmark et al. (2012) funciona de mejor forma para lograr la obtención de mayor número de especies de hongos mediante la secuenciación de nueva generación.

Tabla 1. Secuencias de los primers usados, nombre y dirección.

Nombre del primer	Dirección (5'-3')	Secuencia del primer
<i>Amplicon PCR</i>		
ILLu_fITS7	Foward	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAG</u> <u>AGACAGGTGATCATCGAATCTTTG</u>
ILLu_gITS7	Foward	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAG</u> <u>AGACAGGTGATCATCGATCTTTG</u>
ILLu_ITS4	Reverse	<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA</u> <u>GAGACAGTCCTCCGCTTATTGATATGC</u>
<i>Index PCR</i>		
Forward index primer (S517;S502-S508)	Forward	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC AC[i5]TCGTCGGCAGCGTC
Reverse index primer (N701-N712)	Reverse	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7]G TCTCGTGGGCTCGG

Para la PCR de amplificación los adaptadores Illumina se encuentran subrayados y en texto normal los primers correspondientes. Para la PCR Index se uso Illumina Nextera XT Index Kit, el cual se usa para asignar una etiqueta de nucleótidos específicos para ser adjuntados con el amplicon obtenido de la primera PCR y así se puedan identificar cuando se hace la secuenciación por síntesis.

La PCR anidada se realizó en dos reacciones secuenciales para poder amplificar la región de interés y para asignar a cada secuencia una etiqueta específica (Anexos 1), en la primera reacción se realizó la PCR amplicón con las regiones específicas de los primers y una parte de la región con los adaptadores. La segunda fue la PCR Index que fue usada para complementar las secuencias de los adaptadores y añadir las etiquetas de identificación Nextera XT con las cuales cada secuencia obtenida resulta con los tags (etiquetas) específicos. Entre las reacciones, los amplicones de la primera PCR fueron purificados con el AMPure bead technology, con el fin de separar el producto amplificado de la PCR de otros elementos presentes en las muestras (Oligonucleótidos, sales, dNTPs y Taq polimerasa). Ya que esto está directamente relacionado con la calidad de las secuencias.

Se añadieron 3 µl de ADN de la muestra en la PCR Amplicón y 5 µl del Amplicón purificado para la PCR Index. Cada reacción de PCR contenían 0.2 µl de los primers de la concentración final y 0.1 µl de Smart-Taq Hot Red 2x PCR Mix. A todas las reacciones de PCR se le añadieron controles negativos (NTC no template control), esto con el fin de ver sino existió contaminación en todo el proceso. Los amplicones de la PCR Index fueron purificados con AMPureXP Kit y después se midió la concentración de ADN con el Appliskan fluorescence-based microplate reader (Thermo Scientific) y la solución PicoGreenR dsDNA Quantitation Reagent (Quant-iT dsDNA Broad Range Assay Kit, Invitrogen) con 3 réplicas de cada muestra (las concentraciones pueden ser observadas en las tablas de los anexos).

Tabla 2. Programa de ciclos y condiciones que se usaron para las amplificaciones en el termociclador.

PCR Amplicon		PCR Index	
95 °C	15 min	95 °C	15 min
95 °C	30 seg	95 °C	30 seg
55 °C	30 seg	55 °C	30 seg
72 °C	30 seg	72 °C	30 seg
72 °C	7 min	72 °C	7 min
4 °C	∞	4 °C	∞

Bioinformática

La secuenciación se realizó mediante la plataforma Illumina MiSeq 2*300 v3 run en los laboratorios de la compañía Biota P, en Estonia. La librería usada para la amplificación está basada en Illumina MiSeqsystem “16S Metagenomic Sequencing Library” de la cual se selecciona la región ITS2. Después de la secuenciación, las secuencias obtenidas se obtuvieron en archivos tipo FASTA y se procesaron con base en la metodología de Gweon et al. (2015) para identificar los OTUs comparando con la base de datos internacional (UNITE) (Kõljalg et al. 2005). Esto se llevó a cabo en la ventana de programación de Bio-Linux.

Las aplicaciones usadas para poner en marcha el pipeline fueron:

-BIOM-FORMAT version 2x (McDonald et al. 2012): para poner en formato las secuencias,

-FAST-X tools (Hannon, <http://hannonlab.cshl.edu>): para utilizar los archivos FASTA en los cuales vienen contenidas las secuencias de ADN

-VSEARCH 1.8.1 (Rognes et al. 2015): busca y empata las secuencias obtenidas

- ITSx 1.0.11 (Bengtsson-Palme et al. 2013): obtiene las secuencias que pertenecen a la región ITS
- PEAR 0.9. (Zhang et al. 2014): junta las secuencias en ambas direcciones (Forward y Reverse)
- RDP Classifier 2.10.2 6 (Wang et al. 2007): clasifica las secuencias obtenidas en comparación con las bases de datos en que se parearon las secuencias
- UNITE fungal ITS reference trained dataset 07/04/2014 (Kõljalg et al. 2005): base de datos contra la que se comparan las secuencias obtenidas para asignarlas a un taxón
- UNITE UCHIME reference dataset 11/03/2015: base de datos para retirar las quimeras.

Los pasos del pipeline se dividen en tres partes:

1) PIPITS_PREP: prepara los reads obtenidos del secuenciador Illumina MiSeq que se encuentran en los formatos FASTAQ para la extracción de la región ITS. El resultado es filtrado a través de FASTX-Toolkit para obtener un solo archivo y reducir el tamaño del archivo formando un archivo FASTA. 2) PIPITS_FUNITS: El archivo obtenido del paso anterior, PIPITS_FUNITS es seleccionado para extraer la región ITS de los reads con el ITSx que reorienta la secuencia en la dirección 5'-3' de los archivos FASTA. Esto hace que las secuencias forwards y reverse obtenidas se alineen para que puedan ser identificadas. 3) PIPITS_PROCESS: Con el uso de VSEARCH alinea las secuencias de la región ITS para asignar en OTUs quitando aquellas secuencias con menos de 100 pares de bases y usando un porcentaje de similitud del 97% para no sobreestimar la cantidad de especies encontradas. Después el programa UNITE UCHIME compara con la base de datos que se obtiene para encontrar las quimeras. Finalmente con el uso del RDP classifier, se hace la búsqueda de las especies obtenidas contra la base de datos de UNITE y el resultado se traslada a la base de datos la de abundancia de OTUs.

Filtrado de secuencias:

- » Número de pares de reads: 21 685 263
- » Número de reads conjuntados: 20 862 481
- » Número de reads de calidad filtrados: 19 543 758
- » Número de secuencias preparadas: 19 543 758
- » Número de secuencias de la región ITS: 19 523 867
- » No. de reads después de quitar los singletons y las quimeras: 18 226 423
- » Número de OTUs (especies de hongos):10 582
- » Número de muestras: 95

La muestra C2-25 es la única que no se pudo amplificar de las 96 muestras. Después de limpiar la base con los controles negativos quedaron un total de 10 378 OTUs.

Dado que no hay una convención o consenso para aceptar o rechazar las muestras con bajo rendimiento de secuencias, se realizaron curvas de rarefacción para cada una de ellas con las secuencias recuperadas para comparar el rendimiento entre ellas. Las muestras C2-21=48 OTUs y C3-10=66 OTUs, fueron las que presentaron un número menor a 1000 secuencias. A pesar de ser muestras con poco contenido de secuencias se decidió mantenerlas en el estudio para no afectar el diseño en el escalamiento espacial, ya que eran sólo dos muestras ubicadas de manera aleatoria, por lo que las réplicas dentro de cada cuadro ayudan a corregir la deficiencia. Después la base de datos se sometió al proceso de identificación de los grupos funcionales o gremios de hongos de acuerdo a su asignación taxonómica, usando el software en línea FUNGuild (Nguyen et al. 2015). Este software usa la tabla de OTUs original para asignarlos a un gremio funcional (simbiótico, patógeno y saprótrofo) en base a su clasificación a nivel de género y

especie. Dentro del gremio simbiótico los divide en arbuscular, ectomicorrízico, ericoide, endófito y líquen. Este análisis encontró 2572 asignaciones del total de 10378 OTUs para todos los gremios y sus subsecuentes divisiones. Después del proceso bioinformático se le llamará especies a las OTUs para darles una identidad biológica.

Análisis de datos

Las curvas de rarefacción fueron hechas con el software EstimateS (Colwell 2013) y con 100 aleatorizaciones. La mayoría de las gráficas fueron realizadas en Excel. Los análisis multivariados y el análisis de similitud (1-Bray Curtis) se realizaron en R (R version 3.2.2 (2015-08-14) "Fire Safety"). Los cálculos para obtener las gráficas de escalamiento espacial y el coeficiente de diversidad beta se realizaron como se sugiere en Arita & Rodríguez (2002) y Noguez et al. (2005). La riqueza en la escala A0 es el número total de especies encontradas en todo el cuadro A0, en la escala A1 es la riqueza acumulada promedio de los cuatro cuadros A1 en la escala A2 es la riqueza acumulada promedio de los 16 cuadros A2 y en la escala A3 es la riqueza promedio de los 32 cuadros A3. El recambio de las especies (coeficiente de diversidad beta de Whittaker), se obtuvo como la pendiente de la línea del logaritmo de los valores de riqueza a través de las escalas. También se obtuvieron valores de estadística descriptiva como la media, error estándar, desviación estándar, varianza de la muestra, mínimo, máximo para las variables obtenidos de los cuadros. Así como algunos coeficientes de correlación de Pearson y ANOVAS para algunas de las gráficas necesarias en el programa PAST versión 3.14 (Hammer et al. 2001).

El análisis de correspondencia canónica (CCA) de especies y variables bióticas y abióticas se realizó con los datos estandarizados mediante la función \sqrt{qt} basada en la raíz cuadrada y usando el paquete `vegan` versión 2.4-1 en el programa R mencionado.

RESULTADOS

Composición de la comunidad ectomicorrízica

Del total de especies de hongos encontradas (10 378), se identificaron principalmente Ascomycota (41%) y Basidiomycota (28%) en los tres cuadros y el total (Figura 4). Se observa que existe un alto porcentaje de especies (27%) que no fueron identificados. Los porcentajes de cada phylum fueron prácticamente idénticos en los tres cuadros y, por lo tanto, en el total. En el número de secuencias recuperadas, en cambio, se observó una mayor cantidad de secuencias de Basidiomycota que de Ascomycota y una menor cantidad de secuencias de hongos no identificados (Tabla 3).

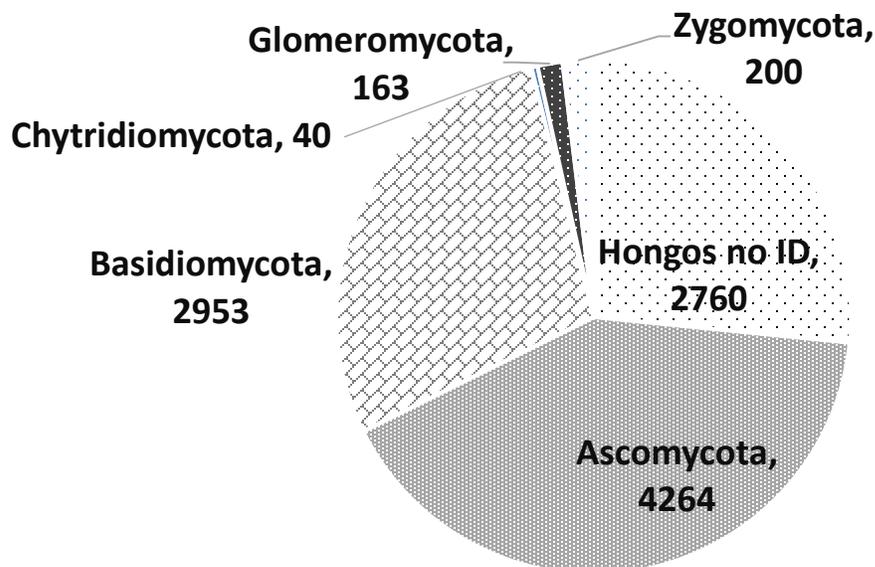


Figura 4. Composición taxonómica de las especies a nivel de phylum.

Tabla 3. Número de secuencias obtenidas por Phylum en total y para cada cuadro A0.

	Total	Cuadro 1	Cuadro 2	Cuadro 3
Ascomycota	2 663 479	836 428	819 224	1 007 827
Basidiomycota	6 478 269	2 058 444	2 130 794	2 289 031
Chytridiomycota	18 602	6 396	6 187	6 019
Glomeromycota	11 829	4 451	2 695	4 683
Zygomycota	1 99 437	88 544	57 118	53 775
Hongos sin identificación	1 012 283	287 603	313 902	410 778

El número total de especies de HECM encontradas fue de 674 y en cada cuadro A0 se recuperó más o menos la misma cantidad de especies, alrededor de 500. Cabe hacer notar que dicha cantidad contiene las especies totales y que algunos son compartidos entre ellas. En el Cuadro 1 se encontró 496 especies, mientras que en los otros dos cuadros se encontraron 472 y 510 respectivamente.

La curva de acumulación de especies muestra como en cada uno de los cuadros hay una tendencia ascendente que sugiere la presencia de más especies (Figura 5). Al analizar la curva de acumulación con la sumatoria de los tres cuadros se considera que el muestreo fue suficiente en base a los índices de completitud calculados en base al índice Chao 2 (C1=74.3%, C2=76.3%, C3=74.8% y total=85%) aunque no llegó a la asíntota, para cubrir la diversidad de HECM en la comunidad estudiada.

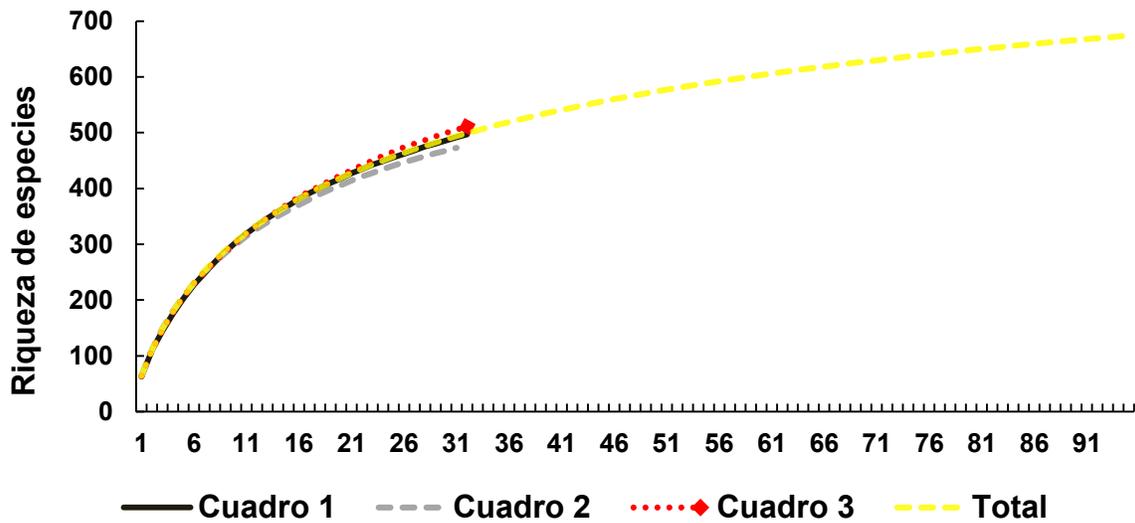


Figura 5. Curva de acumulación de especies de hongos ectomicorrízicos para cada uno de los cuadros A0 y para el total de muestras.

En total se encontraron 61 géneros de HECM (Tabla 4). *Inocybe*, *Tomentella* y *Russula* fueron los géneros más abundantes. Las especies seleccionadas son aquellas en que se tiene la certeza de que son HECM y fueron identificadas hasta el nivel de género y especie después del proceso bioinformático.

Tabla 4. Número de especies ectomicorrízicas encontradas de cada género.

Género	Especies	Género	Especies	Géneros	Especies
<i>Amanita</i>	11	<i>Gyroporus</i>	16	<i>Pulvinula</i>	3
<i>Amphinema</i>	23	<i>Hebeloma</i>	1	<i>Ramaria</i>	4
<i>Astraeus</i>	1	<i>Helvella</i>	1	<i>Rhizopogon</i>	6
<i>Boletopsis</i>	2	<i>Humaria</i>	2	<i>Russula</i>	52
<i>Boletus</i>	1	<i>Hydnellum</i>	9	<i>Sarcodon</i>	7
<i>Brauniellula</i>	2	<i>Hydnobolites</i>	3	<i>Scleroderma</i>	4
<i>Byssocorticium</i>	5	<i>Hydnum</i>	2	<i>Sebacina</i>	45
<i>Cenococcum</i>	24	<i>Hysterangium</i>	5	<i>Serendipita</i>	2
<i>Ceratobasidium</i>	2	<i>Inocybe</i>	118	<i>Sistotrema</i>	10
<i>Chloridium</i>	5	<i>Lactarius</i>	4	<i>Sphaerosporella</i>	4
<i>Chroogomphus</i>	1	<i>Lyophyllum</i>	5	<i>Strobilomyces</i>	5
<i>Clavulina</i>	14	<i>Melanogaster</i>	1	<i>Suillus</i>	10
<i>Coltricia</i>	2	<i>Meliniomyces</i>	2	<i>Tarzetta</i>	1
<i>Cortinarius</i>	36	<i>Otidea</i>	1	<i>Thelephora</i>	1
<i>Craterellus</i>	3	<i>Pachyphloeus</i>	19	<i>Tomentella</i>	60
<i>Elaphomyces</i>	4	<i>Peziza</i>	13	<i>Tomentellopsis</i>	3
<i>Endogone</i>	14	<i>Phellodon</i>	6	<i>Tricholoma</i>	24
<i>Entoloma</i>	12	<i>Piloderma</i>	2	<i>Tuber</i>	5
<i>Gautieria</i>	3	<i>Pisolithus</i>	1	<i>Tylopilus</i>	1
<i>Geopyxis</i>	1	<i>Pseudotomentella</i>	17	<i>Tylospora</i>	31
				<i>Wilcoxina</i>	1

Inocybe y *Russula* también fueron de los géneros con más abundancia en número de secuencias, y otros como *Sebacina* y *Tylospora* que no destacaron por el número de especies (Tabla 5). El número de secuencias de cada género es distinto entre los tres cuadros A0, lo que nos habla de la distinta distribución de las especies entre ellos y de la cantidad de ADN que podemos encontrar producto del micelio y las esporas presentes en el suelo.

Tabla 5. Número de secuencias de cada género encontrado por cuadro.

	Cuadro 1	Cuadro 2	Cuadro 3		Cuadro 1	Cuadro 2	Cuadro 3
<i>Amanita</i>	5204	7786	169646	<i>Lyophyllum</i>	1194	24	121
<i>Amphinema</i>	7994	10369	1253	<i>Melanogaster</i>	1020	1554	1728
<i>Astraeus</i>	29			<i>Meliniomyces</i>	37	132	135
<i>Boletopsis</i>	2		140	<i>Otidea</i>	39	47	26
<i>Boletus</i>	129			<i>Pachyphloeus</i>	5023	2202	4977
<i>Brauniellula</i>	78	51	26	<i>Peziza</i>	19397	21317	2717
<i>Byssocorticium</i>	649	2121	11050	<i>Phellodon</i>	23	1331	735
<i>Cenococcum</i>	61769	24412	12992	<i>Piloderma</i>	27	391	1
<i>Ceratobasidium</i>	34		249	<i>Pseudotomentella</i>	20481	13669	4247
<i>Chloridium</i>	771	223	378	<i>Pulvinula</i>	4	16	43
<i>Chroogomphus</i>	413	31	15262	<i>Ramaria</i>	138	93	311
<i>Clavulina</i>	3317	38423	33092	<i>Rhizopogon</i>	8296	6870	2014
<i>Coltricia</i>	2	6	7	<i>Russula</i>	277155	239140	186402
<i>Cortinarius</i>	14945	8366	48878	<i>Sarcodon</i>	10	13	10655
<i>Craterellus</i>	706	368	69	<i>Scleroderma</i>	156	1002	2156
<i>Elaphomyces</i>	35	867	3249	<i>Sebacina</i>	238708	117679	34081
<i>Endogone</i>	102	174	132	<i>Serendipita</i>	13	7	60
<i>Entoloma</i>	176	18	258	<i>Sistotrema</i>	138	639	545
<i>Gautieria</i>	15		18	<i>Sphaerosporella</i>	206	2348	4000
<i>Geopyxis</i>	1499	2	4	<i>Strobilomyces</i>	252	218	1623
<i>Gyroporus</i>	34715	2734	800	<i>Suillus</i>	13151	3002	3249
<i>Hebeloma</i>	14	11	27	<i>Tarzetta</i>	32		
<i>Helvella</i>	1051	911	338	<i>Thelephora</i>	30		
<i>Humaria</i>	86	141	52	<i>Tomentella</i>	48879	72808	35460
<i>Hydnellum</i>	48154	3471	291	<i>Tomentellopsis</i>	8	96	283
<i>Hydnobolites</i>	214	143	796	<i>Tricholoma</i>	29314	154060	26103
<i>Hydnum</i>	18	9		<i>Tuber</i>	1826	2735	3645
<i>Hysterangium</i>	2	13	3898	<i>Tylopilus</i>	200	6	3
<i>Inocybe</i>	116886	91003	132758	<i>Tylospora</i>	50340	38989	32686
<i>Lactarius</i>	7	310	407	<i>Wilcoxina</i>	105	3	3192

El mapa del contenido de especies ectomicorrízicas encontradas en cada cuadro A3 muestreado muestra la alta riqueza de estos hongos en el sitio de estudio (Figura 6). El promedio de especies del total de cuadros de 10×10 m es de 65.15, en un solo punto de muestreo. Así mismo se observa la gran variación que existe en la riqueza de especies por muestra, ya que se encuentran desde 40 hasta 102 especies.

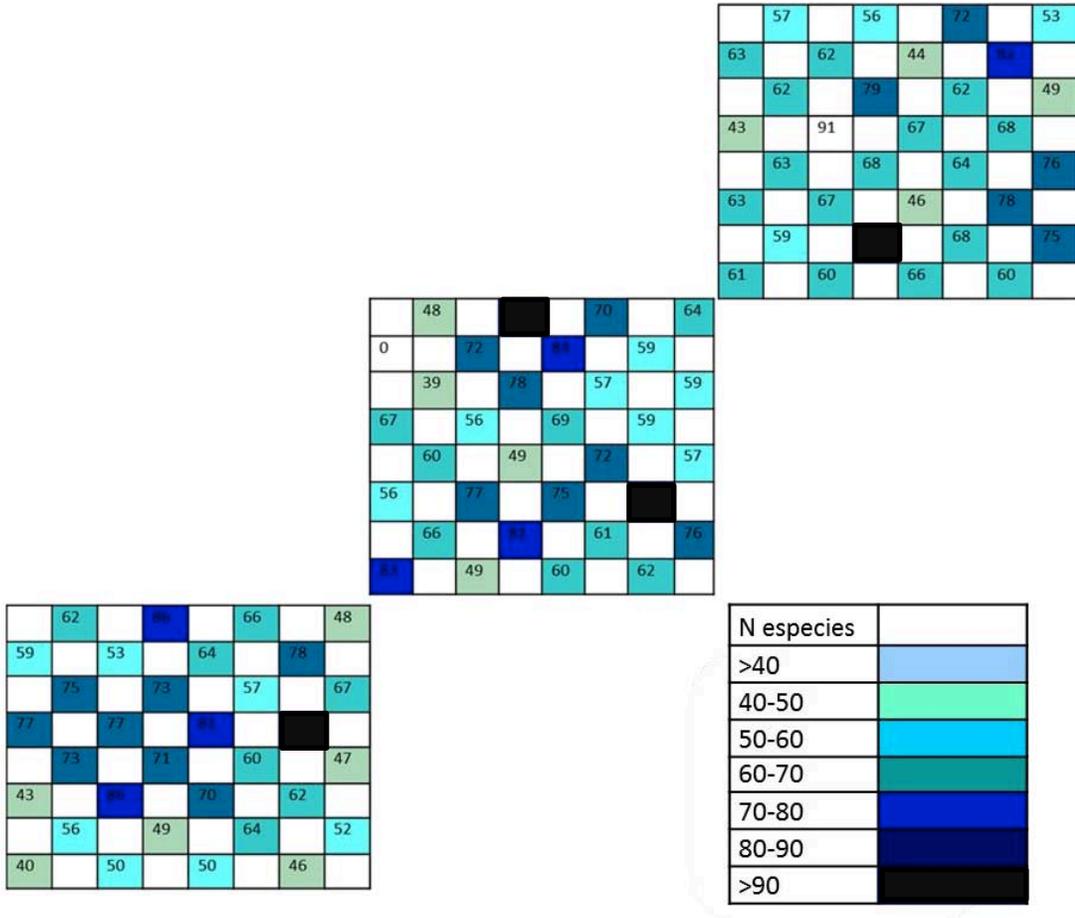


Figura 6. Cuadro con el número de especies ectomicorrízicos que se encontraron en cada cuadro muestreado de 100 m².

Se observaron patrones de distribución en los hongos ectomicorrízicos claros ya que hay gran cantidad de especies que sólo se encuentran en uno o dos cuadros, mientras que aquellas especies que presentan una distribución más amplia son pocas (Figura 7). Básicamente este patrón se cumplió de manera muy similar para los tres cuadros muestreados. No hubieron diferencias significativas al comparar la distribución de las frecuencias en el número de cuadros ocupados entre los cuadros con un ANOVA (Media C1=30.62, C2=29.56 y C3=31.93, P= 0.99).

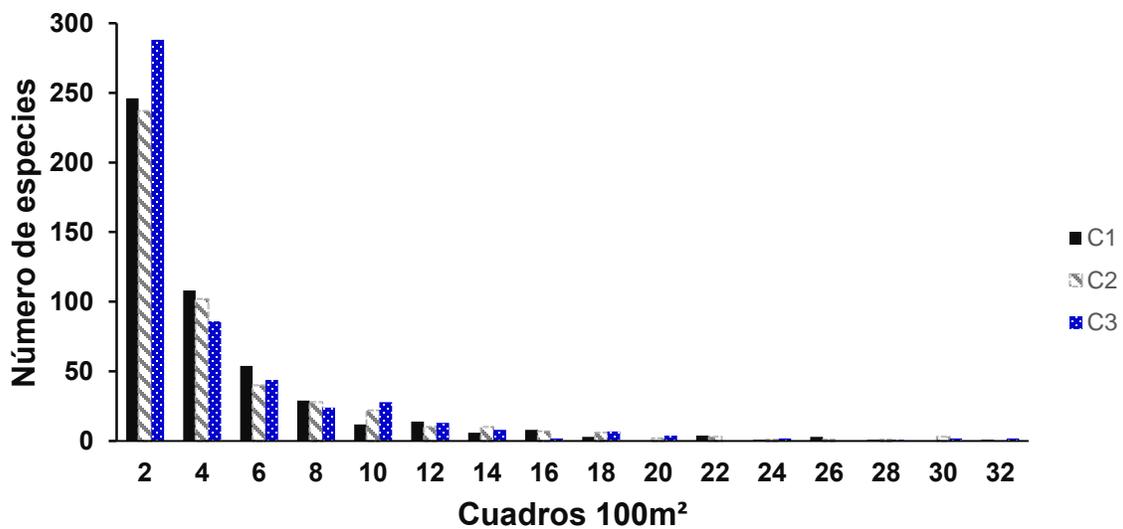


Figura 7. Frecuencias de distribución de las especies en cada cuadro de 100 m² para los tres cuadros muestreados.

De las 674 especies, casi la mitad 318, se encuentran compartidas entre los tres cuadros muestreados pero cada uno de los cuadros contiene un gran número de especies únicas (Figura 8). Esto coincide con los análisis de similitud (1-Bray-Curtis), en donde se aprecia una gran diferencia en composición entre los cuadros (Figura 13).

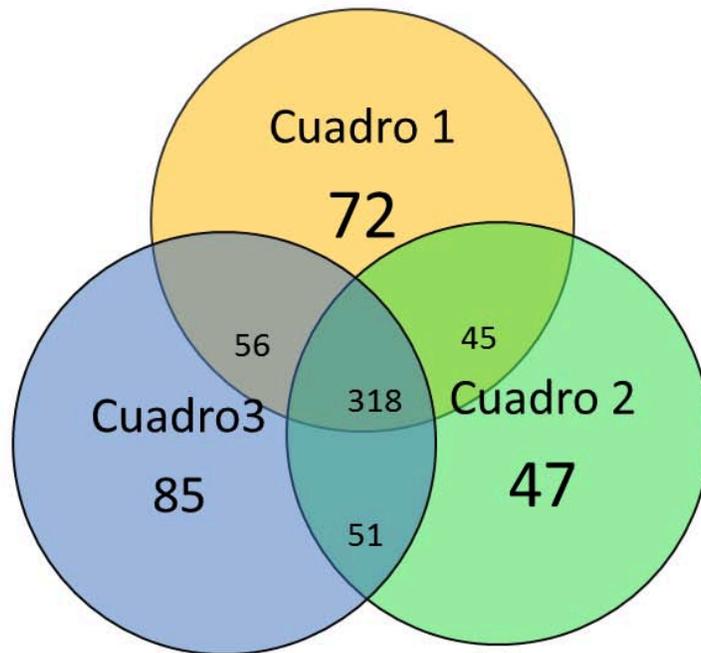


Figura 8. Diagrama de Venn con el número de especies ectomicorrízicas únicas y compartidas encontrados en cada cuadro A0 de muestreo.

Relaciones espaciales de la comunidad ectomicorrízica

La cantidad de especies que se encuentra aumenta rápidamente con la distancia, hasta aproximadamente los 80 m (Figura 9). A partir de esa distancia la pendiente disminuye, pero se siguen encontrando consistentemente especies nuevas hasta el punto más lejano y no se observa el alcance de una asíntota.

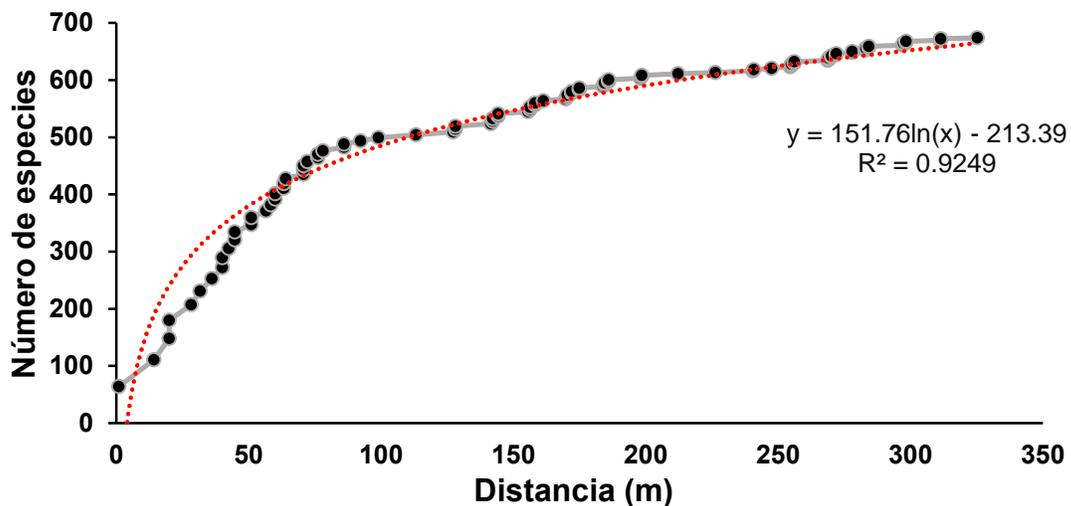


Figura 9. Curva de acumulación de especies del cuadro de inicio (Esquina inferior izquierda de la cuadrícula 1) al punto más distante (esquina superior derecha de la cuadrícula). Las distancias entre los puntos van del centro de un cuadro al otro.

En la gráfica de acumulación de especies en función del área muestreada (Figura 10) se observa igualmente un aumento pronunciado hasta los 400 m² (A2), y pendientes decrecientes de allí a los 1600 m² y nuevamente de ahí a los 6400 m² (A0). Sin embargo, es aún más evidente que en la gráfica con las distancias lineales que no se alcanza la asíntota incluso al llegar a los 12 800 m². En base al análisis de regresión entre el número de especies y el área es de 0.9025.

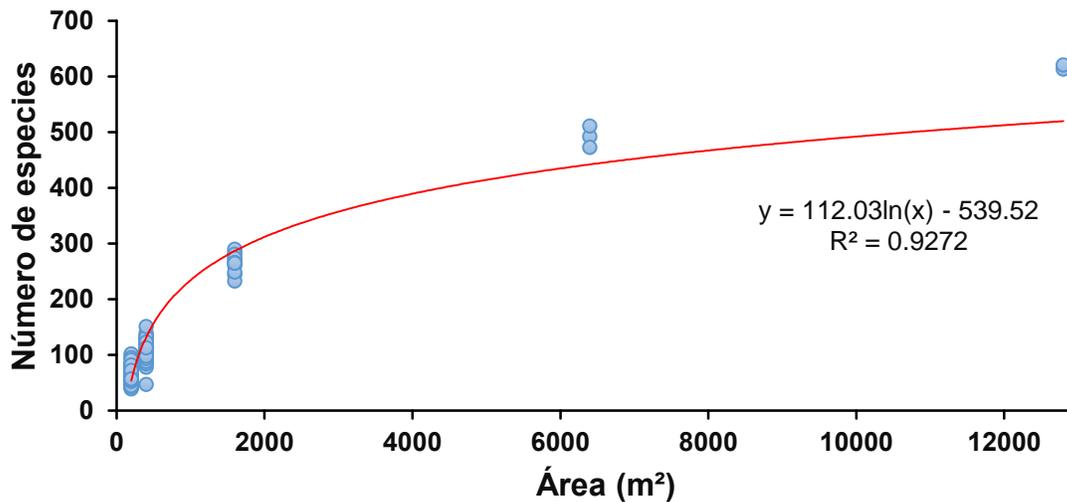
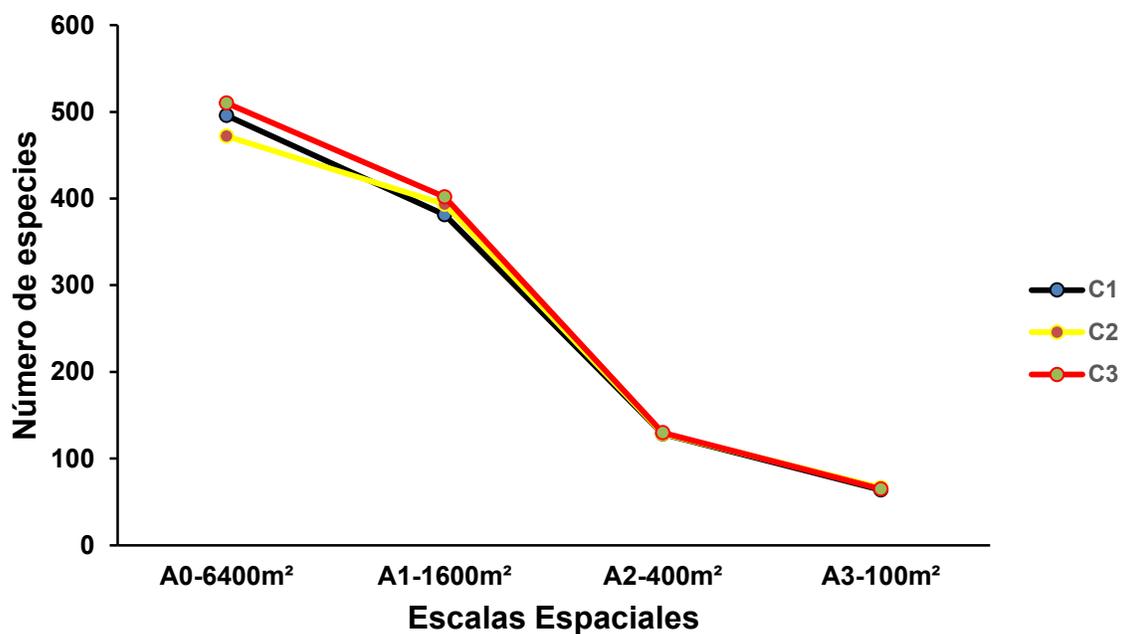


Figura 10. Curva de acumulación de especies del área más pequeña (100 m²) al área más grande (12800 m²).

Al examinar la riqueza total de especies que se encuentra a cada escala (Figura 11), se observa que los cambios mayores se dan entre los 400 y los 1600 m², si bien las tres pendientes son pronunciadas. La gráfica muestra mucho parecido entre los tres cuadros. A pesar de la gran diferencia que existe en la composición de las tres comunidades, el ANOVA comparando su riqueza total de especies en a las cuatro áreas confirmó que no hay diferencias significativas entre ellas (P=0.28). Es decir el patrón de incremento espacial es el mismo, pero con diferentes especies.



	A0 (6400m ²)	A1 (1600m ²)	A2 (400m ²)	A3 (100m ²)
Media	492	392.22	129.08	65.08
Error estándar	10.96	5.95	0.43	0.77

Figura 11. Número de especies distintas que pueden ser encontradas en función de la escala espacial para los tres cuadros A0. Valores de media y error estándar.

Los coeficientes de diversidad beta que se calcularon (Whittaker (-log pendiente)) a partir de la gráfica del logaritmo de la riqueza de especies fueron parecidos y altos cercanos a dos, en los tres cuadros (C1 $r^2=0.9909$ $\beta=1.9380$, C2 $r^2=0.9874$ $\beta=1.8866$ y C3 $r^2=0.9903$ $\beta=1.9541$), lo que indica un recambio de especies similar y alto en las escalas estudiadas.

Al conjuntar los cuadros 1-2, y 2-3, para aumentar la escala a un nivel más alto (12 800 m²), se aprecia una disminución más clara en la incorporación de nuevas especies que ya parece acercarse a la asíntota (Figura 12). Los valores del coeficiente beta bajan al incluir esta escala: $R^2=0.96$, C1-C2 =1.72 y C2-C3=1.75. En este caso solamente hay dos curvas, que se construyen al unir dos arreglos de cuadros y que permiten evaluar a una escala más manteniendo la misma representatividad.

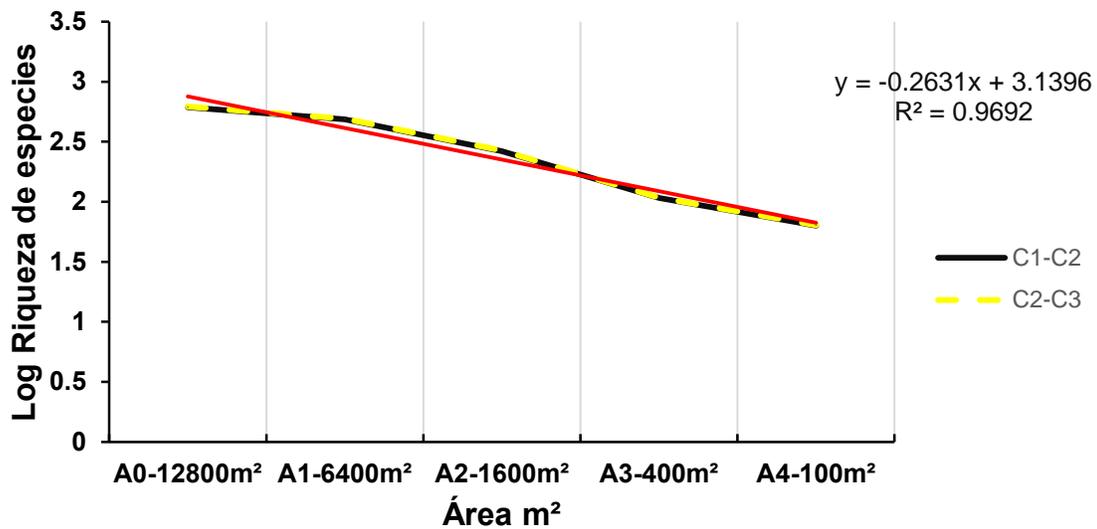


Figura 12. Logaritmo de la riqueza de especies C1-C2 y C2-C3.

A la escala más pequeña (100 m²), donde se pueden comparar más puntos, las comunidades de la mayoría de los puntos de muestreo difieren bastante entre sí y ninguna tiene una similitud más del 25% en cuanto a su composición (Figura 13) basándose en la presencia y abundancia de cada una. La variación en la similitud a la escala de 100 m² es muy alta y, si bien la tendencia es negativa con la distancia, la R^2 es casi cero por lo que no hay relación entre la distancia y la similitud en base al coeficiente de correlación de Pearson obtenido (-0.18) se puede observar que la correlación es casi nula, pero con una tendencia a ser negativa como se esperaría.

Por lo tanto, es tan factible encontrar una comunidad parecida como una similar al alejarse en distancia, pero el intervalo de similitud, al igual que en la escala más grande, no rebasa el 0.25 en ningún punto. La similitud de las comunidades en la escala más grande, de 6400 m², es baja: C1-C2=0.26, C2-C3=0.28, C1-C3=0.22, y es menor como se esperaría entre las cuadrículas más distantes, la 1 y la 3.

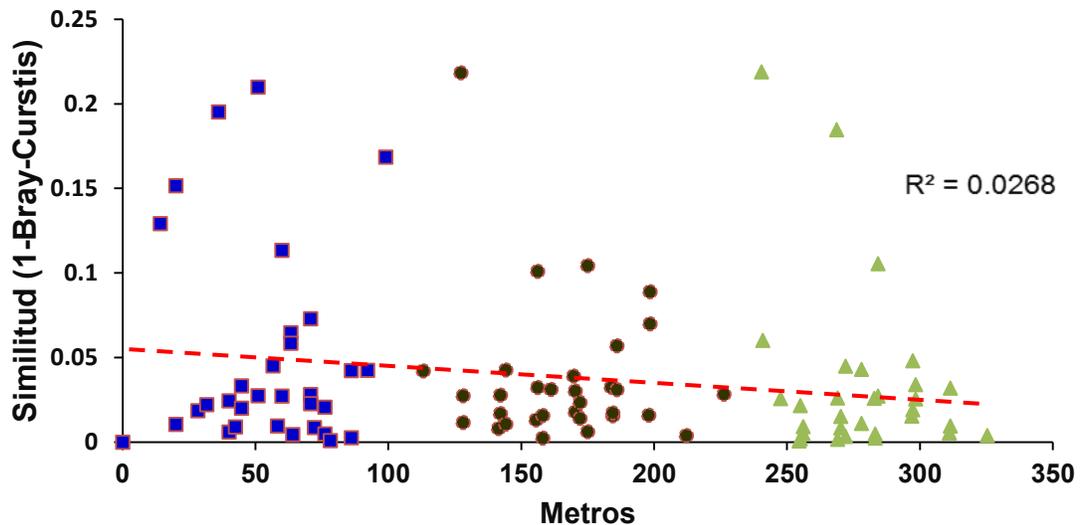


Figura 13. Relación entre efecto de la distancia entre puntos de muestreo en la similitud en la composición de especies.

Al comparar la similitud de las comunidades en función del área muestreada, se observó lo contrario, una tendencia de aumento en la similitud al incrementarse la escala (Figura 14). Sin embargo, esto debe interpretarse con cautela porque el número de puntos que construyen esta relación disminuye considerablemente con el área. Esa tendencia de aumento se define solo hasta la escala más grande, que solo tiene tres puntos, y en este caso la variación es tan alta que el aparente incremento puede ser resultado de que esos tres puntos coincidieron en tener valores un poco más altos. En las escalas inferiores, la variación a la escala de 100 m² cubre todos los valores encontrados a 400 y 1600 m², lo que sugeriría que la falta de relación con la distancia que se observó en la figura 14 se mantiene en términos de área al menos hasta la escala de 1600 m².

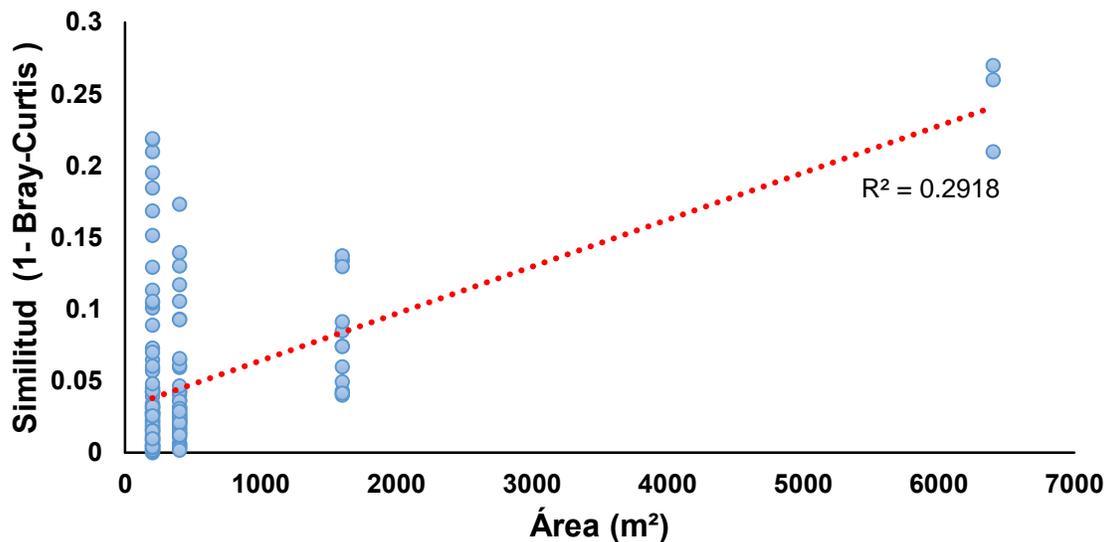


Figura 14. Efecto del tamaño del área de muestreo en la similitud de la composición de especies.

Se usaron los datos de la figura 13 a los 100 m² usando el mismo punto de referencia en todos los casos para los índices calculados a las escalas mayores.

Relación entre la distribución de los hongos ectomicorrízicos y los factores bióticos y abióticos

La vegetación leñosa cubrió de manera amplia casi toda el área de los cuadros A0 (Figuras 15-17). El cuadro con menos vegetación fue el dos y los árboles de los tres cuadros sumaron 11 especies (Tabla 6) (Cobertura de Cuadro 1= 6244.13m², cuadro 2=5008.31m² y cuadro 3=6359.30m²). La comunidad de árboles que forman indudablemente ectomicorrizas también tuvo una cobertura amplia en los tres cuadros A0 (Cobertura cuadro 1=3885.53m², cuadro 2=3857.32m² y cuadro 3=5832.01m²) y estuvo conformada por dos especies de pino y tres de encino (*Pinus pseudostrobus*, *Pinus ayacahuite*, *Quercus subspathulata*, *Quercus laeta* y *Quercus obtusata*). Las especies más importantes en base al valor de importancia relativa fueron *Pinus pseudostrobus* y *Pinus ayacahuite* en los tres cuadros y en el cuadro tres también *Quercus subspathulata*.

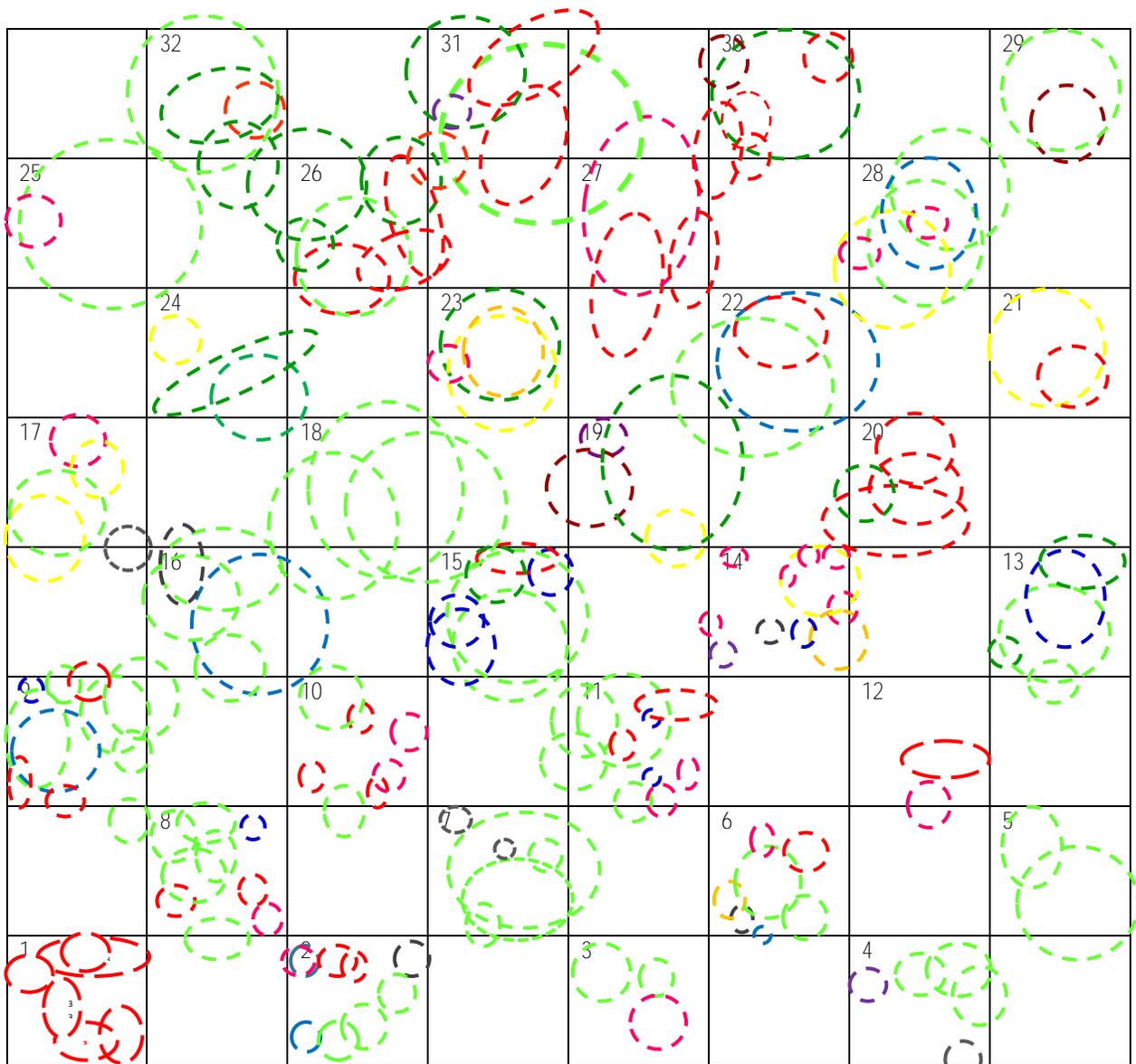


Figura 15. Distribución de la vegetación leñosa Cuadro 1.

Tabla 6. Especies vegetales leñosas encontradas en los tres cuadros. Con * las especies que forman ectomicorriza.

1	<i>Garrya longifolia</i>	7	<i>Quercus subspathulata</i> *
2	<i>Pinus ayacahuite</i> *	8	<i>Quercus obtusata</i> *
3	<i>Pinus pseudostrobus</i> *	9	<i>Quercus laeta</i> *
4	<i>Ilex brandegeana</i>	10	<i>Inga hintonii</i>
5	<i>Verbesina fastigiata</i>	11	<i>Saurauia serrata</i>
6	<i>Styrax argenteus</i>		

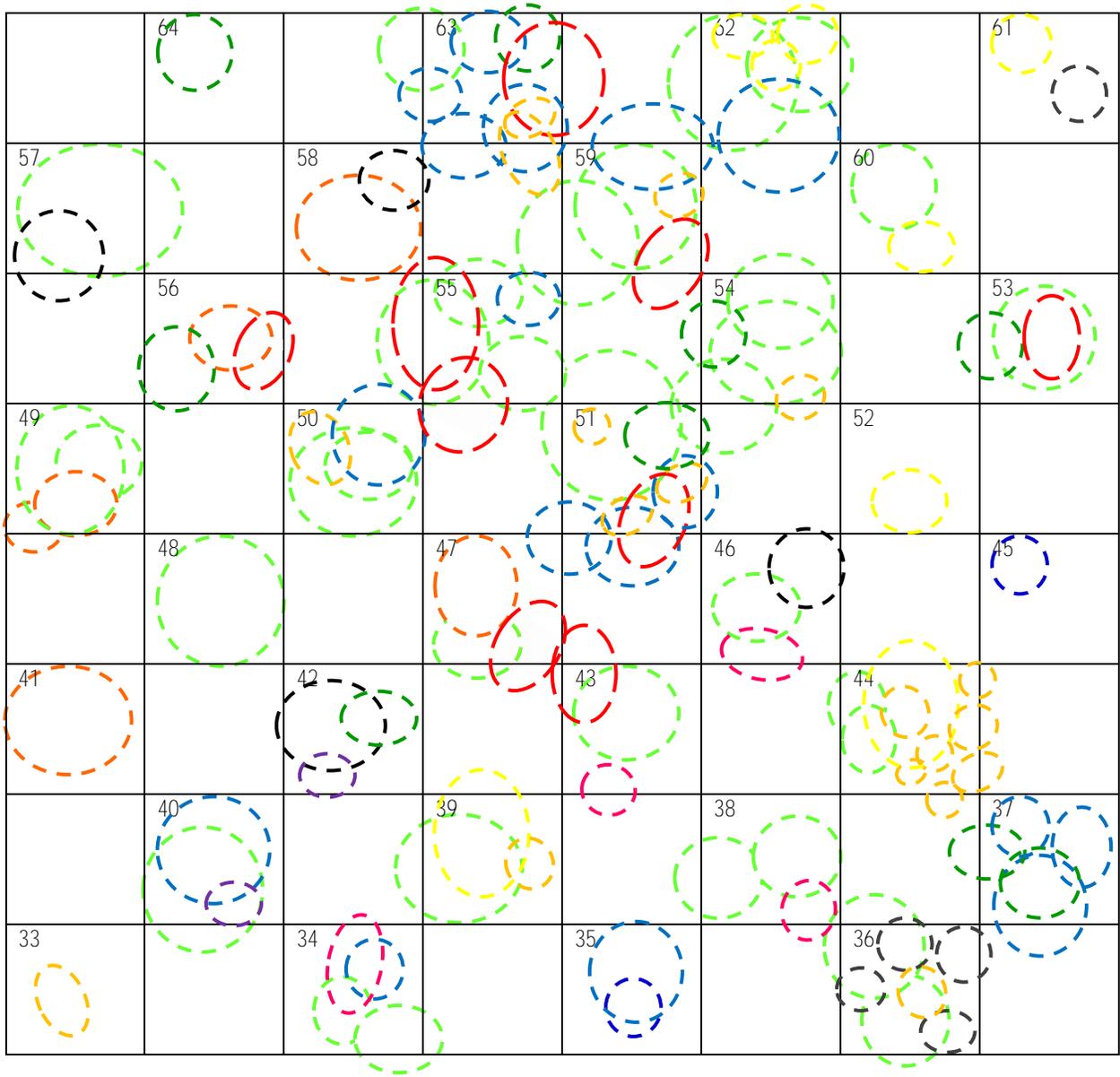


Figura 16. Distribución de la vegetación leñosa Cuadro 2.

1	<i>Garrya longifolia</i>	7	<i>Quercus subspathulata*</i>
2	<i>Pinus ayacahuite*</i>	8	<i>Quercus obtusata*</i>
3	<i>Pinus pseudostrobus*</i>	9	<i>Quercus laeta*</i>
4	<i>Ilex brandegeana</i>	10	<i>Inga hintonii</i>
5	<i>Verbesina fastigiata</i>	11	<i>Saurauia serrata</i>
6	<i>Styrax argenteus</i>		

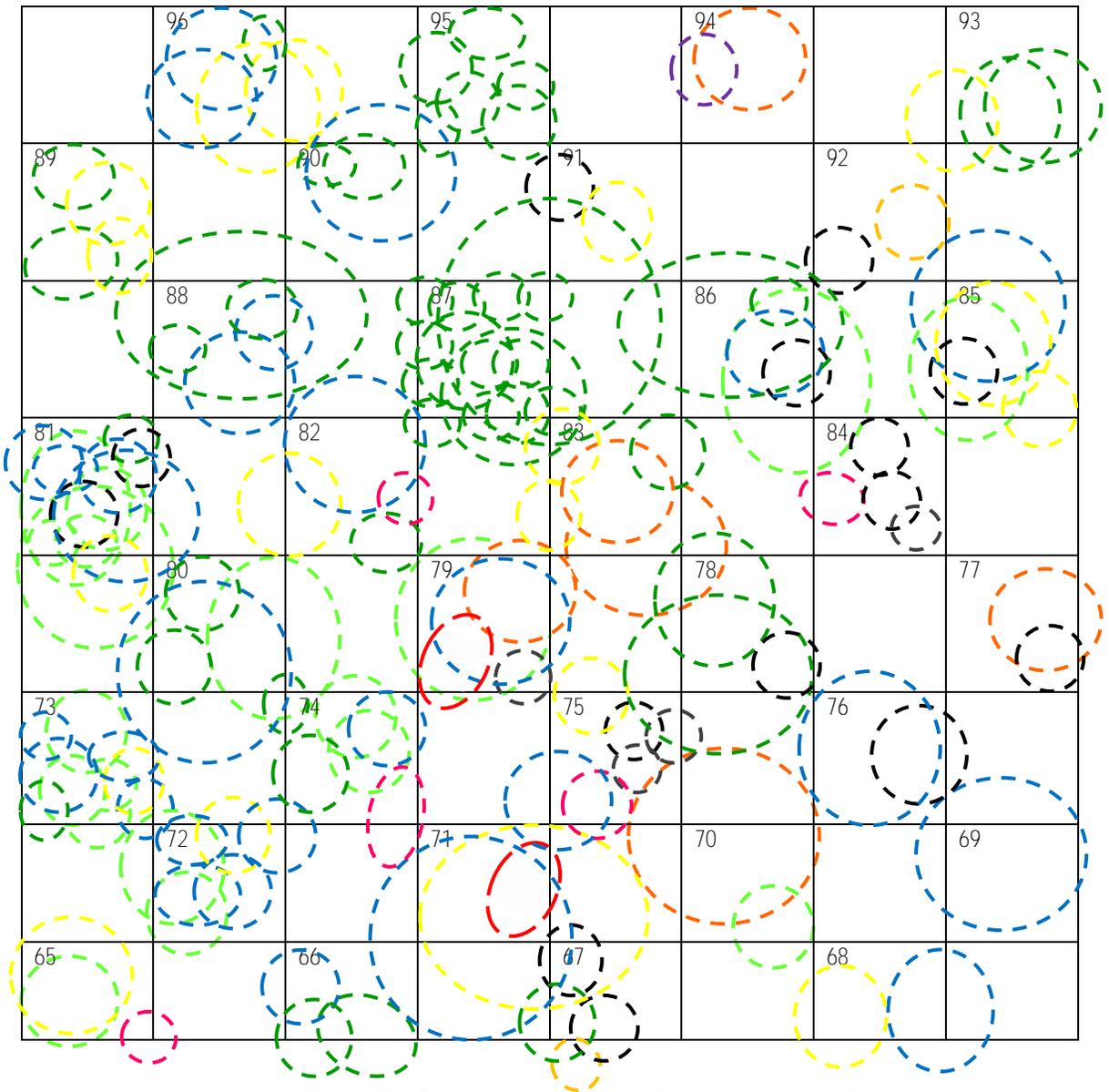


Figura 17. Distribución de la vegetación leñosa del Cuadro 3.

1	<i>Garrya longifolia</i>	7	<i>Quercus subspathulata*</i>
2	<i>Pinus ayacahuite*</i>	8	<i>Quercus obtusata*</i>
3	<i>Pinus pseudostrobus*</i>	9	<i>Quercus laeta*</i>
4	<i>Illex brandegeana</i>	10	<i>Inga hintonii</i>
5	<i>Verbesina fastigiata</i>	11	<i>Saurauia serrata</i>
6	<i>Styrax argenteus</i>		

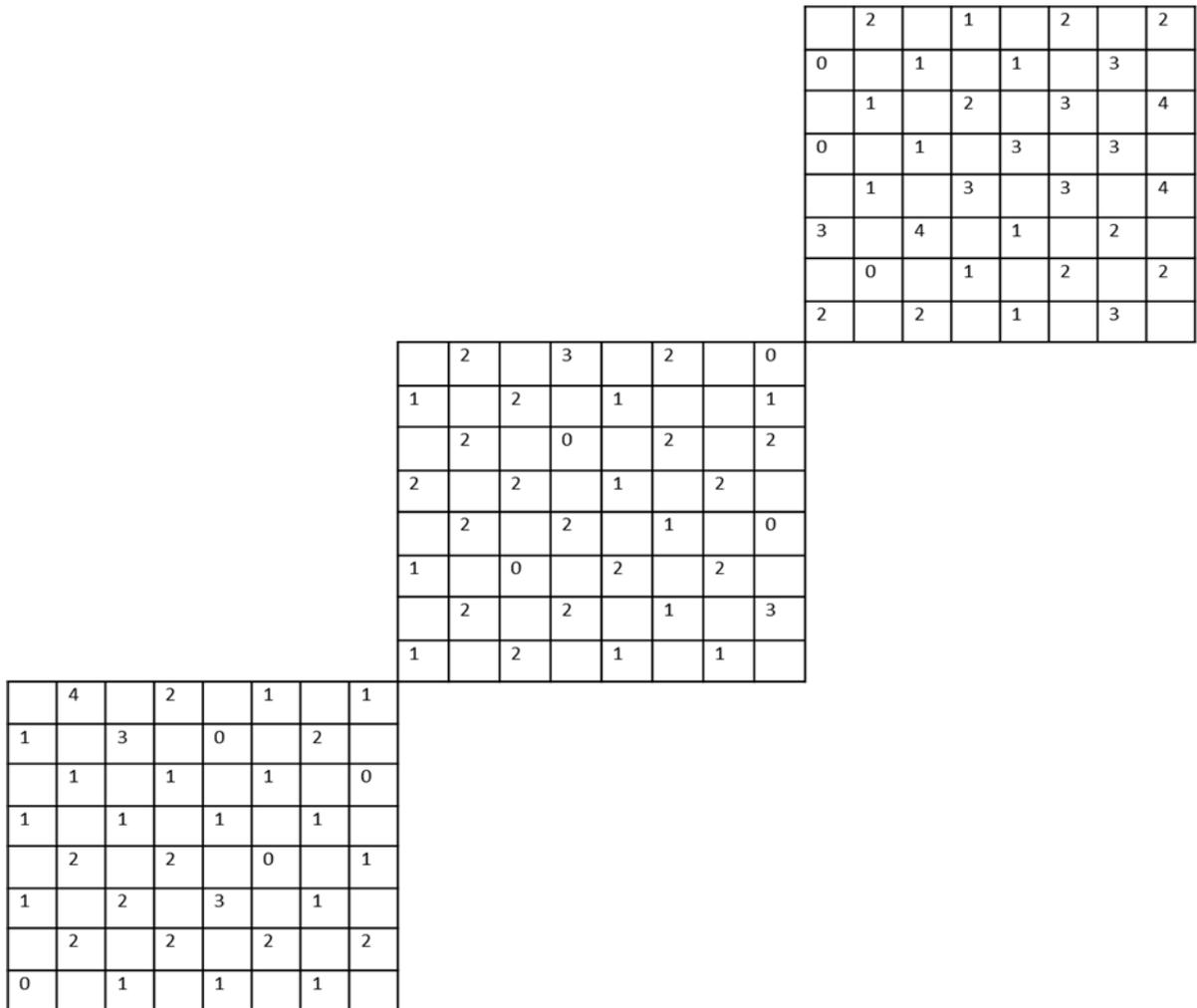
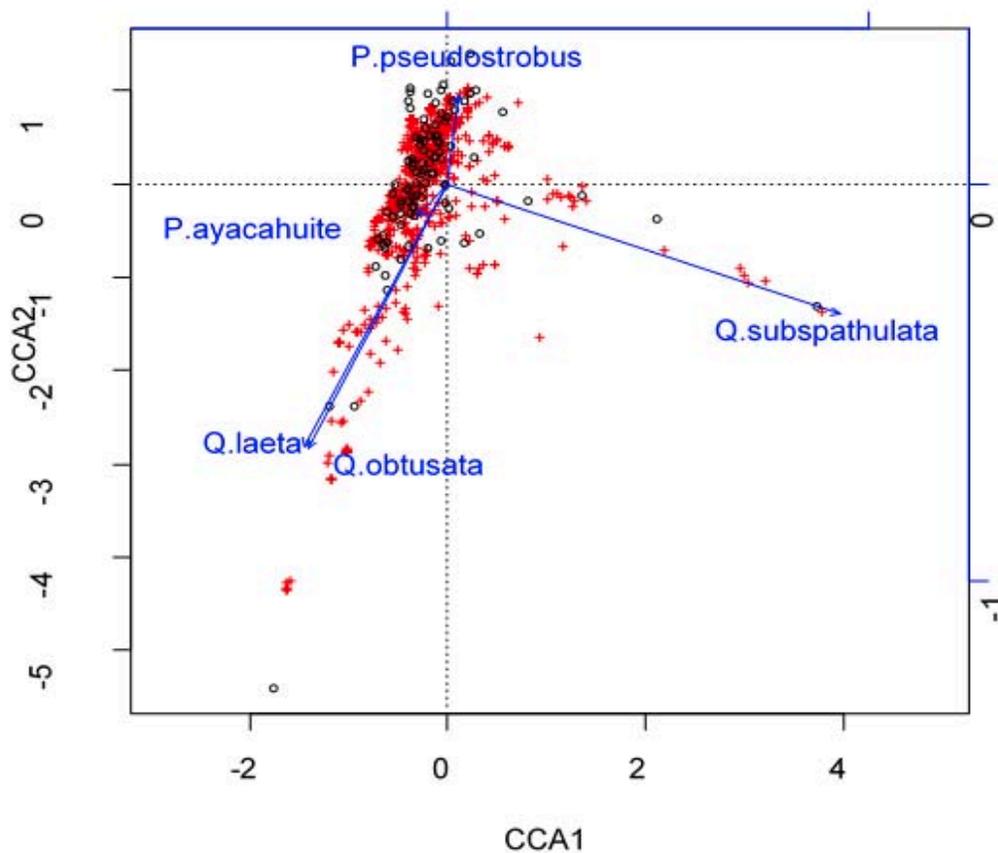


Figura 18. Riqueza de árboles que forman ectomicorriza en cada cuadro A3.

	Especies	VIR
C1	<i>Pinus pseudostrobus</i>	23.285
	<i>Garrya longifolia</i>	18.046
	<i>Pinus ayacahuite</i>	15.385
C2	<i>Pinus pseudostrobus</i>	39.543
	<i>Saurauia serrata</i>	13.771
	<i>Pinus ayacahuite</i>	11.035
C3	<i>Pinus pseudostrobus</i>	24.525
	<i>Pinus ayacahuite</i>	15.655
	<i>Quercus subspathulata</i>	13.683

Tabla 7. Valor de Importancia Relativa de las tres especies de árboles más abundantes de cada cuadrícula.

En el análisis CCA explorando la asociación de las especies de árboles con las especies de HECM, el modelo no alcanzó a ser significativo ($P=0.062$), por lo que se concluyen que no se asocian. Sin embargo quedó cerca de ser significativo y en la gráfica (Figura 19) se observa que las especies de HECM se distribuyen principalmente con *Pinus pseudostrobus* y *Pinus ayacahuite*, las cruces representan las especies de HECM sobre los vectores representativos de las dos especies de pinos. Algunas especies de hongos, que son muchas menos que en comparación con los pinos, solo se encuentran relacionadas a los tres encinos al parecer *Q. obtusata* (*encino blanco*) y *Q. laeta* (*encino blanco*) comparten grupos similares de HECM (correlación negativa) y las especies relacionadas a *Quercus subspathulata* son menos (correlación positiva). La variación explicada por el eje uno fue de 0.2732 y por el eje 2 de 0.2327, ambos ejes explican el 0.5059 de la variación de los datos.



	CCA1	CCA2	P (>F)
P.pseudostrobus	0.02437	0.22167	0.656
Q.obtusata	-0.33105	-0.66226	0.147
Q.laeta	-0.34159	-0.65869	0.254
Q.subspathulata	0.92938	-0.32752	0.072
P.ayacahuite	-0.06892	-0.08111	0.658

Figura 19. Análisis de correspondencia canónica de la relación entre las especies de hongos y los árboles ectomicorrízicos. Las (+) son Especies de hongos, los (o) son muestras.

Se encontró una variación alta en las variables de vegetación (Cobertura y riqueza de especies) y suelo que se midieron a la escala de 100 m², considerando que se trata de un área pequeña y en apariencia muy homogénea dentro del bosque (Figuras 20-24). La humedad varió en hasta 30%, el pH en 1.5 unidades, la materia orgánica en 10% y el amonio, que fue claramente la forma más abundante de nitrógeno disponible, en 20 mg/g.

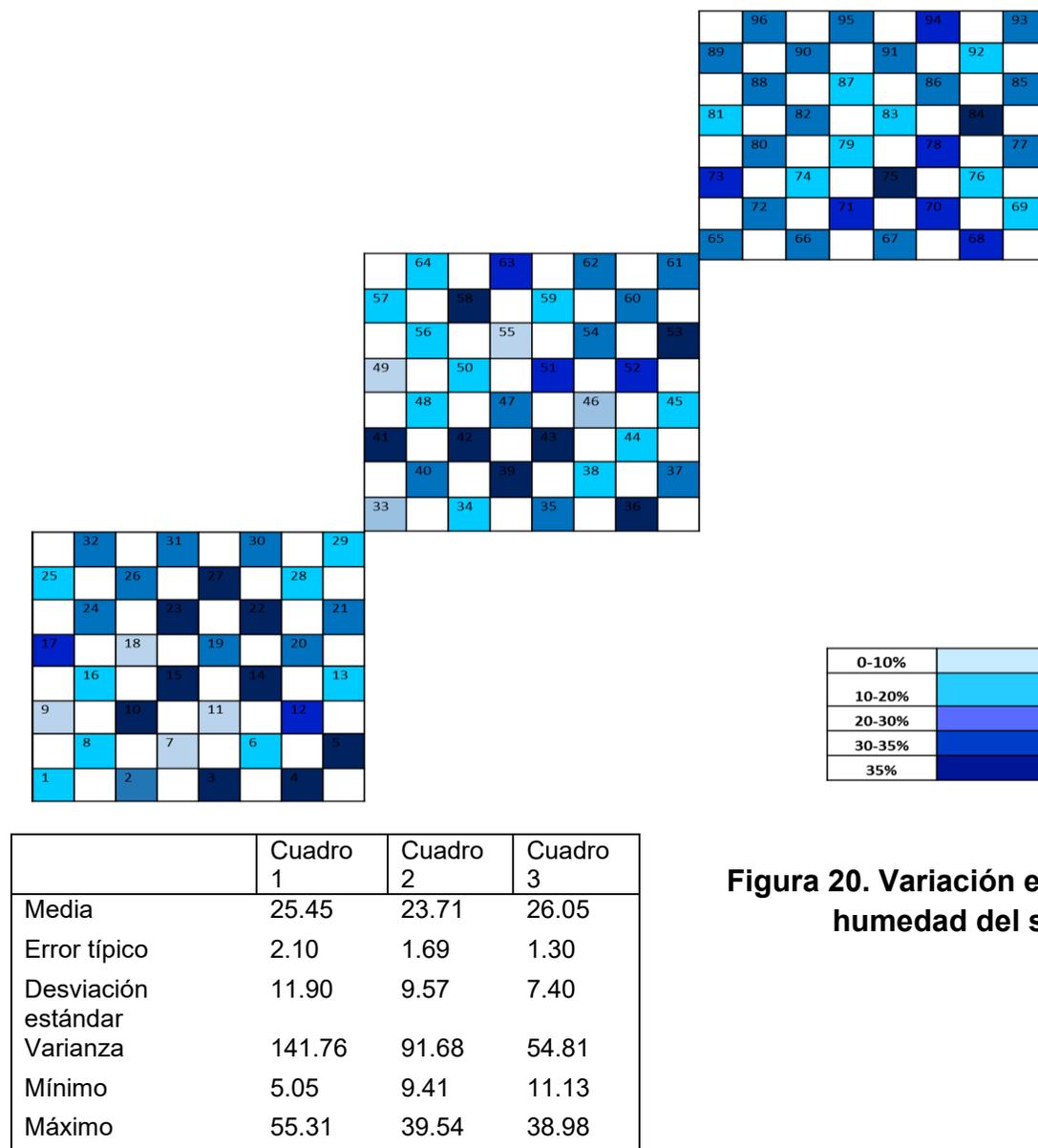


Figura 20. Variación espacial en la humedad del suelo.

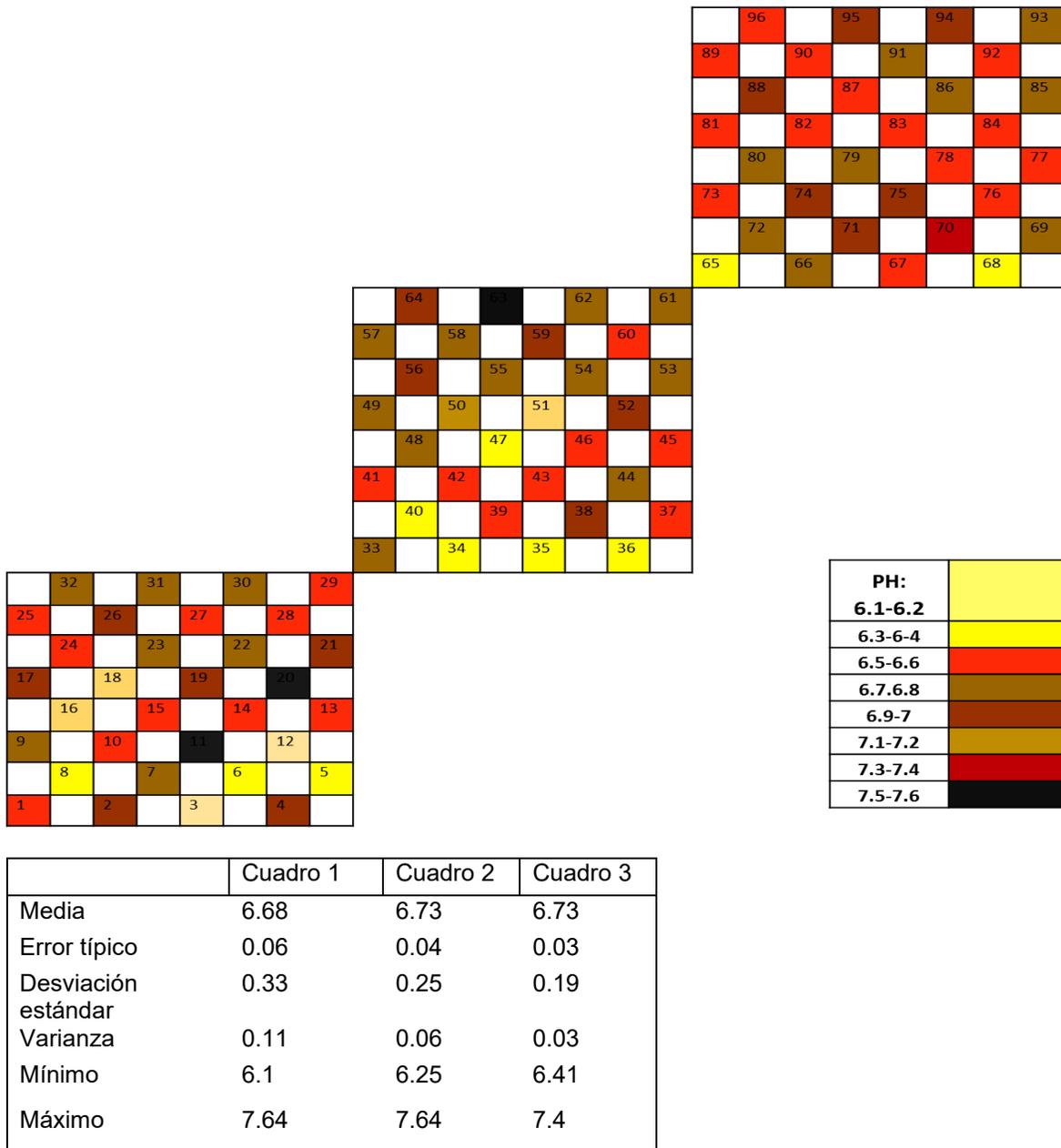
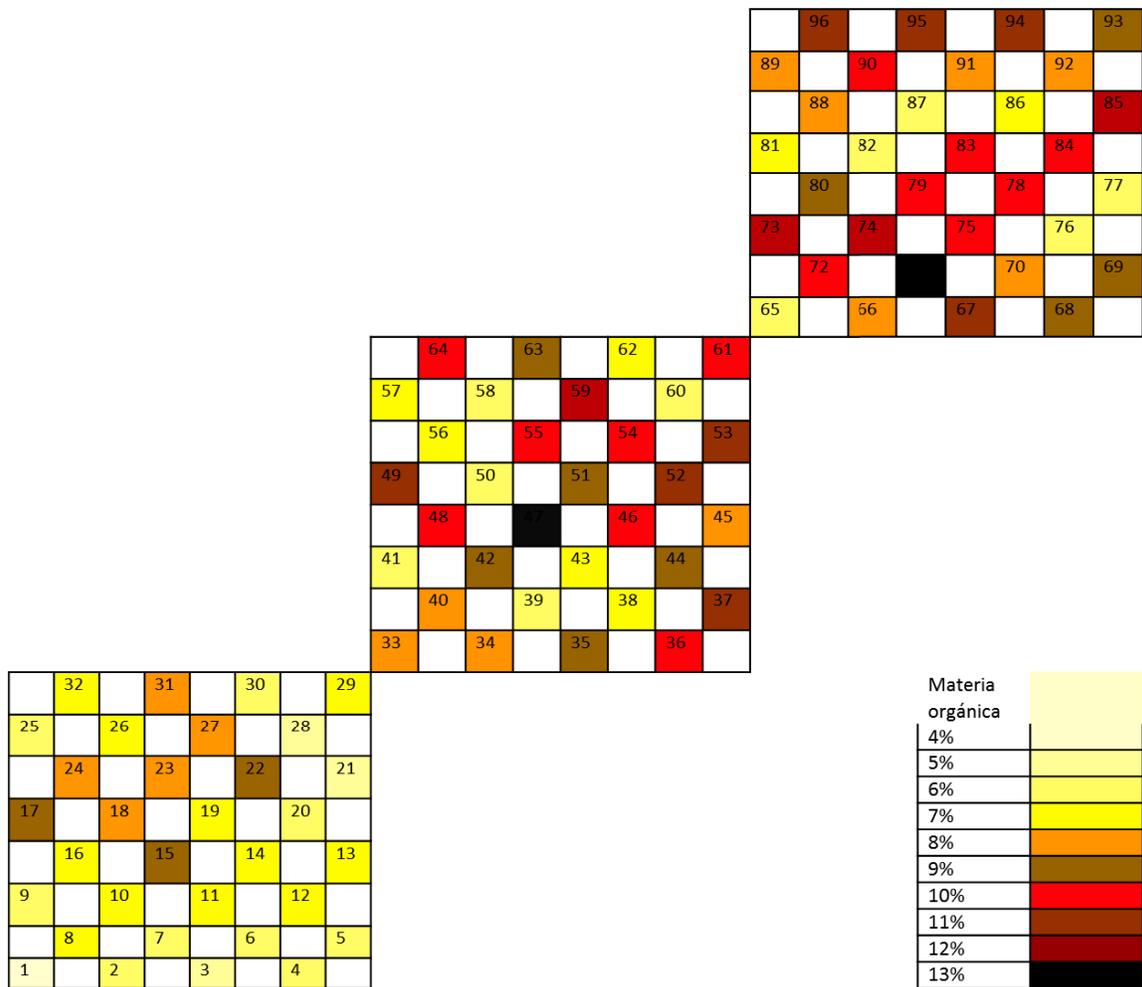


Figura 21. Variación espacial en el pH del suelo.



	Cuadro 1	Cuadro 2	Cuadro 3
Media	7.29	9.24	9.28
Error típico	0.20	0.35	0.40
Desviación estándar	1.14	2.00	2.27
Varianza	1.29	4.00	5.17
Mínimo	4.80	5.85	5.53
Máximo	9.69	13.02	13.10

Figura 22. Variación espacial en el porcentaje de materia orgánica del suelo.

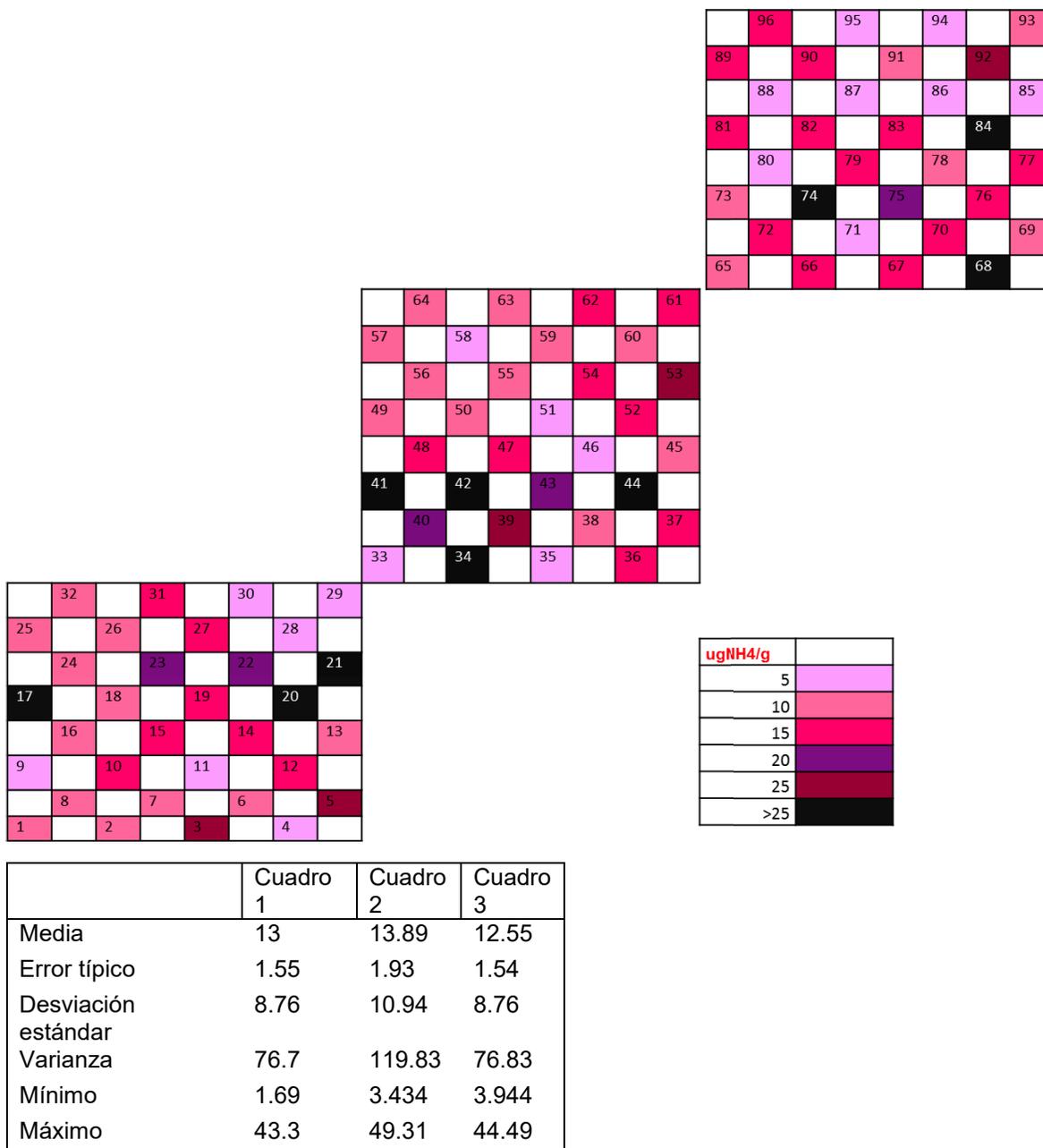


Figura 23. Variación en el contenido de amonio (NH₄⁺) en el suelo.

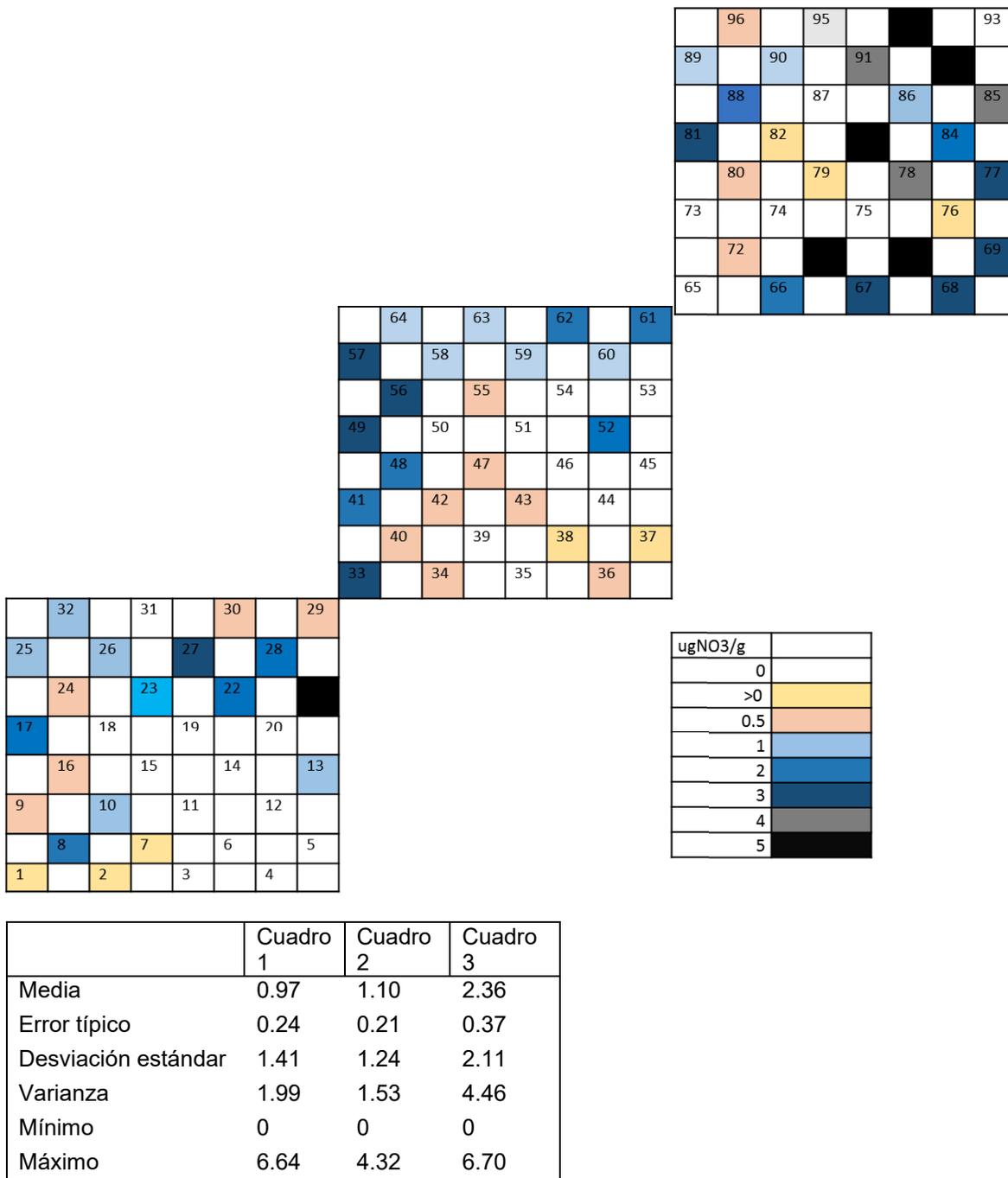
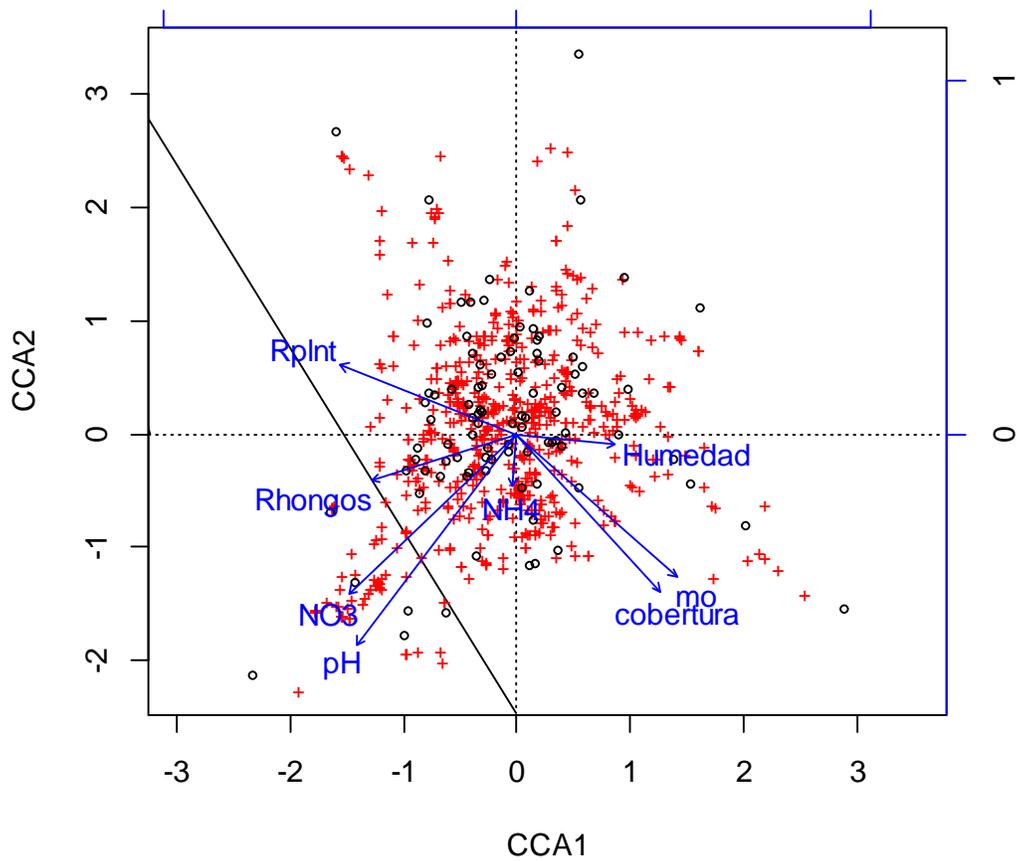


Figura 24. Variación en el contenido de nitrato (NO₃⁻) en el suelo.

En base al análisis de correspondencia canónica que se realizó con los datos de especies ectomicorrízicas, vegetación y suelo, ninguna de las variables parece estar determinando sobre la riqueza y composición de las comunidades de hongos (Figura 25). La relación más fuerte y significativa se encontró con el pH del suelo, con la cobertura de leñosas. La relación más débil con la humedad y la materia orgánica del suelo.

En el análisis CCA entre los factores abióticos y las especies de hongos el modelo sí resulta ser significativo ($P=0.023$) por lo que se puede inferir que no se debe al azar el hecho de que no existe un factor que determine la presencia de estos organismos en el ambiente, sino que más bien es la conjunción de estos factores lo que influye y de manera significativa tanto la cobertura arbórea como el pH cobran importancia significativa. Dicho resultado indica la compleja biología de los HECM y del ecosistema que habitan ya que hay muchos factores bióticos y abióticos que influyen en su presencia. La variación explicada por el eje CCA1 fue de 0.2002, mientras que por el eje CCA2 fue de 0.1807, en conjunto ambos ejes explican el 0.3809 de la variación de los datos.



	CCA1	CCA2	P (>F)
Rhongos (Riqueza hongos)	-0.4134	-0.13291	0.229
Rplnt (Riqueza plantas)	-0.5001	0.19651	0.296
Cobertura	0.4082	-0.44639	0.013 *
pH	-0.4557	-0.59614	0.034 *
Humedad	0.2786	-0.02735	0.950
NH₄⁺	-0.0123	-0.14857	0.417
NO₃⁻	-0.4776	-0.45380	0.097
MO	0.4520	-0.40546	0.202

Figura 25. Análisis de correspondencia canónica de las variables ambientales, de vegetación y las especies de hongos. Las (+) son Especies, los (o) son muestras.

DISCUSIÓN

Riqueza de la comunidad de HECM

Este estudio realizado, reveló una riqueza muy alta de especies ectomicorrízicas en un área pequeña dentro de un fragmento de bosque. En México se estimaba entre 140 000 y 200 000 especies de hongos (Guzmán, 1996; 1998), cantidad que seguramente es mucho mayor considerando las proyecciones más recientes que han generado las herramientas moleculares. En el área evaluada, que casi alcanza las dos hectáreas (19 200 m²), se encontraron más de diez mil especies, principalmente del phylum Ascomycota y Basidiomycota, que incluyen a 674 hongos ectomicorrízicos pertenecientes a 61 géneros distintos.

Es probable que estos el números de especies de hongos y de HECM estén incluso subestimados porque, aunque la base de datos UNITE (Kõljalg et al. 2005) y FUNGuild (Nguyen et al. 2015) proporcionan una excelente herramienta para detección y agrupación de hongos, aún hay limitaciones importantes para su uso. La escasez de secuencias de hongos de México en las bases de datos representa un problema para este tipo de estudios porque el desconocimiento de nuestra diversidad fúngica limita el potencial para el uso de las bases de datos internacionales. FUNGuild ayuda a separar los gremios de hongos, pero solo en aquellas especies que pudieron identificarse después del proceso bioinformático a nivel de género o especie. Por lo tanto, aquellas especies que no se encuentran en este nivel taxonómico son descartadas y con ello gran parte de la información obtenida a través de la selección de herramientas de biología molecular y bioinformática se pierde. Esto nos proporciona mayor seguridad para confirmar la identidad de las especies y asignarlas al gremio de interés pero también se inutiliza gran cantidad de información al no asignar aquellas especies identificadas solo a

nivel de familia, sabiendo que existen familias enteras caracterizadas como ectomicorrízicas.

UNITE es la mejor base de datos para macromicetos y contiene una muy buena representación de secuencias de hongos de Norteamérica y Europa, pero en ella hay pocas secuencias de otras regiones del mundo, incluyendo a México. Más del 20% de las secuencias de hongos que se obtuvieron se quedaron como hongos no identificados y no pudieron ser parte de este análisis. Un ejemplo de esto son aquellas especies identificados a nivel de familias que se conoce ectomicorrízicas como la familia Russulaceae y Amanitaceae (87 y 12 especies respectivamente) aunque existen también especies dentro de las mismas de características saprótrofes. Hasta hace un par de años no se contaba con un software capaz de identificar los gremios ecológicos de los hongos obtenidos, mediante las nuevas tecnologías de secuenciación. No obstante estudios como éste refuerzan la necesidad de incorporar información referenciada y curada de los hongos de México para hacer estudios más complejos y sólidos. El uso de herramientas de biología molecular y bioinformática permite recuperar e identificar una gran cantidad de especies, en particular las plataformas de secuenciación de alto rendimiento, como Illumina, que rinden millones de secuencias. Chagnon et al. (2016) remarcan la importancia de trabajar para crear nuevas herramientas para la ecología de hongos que permitan responder nuevas preguntas y de una manera más eficaz. Claramente hay un reto de trabajo por hacer para enriquecer esas herramientas con datos de los hongos de México.

Morris et al. (2009) realizan un estudio en un bosque de encino en Taxco, Guerrero en donde de igual forma analizan casi los mismos factores abióticos que en el presente estudio, a pesar de haber obtenido 80 muestras número parecido a las 96 colectadas por nosotros, se estima que podrían seguir apareciendo más. En total encuentran 154 hongos ectomicorrízicos y los grupos más abundantes fueron thelephoroide, sebacinoide y russuloide. La cantidad de especies ectomicorrízicas encontradas en nuestro trabajo es muy superior y la composición es distinta (Figura

7-8, Tabla 3). En nuestro estudio realizado fueron *Inocybe*, *Russula*, *Tomentella* y *Sebacina* los géneros que presetaron mayor abundancia.

Se encontraron muchas especies que sólo aparecen en uno o dos de los cuadros de 100 m² (Figura 7, Cuadro1=246, Cuadro 2=237 y Cuadro 3=288), esto nos habla de que no todos los hongos se encuentran en todas partes (Peay et al. 2010), y que existen patrones en su distribución espacial que se relacionan con factores bióticos y abióticos que varían a una escala local. La explicación al por qué se observa diferenciación en las especies encontradas por cuadro puede deberse a múltiples factores como lo son las diferencias en el pH o los nutrientes disponibles. Como se observa en el análisis CCA realizado (Figura 25), no existe un solo factor determinante sobre la presencia de las especies de hongos ectomicorrízicos, aunque la cobertura arbórea y el pH fueron significativos. Una limitante de los datos es que corresponden a una sola fecha de muestreo y podría ser que en periodos de evaluación más largos se detectaran más especies con distribución amplia que no estuvieron presentes cuando se muestreó (Peay et al. 20011). Martiny et al. (2006) exponen además que, al trabajar con microorganismos, explicar su distribución en base a los factores biogeográficos y ambientales es bastante complicado debido al nivel de resolución que se usa para identificarlos. Como se sabe, para muchos de los microorganismos se trabaja con fragmentos de su ADN y con ello se busca obtener la diferenciación entre las secuencias que se obtienen aunque no siempre se logre de manera óptima. Esto no sucede con los macroorganismos, los cuales por sus características morfológicas y genéticas pueden ser separados y estudiados desde el punto de vista de su distribución y biogeografía de manera individual o conjunta más eficazmente. Aunque en el presente estudio si vimos diferenciación en cuanto a la composición de las especies de hongos ectomicorrízicos desde el nivel de género y especies, la composición de los phyla de hongos fue prácticamente idéntica en los tres cuadros muestreados. Esto sugiere que la diferenciación funcional que existe en las especies que se encuentran en puntos específicos les permite utilizar diferentes nichos se da a niveles más bajos de clasificación taxonómica (Conn & Dighton 2000).

Relación entre la comunidad ectomicorrízica y el espacio

Algunos procesos en ecología son visibles solo a ciertas escalas, y como menciona Taylor (2002), el esfuerzo de muestreo, así como la estrategia que se utilice, tienen repercusiones en cómo percibimos la comunidad de hongos ectomicorrízicos. Este estudio reveló patrones de la distribución espacial de los hongos ectomicorrízicos que pueden mejorar los estudios ecológicos con estos organismos. La curva de acumulación de especies en función de la distancia lineal muestra un incremento exponencial hasta los 100 m en distancia lineal y la curva en función del área tiene también crecimiento exponencial al menos hasta los 1600 m² (Figura 9-10). Además, no se llega a la asíntota ni a la distancia (340 m), ni al área (6400 m²) más grandes, ni juntando el total de muestras que se trabajaron; solo hasta cuando se unen dos de los cuadros muestreados (12 800 m²) se observa que se alcanza una asíntota aparente. Considerando que la mayoría de los estudios utilizan transectos tipo Gentry de 50 m, o cuadros de muestreo de tamaño variable, habría que hacer una gran cantidad de transectos o cuadros, o incrementar considerablemente su tamaño, para rebasar al menos la distancia y el área donde se dan los mayores incrementos en la recuperación de especies.

Una ventaja considerable del esquema de muestreo que se usó, es que además de que la representatividad se mantuvo a todas las escalas, todos los datos fueron muestras independientes y, por lo tanto, repeticiones verdaderas. La similitud en los patrones de escalamiento espacial que se observó usando los datos de las tres cuadrículas es casi idéntica (Figuras 11-12). Las diferentes pendientes de las líneas en cada tramo de cambio de escala revelaron además que los cambios más grandes en diversidad y recambio de especies se obtuvieron en las escalas intermedias (400-1600 m², y en menor grado 1600-6400 m²), que son de las más comunes en los estudios de hongos este estudio sugiere que habría que incrementar el área muestreada. Los coeficientes de diversidad beta de Whittaker que se encontraron son cercanos a dos, que son valores altos e indican un recambio aunque algo menores a los que los que se encontraron para mamíferos en ese

estudio a escala mucho mayor (Arita & Rodríguez 2002) y parecidos a los que se encontraron para bacterias en un bosque tropical seco a una escala mucho menor (Noguez et al. 2005).

Se ha observado que la escala espacial influye en el ensamblaje de la comunidad, así como en los cambios a los que puede ser sometida. Dependiendo del fragmento en el que se realizan los estudios, la variación en el tamaño de área en donde se encuentra una comunidad tiene influencia sobre su funcionalidad y consecuencias sobre los organismos que se encuentran ahí establecidos (Fukami 2010). Nuevamente los resultados de este trabajo refuerzan la sugerencia de incrementar la escala en los estudios de distribución de hongos en bosques de México. Estudios previamente realizados (Arita & Rodríguez 2002; Noguez et al. 2005; Talbot et al. 2014) muestran como conforme se avanza en la distancia se van encontrando nuevas especies y las comunidades se van haciendo más disímiles. En el presente estudio, la similitud en todos los casos fue muy baja y no se encontró una caída consistente en la similitud de las comunidades dentro de las distancias estudiadas, sino apenas una leve indicación de cambio. Esta ausencia de diferenciación en distancias cortas ya ha sido observada en los hongos micorrízicos arbusculares y se plantea una posible explicación en la variación y diversidad que existe en la vegetación con la que se asocian (Davison et al. 2012). Izzo et al. (2006) tampoco encontraron un patrón en la distribución de los hongos ectomicorrízicos pero si una diferenciación en cuanto a la riqueza de especies entre los dos sitios comparados con diferentes hospederos, que muestra la influencia de las plantas sobre los hongos al menos en cuanto a su riqueza. Nekola & White (1999) propusieron que los factores que afectan la estructura de la comunidad pueden ser estudiados analizando el grado de similitud en la composición de especies entre sitios, argumentando que la similitud decrece conforme aumenta la distancia y esto es producido por las especies que generan distintos nichos en base a las condiciones de su medio así como a los procesos de dispersión. Esto de igual forma coincide parcialmente con lo encontrado en nuestro trabajo y nos proporciona argumentos sobre cómo explicar los procesos que controlan la distribución y

presencia de los hongos ectomicorrízicos. La baja similitud que se encontró a una distancia de 20 m de separación entre los cuadros, en la escala más pequeña que se usó en este trabajo, sugiere que los cambios más grandes en la similitud de las comunidades se dan a una escala más pequeña, o mucho más grande, como observaron Talbot et al. (2014). Ellos observaron que la proporción de especies que se encuentran no deja de aumentar desde la escala del punto de muestreo hasta la región (Norteamérica).

Relación entre los hongos ectomicorrízicos y los factores bióticos y abióticos

Existe fuerte relación entre los hongos ectomicorrízicos y las plantas como se puede observar en los análisis del presente trabajo (Figura 19). Bruns (1995) encontró especificidad en ciertas especies tanto por el lado de la planta como por el del hongo. De modo que se encuentran a escala local especies de HECM que solo se encuentran al lado de ciertos árboles o en parches específicos, pero en el estudio realizado existen un gran número de especies asociadas a pocas especies de árboles. En estudios realizados en bosques tropicales en donde se conoce muy poco en general de los hongos ectomicorrízicos y sus hospederos se ha encontrado alta especificidad ya que existen pocos hospederos potenciales (Álvarez-Manjarrez et al. 2015). Otros estudios realizados con el género *Alnus* nos revelan, en cambio, que al comparar varias especies de este mismo género en cuanto a la composición de hongos ectomicorrízicos, la composición y abundancia de las especies con las cuales se asocian fueron muy distintas a pesar de ser especies emparentadas (Kennedy et al. 2011).

En nuestro estudio se observó que una gran cantidad de hongos ectomicorrízicos (674 especies) se pueden asociar a poca cantidad de hospederos (*Pinus pseudostrobus*, *Pinus ayacahuite*, *Quercus subspathulata*, *Quercus laeta* y *Quercus obtusata*) y esto coincide con lo encontrado por Terdersoo et al. (2006;

2013) donde una gran cantidad de especies de hongos ectomicorrízicos estuvieron asociados a pocos hospederos o a un grupo específico. Aparentemente los beneficios de la alta especificidad entre los simbioses se relaciona con una mejor adaptación y compatibilidad a la hora de realizar el intercambio de nutrientes lo que proporciona fisiológicamente ventajas para ambos que influirán en su desarrollo, pero aún existen dudas al respecto ya que dicha hipótesis no siempre se cumple en los casos conocidos de especificidad hongo-planta (Bruns et al. 2002). La mayoría de las especies del presente estudio se aglomeraron en torno a las especies de pino como se ve en los vectores reflejados en análisis de CCA (Figura 19) con poca segregación entre las dos especies. La asociación con esas dos especies de pino es más clara que con las especies de *Quercus*, donde solo se apreció mayor segregación de los hongos asociados a *Quercus subspathulata*. Existen casos como en estudios anteriores (Olsson & Wallander 1998; Avis et al. 2003), donde conocer la red específica que forman tanto los hongos como las plantas resultó bastante complejo debido a la gran cantidad de factores ambientales que influyen en ello y que nos arrojan resultados tan distintos a la hora de querer conocer la complejidad de la red simbiótica entre hongo y planta así como los factores que la determinan (Bahram et al. 2014), como fue que observamos en el presente estudio (Figura 25).

Aunque no existió un factor que determinara de manera evidente la presencia o ausencia de los hongos, la cobertura de árboles y el pH resultaron ser significativos en base al análisis CCA realizado (Figura 25). Talbot et al. (2014) sugieren que la estructura y el funcionamiento de la comunidad de hongos HECM se relacionan a la escala local y regional principalmente con los factores abióticos de su entorno así como con las especies vegetales que se encuentren en su medio. Esto fue reportado Toljander et al. (2006) en donde los factores abióticos y de igual forma la distancia influyeron en conjunto sobre las especies de hongos. En este estudio se planteó la hipótesis de que la comunidad de hongos HECM estaría influenciada por la presencia de las plantas hospederas y por los factores ambientales y los resultados no apoyan del todo dicha hipótesis, ya que solo pH y

cobertura resultaron ser significativos y las especies de árboles influyen en conjunto más no una sola especie. En los diversos análisis multivariados que se realizaron, no se encontraron ni agrupamientos ni variables de peso en la diferenciación de las comunidades cuando se exploraron los datos completos. Los modelos más simples, examinando solo las especies de plantas, especies de hongos y las variables edáficas, especies de hongos y variables de vegetación simplificadas (riqueza y cobertura). La cobertura vegetal fue una de las variables significativas en el estudio, lo que se puede relacionar con el paso de luz hacia el suelo en donde habitan estos hongos, reduciendo la humedad debido a la evaporación dichas variables permitieron ver mejor la asociación de las especies de plantas y con los factores del suelo.

Jackson & Caldwell (1993) mostraron que existe variación en factores abióticos como el pH, materia orgánica, fosfato, potasio, amonio y nitrato a una escala de solo 1 m. Algunos de estos mismos factores fueron medidos en el presente estudio y se encontró mucha variación a una escala mayor. La variación encontrada en casi todas las variables muestra la alta heterogeneidad ambiental que puede existir en un área muy pequeña del mismo bosque. La materia orgánica y la humedad fueron las menos importantes, probablemente porque ambas tuvieron valores muy altos en todos los casos y los incrementos ya no representan una diferencia en disponibilidad de agua o de recurso. Ambos factores pueden ser explicadas por el aumento en la densidad de árboles más adentro del bosque, al existir mayor número de individuos y de mayor tamaño se retiene de mejor forma la humedad así como la materia orgánica que se acumula en el suelo (Maestre et al. 2012; de Vries et al. 2012).

CONCLUSIÓN

Con la ayuda del diseño espacial se pudo conocer la escala sobre la cual cambia la estructura de la comunidad y como conforme se avanza se siguen encontrando distintas especies de hongos ectomicorrízicos. Así mismo los resultados apoyaron parcialmente la hipótesis de que la riqueza y la composición de las comunidades estarían definidas principalmente por las especies de árboles ectomicorrízicos ya que, aunque sí fueron importantes, no hubo una diferenciación tan grande en función de las especies de árboles. Al considerar el número de especies y no las identidades, la riqueza es importante así como lo fueron más la cobertura y el pH del suelo, este último ha sido un factor significativo en muchos estudios. Los resultados de este estudio también sugieren que los esquemas tradicionales de muestreo basados en transectos o cuadros, cubriendo áreas pequeñas y juntando muestras pueden estar perdiendo información sobre la comunidad si lo que se pretende es medir la escala espacial a la cual las comunidades de hongos cambian y funcionan mejor para describir las comunidades presentes. El enfoque en las comunidades presentes en el suelo ayudó a 1) detectar una gran cantidad de especies de hongos diferentes en cada punto de muestreo, 2) confirmar que la mayoría de estas especies tienen una distribución restringida y la minoría una distribución generalista, 3) demostrar que las comunidades de hongos ectomicorrízicos pueden ser muy diferentes a solo 100 m de distancia y 4) que los factores ambientales que influyen para determinar la presencia o ausencia de las especies de hongos ectomicorrízicos son múltiples y muy variables. Para poder representar la escala y el cambio en la riqueza y composición de las especies de hongos ectomicorrízicos el modelo usado muestra los cambios dependiendo de cómo se avanza en la distancia lineal o en área por lo que ayuda a entender cómo es que estos hongos se distribuyen en el bosque dependiendo de las condiciones de su ambiente.

PERSPECTIVAS

El cambio de uso de suelo que se ha venido desarrollando en la región estudiada es una amenaza para la conservación de los bosques que ahí se hallan ya que se encuentran muy deteriorados y fragmentados (Bravo-Espinosa et al. 2012). Se ha observado que dicha deforestación está cambiando los ciclos de nutrientes (Lawrence et al. 2007; Smith et al. 2015), degradando sus propiedades y modificando su estabilidad. Urge el desarrollo de técnicas de cultivos sustentables en la región así como la limitación y vigilancia de las áreas de cultivo para impedir su expansión, ya que de seguir así se perderá gran parte de la biodiversidad que ahí encontramos. Este trabajo provee información que puede usarse para diseñar nuevos estudios que ayuden a proponer áreas de conservación en las plantaciones de aguacate. La alta riqueza de especies de hongos ectomicorrízicos que se pudo encontrar en un área pequeña como las que se dejan con frecuencia en la zona donde se realizó el estudio sugiere que se puede conservar mucha diversidad incluso promoviendo el establecimiento y el cuidado de fragmentos pequeños de bosque. Esto podría atenuar el efecto negativo del acelerado cambio de uso de suelo en la región que está reemplazando al bosque.

LITERATURA CITADA

Álvarez-Manjarrez J, Villegas-Ríos M, Garibay-Orijel R, Contreras-Pacheco M & Kõljalg U. 2015. *Tomentella brunneoincrustedata*, the first described species of the Pisonieae-associated Neotropical *Tomentella* clade, and phylogenetic analysis of the genus in Mexico. *Mycological Progress* 15, 10.

Arita HT & Rodríguez P. 2002. Geographic range, turnover rate and the scaling of species diversity. *Ecography* 25, 541-550.

Ashkannejhad S & Horton TR. 2006. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. *New Phytologist* 169, 345-354.

Bahram M, Põlme S, Kõljalg U & Tedersoo L. 2011. A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 75, 313-320.

Bahram M, Harend H & Tedersoo L. 2014. Network perspectives of ectomycorrhizal associations. *Fungal ecology* 7, 70-77.

Bahram M, Peay KP & Tedersoo L. 2015. Local-scale biogeography and spatiotemporal variability in communities of mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 205, 1454-1463.

Bass D & Richards TA. 2011. Three reasons to re-evaluate fungal diversity 'on Earth and in the ocean. *Fungal biology reviews* 25, 159-164.

Begon M, Townsend CR & Harper L. 2006. Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades. Parte 4 comunidades. *Scientific Publications Oxford*. 599-639.

Blackwell M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species?. *American Journal of Botany* 98, 1-13.

Bengtsson-Palme J, Veldre V, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A, Bertrand Y, Wit P, Sanchez M, Ebersberger I, Sanli K, de Souza F, Kristiansson E, Abarenkov K, Eriksson KM, Nilsson RH. 2013. ITSx: Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for use in environmental sequencing. *Methods in Ecology and Evolution* 4, 914-919.

Bocco G, Mendoza M & Maserá OR. 2000. La dinámica del cambio del uso del suelo en Michoacán. Una propuesta metodológica para el estudio de los procesos de deforestación. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM.* 44, 18-38.

Brandes B, Godbold DL, Kuhn AJ & Jentschke G. 1998. Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and its effect on host nutrition. *New Phytologist* 140, 735-743.

Bravo-Espinoza M, Mendoza M, Allende T, Medina L, Sáenz-Reyes JT & Páez R. 2012. Effects of converting forest to avocado orchards on topsoil properties in the trans-mexican volcanic system, Mexico. *Land degradation & development* 25, 452-467.

Brundett 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* Volume 320, 37-77.

Bruns TD, Bidartindo MI & Taylor D.2002. Host Specificity in Ectomycorrhizal Communities: What Do the Exceptions Tell us?. *Integrative and comparative biology* 42, 352-359.

Bruns TD. 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 170, 63-73.

Buscot F, Munch JY, Charcosset J, Gardes M, Nehls U & Hampp R. 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 601-614.

Chagnon PL, Rineau F & Kaiser C. 2016. Mycorrhizas across scales: a journey between genomics, global patterns of biodiversity and biogeochemistry. *New Phytologist* 209, 913-916.

Challenger A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. CONABIO. UNAM, 847.

Chambers SM, Sharples JM, & Cairney JW. 1998. Towards a molecular identification of the *Pisonia* mycobiont. *Mycorrhiza* 7, 319-321.

Clemmensen K, Finlay R, Dahlberg A, Stenlid J, Wardle DA & Lindahl BD. 2015. Carbon sequestration is related to mycorrhizal fungal community shifts during long-term succession in boreal forests. *New Phytologist* 205, 1525-1536.

Colwell RK. 2013. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples, version 9.0. Available at <http://purl.oclc.org/estimates>.

Conn C & Dighton J. 2000. Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 489-496.

Cuevas-Villalobos I. 2016. Caracterización de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares y su relación con la vegetación en un mosaico forestal del trópico seco de Veracruz. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas UNAM, 2016 Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas.

Dahlberg A. 2001. Community Ecology of Ectomycorrhizal Fungi: An Advancing Interdisciplinary Field. *New Phytologist* 150, 555-562.

Davison J, Öpik M, Zobel M, Vasar M, Metsis M & Moora M. 2012. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary throughout the growing season. *PLoS ONE* 7, 8.

Ellner PS, McCauley E, Kendall BE, Briggs JC, Hosseinik, Wood R, Janssen A, Sabelis W, Turchini P, Nisbet R. & Murdoch W. 2001. Habitat structure and population persistence in an experimental community. *NATURE* 412, 2.

Fukami T. 2010. Community ecology: Process, models and applications. Chapter 4: Community assembly dynamics in space. *Oxford University Press, Oxford* 45-54.

Futuyma DJ. 2005. Evolution. Chapter 6: *The Geography of Evolution*. Third edition, State University of New York at Stony Brook 117-139.

Gardens M & Bruns DT. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.

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.

Gutiérrez-Contreras M, Lara BN, Guillén H & Chávez AT. 2010. Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia* 35, 647-653.

Guzmán G. 1996. Análisis cualitativo y cuantitativo sobre la diversidad de los hongos en México. La Diversidad Biológica de Iberoamérica II. Instituto de Ecología. Xalapa, Ver., México. 111-176.

Guzmán G. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation* 7, 369-384.

Guzmán G. 2008. Análisis de los estudios sobre macromycetes en México. *Revista mexicana de micología* 28, 7-15.

Gweon HS, Oliver A, Taylor J, Booth T, Gibbs M, Read DS, Griffiths R & Schonrogge K. 2015. PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 973-980.

Halling RE, Osmundson TW & Neves MA. 2008. Pacific boletes: Implications for biogeographic relationships. *Mycological research* 112, 437-447.

Hammer Ř, Harper DAT & Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9.

Hansen MC, Potapov V, Moore R, Hancher M, Turubanova A, Tyukavina A, Thau D, StehmanV, Goetz J, Loveland R, Kommareddy A, Egorov A , Chini L, Justice O & Townshend G. 2013. High-Resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science* 342, 849-853.

Holdridge LR. 2000. Ecología basada en zonas de vida. Quinta edición. Capítulo 2, El diagrama de las zonas de vida 13-29.

Ihrmark k, Inga TM, deker B, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, Strid Y, Stenlid J, Brandströ-Durling M, Clemmensen KE & Lindahl D. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 82, 666-677.

Izzo A, Agbowo J, & Bruns TD. 2005. Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytologist* 166, 619-630.

Izzo A, Nguyen DT & Bruns TD. 2006. Spatial structure and richness of ectomycorrhizal fungi colonizing bioassay seedlings from resistant propagules in a Sierra Nevada forest: comparisons using two hosts that exhibit different seedling establishment patterns. *Mycologia* 98, 374-383.

Jackson RB & Caldwell M. 1993. Geostatistical patterns of soil heterogeneity around individual perennial plants. *Journal Ecology* 81, 683–692.

John TV & Coleman DC. 1983. The role of mycorrhizae in plant ecology. *Canadian Journal of Botany* 61, 1005-1014.

Kark S, Schneider CJ, & Smith T B. 2001. Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions: the need for preserving environmental transitions. *Trends in ecology and evolution* 16, 431.

Kennedy P, Izzo AD & Bruns TD. 2003. There is high potential for the formation of common mycorrhizal networks between understory and canopy trees in a mixed evergreen forest. *Journal of Ecology* 91, 1071-1080.

Kennedy PG, Garibay-Orijel R, Higgins LM & Angeles-Arguiz R. 2011. Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza* 21, 559-568.

Klooster D & Maser O. 2000. Community forest management in Mexico: carbon mitigation and biodiversity conservation through rural development. *Global Environmental Change* 10, 259-272.

Koide RT, Pierre-Emmanuel Courty & Garbaye J. 2007. Research perspectives on functional diversity in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 174, 240-243.

Koide RT, Shumway DL, Bing Xu & Sharda N. 2006. On temporal partitioning of a community of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 174, 420-429.

Kõljalg U, Larsson H, Abarenkov K, Nilsson H, Alexander J, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølner R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor FS, Tedersoo L, Vrålstad T & Ursing B. 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166, 1063-1068.

Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott JA, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiß M & Larsson KH. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi. *Molecular Ecology*, 2, 5271-5277.

Lawrence D, D'Odorico P, Diekmann L, DeLonge M, Das R & Eaton J. 2007. Ecological feedbacks following deforestation create the potential for a catastrophic ecosystem shift in tropical dry forest. *PNAS* 104, 20696-20701.

LePage A, Currah S, Stockey A & Rothwell W. 1997. Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. *American Journal of Botany* 84, 410-412.

Lindahl BD, Ihrmark K, Boberg J, Trumbore SE, Hogberg P, Stenlid J & Finlay RD. 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist* 173, 611-620.

Locey KJ & Lennon JT. 2015. Scaling laws predict global microbial diversity. *PNAS* 113, 5970-5975.

Martiny HB, Bohannan JM, Brown H, Colwell K, Fuhrman A, Green L, Horner-Devine C, Kane M, Krumins A J, Kuske R, Morin J P, Naeem S, Øvreås L, Reysenbach AL, Smith H & taley SJ. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 4, 102-112.

Maestre T, Quero L, Gotelli J, Escudero A, Ochoa V, Delgado-Baquerizo M, García-Gómez M, Bowker A, Soliveres S, Escolar C, García-Palacios P, Berdugo M, Valencia E, Gozalo B, Gallardo A, Aguilera L, Arredondo T, Blone J, Boeken B, Bran D, Conceição A, Cabrera O, Chaieb M, Derak M, Eldridge J, Espinosa L, Florentino A, Gaitán J, Gatica G, Ghiloufi W, Gómez-González S, Gutiérrez R, Hernández M, Huang X, Huber-Sannwald E, Jankju M, Miriti M, Monerri J, Mau L, Morici E, Naseri K, Ospina A, Polo V, Prina A, Pucheta E, Ramírez-Collantes A, Romão R, Tighe M, Torres-Díaz C, Val J, Veiga P, Deli Wang & Zaady E. 2012. Plant species richness and ecosystem multifunctionality in global drylands. *Science* 13, 214-218.

McDonald D, Clemente JC, Kuczynski J, Rideout JR, Stombaugh J, Wendel D, Wilke A, Huse S, Hufnagle J, Meyer F, Knight R, Caporaso JG. 2012. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *GigaScience* 1, 7.

Mehlich A. 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 15, 1409-1416.

Morales-Manila LM & Cuevas-Garcia G. (2011). Inventarios 1974-2007, y evaluación del impacto ambiental regional del cultivo de aguacate en el estado de Michoacán. Morelia, Michoacán. Centro de Investigaciones en Geografía Ambiental. 138.

Morales-Manila LM, Reyes-González A, Cuevas-Garcia G & Onchi-Ramuco M. (2012). Inventario 2011 del cultivo del aguacate en el estado de Michoacán, UNAM-COFUPRO. 89.

Morris HM, 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.

Myers N.1998. The world's forests and their ecosystem services. Nature's services. Island press Washington chapter 12, 215-235.

Myers N.1988. Threatened biotas: "Hot spots" in tropical forests. *The Environmentalist* 8, 1-2.

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini T M, Landi L, Pirramellara G & Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54, 655–670.

Nekola JC & White PS. 1999. The distance decay of similarity in biogeography and ecology. *Journal of Biogeography* 26, 867-878.

Nguyen NH, Song Z, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling J & Kennedy GP. 2015. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* 20, 241-248.

Noguez AM, Arita HT, Escalante AE, Forney LJ, García-Oliva F & Souza V. 2005. Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecology and Biogeography* 14, 241-248.

Olsson PA & Wallander H. 1998. Interactions between ectomycorrhizal fungi and the bacterial community in soils amended with various primary minerals. *FEMS Microbiology Ecology* 27, 195-205.

Öpik M, Davison J, Moora M & Zobel M. 2013. DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany* 92, 135-147.

Peay KG, Kennedy GP & Bruns T D. 2008. Fungal community ecology: A hybrid beast with a molecular master. *BioScience* 58, 799.

Peay KG, Bidartondo MI & Arnold AE. 2010. Not every fungus is everywhere: scaling to the biogeography of fungal-plant interactions across roots, shoots and ecosystems. *New Phytologist* 185, 878-882.

Peay KG, Garbelotto M & Bruns TD. 2010. Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: Isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology* 91, 3631-3640.

Peay KG, Bruns TD & Kennedy PG. 2011. Rethinking ectomycorrhizal succession: are root density and hyphal exploration type's drivers of spatial and temporal zonation? *Fungal ecology* 4, 233-240.

Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH & Bruns TD. 2012. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology* 21, 4122-4136.

Peay KG, Baraloto C & Fine P. 2013. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. *International Society for Microbial Ecology* 7, 1852-1861.

Peter M, Ayer F, Egli S & Honegger R. 2001. Above- and below-ground community structure of ectomycorrhizal fungi in three Norway spruce (*Picea abies*) stands in Switzerland. *Canadian Journal of Botany* 79, 10.

Ricklefs RE & Schluter D. 1993. Species diversity in ecological communities. University of Chicago press. Chapter: 7, 8, 9 y 10, 66-116.

Ricklefs RE & Miller GL. 2000. Ecology. Edition 4.

Rinaldi AC, Comandini O & Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33, 1-45.

Robertson PG, Coleman DC, Bledsoe CS & Sollins P. 1999. Standard soil methods for long-term ecological research (LTER). *Oxford, New York University Press.*

Rognes T, Mahé F, Flouri T, McDonald D, Schloss P & Woodcroft BJ. 2015. vsearch: VSEARCH 1.8.1

Rosling A, Landeweert R, Lindahl BD, Larsson KH, Kuyper TW, Taylor FS & Finlay RD. 2003. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist* 159, 775-783.

Saunders DA, Hobbs RJ & Margules RC. 1991. Biological Consequences of Ecosystem Fragmentation: *A Review Conservation Biology* 5, 18-32.

Scherer-Lorenzen Korner C & Schulze D. 2005. Forest Diversity and function: Temperate and Boreal systems. *Ecological studies* 176, 3-10.

Schoch CL, Seifert KA & Huhndorf A. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109, 6241-6246.

Smith P, Cotrufo MF, Rumpel C, Paustian K, Kuikman PJ, Elliott JA, McDowell R, Griffiths RI, Asakawa S, Bustamante M, House J I, Sobocká J, Harper R, Pan G, West PC, Gerber JS, Clark JM, Adhya T, Scholes RJ & Scholes MC. 2015. Biogeochemical cycles and biodiversity as key drivers of ecosystem services provided by soils. *Soil Discussions* 2, 537-586.

Smith EM, Douhan WG & Rizzo DM. 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist* 174, 847–863.

Schmit JP & M. Mueller. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity Conservation* 16, 99-111.

Smith ES & Read D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Third Edition, Section 2, 200-398.

Smith MT & Smith LR. 2007. *Ecología Sexta edición*. Sexta parte capítulos 16, 17, 18 y 19, 348-416.

Talbot MJ, Brunsb D T, Taylorb W J, Smitha PD, Brancob S, Glassmanb SI, Erlandsona S, Vilgalysc R, Liaoc H, Smithd EM, & Peay KG. 2014. Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *PNAS* 111, 6341-6346.

Taylor FS. 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil* 244, 19-28.

Tedersoo L, Hallenberg N & Larsson KH. 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist* 159, 153-165.

Tedersoo L, Suvia T, Larsson E & Koljal U. 2006. Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. *Mycological research* 110, 734-748.

Tedersoo L, May W T & Matthew E. Smith. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20, 217-263.

Tedersoo L, Mett M, Ishida TA & Bahram, M. 2013. Phylogenetic relationships among host plants explain differences in fungal species richness and community composition in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 199, 822-831.

Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou N, Wijesundera R, Ruiz L, Vasco-Palacios M, Thu P, Suija A, Smith E, Sharp C, Saluveer E, Saitta A, Rosas M, Riit T, Ratkowsky D, Pritsch K, Põldmaa K, Piepenbring M, Phosri C, Peterson M, Parts K, Pärtel K, Otsing E, Nouhra E, Njouonkou L, Nilsson H, Morgado L, Mayor J, May W, Majuakim L, Lodge D, See Lee, Larsson KH, Kohout P, Hosaka K, Hiiesalu I, Henkel W, Harend H, L Guo, Greslebin A, Grelet G, Geml J, G Gates, W Dunstan, C Dunk, R Drenkhan, J Dearnaley, A De Kesel, T Dang, Xin Chen, F Buegger, Brearley Q, G Bonito, S Anslan, S Abell & Abarenkov K. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346, 1052-1053.

Tedersoo L, Anslan S, Bahram M, Põlme S, Riit T, Ingrid Liiv, Kõljalg U, Kisand V, Nilsson R, Hildebrand F, Bork P & Abarenkov K. 2015. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys* 10, 1-43.

T. de Vries F, Manning P, Tallowin RB, Mortimer R, Pilgrim S, Harrison A, Hobbs J, Quirk H, Shipley B, Cornelissen HC, Kattge J & Bardgett R. 2012. Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecology Letters* 15, 1230-1239.

Toljander FJ, Eberhardt U, Toljander YK, Paul R & Taylor FS. 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist* 170, 873-884.

Van Der Heijden MG, Streitwolf-Engel R, Riedl R, Siegrist S, Neudecker A, Ineichen K, Boller T, Wiemken A & Sanders IR. 2006. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist* 172, 739-752.

Voříšková J & Baldrian P. 2013. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *The ISME Journal* 7, 477-486.

Walkley A & Black. 1947. A Critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soil-effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science* 63, 251-264.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM & Cole JR. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5261-5267.

Whittaker JR, Araújo BM, Jepson P, Ladle JR, Watson EM & Willis JK. 2005. Conservation Biogeography: assessment and prospect. *Diversity and Distributions*, 11, 3-23.

Williams LG, Manson HR & Insunza E. 2002. La fragmentación del bosque mesófilo de montaña y patrones de uso de suelo en la región oeste de Xalapa, Veracruz, México. *Madera y Bosques* 9, 73-89.

Williams PH & Araújo MB. 2000. Integrating species and ecosystem monitoring for identifying conservation priorities. *European Conservation* 4, 17-18.

Zhang J, Kobert K, Flouri T & Stamatakis A. (2014) PEAR: a fast and accurate Illumina paired-end read merger. *Bioinformatics*, 30, 614-620.

Paginas Web:

<http://www.stbates.org/guilds/app.php>

<http://www.greenpeace.org/mexico/es/Campanas/Bosques/Geografia-de-la-deforestacion/Michoacan/>

ANEXOS

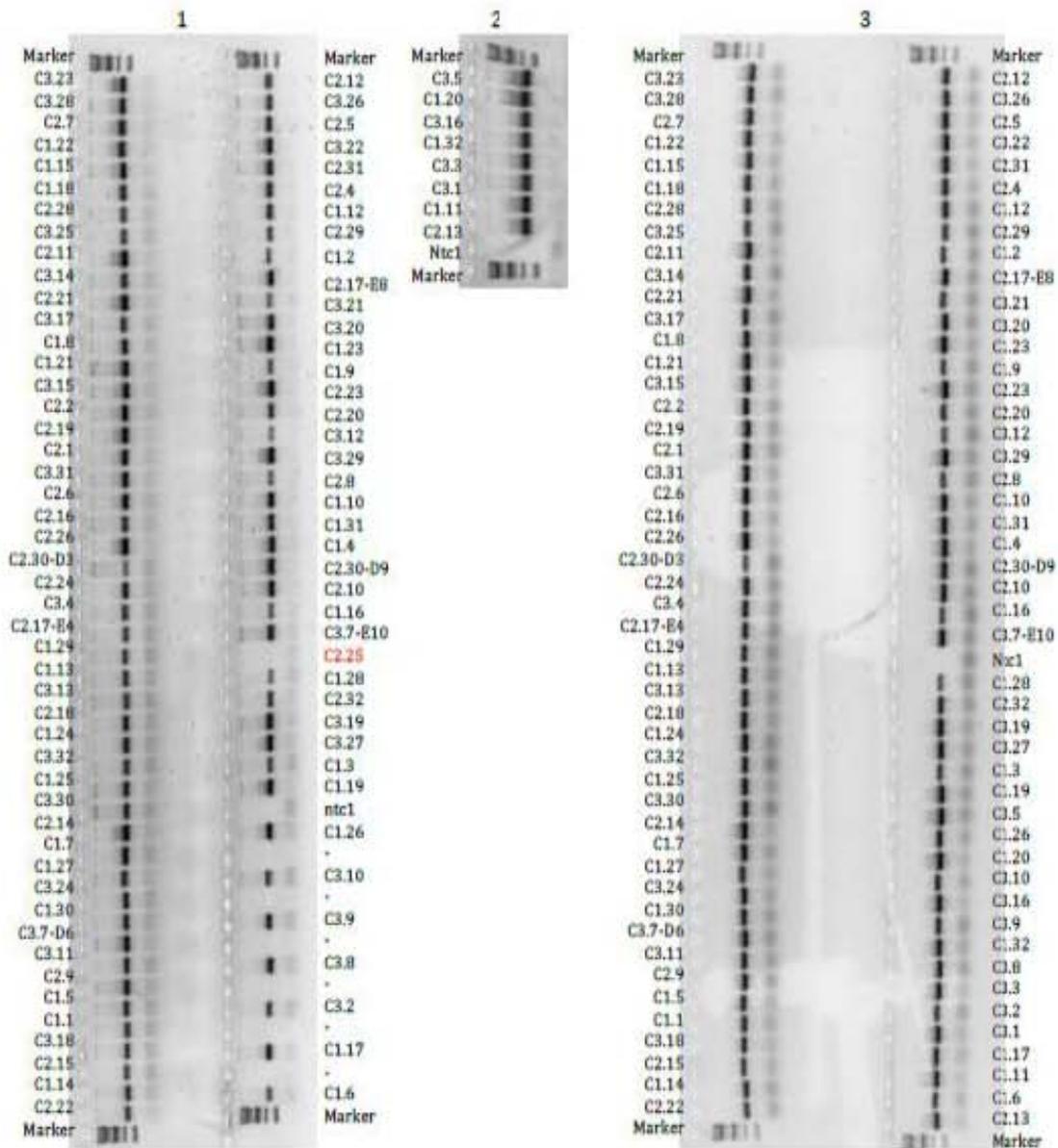
Anexos 1. Nombre de las muestras con las concentraciones de ADN en la PCR index.

No.	Sample name (customer)	Sample ID (BiotaP)	DNA concentration (ng/ul)	Index i7	Index i5
1	C3.23	SO_004720	14.7	N701	S517
2	C2.7	SO_004721	22.7	N701	S502
3	C1.15	SO_004722	31.2	N701	S503
4	C2.28	SO_004723	12.3	N701	S504
5	C2.11	SO_004724	19.2	N701	S505
6	C2.21	SO_004725	19.8	N701	S506
7	C1.8	SO_004726	15.0	N701	S507
8	C3.15	SO_004727	16.8	N701	S508
9	C3.28	SO_004728	32.9	N702	S517
10	C1.22	SO_004729	12.9	N702	S502
11	C1.18	SO_004730	5.1	N702	S503
12	C3.25	SO_004731	7.1	N702	S504
13	C3.14	SO_004732	15.7	N702	S505
14	C3.17	SO_004733	14.3	N702	S506
15	C1.21	SO_004734	42.3	N702	S507
16	C2.2	SO_004735	17.1	N702	S508
17	C2.19	SO_004736	8.7	N703	S517
18	C3.31	SO_004737	12.4	N703	S502
19	C2.16	SO_004738	18.4	N703	S503
20	C2.30-D3	SO_004739	38.4	N703	S504
21	C3.4	SO_004740	8.6	N703	S505
22	C1.29	SO_004741	10.8	N703	S506
23	C3.13	SO_004742	19.6	N703	S507
24	C1.24	SO_004743	8.6	N703	S508
25	C2.1	SO_004744	6.0	N704	S517
26	C2.6	SO_004745	9.0	N704	S502
27	C2.26	SO_004746	10.9	N704	S503
28	C2.24	SO_004747	6.3	N704	S504
29	C2.17-E4	SO_004748	10.0	N704	S505
30	C1.13	SO_004749	13.4	N704	S506
31	C2.18	SO_004750	8.7	N704	S507
32	C3.32	SO_004751	14.3	N704	S508
33	C1.25	SO_004752	22.6	N705	S517

34	C2.14	SO_004753	8.6	N705	SS02
35	C1.27	SO_004754	11.4	N705	SS03
36	C1.30	SO_004755	7.5	N705	SS04
37	C3.11	SO_004756	16.5	N705	SS05
38	C1.5	SO_004757	18.9	N705	SS06
39	C3.18	SO_004758	18.6	N705	SS07
40	C1.14	SO_004759	16.7	N705	SS08
41	C3.30	SO_004760	35.7	N706	SS17
42	C1.7	SO_004761	6.1	N706	SS02
43	C3.24	SO_004762	5.2	N706	SS03
44	C3.7-D6	SO_004763	17.3	N706	SS04
45	C2.9	SO_004764	5.9	N706	SS05
46	C1.1	SO_004765	16.7	N706	SS06
47	C2.15	SO_004766	3.9	N706	SS07
48	C2.22	SO_004767	8.8	N706	SS08
49	C2.12	SO_004768	14.0	N707	SS17
50	C2.5	SO_004769	13.8	N707	SS02
51	C2.31	SO_004770	24.9	N707	SS03
52	C1.12	SO_004771	10.8	N707	SS04
53	C1.2	SO_004772	1.0	N707	SS05
54	C3.21	SO_004773	24.4	N707	SS06
55	C1.23	SO_004774	33.3	N707	SS07
56	C2.23	SO_004775	9.3	N707	SS08
57	C3.26	SO_004776	36.5	N708	SS17
58	C3.22	SO_004777	16.5	N708	SS02
59	C2.4	SO_004778	12.8	N708	SS03
60	C2.29	SO_004779	2.3	N708	SS04
61	C2.17-E8	SO_004780	10.0	N708	SS05
62	C3.20	SO_004781	34.9	N708	SS06
63	C1.9	SO_004782	7.2	N708	SS07
64	C2.20	SO_004783	11.1	N708	SS08
65	C3.12	SO_004784	15.8	N709	SS17
66	C2.8	SO_004785	17.8	N709	SS02
67	C1.31	SO_004786	12.6	N709	SS03
68	C2.30-D9	SO_004787	9.1	N709	SS04
69	C1.16	SO_004788	10.9	N709	SS05
70	ntc1	SO_004789	0.3	N709	SS06
71	C2.32	SO_004790	5.4	N709	SS07
72	C3.27	SO_004791	5.4	N709	SS08
73	C3.29	SO_004792	10.5	N710	SS17
74	C1.10	SO_004793	11.6	N710	SS02
75	C1.4	SO_004794	6.7	N710	SS03
76	C2.10	SO_004795	12.9	N710	SS04

77	C3.7-E10	SO_004796	36.4	N710	SS05
78	C1.28	SO_004797	3.3	N710	SS06
79	C3.19	SO_004798	23.7	N710	SS07
80	C1.3	SO_004799	12.6	N710	SS08
81	C1.19	SO_004800	17.5	N711	SS17
82	C1.26	SO_004801	7.7	N711	SS02
83	C3.10	SO_004802	24.0	N711	SS03
84	C3.9	SO_004803	5.8	N711	SS04
85	C3.8	SO_004804	4.6	N711	SS05
86	C3.2	SO_004805	9.6	N711	SS06
87	C1.17	SO_004806	15.5	N711	SS07
88	C1.6	SO_004807	11.5	N711	SS08
89	C3.5	SO_004808	19.8	N712	SS17
90	C1.20	SO_004809	20.7	N712	SS02
91	C3.16	SO_004810	7.1	N712	SS03
92	C1.32	SO_004811	8.9	N712	SS04
93	C3.3	SO_004812	14.8	N712	SS05
94	C3.1	SO_004813	18.7	N712	SS06
95	C1.11	SO_004814	4.3	N712	SS07
96	C2.13	SO_004815	13.4	N712	SS08

Anexos 2. Electroforesis de los amplicones obtenidos de la primera PCR y de la PCR index, se usaron 5µl para cada una.



Anexos 3. Concentraciones de ADN después de la purificación de los Amplicones obtenidos de las dos PCR realizadas y que fueron enviadas para su secuenciación.

No.	Sample name (customer)	DNA concentration (ng/ul)
1	C3.23	87.3
2	C2.7	79.4
3	C1.15	77.8
4	C2.28	40.0
5	C2.11	78.3
6	C2.21	78.1
7	C1.8	56.9
8	C3.15	72.5
9	C3.28	55.1
10	C1.22	70.4
11	C1.18	47.7
12	C3.25	33.2
13	C3.14	39.5
14	C3.17	38.3
15	C1.21	57.9
16	C2.2	39.7
17	C2.19	60.3
18	C3.31	55.2
19	C2.16	39.2
20	C2.30-D3	15.5
21	C3.4	37.2
22	C1.29	32.6
23	C3.13	38.4
24	C1.24	52.8
25	C2.1	56.0
26	C2.6	57.7
27	C2.26	65.1

28	C2.24	44.9
29	C2.17-E4	34.0
30	C1.13	37.6
31	C2.18	42.8
32	C3.32	38.5
33	C1.25	46.9
34	C2.14	77.0
35	C1.27	38.5
36	C1.30	51.1
37	C3.11	55.6
38	C1.5	53.2
39	C3.18	48.8
40	C1.14	58.9
41	C3.30	39.5
42	C1.7	57.7
43	C3.24	49.5
44	C3.7-D6	53.9
45	C2.9	46.8
46	C1.1	43.3
47	C2.15	35.8
48	C2.22	42.4
49	C2.12	56.6
50	C2.5	75.7
51	C2.31	66.3
52	C1.12	47.6
53	C1.2	30.6
54	C3.21	32.8
55	C1.23	64.6
56	C2.23	64.0
57	C3.26	58.8
58	C3.22	90.8
59	C2.4	57.4
60	C2.29	36.3
61	C2.17-E8	61.0
62	C3.20	56.5
63	C1.9	29.2
64	C2.20	36.8
65	C3.12	21.8
66	C2.8	30.6
67	C1.31	55.8
68	C2.30-D9	54.9
69	C1.16	19.4
70	ntc1	-

71	C2.32	36.6
72	C3.27	49.1
73	C3.29	65.7
74	C1.10	75.6
75	C1.4	64.9
76	C2.10	52.6
77	C3.7-E10	52.1
78	C1.28	14.0
79	C3.19	54.5
80	C1.3	27.0
81	C1.19	62.4
82	C1.26	45.4
83	C3.10	38.4
84	C3.9	39.9
85	C3.8	57.4
86	C3.2	39.3
87	C1.17	58.0
88	C1.6	39.2
89	C3.5	71.8
90	C1.20	79.3
91	C3.16	69.3
92	C1.32	70.4
93	C3.3	78.6
94	C3.1	68.3
95	C1.11	79.9
96	C2.13	76.1

Anexos 4. Número se secuencias por especie y presencia de cada especie por muestra.

Organización:

Taxón Cuadro 1,2 y 3	Secuencias			Presencias			en cada cuadro	
---------------------------------------	-------------------	--	--	-------------------	--	--	-----------------------	--

Amanita 1	222	12	Amanita 1	140	9	Amanita 1	1659 85	20
Amanita 10	3	1	Amanita 10	1	1	Amanita 10	6	1
Amanita 11	5	2	Amanita 2	2771	17	Amanita 2	1023	17
Amanita 2	4252	15	Amanita 3	3160	12	Amanita 3	1592	9
Amanita 3	660	8	Amanita 4	1328	1	Amanita 4	4	2
Amanita 4	6	2	Amanita 5	5	1	Amanita 5	951	1
Amanita 5	1	1	Amanita 6	346	8	Amanita 6	77	2
Amanita 8	30	3	Amanita 7	32	1	Amanita 7	4	1
Amanita 9	25	1	Amanita 8	3	1	Amanita 9	4	3
Amphinema 1	4486	15	Amphinema 1	7093	11	Amphinema 1	814	17
Amphinema 10	81	5	Amphinema 10	3	1	Amphinema 10	6	4
Amphinema 11	62	6	Amphinema 11	11	1	Amphinema 11	1	1
Amphinema 12	46	3	Amphinema 12	9	2	Amphinema 13	2	2
Amphinema 13	42	3	Amphinema 13	3	1	Amphinema 14	35	2
Amphinema 14	6	4	Amphinema 14	3	2	Amphinema 15	3	2
Amphinema 15	6	4	Amphinema 15	17	1	Amphinema 16	2	2
Amphinema 16	10	3	Amphinema 16	10	1	Amphinema 17	1	1
Amphinema 17	7	5	Amphinema 17	12	1	Amphinema 18	9	2
Amphinema 18	6	2	Amphinema 18	3	3	Amphinema 19	3	2
Amphinema 19	14	2	Amphinema 2	2931	15	Amphinema 2	159	9
Amphinema 2	2386	8	Amphinema 20	1	1	Amphinema 20	15	2
Amphinema 20	1	1	Amphinema 21	6	2	Amphinema 21	4	2
Amphinema 21	2	2	Amphinema 22	3	1	Amphinema 22	2	1
Amphinema 22	1	1	Amphinema 3	3	1	Amphinema 23	2	1
Amphinema 3	322	5	Amphinema 4	16	2	Amphinema 3	7	3

Amphinema 4	197	6	Amphinema 5	185	1	Amphinema 4	1	1
Amphinema 6	14	5	Amphinema 6	29	1	Amphinema 6	139	2
Amphinema 7	127	10	Amphinema 7	16	3	Amphinema 7	38	9
Amphinema 8	88	7	Amphinema 8	10	4	Amphinema 8	8	5
Amphinema 9	90	2	Amphinema 9	5	1	Amphinema 9	2	1
Boletopsis 2	2	1	Boletus 1	129	3	Astraeus 1	29	1
Brauniellula 1	78	5	Brauniellula 1	51	3	Boletopsis 1	140	2
Byssocorticium 1	5	1	Byssocorticium 1	2098	7	Brauniellula 1	5	2
Byssocorticium 2	643	3	Byssocorticium 3	15	1	Brauniellula 2	21	2
Cenococcum 1	36082	26	Byssocorticium 4	8	1	Byssocorticium 1	9883	7
Cenococcum 11	95	4	Cenococcum 1	6097	21	Byssocorticium 2	1072	2
Cenococcum 12	35	1	Cenococcum 10	9	2	Byssocorticium 3	89	1
Cenococcum 13	114	6	Cenococcum 11	101	2	Byssocorticium 5	6	1
Cenococcum 14	69	4	Cenococcum 12	139	1	Cenococcum 1	1156	24
Cenococcum 15	68	3	Cenococcum 13	39	2	Cenococcum 10	389	1
Cenococcum 17	52	6	Cenococcum 14	63	2	Cenococcum 11	36	4
Cenococcum 19	15	1	Cenococcum 15	57	2	Cenococcum 12	2	2
Cenococcum 2	11028	15	Cenococcum 17	21	6	Cenococcum 13	6	1
Cenococcum 21	1	1	Cenococcum 18	48	1	Cenococcum 14	11	2
Cenococcum 22	6	1	Cenococcum 19	8	1	Cenococcum 15	18	2
Cenococcum 23	4	2	Cenococcum 2	11264	10	Cenococcum 16	125	1
Cenococcum 3	10018	22	Cenococcum 20	17	1	Cenococcum 17	33	9
Cenococcum 4	2268	12	Cenococcum 21	4	2	Cenococcum 18	13	2
Cenococcum 5	994	6	Cenococcum 3	2054	14	Cenococcum 19	9	1
Cenococcum 6	71	5	Cenococcum 4	1500	16	Cenococcum 2	2651	10
Cenococcum 7	235	7	Cenococcum 5	424	10	Cenococcum 21	9	2
Cenococcum 8	77	1	Cenococcum 6	1123	9	Cenococcum 23	2	2
Cenococcum 9	537	1	Cenococcum 7	747	7	Cenococcum 24	2	1
Ceratobasidium 1	34	1	Cenococcum 8	696	3	Cenococcum 3	558	14

Chloridium 1	592	5	Cenococcum 9	1	1	Cenococcum 4	2601	18
Chloridium 2	93	3	Chloridium 1	2	2	Cenococcum 5	2494	10
Chloridium 3	78	9	Chloridium 2	14	3	Cenococcum 6	2043	10
Chloridium 4	8	1	Chloridium 3	56	9	Cenococcum 7	795	9
Chroogomphus 1	413	6	Chloridium 4	149	4	Cenococcum 8	37	1
Clavulina 1	483	13	Chloridium 5	2	1	Cenococcum 9	2	1
Clavulina 10	46	3	Chroogomphus 1	31	10	Ceratobasidium 1	177	1
Clavulina 11	65	3	Clavulina 1	3296 1	9	Ceratobasidium 2	72	1
Clavulina 12	55	3	Clavulina 10	130	2	Chloridium 1	174	3
Clavulina 13	29	1	Clavulina 11	32	3	Chloridium 2	127	3
Clavulina 2	644	7	Clavulina 14	5	1	Chloridium 3	60	9
Clavulina 3	3	2	Clavulina 2	7	3	Chloridium 4	17	1
Clavulina 4	1529	3	Clavulina 3	4085	4	Chroogomphus 1	1526 2	11
Clavulina 5	411	3	Clavulina 4	1	1	Clavulina 1	27	10
Clavulina 6	34	2	Clavulina 5	20	3	Clavulina 10	1	1
Clavulina 7	13	2	Clavulina 6	331	3	Clavulina 11	1	1
Clavulina 9	5	2	Clavulina 7	334	2	Clavulina 2	3249 8	3
Coltricia 1	2	2	Clavulina 8	281	2	Clavulina 3	561	4
Cortinarius 1	22	4	Clavulina 9	236	3	Clavulina 6	1	1
Cortinarius 10	2	2	Coltricia 1	3	1	Clavulina 8	3	2
Cortinarius 11	1	1	Coltricia 2	3	1	Coltricia 1	7	1
Cortinarius 12	146	1	Cortinarius 1	50	7	Cortinarius 1	2998 7	3
Cortinarius 13	33	4	Cortinarius 10	1	1	Cortinarius 10	449	2
Cortinarius 2	6357	6	Cortinarius 12	18	2	Cortinarius 11	233	1
Cortinarius 22	10	1	Cortinarius 13	101	5	Cortinarius 12	58	3
Cortinarius 27	7	1	Cortinarius 17	8	1	Cortinarius 13	69	3
Cortinarius 28	2	1	Cortinarius 18	8	1	Cortinarius 14	188	3
Cortinarius 3	254	3	Cortinarius 19	3	1	Cortinarius 15	78	2
Cortinarius 32	4	1	Cortinarius 2	2654	13	Cortinarius 16	29	1
Cortinarius 33	4	1	Cortinarius 20	1	1	Cortinarius 17	17	1
Cortinarius 36	3	1	Cortinarius 29	6	1	Cortinarius 18	16	1
Cortinarius 4	3975	3	Cortinarius 3	3801	2	Cortinarius 19	17	1
Cortinarius 5	1500	2	Cortinarius 30	3	1	Cortinarius 2	1767 7	13
Cortinarius 6	1367	3	Cortinarius 31	1	1	Cortinarius 20	14	2
Cortinarius 7	1256	1	Cortinarius 4	16	7	Cortinarius 21	12	1
Cortinarius 8	2	2	Cortinarius 5	554	5	Cortinarius 22	2	1
Craterellus 1	677	2	Cortinarius 6	663	4	Cortinarius 23	10	3

Craterellus 2	29	3	Cortinarius 7	5	1	Cortinarius 24	9	1
Elaphomyces 1	30	5	Cortinarius 8	2	2	Cortinarius 25	9	1
Elaphomyces 2	5	2	Cortinarius 9	471	1	Cortinarius 26	8	1
Endogone 1	32	12	Craterellus 1	33	2	Cortinarius 28	5	1
Endogone 10	8	5	Craterellus 2	332	3	Cortinarius 3	4	2
Endogone 12	9	1	Craterellus 3	3	1	Cortinarius 30	3	1
Endogone 13	7	1	Elaphomyces 1	788	5	Cortinarius 31	4	1
Endogone 14	5	1	Elaphomyces 2	72	2	Cortinarius 34	3	1
Endogone 2	5	1	Elaphomyces 3	7	1	Cortinarius 35	3	2
Endogone 3	3	1	Endogone 1	26	9	Cortinarius 4	68	5
Endogone 4	3	2	Endogone 10	7	4	Cortinarius 5	290	5
Endogone 5	6	1	Endogone 11	11	3	Cortinarius 6	1	1
Endogone 6	4	3	Endogone 14	3	1	Cortinarius 7	1	1
Endogone 7	9	1	Endogone 2	32	2	Cortinarius 8	614	1
Endogone 8	5	1	Endogone 3	24	5	Craterellus 1	1	1
Endogone 9	6	2	Endogone 4	17	3	Craterellus 2	55	3
Entoloma 1	74	3	Endogone 5	14	3	Craterellus 3	13	1
Entoloma 10	8	1	Endogone 6	15	3	Elaphomyces 1	3247	6
Entoloma 2	23	2	Endogone 7	10	2	Elaphomyces 4	2	1
Entoloma 3	43	2	Endogone 8	8	2	Endogone 1	32	9
Entoloma 5	1	1	Endogone 9	7	3	Endogone 10	1	1
Entoloma 6	27	2	Entoloma 12	2	1	Endogone 11	2	2
Geopyxis 1	1499	2	Entoloma 2	2	1	Endogone 13	2	1
Gyroporus 1	28136	6	Entoloma 6	1	1	Endogone 2	35	5
Gyroporus 10	26	1	Entoloma 7	13	2	Endogone 3	11	4
Gyroporus 11	7	2	Gautieria 1	2	2	Endogone 4	11	2
Gyroporus 12	9	1	Gautieria 2	13	1	Endogone 5	9	4
Gyroporus 14	6	1	Geopyxis 1	2	2	Endogone 6	7	2
Gyroporus 16	3	1	Gyroporus 1	371	5	Endogone 7	5	2
Gyroporus 2	6204	11	Gyroporus 11	2	1	Endogone 8	10	5
Gyroporus 4	126	5	Gyroporus 13	6	1	Endogone 9	7	2
Gyroporus 5	74	4	Gyroporus 15	5	1	Entoloma 1	67	3
Gyroporus 6	74	1	Gyroporus 2	1616	8	Entoloma 11	2	1
Gyroporus 9	50	2	Gyroporus 3	713	2	Entoloma 2	81	1
Hebeloma 1	14	5	Gyroporus 4	11	2	Entoloma 3	1	1
Helvella 1	1051	15	Gyroporus 5	10	4	Entoloma 4	36	2
Humaria 1	86	3	Hebeloma 1	11	3	Entoloma 5	32	1
Hydnellum 1	48080	9	Helvella 1	911	16	Entoloma 7	14	2
Hydnellum 2	71	4	Humaria 1	133	4	Entoloma 8	14	2

Hydnellum 3	1	1	Humaria 2	8	1	Entoloma 9	11	2
Hydnellum 7	2	1	Hydnellum 1	43	5	Gautieria 1	43	1
Hydnobolites 1	206	4	Hydnellum 2	2547	5	Gautieria 2	16	2
Hydnobolites 2	8	1	Hydnellum 3	516	2	Gautieria 3	2	1
Hydnum 1	18	1	Hydnellum 4	316	2	Geopyxis 1	4	2
Hysterangium 1	2	2	Hydnellum 6	22	2	Gyroporus 1	25	8
Inocybe 1	508	6	Hydnellum 7	10	1	Gyroporus 11	4	1
Inocybe 10	824	4	Hydnellum 8	11	1	Gyroporus 2	256	5
Inocybe 101	7	1	Hydnellum 9	6	1	Gyroporus 3	398	2
Inocybe 102	6	1	Hydnobolites 1	105	4	Gyroporus 5	5	2
Inocybe 103	5	1	Hydnobolites 2	38	1	Gyroporus 7	60	3
Inocybe 104	4	2	Hydnum 2	9	1	Gyroporus 8	52	1
Inocybe 105	4	1	Hysterangium 1	3	1	Hebeloma 1	27	2
Inocybe 106	2	1	Hysterangium 2	2	2	Helvella 1	338	18
Inocybe 107	3	1	Hysterangium 3	8	1	Humaria 1	50	5
Inocybe 108	3	1	Inocybe 1	102	14	Humaria 2	2	1
Inocybe 109	3	1	Inocybe 10	59	6	Hydnellum 1	44	5
Inocybe 11	998	6	Inocybe 11	5191	8	Hydnellum 2	26	5
Inocybe 110	3	1	Inocybe 113	3	1	Hydnellum 4	21	1
Inocybe 111	3	1	Inocybe 12	43	7	Hydnellum 5	198	1
Inocybe 112	2	1	Inocybe 13	8	4	Hydnellum 7	2	1
Inocybe 114	2	1	Inocybe 14	9	4	Hydnobolites 1	781	7
Inocybe 116	2	1	Inocybe 15	930	9	Hydnobolites 3	15	1
Inocybe 12	8353	9	Inocybe 16	823	5	Hysterangium 1	3838	6
Inocybe 13	6334	7	Inocybe 17	3889	2	Hysterangium 2	49	2
Inocybe 14	5987	6	Inocybe 19	1353	5	Hysterangium 4	8	1
Inocybe 15	3696	4	Inocybe 2	2294	17	Hysterangium 5	3	1
Inocybe 16	902	10	Inocybe 20	1	1	Inocybe 1	6126	14
Inocybe 17	3	2	Inocybe 21	197	11	Inocybe 10	1353	8
Inocybe 18	2	1	Inocybe 22	1901	5	Inocybe 100	8	1
Inocybe 19	568	1	Inocybe 23	259	5	Inocybe 106	2	1
Inocybe 2	17726	17	Inocybe 24	1620	1	Inocybe 11	8084	4
Inocybe 20	1	1	Inocybe 25	123	4	Inocybe 112	1	1
Inocybe 21	1626	12	Inocybe 26	242	6	Inocybe 115	2	1
Inocybe 22	1	1	Inocybe 27	127	4	Inocybe 117	2	1
Inocybe 23	1392	4	Inocybe 28	883	3	Inocybe 118	2	1
Inocybe 25	1233	4	Inocybe 29	876	4	Inocybe 12	4533	6
Inocybe 26	21	5	Inocybe 3	2733	14	Inocybe 13	10	7

Inocybe 27	838	8	Inocybe 31	4	2	Inocybe 14	13	3
Inocybe 29	12	4	Inocybe 32	15	2	Inocybe 15	11	2
Inocybe 3	23501	16	Inocybe 33	35	5	Inocybe 16	2450	6
Inocybe 30	1	1	Inocybe 34	126	2	Inocybe 17	6	4
Inocybe 31	8	3	Inocybe 35	41	4	Inocybe 18	2488	1
Inocybe 32	426	8	Inocybe 36	1	1	Inocybe 19	490	2
Inocybe 33	330	7	Inocybe 37	25	3	Inocybe 2	1179 5	11
Inocybe 34	62	2	Inocybe 38	1	1	Inocybe 20	2329	1
Inocybe 35	326	8	Inocybe 39	391	1	Inocybe 21	239	5
Inocybe 36	426	3	Inocybe 4	2434 9	7	Inocybe 22	43	3
Inocybe 37	248	6	Inocybe 40	137	2	Inocybe 23	96	2
Inocybe 39	1	1	Inocybe 41	311	2	Inocybe 24	24	1
Inocybe 4	14	4	Inocybe 42	22	2	Inocybe 25	94	1
Inocybe 40	54	3	Inocybe 43	19	3	Inocybe 26	937	2
Inocybe 42	215	5	Inocybe 44	15	2	Inocybe 27	216	4
Inocybe 43	236	5	Inocybe 45	14	3	Inocybe 28	9	4
Inocybe 44	218	8	Inocybe 46	43	2	Inocybe 29	3	1
Inocybe 45	197	5	Inocybe 47	17	1	Inocybe 3	3797	13
Inocybe 46	168	1	Inocybe 49	13	1	Inocybe 30	578	1
Inocybe 47	173	6	Inocybe 5	2411 8	6	Inocybe 31	485	3
Inocybe 48	193	1	Inocybe 50	1	1	Inocybe 32	45	5
Inocybe 49	152	5	Inocybe 52	11	2	Inocybe 33	94	5
Inocybe 5	8	3	Inocybe 53	162	1	Inocybe 34	269	2
Inocybe 50	179	3	Inocybe 54	23	1	Inocybe 35	75	4
Inocybe 51	2	1	Inocybe 55	13	2	Inocybe 36	1	1
Inocybe 52	133	6	Inocybe 56	105	1	Inocybe 37	134	6
Inocybe 54	16	3	Inocybe 59	7	3	Inocybe 38	404	3
Inocybe 55	88	5	Inocybe 6	34	8	Inocybe 4	11	4
Inocybe 57	86	1	Inocybe 60	67	1	Inocybe 40	135	3
Inocybe 59	45	5	Inocybe 63	55	1	Inocybe 42	43	5
Inocybe 6	22006	7	Inocybe 64	7	3	Inocybe 43	19	2
Inocybe 61	56	2	Inocybe 67	3	2	Inocybe 44	36	3
Inocybe 62	52	2	Inocybe 69	5	2	Inocybe 45	29	4
Inocybe 64	41	4	Inocybe 7	1512	14	Inocybe 46	16	1
Inocybe 67	40	3	Inocybe 70	4	3	Inocybe 47	26	7
Inocybe 69	36	3	Inocybe 71	39	1	Inocybe 48	2	1
Inocybe 7	15394	14	Inocybe 73	28	4	Inocybe 49	24	4
Inocybe 70	31	6	Inocybe 74	9	2	Inocybe 5	11	4
Inocybe 72	38	2	Inocybe 78	4	1	Inocybe 50	1	1

Inocybe 73	3	1	Inocybe 79	9	2	Inocybe 51	169	3
Inocybe 74	14	1	Inocybe 8	1532 8	7	Inocybe 52	27	5
Inocybe 75	31	2	Inocybe 82	6	3	Inocybe 54	122	1
Inocybe 76	31	2	Inocybe 83	2	2	Inocybe 55	13	3
Inocybe 77	31	3	Inocybe 86	1	1	Inocybe 57	9	1
Inocybe 78	23	5	Inocybe 88	8	1	Inocybe 58	84	1
Inocybe 79	7	1	Inocybe 9	185	4	Inocybe 59	18	6
Inocybe 8	15	6	Inocybe 90	3	2	Inocybe 6	53	10
Inocybe 81	2	1	Inocybe 91	7	1	Inocybe 61	2	1
Inocybe 82	2	2	Inocybe 95	2	1	Inocybe 62	5	1
Inocybe 83	18	4	Lactarius 1	162	2	Inocybe 64	7	3
Inocybe 84	6	3	Lactarius 2	148	1	Inocybe 65	52	2
Inocybe 86	24	1	Lyophyllum 1	1	1	Inocybe 66	51	3
Inocybe 89	18	2	Lyophyllum 2	4	1	Inocybe 67	5	2
Inocybe 9	322	9	Lyophyllum 4	10	1	Inocybe 68	46	1
Inocybe 90	3	1	Lyophyllum 5	9	2	Inocybe 69	2	2
Inocybe 91	5	1	Melanogaster 1	1554	30	Inocybe 7	2482	12
Inocybe 94	11	1	Meliniomyces 1	122	3	Inocybe 70	6	3
Inocybe 95	9	1	Meliniomyces 2	10	2	Inocybe 73	7	1
Inocybe 96	10	1	Otidea 1	47	2	Inocybe 74	12	1
Inocybe 97	10	1	Pachyphloeus 1	674	9	Inocybe 75	1	1
Inocybe 98	9	1	Pachyphloeus 10	2	1	Inocybe 78	4	1
Inocybe 99	8	1	Pachyphloeus 12	2	1	Inocybe 79	14	2
Lactarius 1	2	1	Pachyphloeus 13	8	3	Inocybe 8	16	6
Lactarius 4	5	1	Pachyphloeus 14	7	1	Inocybe 80	28	3
Lyophyllum 1	1174	2	Pachyphloeus 19	4	1	Inocybe 81	26	1
Lyophyllum 3	9	2	Pachyphloeus 2	4	3	Inocybe 82	19	2
Lyophyllum 4	6	2	Pachyphloeus 3	1266	4	Inocybe 83	6	3
Lyophyllum 5	5	1	Pachyphloeus 4	159	5	Inocybe 84	19	1
Melanogaster 1	1020	29	Pachyphloeus 6	62	1	Inocybe 85	25	2
Meliniomyces 1	37	2	Pachyphloeus 7	2	2	Inocybe 87	24	2
Otidea 1	39	2	Pachyphloeus 8	11	1	Inocybe 88	14	2
Pachyphloeus 1	279	5	Pachyphloeus 9	1	1	Inocybe 9	1444 6	9
Pachyphloeus 10	48	3	Peziza 1	1809 7	18	Inocybe 90	7	1
Pachyphloeus 11	29	1	Peziza 10	10	3	Inocybe 92	12	1

Pachyphloeus 12	19	3	Peziza 11	4	1	Inocybe 93	11	1
Pachyphloeus 13	6	2	Peziza 12	4	1	Lactarius 1	315	2
Pachyphloeus 16	5	1	Peziza 13	1	1	Lactarius 2	1	1
Pachyphloeus 18	4	1	Peziza 2	429	6	Lactarius 3	91	5
Pachyphloeus 2	1973	3	Peziza 3	937	4	Lyophyllum 1	8	4
Pachyphloeus 3	302	5	Peziza 4	1077	9	Lyophyllum 2	105	1
Pachyphloeus 4	1231	7	Peziza 5	403	13	Lyophyllum 3	7	1
Pachyphloeus 5	701	3	Peziza 6	240	9	Lyophyllum 5	1	1
Pachyphloeus 6	1	1	Peziza 8	82	2	Melanogaster 1	1728	32
Pachyphloeus 7	333	4	Peziza 9	33	1	Meliniomyces 1	83	5
Pachyphloeus 8	64	3	Phellodon 1	1	1	Meliniomyces 2	52	1
Pachyphloeus 9	28	1	Phellodon 2	580	4	Otidea 1	26	2
Peziza 1	14362	13	Phellodon 3	449	2	Pachyphloeus 1	2865	9
Peziza 10	8	1	Phellodon 4	10	1	Pachyphloeus 12	1	1
Peziza 11	10	3	Piloderma 1	291	6	Pachyphloeus 15	5	1
Peziza 12	7	1	Pseudotomentella 1	3593	13	Pachyphloeus 17	5	1
Peziza 13	2	1	Pseudotomentella 11	87	1	Pachyphloeus 2	630	3
Peziza 2	2609	5	Pseudotomentella 12	18	4	Pachyphloeus 3	1	1
Peziza 3	1304	4	Pseudotomentella 13	3	2	Pachyphloeus 4	125	7
Peziza 4	303	7	Pseudotomentella 14	2	1	Pachyphloeus 5	720	6
Peziza 5	784	11	Pseudotomentella 15	8	1	Pachyphloeus 6	574	4
Peziza 6	5	2	Pseudotomentella 16	3	1	Pachyphloeus 7	12	4
Peziza 8	3	2	Pseudotomentella 17	6	1	Pachyphloeus 8	1	1
Phellodon 1	1	1	Pseudotomentella 2	3294	18	Pachyphloeus 9	38	3
Phellodon 2	3	1	Pseudotomentella 3	3697	4	Peziza 1	24	11
Phellodon 3	6	1	Pseudotomentella 4	2839	4	Peziza 2	54	4
Phellodon 4	1	1	Pseudotomentella 5	12	3	Peziza 3	684	3

Phellodon 5	4	1	Pseudotomentella 6	107	4	Peziza 4	319	10
Phellodon 6	8	2	Pulvinula 2	15	1	Peziza 5	246	11
Piloderma 1	20	3	Pulvinula 3	1	1	Peziza 6	746	10
Piloderma 2	7	1	Ramaria 1	84	6	Peziza 7	493	7
Pseudotomentella 1	9363	8	Ramaria 2	4	2	Peziza 8	145	3
Pseudotomentella 10	122	2	Ramaria 4	5	2	Peziza 9	6	1
Pseudotomentella 11	10	1	Rhizopogon 1	3188	30	Phellodon 1	696	1
Pseudotomentella 12	69	3	Rhizopogon 2	3413	30	Phellodon 2	30	5
Pseudotomentella 13	50	2	Rhizopogon 3	265	20	Phellodon 3	4	2
Pseudotomentella 14	33	4	Rhizopogon 5	2	2	Phellodon 5	5	1
Pseudotomentella 15	2	2	Rhizopogon 6	2	1	Piloderma 1	1	1
Pseudotomentella 16	13	5	Russula 1	43410	21	Pisolithus 1	2	1
Pseudotomentella 2	6976	21	Russula 10	15	5	Pseudotomentella 1	2024	13
Pseudotomentella 3	2953	4	Russula 11	3562	5	Pseudotomentella 11	5	2
Pseudotomentella 5	2	1	Russula 12	3704	4	Pseudotomentella 12	3	1
Pseudotomentella 6	521	4	Russula 13	382	5	Pseudotomentella 13	1	1
Pseudotomentella 7	366	4	Russula 14	2831	7	Pseudotomentella 15	24	2
Pseudotomentella 9	1	1	Russula 15	1	1	Pseudotomentella 17	3	1
Pulvinula 2	2	1	Russula 17	387	1	Pseudotomentella 2	215	9
Pulvinula 3	2	2	Russula 18	72	2	Pseudotomentella 3	187	4
Ramaria 1	37	4	Russula 19	3	2	Pseudotomentella 4	6	4
Ramaria 2	55	2	Russula 2	42786	12	Pseudotomentella 5	1504	8
Ramaria 3	46	3	Russula 20	688	1	Pseudotomentella 6	11	3
Rhizopogon 1	4410	31	Russula 21	91	6	Pseudotomentella 7	1	1
Rhizopogon 2	3620	27	Russula 23	88	8	Pseudotomentella 8	134	1
Rhizopogon 3	208	18	Russula 25	15	2	Pseudotomentella 9	129	1
Rhizopogon 4	56	5	Russula 26	29	4	Pulvinula 1	43	1
Rhizopogon 5	2	1	Russula 27	140	2	Ramaria 1	263	6

Russula 1	11322 1	15	Russula 28	1	1	Ramaria 2	28	2
Russula 10	8006	8	Russula 3	38	4	Ramaria 3	20	1
Russula 11	1957	8	Russula 32	68	3	Rhizopogon 1	873	31
Russula 12	4	4	Russula 34	13	1	Rhizopogon 2	1041	29
Russula 13	3152	3	Russula 35	6	3	Rhizopogon 3	97	18
Russula 14	19	4	Russula 38	25	2	Rhizopogon 5	3	3
Russula 15	1768	1	Russula 39	38	2	Russula 1	4155 5	13
Russula 16	1386	2	Russula 4	6346 6	15	Russula 10	4843	6
Russula 18	375	5	Russula 40	12	2	Russula 11	4171	10
Russula 19	695	1	Russula 41	9	1	Russula 12	2	1
Russula 2	142	14	Russula 42	6	1	Russula 13	2	1
Russula 21	405	3	Russula 43	9	1	Russula 14	297	1
Russula 23	87	5	Russula 44	8	3	Russula 15	2	2
Russula 24	163	2	Russula 45	1	1	Russula 17	768	2
Russula 25	65	4	Russula 46	1	1	Russula 18	341	4
Russula 26	91	2	Russula 48	3	1	Russula 19	69	2
Russula 28	129	1	Russula 5	4487 2	6	Russula 2	1244 00	12
Russula 29	121	1	Russula 6	1794 7	14	Russula 21	162	3
Russula 3	85407	8	Russula 7	19	7	Russula 22	298	2
Russula 32	25	4	Russula 8	16	5	Russula 23	5	2
Russula 33	81	1	Russula 9	1437 8	7	Russula 24	11	1
Russula 35	32	2	Sarcodon 1	2	1	Russula 25	73	4
Russula 36	44	1	Sarcodon 7	11	2	Russula 26	30	2
Russula 37	43	1	Scleroderma 1	988	14	Russula 27	2	2
Russula 38	16	5	Scleroderma 2	9	4	Russula 28	2	1
Russula 4	1057	17	Scleroderma 4	5	1	Russula 29	10	1
Russula 42	1	1	Sebacina 1	4779 9	18	Russula 3	1139	8
Russula 45	5	1	Sebacina 10	110	6	Russula 30	114	1
Russula 46	3	1	Sebacina 11	12	4	Russula 31	97	1
Russula 47	4	2	Sebacina 12	1447	3	Russula 32	2	1
Russula 5	14	3	Sebacina 15	620	3	Russula 34	59	1
Russula 50	2	1	Sebacina 16	2	1	Russula 35	13	1
Russula 6	14978	11	Sebacina 17	453	2	Russula 36	4	1
Russula 7	27658	10	Sebacina 2	114	7	Russula 39	2	1
Russula 8	15988	5	Sebacina 21	240	3	Russula 4	2522	19
Russula 9	11	6	Sebacina 22	20	1	Russula 41	3	1
Sarcodon 1	4	2	Sebacina 23	93	2	Russula 42	4	3

Sarcodon 7	6	1	Sebacina 25	22	1	Russula 43	1	1
Scleroderma 1	137	12	Sebacina 29	18	1	Russula 45	1	1
Scleroderma 2	10	2	Sebacina 3	2325	16	Russula 46	1	1
Scleroderma 3	9	1	Sebacina 30	14	1	Russula 49	3	1
Sebacina 1	12351	12	Sebacina 33	9	2	Russula 5	12	4
Sebacina 10	459	7	Sebacina 34	13	1	Russula 50	1	1
Sebacina 11	1	1	Sebacina 38	7	1	Russula 51	3	1
Sebacina 12	5	4	Sebacina 4	19	3	Russula 52	2	1
Sebacina 13	781	1	Sebacina 42	4	1	Russula 6	647	8
Sebacina 14	18	2	Sebacina 45	2	1	Russula 7	3515	3
Sebacina 15	2	1	Sebacina 5	9175	9	Russula 8	1219	5
Sebacina 16	613	4	Sebacina 6	2852 4	6	Russula 9	5	2
Sebacina 17	12	3	Sebacina 7	1770 5	10	Sarcodon 1	1037 1	6
Sebacina 18	451	2	Sebacina 8	91	6	Sarcodon 2	124	1
Sebacina 2	72714	6	Sebacina 9	8841	4	Sarcodon 3	64	1
Sebacina 20	171	1	Serendipita 1	7	1	Sarcodon 4	46	1
Sebacina 23	8	4	Sistotrema 1	498	2	Sarcodon 5	41	2
Sebacina 24	89	3	Sistotrema 2	76	4	Sarcodon 6	19	1
Sebacina 25	8	2	Sistotrema 3	30	4	Scleroderma 1	2063	7
Sebacina 26	45	1	Sistotrema 4	34	4	Scleroderma 2	90	7
Sebacina 27	4	1	Sistotrema 8	1	1	Scleroderma 3	3	1
Sebacina 28	23	1	Sphaerosporella 1	1337	6	Sebacina 1	1564 7	11
Sebacina 29	13	2	Sphaerosporella 2	994	8	Sebacina 10	1977	11
Sebacina 3	55467	21	Sphaerosporella 3	16	1	Sebacina 11	2449	4
Sebacina 30	12	1	Sphaerosporella 4	1	1	Sebacina 12	12	6
Sebacina 37	8	1	Strobilomyces 2	187	7	Sebacina 14	728	2
Sebacina 4	53562	7	Strobilomyces 4	29	2	Sebacina 17	88	3
Sebacina 40	4	1	Strobilomyces 5	2	1	Sebacina 19	412	2
Sebacina 43	4	1	Suillus 1	229	22	Sebacina 2	29	4
Sebacina 44	2	1	Suillus 2	435	23	Sebacina 20	84	1
Sebacina 5	34724	12	Suillus 3	1063	16	Sebacina 21	3	1
Sebacina 6	8	4	Suillus 4	1004	6	Sebacina 22	118	2
Sebacina 7	907	11	Suillus 5	188	12	Sebacina 23	8	3
Sebacina 8	6234	3	Suillus 6	11	3	Sebacina 25	21	2
Sebacina 9	8	3	Suillus 7	36	3	Sebacina 27	34	2
Serendipita 2	13	1	Suillus 8	12	1	Sebacina 28	10	1
Sistotrema 10	4	1	Suillus 9	24	4	Sebacina 29	1	1

Sistotrema 2	19	6	Tomentella 1	1664 7	18	Sebacina 3	239	19
Sistotrema 3	83	7	Tomentella 10	2334	11	Sebacina 30	4	1
Sistotrema 4	3	1	Tomentella 11	1006	10	Sebacina 31	28	1
Sistotrema 5	3	1	Tomentella 12	1991	3	Sebacina 32	15	1
Sistotrema 6	12	1	Tomentella 13	24	9	Sebacina 33	5	2
Sistotrema 7	1	1	Tomentella 14	34	3	Sebacina 35	12	1
Sistotrema 8	8	2	Tomentella 15	246	3	Sebacina 36	8	2
Sistotrema 9	5	1	Tomentella 16	49	4	Sebacina 39	5	1
Sphaerosporella 1	93	8	Tomentella 17	278	10	Sebacina 4	25	6
Sphaerosporella 2	108	4	Tomentella 18	400	3	Sebacina 41	4	1
Sphaerosporella 3	5	1	Tomentella 19	1	1	Sebacina 5	26	8
Strobilomyces 1	1	1	Tomentella 2	1311 5	11	Sebacina 6	11	4
Strobilomyces 2	47	4	Tomentella 20	2	1	Sebacina 7	4923	10
Strobilomyces 3	198	1	Tomentella 22	48	1	Sebacina 8	7147	3
Strobilomyces 4	6	2	Tomentella 24	138	3	Sebacina 9	8	3
Suillus 1	9193	25	Tomentella 25	292	3	Serendipita 1	60	2
Suillus 10	10	4	Tomentella 26	10	1	Sistotrema 1	3	1
Suillus 2	1827	26	Tomentella 27	115	1	Sistotrema 2	358	11
Suillus 3	1385	13	Tomentella 28	166	5	Sistotrema 3	158	7
Suillus 4	34	3	Tomentella 29	126	1	Sistotrema 4	1	1
Suillus 5	653	13	Tomentella 3	1179	15	Sistotrema 5	15	2
Suillus 6	2	1	Tomentella 30	80	1	Sistotrema 7	10	1
Suillus 7	8	1	Tomentella 31	2	2	Sphaerosporella 1	2895	8
Suillus 8	39	2	Tomentella 32	90	3	Sphaerosporella 2	1087	6
Tarzetta 1	2	1	Tomentella 33	64	6	Sphaerosporella 3	3	1
Thelephora 1	30	2	Tomentella 35	56	3	Sphaerosporella 4	15	1
Tomentella 1	15034	16	Tomentella 36	1	1	Strobilomyces 1	1169	9
Tomentella 10	16	6	Tomentella 37	12	3	Strobilomyces 2	271	10
Tomentella 11	4202	7	Tomentella 38	1	1	Strobilomyces 3	1	1
Tomentella 12	104	3	Tomentella 39	6	1	Strobilomyces 4	140	1
Tomentella 13	1864	6	Tomentella 4	77	7	Strobilomyces 5	42	1
Tomentella 15	1353	3	Tomentella 40	9	1	Suillus 1	854	24
Tomentella 16	1303	9	Tomentella 41	11	2	Suillus 10	4	3
Tomentella 17	75	3	Tomentella 43	13	1	Suillus 2	1377	18

Tomentella 18	6	1	Tomentella 46	3	1	Suillus 3	12	4
Tomentella 2	2339	11	Tomentella 5	1065 6	8	Suillus 4	771	8
Tomentella 20	429	2	Tomentella 51	6	1	Suillus 5	84	14
Tomentella 21	433	3	Tomentella 52	5	1	Suillus 6	99	3
Tomentella 22	67	3	Tomentella 53	1	1	Suillus 7	45	4
Tomentella 23	51	3	Tomentella 54	4	1	Suillus 8	1	1
Tomentella 24	177	3	Tomentella 57	3	1	Suillus 9	2	1
Tomentella 25	11	1	Tomentella 6	1020 8	8	Tomentella 1	154	12
Tomentella 26	2	1	Tomentella 60	2	1	Tomentella 10	3380	15
Tomentella 28	12	3	Tomentella 7	8485	8	Tomentella 11	506	5
Tomentella 29	17	1	Tomentella 8	3755	7	Tomentella 12	95	2
Tomentella 3	16099	9	Tomentella 9	1057	3	Tomentella 13	141	7
Tomentella 30	6	1	Tomentellopsis 1	88	5	Tomentella 14	1824	1
Tomentella 31	5	4	Tomentellopsis 2	6	1	Tomentella 15	55	4
Tomentella 32	63	3	Tomentellopsis 3	2	1	Tomentella 16	9	3
Tomentella 33	53	3	Tricholoma 1	7847 4	25	Tomentella 17	600	5
Tomentella 34	112	2	Tricholoma 10	160	4	Tomentella 18	324	2
Tomentella 35	1	1	Tricholoma 11	143	3	Tomentella 19	640	1
Tomentella 37	3	1	Tricholoma 12	138	5	Tomentella 2	7638	19
Tomentella 38	25	4	Tricholoma 13	137	4	Tomentella 20	65	4
Tomentella 39	1	1	Tricholoma 14	110	4	Tomentella 21	10	1
Tomentella 4	529	3	Tricholoma 15	93	4	Tomentella 22	283	4
Tomentella 41	3	2	Tricholoma 16	4	3	Tomentella 23	334	2
Tomentella 42	1	1	Tricholoma 2	7420 5	11	Tomentella 24	15	2
Tomentella 43	2	1	Tricholoma 22	1	1	Tomentella 25	1	1
Tomentella 45	8	1	Tricholoma 24	2	1	Tomentella 26	271	1
Tomentella 46	10	1	Tricholoma 3	220	9	Tomentella 27	129	2
Tomentella 47	10	3	Tricholoma 4	17	2	Tomentella 28	10	2
Tomentella 48	4	2	Tricholoma 5	30	5	Tomentella 29	44	2
Tomentella 49	3	2	Tricholoma 6	42	4	Tomentella 3	25	6
Tomentella 5	893	10	Tricholoma 7	270	4	Tomentella 30	96	3
Tomentella 53	2	1	Tricholoma 8	14	3	Tomentella 31	159	5
Tomentella 55	2	1	Tuber 1	2291	3	Tomentella 32	7	2
Tomentella 59	2	1	Tuber 2	158	6	Tomentella 33	14	7
Tomentella 6	33	3	Tuber 3	218	3	Tomentella 35	11	3
Tomentella 7	93	6	Tuber 4	61	9	Tomentella 36	59	3
Tomentella 8	3410	5	Tuber 5	7	2	Tomentella 37	22	3

Tomentella 9	11	4	Tylophilus 1	6	1	Tomentella 38	3	2
Tomentellopsis 1	8	1	Tylospora 1	23887	27	Tomentella 39	15	5
Tricholoma 1	16835	21	Tylospora 10	177	8	Tomentella 4	11511	11
Tricholoma 11	2	2	Tylospora 11	41	10	Tomentella 40	12	1
Tricholoma 12	3	3	Tylospora 12	39	6	Tomentella 41	3	2
Tricholoma 13	1	1	Tylospora 13	36	2	Tomentella 42	15	3
Tricholoma 14	1	1	Tylospora 14	10	4	Tomentella 44	15	1
Tricholoma 15	2	1	Tylospora 15	8	2	Tomentella 45	6	2
Tricholoma 16	4	2	Tylospora 16	7	2	Tomentella 48	5	2
Tricholoma 17	19	1	Tylospora 17	8	4	Tomentella 49	5	1
Tricholoma 2	375	16	Tylospora 18	56	10	Tomentella 5	28	11
Tricholoma 20	2	1	Tylospora 19	6	4	Tomentella 50	6	2
Tricholoma 22	4	1	Tylospora 2	1330	13	Tomentella 53	1	1
Tricholoma 23	2	1	Tylospora 20	6	3	Tomentella 55	1	1
Tricholoma 3	10330	12	Tylospora 21	15	7	Tomentella 56	3	1
Tricholoma 4	1538	7	Tylospora 22	62	3	Tomentella 58	3	1
Tricholoma 5	27	7	Tylospora 24	40	7	Tomentella 6	624	13
Tricholoma 6	3	2	Tylospora 25	1	1	Tomentella 7	49	6
Tricholoma 7	2	2	Tylospora 26	21	3	Tomentella 8	211	7
Tricholoma 8	164	2	Tylospora 27	8	2	Tomentella 9	6023	10
Tuber 1	1067	3	Tylospora 28	15	1	Tomentellopsis 1	262	1
Tuber 2	8	4	Tylospora 3	10226	11	Tomentellopsis 2	21	2
Tuber 3	639	3	Tylospora 30	2	1	Tricholoma 1	21533	28
Tuber 4	112	9	Tylospora 4	11	6	Tricholoma 10	1	1
Tylophilus 1	200	3	Tylospora 5	2023	7	Tricholoma 14	4	1
Tylospora 1	16823	24	Tylospora 6	559	9	Tricholoma 16	19	6
Tylospora 10	216	8	Tylospora 7	65	6	Tricholoma 18	17	1
Tylospora 11	366	7	Tylospora 8	60	8	Tricholoma 19	9	1
Tylospora 12	322	5	Tylospora 9	270	11	Tricholoma 2	60	16
Tylospora 13	322	1	Wilcoxina 1	3	3	Tricholoma 20	4	1
Tylospora 14	152	3				Tricholoma 21	5	1
Tylospora 15	114	1				Tricholoma 3	2938	10
Tylospora 16	107	1				Tricholoma 4	171	6
Tylospora 17	71	3				Tricholoma 5	643	5
Tylospora 18	20	6				Tricholoma 6	480	1
Tylospora 19	73	1				Tricholoma 7	2	1
Tylospora 2	18439	9				Tricholoma 8	34	3
Tylospora 20	72	2				Tricholoma 9	183	2

