



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
ECOLOGÍA

Diversidad, ecología y huella isotópica de *Clavulina* en bosques de *Abies* del suroeste de la cuenca de México

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

FRANCISCO EDUARDO PÉREZ PAZOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

Enero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
ECOLOGÍA

Diversidad, ecología y huella isotópica de *Clavulina* en bosques de *Abies* del suroeste de la cuenca de México

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

FRANCISCO EDUARDO PÉREZ PAZOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

Enero, 2018

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/842/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **25 de septiembre de 2017** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Ecología** del (la) alumno(a) **PÉREZ PAZOS FRANCISCO EDUARDO** con número de cuenta **307198093** con la tesis titulada "**Diversidad, ecología y huella isotópica de *Clavulina* en bosques de *Abies* del suroeste de la Cuenca de México**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RIOS:**

Presidente: DRA. MARÍA GUADALUPE BARAJAS GUZMÁN
Vocal: DRA. LAURA GUZMÁN DÁVALOS
Secretario: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
Suplente: DR. BRUNO MANUEL CHÁVEZ VERGARA
Suplente: DR. FRÉDÉRIQUE REVERCHON

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 4 de diciembre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MJFM/ASR/ipp

Agradecimientos académicos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por mi formación dentro de su plan de estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por aceptarme en su Programa de Becas Nacionales, otorgándome la beca 420208 para la realización de mis estudios de maestría. Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por otorgarme el apoyo financiero PAEP en su convocatoria de 2016. Al proyecto PAPIIT IN-223114 y a la Red Mexbol (CONACYT-280896) por el financiamiento parcial para la realización de este proyecto.

A mi tutora principal, Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos por dirigir este proyecto, por el apoyo financiero y de infraestructura que hicieron posible la culminación de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Roberto Garibay Orijel y Dra. María del Pilar Ortega Larrocea, por participar en este proyecto, por todas sus críticas constructivas y comentarios que permitieron la culminación de este trabajo.

A los miembros de mi jurado: Dra. María Guadalupe Barajas Guzmán, Dra. Laura Guzmán Dávalos, Dr. Roberto Garibay Orijel, Dr. Bruno Manuel Chávez Vergara y Dra. Frédérique Reverchon. Por su visión, sus comentarios y sus críticas que potenciaron el nivel académico del trabajo. Les agradezco por siempre estar abiertos a debatir ideas y compartir su conocimiento y experiencia conmigo.

Al Mtro. Pedro Abelardo Morales Puente, Mtro. Francisco Javier Otero Trujano y a la Mtra. Edith Cienfuegos Alvarado por el apoyo técnico brindado para la obtención parcial de los datos isotópicos en el Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología, UNAM.

Al Dr. Jason Curtis por el apoyo técnico brindado para la obtención parcial de los datos isotópicos en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de Isótopos Estables de la Universidad de Florida, EUA.

A la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar por el apoyo técnico brindado para la obtención de las secuencias de ADN de los basidiomas y ectomicorrizas en el Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM.

A la Dra. Kumiko Shimada Miyasaka por el apoyo técnico brindado para la caracterización química de las muestras de suelo en el Laboratorio de Edafología Ambiental del Instituto de Geología, UNAM.

Al M. en C. Rodolfo Enrique Ángeles Argáiz y a la Dra. Noemí Matías Ferrer por el apoyo técnico brindado durante los procesos de obtención de secuencias de ADN.

Al Dr. Zenón Cano Santana y al M. en C. Iván Castellanos Vargas por el apoyo técnico brindado para la deshidratación de las muestras para el análisis de isótopos estables.

A la Dra. Silvia Espinoza por el apoyo técnico brindado para la obtención de imágenes de microscopía electrónica de barrido.

Al M. en A. Aldi de Oyarzabal Salcedo por el apoyo brindado para las ilustraciones de los basidios de las especies descritas en este trabajo.

Al Geog. Andrés Prado Lallande y al Geog. Óscar Ramírez por el apoyo técnico brindado en la elaboración del mapa de los sitios de muestreo.

A las autoridades del Parque Nacional Desierto de los Leones, por la anuencia otorgada para realizar la recolecta de las muestras biológicas y por las facilidades brindadas para acceder al Centro de Administración, Vigilancia y Monitoreo Ecológico El Pantano.

A la comunidad de San Pedro Atlapulco por las facilidades para acceder a los bosques de El Zarco y la recolecta de muestras biológicas.

Agradecimientos personales

Nuevamente a las autoridades del Parque Nacional Desierto de los Leones, sobre todo a sus guardabosques y vigilantes. Porque son ustedes quienes día a día salvaguardan ese espacio común, aún con las adversidades propias del sitio. Gracias por cuidar ese bosque que necesitamos todos.

De nueva cuenta a la comunidad de San Pedro Atlapulco, por permitirme realizar parte de mi trabajo en sus bosques. Gracias por su labor constante, sígan protegiendo a El Zarco, es un sitio único.

Isabel Salcedo Larralde eta Ibai Olariaga Iburguren doktoreei. Euskal Herriko Unibertsitatean hartzeagatik eta nirekin hain adeitsuak izateagatik. Ibai, eskerrik asko hain denbora gutxian erakutsi zenidan guztiagatik. Baita zure herri ederra erakusteagatik ere. Bueltatu behar naiz, ez ezazu hortaz zalantzarik izan. Isabel, eskerrik asko ni hartzeko izan zenuen borondate eta denboragatik. Bai esparru akademikoan eta bai esparru akademikorik kanpo ere.

Traducción: A la Dra. Isabel Salcedo Larralde y al Dr. Ibai Olariaga Iburguren. Por recibirme en la Universidad del País Vasco y por ser siempre tan amables conmigo. Ibai, gracias por todo lo que me enseñaste en tan poco tiempo. Por mostrarme tu país tan hermoso. He de volver, que no te quepa duda. Isabel, gracias por el espacio y la voluntad que tuviste para recibirme y para compartir tiempo dentro y fuera del ámbito académico.

Lur, Goru eta Mikeli. Eskerrik asko nire Euskal Herriko egonaldian zehar zuen etxean hartzeagatik. Denbora gutxi izan zen elkarrekin bizi izan genuena baina jakin ezazue oso baliotsua izan zela niretzako eta beti nirekin eramango zaituztedala. Pertsona bikainak zarete eta asko gustatu zitzaidan zuek ezagutzea. ¡Euskaraz bizi nahi dut!

Traducción: A Lur, Goru y Mikel. Gracias por recibirme en su hogar durante mi estancia en País Vasco. Fue poco el tiempo que convivimos pero sepan que fue muy valioso para mi y que lo llevo siempre. Son excelentes personas y me dio mucho gusto haberlos conocido. ¡Euskaraz bizi nahi dut!

Dedicatoria

A mi *Alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi segundo hogar, la Facultad de Ciencias. Por formarme como profesional en el área de investigación. Por darme las bases académicas y humanas para aportar siempre una visión crítica del mundo social y del natural.

A mi madre, Rebeca Pazos Rodríguez. Por que siempre has estado allí para animarme y para hacerme ver la realidad en todos los aspectos. Sigues siendo la mejor persona que conozco. No hay momento en que no reconozca que si he llegado hasta este nivel, ha sido por tu apoyo incondicional, todos los días y en todo momento. Gracias por tanto, siempre. Te amo mamá.

A mi hermana, María Fernanda Pérez Pazos. Por demostrarme con el ejemplo que es posible conquistar metas, poco a poco, pero siempre dando pasos firmes. Gracias por siempre reconocer mis aptitudes (a menudo más de lo que yo mismo lo hago), por apoyarme, pero sobre todo por hacerme ver cuando me equivoco. Te amo y te admiro mucho.

A mi familia, que nunca han dejado de estar conmigo. Sobre todo a quien más extraño a diario: a mi abuela. Que gusto me habría dado que hubieses compartido esto conmigo. Te llevo siempre porque en ti están mis raíces. Sé que de algún modo, siempre estarás, en todo lo que soy y en cualquier lugar en donde me encuentre.

A mi tutora, maestra y amiga, Margarita Villegas Ríos. Por reconocer mi potencial y por hacerme ver que es posible conquistar nuestros sueños, siempre que haya trabajo de por medio. Por siempre apoyarme en este y en otros proyectos. Por confiar en mí y por darme las herramientas para ser un mejor estudiante, profesor y ser humano. A ese bello país sudamericano le estoy en deuda vitalicia, por que me regaló a personas increíbles como tú.

A mis colegas del LAB-MVR (así le llamo yo). A Rodolfo Salas Lizana. Por tu ojo crítico, por enseñarme todos los días algo nuevo, desde análisis filogenéticos hasta el sentido para subir y bajar las escaleras. A veces no te das cuenta de lo mucho que te he aprendido desde que compartimos el espacio. Te estimo mucho Rodo, gracias por compartir tantas cosas y apoyarme siempre.

A Eduardo Choreño Parra. Fue un verdadero gusto ver como poco a poco te fuiste metiendo en "El Reino de los Hongos". Académicamente es un placer convivir contigo y debatir ideas, sin embargo lo que más valoro, es que eres una excelente persona, muy noble y muy solidario. Gracias por el apoyo en campo y por ser tan excelente ser humano Chore, no hay duda de que llegarás lejos.

A Mariana López Quirasco. Marianita, gracias por ser quien eres, es muy grato compartir el laboratorio contigo. Siempre reímos y me doy cuenta de que eres tremendamente inteligente. Recuerda siempre que la capacidad la tienes, sólo dependes de ti misma.

A los miembros del Laboratorio de Sistemática y Ecología de Hongos Ectomicorrízicos del Instituto de Biología de la UNAM. Por recibirme y hacerme parte de su espacio. Por estimular mis inquietudes académicas y por siempre mantener un diálogo, sin dejar de lado su enorme calidad humana. En particular agradezco a Julieta Álvarez Manjarrez, por ser en un comienzo maestra, luego compañera y

rápidamente mi amiga. Por ser una persona que me dice lo que debo y no lo que quiero oír, eso lo valoro por encima de cualquier cosa. Gracias de corazón por este tiempo que hemos compartido y por todo el tiempo que nos queda por compartir. En mí tienes a un amigo para siempre, no lo dudes nunca.

A los miembros, profesores y alumn@s, del Taller: Diversidad y aspectos ecológicos de hongos saprobios, ectomicorrizógenos y líquenes. Por estudiar a los hongos, por ser auténtic@s y por apasionarse por este grupo de organismos. Siempre anhelé ingresar a "un taller de hongos"... gracias a ustedes por hacer realidad ese deseo.

A mis exalumnos de Biología de Hongos, por hacerme dar lo mejor que tengo académicamente. Espero que en mayor o menor medida les haya transmitido la importancia y la belleza de este grupo. Porque algunos me enseñaron mucho a mí también y porque afortunadamente, más de uno, se ha convertido en un amig@.

A todos mis amig@s, "l@s nuevos" y l@s "de toda la vida", los que están lejos y los que están cerca. A Fernando Nava Márquez, Andrés Prado Lallande y Jimena Martínez Camargo. A Olivia Tabares Mendoza, Angélica Vázquez Cervantes, Claudia Palacios Guerrero, Leilani García Álvarez, Mariela García Ramos, Tania Oseguera Olalde, Fátima García Ibarra, Karen Ramírez Antonio y Tonantzin Sandoval Silva. A Ana Laura Velázquez Cortés (gusano). A Julieta Álvarez Manjarrez, Andrés Argüelles Moyao, Rodolfo Ángeles Argáiz, Laura Rodríguez Bustos, Alejandra Franco Corona y Sofía Gámez Yañez. A tod@s ustedes gracias, por permanecer o por llegar. Por que de uno u otro modo son parte importantísima en mi vida.

A cualquier biológ@ que lea estas líneas. Por hacer lo que les gusta, por dedicarse a estudiar "lo irrelevante, porque al igual que la música, el arte o la literatura, la biología es una aventura para la mente y un alimento para el espíritu" (Curtis, 2000).

Finalmente y en palabras de mi gran amiga Mariela García Ramos:
"a la evolución, por hacer todo esto posible".

*“Las cosas que realmente podemos,
entender con la razón y sentir con el corazón,
son aquellas que somos capaces de ver desde adentro
y desde abajo”.*

Eduardo Galeano

Índice general	
Resumen	13
Abstract	15
I. Introducción	17
II. Marco teórico	18
2.1 Los hongos ectomicorrizógenos (HECM).....	18
2.2 Los hongos saprótrofos (HSAP).....	19
2.3 Grupos funcionales en hongos.....	21
2.4 Aproximaciones para la determinación de grupos funcionales.....	24
2.5 El género <i>Clavulina</i>	27
III. Antecedentes y planteamiento del problema	30
3.1 Descripción y antecedentes del área de estudio.....	30
3.1.1 El Zarco.....	30
3.1.2 El Pantano.....	31
3.2 Planteamiento del problema.....	32
3.3 Justificación.....	33
IV. Objetivos	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos particulares.....	35
V. Hipótesis	35
VI. Métodos	36
6.1 Recolecta y descripción de los basidiomas.....	36
6.1.1 Recolecta y discriminación de individuos.....	36
6.1.2 Registro de datos microambientales.....	37
6.1.3 Descripciones y determinación taxonómica.....	37
6.2 Muestreo y disección de las ectomicorrizas.....	38
6.2.1 Recolecta de núcleos de suelo.....	38

6.2.2 Limpieza de núcleos y obtención de ectomicorrizas.....	39
6.3 Caracterización del suelo en las parcelas de muestreo.....	40
6.4 Análisis de isótopos estables.....	41
6.4.1 Proceso de las muestras pre-análisis.....	41
6.4.2 Obtención de los valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$	41
6.5 Biología molecular.....	42
6.5.1 Extracción de ADN.....	42
6.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los ITS (nrDNA).....	43
6.5.3 Limpieza de productos de PCR.....	43
6.6 Análisis bioinformático.....	44
6.6.1 Edición de secuencias.....	44
6.6.2 Generación de Unidades Moleculares Taxonómicas Operativas.....	44
6.7 Análisis filogenético.....	45
6.8 Análisis estadísticos.....	45
VII. Resultados.....	47
7.1 Recolecta y descripción de los ejemplares.....	47
7.2 Muestreo y disección de las ectomicorrizas.....	47
7.3 Caracterización del suelo en las parcelas de muestreo.....	47
7.4 Biología molecular y análisis bioinformático.....	49
7.4.1 Extracción de ADN, PCR y limpieza de productos.....	49
7.4.2 Edición de secuencias y generación de MOTUs de HECM.....	50
7.5 Taxonomía integrativa de <i>Clavulina</i>	56
7.5.1 Análisis filogenético.....	56
7.5.2 Determinación taxonómica y descripción de las especies de <i>Clavulina</i>	61
7.5.2.1 <i>Clavulina reae</i> Olariaga.....	63
7.5.2.3 <i>Clavulina</i> sp. nov. 1.....	65
7.5.2.3 <i>Clavulina</i> sp. nov. 2.....	66
7.5.2.4 <i>Clavulina</i> sp. nov. 3.....	67
7.6 Disyuntivas ecológicas del género en bosques de <i>Abies religiosa</i>	69
7.6.1 Formación de basidiomas.....	69
7.6.2 Formación de ectomicorrizas.....	70

7.7 Características microambientales durante las recolectas de <i>Clavulina</i>	71
7.8 Ecofisiología isotópica de <i>Clavulina</i> en bosques de <i>Abies religiosa</i>	73
VIII. Discusión	82
IX. Conclusiones	90
X. Perspectivas	91
Referencias	92

Apéndices

I. Listado de especies de hongos ectomicorrizógenos obtenidos en El Zarco y El Pantano.....	104
II. Comunidad de hongos ectomicorrizógenos en El Zarco y El Pantano.....	106
III. Hongos ectomicorrizógenos mencionados por Argüelles-Moyao <i>et al.</i> (2017) y registrados en este trabajo.....	107
IV. Fenología reproductiva de <i>Clavulina</i> de agosto a noviembre de 2015, en bosques de <i>Abies religiosa</i> de El Zarco y El Pantano.....	108
V. Variación morfológica de <i>Clavulina reae</i>	109

Índice de figuras

Figura 3.1. Localización del área de estudio.....	31
Figura 3.2. Especies arbóreas en las parcelas de muestreo.....	32
Figura 6.1. Diagrama de muestreo de las ectomicorrizas.....	39
Figura 6.2. Diagrama de muestreo del suelo.....	40
Figura 7.1. Número de ectomicorrizas por familia taxonómica.....	51
Figura 7.2. Número de especies (MOTUs) por género.....	53
Figura 7.3. Número de ectomicorrizas por género.....	54
Figura 7.4. Curva de Rango-Abundancia de las especies de HECM.....	55
Figura 7.5. Árbol filogenético de las especies de <i>Clavulina</i> en las localidades de estudio....	60

Figura 7.6. Tamaño de las basidiosporas de las especies de <i>Clavulina</i>	62
Figura 7.7. Valor de Q promedio de las basidiosporas de las especies de <i>Clavulina</i>	62
Figura 7.8. Diferencias en el tamaño de las basidiosporas por especie de <i>Clavulina</i>	63
Figura 7.9. <i>Clavulina reae</i> Olariaga.....	64
Figura 7.10. <i>Clavulina</i> sp. nov. 1.....	66
Figura 7.11. <i>Clavulina</i> sp. nov. 2.....	67
Figura 7.12. <i>Clavulina</i> sp. nov. 3.....	68
Figura 7.13. Ejemplares recolectados y biomasa en peso seco por localidad.....	70
Figura 7.14. Variables microambientales asociadas a la producción de basidiomas de <i>Clavulina</i> en bosques de <i>Abies religiosa</i>	73
Figura 7.15. $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de las muestras biológicas.....	76
Figura 7.16. ANOVA de los valores isotópicos promedio de <i>Clavulina</i> por sitio.....	77
Figura 7.17. Valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de <i>Clavulina</i> por especie y de los HECM y HSAP.....	78
Figura 7.18. ANOVA de los valores isotópicos promedio de <i>Clavulina</i> por especie.....	79
Figura 7.19. $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de los basidiomas del género <i>Clavulina</i>	81

Índice de tablas

Tabla 2.1. Trabajos que incluyen análisis de isótopos estables para delimitar grupos funcionales.....	26
Tabla 7.1. Prueba de U de Mann-Whitney del número de ectomicorrizas entre sitios.....	47
Tabla 7.2. Características químicas del suelo de las parcelas de muestreo por sitio.....	48
Tabla 7.3. Prueba de U de Mann-Whitney de las características químicas del suelo entre sitios.....	48
Tabla 7.4. Eficiencia en el procesamiento de la comunidad de HECM por sitio de estudio..	49
Tabla 7.5. Afinidad genética y tamaño de las basidiosporas de los ejemplares de <i>Clavulina</i> con secuencia de ITS.....	57
Tabla 7.6. Número de recolectas y biomasa en peso seco de ejemplares de <i>Clavulina</i>	69
Tabla 7.7. Prueba de U de Mann-Whitney de la frecuencia y biomasa de basidiomas entre sitios.....	70

Tabla 7.8. Ectomicorrizas de especies de <i>Clavulina</i> por sitio.....	71
Tabla 7.9. Prueba de U de Mann-Whitney del número de ectomicorrizas de <i>Clavulina</i> entre sitios.....	71
Tabla 7.10. Datos microambientales para la producción de los basidiomas de <i>Clavulina</i> spp.....	72
Tabla 7.11. Datos microambientales para la producción de los basidiomas de <i>Clavulina reae</i>	72
Tabla 7.12. $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de las muestras biológicas.....	75
Tabla 7.13. Análisis de varianza (ANOVA) del $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ entre las especies de <i>Clavulina</i>	78
Tabla 7.14. Análisis de varianza (ANOVA) del $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de <i>Clavulina</i> por especie, HECM y HSAP.....	79
Tabla 7.15. $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ reportados en la literatura para especies de <i>Clavulina</i>	80

Resumen

Clavulina J. Schröt. (Clavulinaceae, Basidiomycota) es un género de hongos macroscópicos, de formas mayoritariamente clavarioides, el cual está categorizado dentro de los hongos ectomicorrizógenos. Cuenta con 81 especies descritas tanto de ecosistemas templados como tropicales; en los ecosistemas templados, las especies habitualmente reconocidas son: *C. amethystina* (Bull.) Donk, *C. coralloides* (L.) J. Schröt., *C. cinerea* (Bull.) J. Schröt. y *C. rugosa* (Bull.) J. Schröt. El objetivo de este trabajo fue describir la diversidad de especies y aspectos ecofisiológicos del género en dos bosques templados dominados por *Abies religiosa* (Kunth) Schlttdl. & Cham. mediante el estudio de los basidiomas y las ectomicorrizas. Las localidades de estudio, El Zarco y El Pantano, se ubican en la región central de la República Mexicana y forman parte de La Sierra de las Cruces.

El muestreo de los basidiomas de *Clavulina* se realizó de julio a diciembre de 2015 en tres parcelas de 20 × 20 m por localidad. La recolecta de basidiomas se hizo quincenalmente en ambos sitios, mientras que las ectomicorrizas se recolectaron en los meses de octubre y noviembre, utilizando nucleadores de PVC de 30 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro (N= 27 núcleos por sitio). Adicionalmente, se recolectaron todos los basidiomas que se encontraron en los trayectos entre las parcelas en ambos sitios de estudio. Todos los basidiomas de *Clavulina* fueron deshidratados y revisados macro y micromorfológicamente, incluyendo microscopía de alta resolución para determinar las especies con ayuda de claves taxonómicas. Se recolectaron esporomas de hongos saprótrofos (HSAP), hongos ectomicorrizógenos (HECM) así como acículas de árboles hospederos en los dos sitios. Finalmente se recolectaron en el mes de noviembre muestras de suelo utilizando nucleadores de PVC (N= 6 muestras por sitio). De los basidiomas y ectomicorrizas de *Clavulina* se extrajo el ADN, se amplificó la región de los ITS y los productos se secuenciaron en plataforma Sanger. Las secuencias fueron editadas en el programa Geneious y junto con las secuencias disponibles en GenBank se realizó un alineamiento (MUSCLE) en el programa Aliview, el cual fue editado manualmente. Se realizaron análisis de inferencia bayesiana en la plataforma CIPRES usando como grupo externo a *Hydnum repandum* L. Se obtuvieron los valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de basidiomas de *Clavulina* (N= 29), HSAP (N= 4), HECM (N= 4) y acículas (N= 5) por medio de espectrometría de masas. De las muestras de suelo se obtuvieron el C y N totales, P_{disp} y pH.

Los valores promedio de isótopos de *Clavulina*, de los HECM y los HSAP fueron comparados con análisis de varianza de una vía y los parámetros químicos del suelo se compararon entre sitios por medio de pruebas no paramétricas.

En total se recolectaron 112 ejemplares de *Clavulina* entre ambos sitios, 34 en El Zarco y 78 en El Pantano. Se obtuvieron secuencias de 55 basidiomas y 47 ectomicorrizas de *Clavulina*. Los análisis morfológicos y filogenéticos fueron coincidentes y con ellos se delimitaron a *C. reae*, *C. sp. nov. 1*, *C. sp. nov. 2* y *C. sp. nov. 3*. *Clavulina reae* y *C. sp. nov. 3* son taxones cercanos a especies reconocidas en Europa, mientras que *C. sp. nov. 1* y *C. sp. nov. 2* no corresponden a taxones previamente descritos para el género. Morfológicamente, el tamaño de las basidiosporas, la pigmentación de los basidiomas y la presencia de cistidios delimitaron claramente a las cuatro especies. Se registró una mayor producción de basidiomas de *Clavulina* así como de biomasa de los mismos en El pantano en comparación con El Zarco. En lo que respecta a la estructura de la comunidad de HECM, se recolectaron 718 ectomicorrizas y a partir de éstas se recuperaron 274 secuencias útiles. Las 142 secuencias de El Zarco se agruparon en 30 especies y las 132 de El Pantano en 40. Se identificaron un total de 59 especies de HECM entre los dos sitios de estudio, 52 fueron del Phylum Basidiomycota y nueve de Ascomycota. *Clavulina reae* fue la especie más común del género y la dominante en la comunidad de HECM.

En cuanto a los valores isotópicos se encontró que *Clavulina* mostró $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ intermedios entre los HECM y los HSAP y los valores no difirieron entre las especies ni entre los sitios. No obstante, se encontraron diferencias significativas en el $\delta^{15}\text{N}$ de *Clavulina* de ambos sitios junto con los HSAP, en comparación con los HECM ($P < 0.001$); en contraste, también hubo diferencias en el $\delta^{13}\text{C}$ del total de taxones de *Clavulina* de ambos sitios junto con los HECM, respecto a los HSAP ($P < 0.01$). No se hallaron diferencias en los parámetros químicos del suelo entre ambos sitios. El que *Clavulina* sea más parecido al $\delta^{13}\text{C}$ de los HECM consolida la ubicación del género dentro de dicho grupo funcional; sin embargo, el que sea más similar al $\delta^{15}\text{N}$ de los HSAP sugiere su baja eficiencia en la translocación de N a su hospedero. Este trabajo respalda la propuesta de considerar a las especies del género *Clavulina* en futuros proyectos de restauración de bosques de *A. religiosa*, particularmente a *C. reae* al ser la especie dominante de estos sitios de estudio.

Abstract

Clavulina J. Schröt. (Clavulinaceae, Basidiomycota) is a genus of macroscopic fungi, mostly with clavarioid sporocarps, categorized within ectomycorrhizal fungi. It has 81 species described from temperate and tropical ecosystems; in the temperate ones, the most commonly recognized species are: *C. amethystina* (Bull.) Donk, *C. coralloides* (L.) J. Schröt., *C. cinerea* (Bull.) J. Schröt., and *C. rugosa* (Bull.) J. Schröt. The aim of this study was to describe the diversity and ecophysiological aspects of the *Clavulina* genus in two temperate forests of *Abies religiosa* (Kunth) Schtdl. & Cham. through the study of sporocarps and ectomycorrhizae. The study sites, El Zarco and El Pantano, are located in the central region of the Mexican Republic and are part of La Sierra de las Cruces.

Sporocarp sampling was conducted from July to December 2015 in three 20 × 20 m plots per locality. Sporocarp collection was done biweekly at both sites, while ectomycorrhizae were harvested in October and November, using plastic tubes of 30 cm long and 2.5 cm in diameter (N= 27 tubes per site). In addition, all the sporocarps that were found on the transects between the plots in both study sites were collected. All sporocarps were dehydrated and reviewed macro- and micromorphologically, including high resolution microscopy to determine species using taxonomic keys. Saprophytic fungi (SAPF), ectomycorrhizal fungi (ECMF) as well as needles from host trees were collected at both sites. Finally soil samples were collected in November using plastic tubes (N= 6 samples per site). DNA was extracted from the sporocarps and ectomycorrhizae of *Clavulina*, the ITS region was amplified and the products were sequenced by Sanger platform. The sequences were edited in the Geneious program and together with those available in GenBank database, were aligned (MUSCLE) in the Aliview program and edited manually. Bayesian inference analyzes were performed on the CIPRES platform using *Hydnum repandum* L. as an outgroup. The isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of *Clavulina* (N= 29), SAPF (N= 4), ECMF (N= 4) and needles (N= 5) were obtained by means of mass spectrometry. From the soil samples, the total C and N, available P and pH were obtained. The mean isotopic values of *Clavulina*, ECMF and SAPF were compared with one-way analysis of variance and soil chemical parameters were compared between sites by means of non-parametric tests.

A total of 112 *Clavulina* specimens were collected between the two sites, 34 at El Zarco and 78 at El Pantano. Sequences from 55 sporocarp and 47 ectomycorrhizae of *Clavulina* were obtained. Morphological and phylogenetic analyzes were coincident and species were delimited as *C. reae*, *C. sp. nov. 1*, *C. sp. nov. 2*, y *C. sp. nov. 3*. *Clavulina reae* and *C. sp. nov. 3* are close to species which have been described in Europe, while *C. sp. nov. 1* y *C. sp. nov. 2* do not correspond to taxa previously described for the genus. Morphologically, the size of the basidiospores, the pigmentation of the sporocarps and the presence of cystids clearly delimited the four species. There was a significant higher production as well as dry weight of *Clavulina* sporocarps at El Pantano compared to El Zarco. In total, 718 ectomycorrhizae were collected and 274 useful sequences were retrieved from them. The 142 sequences from El Zarco were grouped into 30 species and 132 from El Pantano in 40 species. A total of 59 species of ECMF were identified between the two study sites, 52 belong to Phylum Basidiomycota and nine to Ascomycota. *Clavulina reae* was the most common species of the genus and the dominant species in the ECMF community.

Clavulina showed isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ intermediate between ECMF and SAPF and these values did not differ between species or between sites. However, significant differences were found between $\delta^{15}\text{N}$ values of *Clavulina* and SAPF at both sites, compared to those of ECMF ($P < 0.001$); significant differences were also found between $\delta^{13}\text{C}$ values of *Clavulina* taxa from both sites and these together with ECMF, compared to those of SAPF ($P < 0.01$). No differences were found in the soil chemical parameters between the two sites. The fact that $\delta^{13}\text{C}$ values of *Clavulina* were more similar to those of ECMF than to those of SAPF consolidates the location of *Clavulina* within the ECMF functional group, however, the similarity to SAPF in terms of $\delta^{15}\text{N}$ values suggests the low efficiency of *Clavulina* in N translocation to its host. This work supports the proposal to consider species of the genus *Clavulina* in future restoration projects of *A. religiosa* forests, particularly *C. reae* as it is the dominant species of these study sites.

I. Introducción

El número de especies fúngicas que habitan en la Tierra se ha estimado desde los 2.2–3.8 (Hawksworth y Lücking, 2017) hasta los 5.1 millones de especies (Blackwell, 2011). Debido a las funciones que realizan en procesos como la descomposición de residuos orgánicos, así como a las múltiples simbiosis que establecen con otros organismos, los hongos constituyen un grupo biológico de enorme importancia en todos los ecosistemas terrestres (Dahlberg *et al.*, 2010).

Clavulina J. Schröt. es un género de hongos macroscópicos de la familia Clavulinaceae (Cantharellales, Basidiomycota), que ha sido considerado dentro de los hongos ectomicorrizógenos (Rinaldi *et al.*, 2008; Tedersoo *et al.*, 2010). A nivel global, han sido reconocidas 81 especies para el género, de las cuáles las más reportadas (Richard *et al.*, 2004; Burrola-Aguilar *et al.*, 2013) para ecosistemas templados son: *Clavulina amethystina* (Bull.) Donk, *C. coralloides* (L.) J. Schröt., *C. cinerea* (Bull.) J. Schröt. y *C. rugosa* (Bull.) J. Schröt. Estas especies se caracterizan por desarrollar basidiomas clavarioides, simples o ramificados, de coloraciones brillantes u opacas y tonalidades blancas, grisáceas y hasta púrpureas. Microscópicamente desarrollan por lo general basidios bi-esterigmados, basidiosporas pequeñas (<10 µm de longitud), lisas y hialinas. En ecosistemas templados, la diversidad del género ha sido asociada a un incremento en la tasa de diversificación en el complejo cristata, al cuál pertenecen éstas cuatro especies (Kennedy *et al.*, 2012). Por otro lado, la pertenencia del género de manera estricta al grupo de los hongos ectomicorrizógenos, se ha cuestionado a partir de resultados de estudios con isótopos (Hobbie *et al.*, 2001, 2002).

Dadas las características idiosincráticas de los hongos macroscópicos, en términos de su forma de vida subterránea durante la fase somática y generalmente epigea durante la fase reproductiva, la mayor parte de los estudios de diversidad y ecología de este grupo de organismos, se han basado en la fase más conspicua de su ciclo de vida, los esporomas. Sin embargo, esta fase representa únicamente la culminación de los procesos de reproducción sexual y no integra la complejidad de los procesos biológicos que realizan los hongos. En este trabajo, se evalúa al género *Clavulina* taxonómica y sistemáticamente, para aproximarnos a las historias de vida de las especies del género y a su ecología, a través del análisis de dos fases de su ciclo de vida: los basidiomas y las ectomicorrizas.

II. Marco teórico

2.1 Los hongos ectomicorrizógenos (HECM)

La simbiosis que involucra al micelio de los hongos y a las raíces de las plantas, se denomina micorriza (Frank, 2005). En este caso, solo se hace referencia a las ectomicorrizas, aunque se reconocen al menos siete tipos diferentes de micorrizas de acuerdo con Smith y Read (2008). Los HECM obtienen la mayor parte de su carbono (C) a partir de una interacción biótica con las células vivas de su planta hospedera (Koide *et al.*, 2008; Lindahl y Tunlid, 2015). Esta interacción favorece la obtención por parte de la planta de elementos como el nitrógeno (N), fósforo (P), agua, mayor resistencia al estrés hídrico y la protección de las raíces contra patógenos. En contraparte, el hospedero vegetal le provee de fotosintatos al HECM, conformando así una relación mutualista (Courty *et al.*, 2010; van der Heijden *et al.*, 2015), misma que aumenta el nicho realizado de los simbioses (Peay, 2016).

Morfológicamente, este grupo de hongos se caracteriza por modificar las raíces terciarias de los árboles en sistemas micorrizógenos. En primera instancia, se desarrolla un manto, que envuelve a la raíz de la planta aislándola del contacto directo con su medio; este recubrimiento micelial puede variar en espesor, textura y color (Agerer, 1987-2008). Algunas especies extienden el micelio desde el manto hacia el suelo, lo que conforma el denominado micelio extramatricial, que define diferentes tipos de ectomicorrizas en función de su tipo de exploración micelial, como: de contacto y de exploración a cortas, medianas y largas distancias (Agerer, 2001). Junto con el manto, se desarrollan hifas que penetran y avanzan entre las células corticales de la raíz de la planta, a lo que se llama la red de Hartig. Generalmente, esta red penetra desde la parte superficial de la raíz, se extiende por el córtex y constituye la característica diagnóstica de las ectomicorrizas (Smith y Read, 2008). La relevancia de esta estructura radica en que es en este sitio en el que ocurre el intercambio de nutrimentos entre la planta y el simbionte fúngico (García *et al.*, 2015). El establecimiento de esta interacción, es el resultado de un complejo sistema de comunicación química entre la planta y el hongo, el cual ha sido estudiado a detalle en especies como *Laccaria bicolor*, en la que se han encontrado moléculas como las "Mycorrhizal induced small secreted proteins" (MiSSP), que son imprescindibles para la formación de la ectomicorriza (Plett *et al.*, 2011).

Se han realizado estimaciones del número de especies de hongos que pueden formar ectomicorrizas, las cuales van desde las 5,000–6,000 (Agerer, 2006) hasta 20,000–25,000 especies (Rinaldi *et al.*, 2008). Los HECM se asocian con especies vegetales distribuidas en ecosistemas templados y boreales y en menor medida en regiones tropicales (Courty *et al.*, 2010; Álvarez-Manjarrez, 2014; Böderker *et al.*, 2014; Tedersoo *et al.*, 2014a). De acuerdo con Brundrett (2009), las 6,000 especies de plantas que se sabe que forman asociación ectomicorrizógena, se distribuyen en 146 géneros y 26 familias, entre ellas Betulaceae, Caesalpiniaceae, Dipterocarpaceae, Fagaceae, Myrtaceae, Nothofagaceae, Pinaceae y Salicaceae (Tedersoo *et al.*, 2010). A pesar de que solo cerca del 2 % de las especies de plantas forman este tipo de asociación (Brundrett, 2009), la vegetación que las presenta abarca una gran extensión de la superficie terrestre y por ende repercuten en gran medida en los ciclos biogeoquímicos (Smith *et al.*, 2017).

Los ecosistemas templados suelen tener suelos ácidos, con niveles de pH de 4.0–5.7 y generalmente presentan una estacionalidad en el periodo de lluvias (Read, 1991), mismas que en México se concentran entre los meses de junio y septiembre (CONANP-SEMARNAT, 2006). Así mismo, las especies vegetales que se asocian con los HECM, generalmente producen material orgánico con relaciones C:N altas, en comparación con sistemas en donde predominan otras familias mayoritariamente representadas por angiospermas (Kögel-Knabner, 2002). Es por ello que en ecosistemas templados, es la calidad y no la cantidad de fuentes de N, lo que propicia que este elemento sea el factor limitante para la productividad primaria neta. Se le ha atribuido a los HECM la función de transferir N y P a su hospedero a partir de fuentes minerales (Read, 1991; Smith y Read, 2008). Sin embargo, durante los últimos 30 años se ha puesto en evidencia la capacidad de algunos HECM para realizar una búsqueda activa de N en los residuos orgánicos (Read y Pérez-Moreno, 2003). De acuerdo con Hobbie (2005), la mayoría de los HECM obtienen los nutrientes de la materia orgánica, a partir de fuentes lábiles como aminoazúcares, proteínas y otros compuestos solubles.

2.2 Los hongos saprótrofos (HSAP)

Los HSAP se caracterizan por obtener su carbono metabólico y estructural a partir de la materia orgánica muerta (Osono, 2007; Lindahl y Tunlid, 2015). Es por medio de la actividad de

este grupo de hongos y de algunas bacterias, que ocurre el proceso de descomposición, el cual determina el rumbo de los ciclos biogeoquímicos a escala global (Chapin *et al.*, 2011). Los HSAP, tienen la capacidad de desarrollar estructuras especializadas para la translocación de los nutrientes que asimilan, como lo son los cordones miceliares (Boberg *et al.*, 2014); así mismo los HSAP producen exoenzimas (EEs) que degradan la materia orgánica del suelo (MOS) (Burns *et al.*, 2013). Esta mezcla heterogénea de residuos vegetales, animales y de microorganismos en diferentes estados de oxidación biogeoquímica, denominada MOS (Feng y Simpson, 2011), es un componente presente en la mayoría de los ecosistemas terrestres. Aunque la MOS rara vez supera el 10 % del volumen total del suelo, influye en los procesos de pedogénesis (Brady y Weil, 2008) y su descomposición representa la reintegración de la energía almacenada en su biomasa (Chapin *et al.*, 2011).

Los procesos mediados por la acción de las EEs producidas por los HSAP, involucran la despolimerización de moléculas y cambios estructurales de sus grupos funcionales, la pérdida de masa debido a la liberación de compuestos solubles y la generación de compuestos recalcitrantes (Lindahl y Tunlid, 2015). Algunos de los residuos derivados de la despolimerización de la MOS, se acumulan en el horizonte Oh del suelo, conformando el *humus*, mismo que representa una mezcla heterogénea de moléculas cuya descomposición demanda gran cantidad de energía (Brady y Weil, 2008). Este hecho ha sido puesto en duda recientemente, ya que las moléculas recalcitrantes también pueden ser degradadas desde las primeras etapas de la descomposición (Baldrian, 2008; Lehman y Kleber, 2015).

La mayoría de los hongos, incluyendo a los HECM, son capaces de sintetizar EEs como fosfatasas, β -glucosidasas, lipasas, N-acetilglucosaminidasas y aminopeptidasas (Eichlerová *et al.*, 2015). Además, para los HECM han sido descritas EEs como β -xylosidasas, celobiohidrolasas, glucoronidasas, proteasas e incluso polifenol oxidasas (Baldrian, 2008; Lindahl y Boberg, 2008; Bödeker *et al.*, 2014). Pese a esto, la capacidad enzimática de los HECM es inferior a la de los HSAP (Osono, 2007; Baldrian, 2008). Esto hace que los HSAP sean más eficientes que los HECM en la degradación de sustratos lignificados o con altas concentraciones de residuos ácidos no hidrolizables (Berg, 2014). Estas diferencias son más claras en los primeros estadios de la descomposición, en comparación con los terminales, en donde se plantea que los HECM degradan y asimilan a la MOS, debido a la ventaja que les

confiere el suministro de C por parte de su hospedero (Talbot *et al.*, 2008). Así mismo, la distribución de algunos HECM en los horizontes orgánicos del suelo, en donde prevalecen los denominados residuos recalcitrantes, se asocia a una especialización en esos sustratos que disminuye el efecto de la competencia con los HSAP (Read y Pérez-Moreno, 2003).

Durante la descomposición, se presenta un proceso de sucesión degradativa, en donde los HSAP son los encargados de la despolimerización de moléculas complejas, que causan pudriciones café y blanca en la madera, producto de reacciones enzimáticas de hidrólisis y oxidación, respectivamente (Riley *et al.*, 2014). En este proceso, ocurren transformaciones de la MOS reguladas por la cantidad y calidad de los constituyentes orgánicos en términos de su composición química (Kögel-Knabner, 2002), por la estructura de la comunidad de los descomponedores y por las condiciones ambientales que prevalezcan (Gartner y Cardon, 2004; Chapin *et al.*, 2011).

2.3 Grupos funcionales en hongos

Es a partir de la discrepancia en la fuente primaria del carbono metabólico, que surgen los dos grandes grupos funcionales o formas de vida (Gebauer y Taylor, 1999) descritos anteriormente: los HECM y los HSAP. Esta separación en grupos funcionales probablemente tenga su origen en la descripción misma de las "micorrizas", término acuñado por Frank en 1885, en el cual describe que los HECM deben tomar los nutrientes minerales (y orgánicos) del suelo para transferirlo a sus hospederos (Frank, 2005).

A lo largo del tiempo, esta consideración se ha transformado, ya que en un inicio se planteó que la separación entre ambos grupos era estricta (Hering en 1982, en Rinaldi *et al.*, 2008), sin hacer hincapié en que la capacidad de obtener nutrientes de la materia orgánica, no desaparece al ser suministrada una fuente directa de C (en el caso de los HECM), misma capacidad que incluso es favorecida por la interacción. Lo anterior ha sido planteado como "la hipótesis de los descomponedores coincidentes" (Talbot *et al.*, 2008) o "el modelo de adquisición de nutrientes" (Hupperts *et al.*, 2017). Autores como Henn y Chapela (2001), plantearon a partir del análisis de isótopos estables, la posibilidad de trazar una línea que divida a ambos grupos ("The ECM-SAP divide"). De esta manera, se puede tener una evidencia fisiológica para designar a una especie dentro de alguno de los dos grupos

funcionales. Sin embargo, la separación de estos grupos constituye un tema en discusión (Baldrian, 2009; Lindahl y Tunlid, 2015), dado que en muchos casos existen taxones con valores isotópicos intermedios (Hobbie *et al.*, 2002; Agerer *et al.*, 2012; Tedersoo *et al.*, 2014b). Por esta razón, se ha postulado que la visión estricta de dichos grupos funcionales debe ser descrita en un gradiente de biotrofia-saprotrofia, en función de las especies y de su entorno (Koide *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista evolutivo, el hecho de que los hongos puedan pertenecer a un grupo funcional dado, dependerá de la historia de los linajes (Kohler *et al.*, 2015). La simbiosis ectomicorrizógena ha surgido en múltiples ocasiones en distintos linajes de hongos a partir de un ancestro saprobio; así mismo, también han ocurrido regresiones evolutivas de HECM a HSAP como es el caso del género *Lentaria* (Hibbett *et al.*, 2000; Tedersoo y Smith, 2013). Como resultado, en la actualidad existen taxones filogenéticamente cercanos, con grupos funcionales divergentes (v.g. los géneros *Hebeloma* y *Galerina*, pertenecen a la familia Hymenogastraceae, pero el primero es un HECM y el segundo es un HSAP).

Desde el punto de vista ecológico, también tiene relevancia el estado de salud del ecosistema en donde habiten los hongos, para la determinación de un tipo de actividad saprótrofa o biótropa por parte de los organismos (Lindahl y Boberg, 2008). Por ejemplo, Bödeker *et al.* (2014) han reportado para bosques perturbados la presencia de enzimas peroxidasas clase II, propias de HSAP, expresadas por *Cortinarius glaucopus*, un HECM. Del mismo modo, otros autores han demostrado la actividad saprótrofa en géneros de HECM como *Lactarius* y *Russula* (Rajala *et al.*, 2011), así como para *Tomentella* (Courty *et al.*, 2005). Otra evidencia es el caso de *Tricholoma matsutake*, un HECM que en condiciones *in vitro* tiene la capacidad de sintetizar enzimas hemicelulolíticas, por lo que Vaario *et al.* (2012) han postulado que este hongo habita principalmente como un HECM pero puede alimentarse de manera saprótrofa. Por su parte, Kumla *et al.* (2012, 2015, 2016) han demostrado que *Phlebopus portentosus*, un HECM, puede formar asociaciones ectomicorrizógenas *in vitro* y a su vez crecer y formar basidiomas de manera independiente a un hospedero vegetal. Por su parte, Martos *et al.* (2009) reportan el desarrollo de pelotones de hifas (*in situ*) de *Resinicium* sp. (un HSAP) en las raíces de la orquídea micoheterótrofa *Gastrodia similis*; estos autores también describen la asociación entre los HSAP *Mycena* y *Gymnopus*, con las raíces de la

orquídea *Wulfschlaegelia aphylla*. La presencia de HSAP asociados a orquídeas micoheterótrofas también ha sido reportada *in situ* por Dearnaley y Bougoure (2010), quienes encontraron a especies de HSAP de los géneros *Campanella* y *Marasmius* en las raíces de *Gastrodia sesamoides*, con la capacidad de suministrar C a su hospedero. Vasiliauskas *et al.* (2007) han puesto en evidencia que tal situación puede presentarse también con HSAP xilófagos (*in vitro*) como *Phlebiopsis gigantea*, que al asociarse con raíces de *Picea abies* puede formar ectomicorrizas. Recientemente, en un estudio con más de 200 cepas de HSAP, se descubrió que *Phellinus igniarius* también puede asociarse (*in vitro*) con las raíces de *Picea abies* y desarrollar una red de Hartig (Smith *et al.*, 2017). Por lo anterior, resulta evidente que la separación entre estos dos grupos funcionales, HECM y HSAP, no es estricta. Así mismo, las clasificaciones de estos grupos a nivel de género y no de especies, pueden conducir a generalizaciones erróneas. Un ejemplo es el caso de *Amanita thiersii*, especie saprótrofa (Wolfe *et al.*, 2010), que pertenece a un género de HECM de acuerdo a Rinaldi *et al.* (2008) y Tedersoo *et al.* (2010).

A partir de los problemas conceptuales previamente referidos, han sido separados dos conceptos: los organismos descomponedores y los saprobios facultativos (Lindahl y Tunlid, 2015) en los que se pueden involucrar a los HECM. Los organismos descomponedores son aquellos que pueden despolimerizar a la materia orgánica en moléculas más pequeñas; estas transformaciones pueden llevar a una pérdida de masa debido a una liberación de compuestos solubles (*ibidem*). En contraste, los saprobios facultativos son aquellos HECM que ante un déficit en la obtención de C por parte de su hospedero, pueden acceder a los nutrientes de la MOS a través de la secreción de EEs. Dicho de esta forma, este último concepto hace referencia a una actividad funcional degradativa por parte de los HECM, ante alteraciones en la simbiosis con su hospedero, es decir, “la hipótesis del plan B” (Talbot *et al.*, 2008) o “el modelo de saprotrofia” (Hupperts *et al.*, 2017). No obstante, autores como Osono (2007) y Baldrian (2009), hacen hincapié en que el calificar a los HECM como saprobios facultativos carece de sustento, ya que el que haya una expresión de genes de actividad enzimática, no implica que se estén degradando las moléculas complejas de la MOS.

2.4 Aproximaciones para la determinación de grupos funcionales

En el caso particular de los grupos funcionales en hongos, existen distintas formas para determinar la pertenencia de una especie a un gremio determinado. De acuerdo con Mayor *et al.* (2009) estas son: 1) el sustrato en donde se encuentren desarrollándose los esporomas (para los HSAP); 2) la co-ocurrencia exclusiva de los esporomas con los hospederos (para los HECM); 3) la distancia filogenética de los grupos a estudiar con otros previamente asignados a un grupo funcional (para los HECM y los HSAP); 4) el rastreo del micelio directamente debajo de los esporomas y hasta las raíces de los hospederos (para los HECM); 5) la comparación molecular de los esporomas con las raíces ectomicorrizadas (para los HECM); y 6) la obtención de valores de isótopos de C y N para determinar el modo de nutrición (para los HECM y los HSAP). A estas seis vías, se añaden estudios como el cultivo *in vitro* del hongo de interés en medios con diferentes fuentes de carbono y la identificación de genes funcionales (Wolfe *et al.*, 2012). Todas estas aproximaciones tienen diferentes problemáticas asociadas a la interpretación de las observaciones (Mayor *et al.*, 2009); sin embargo, el uso combinado de dos o más de estos métodos, sustenta de mejor manera la ubicación de los taxones en un grupo funcional dado.

Uno de los métodos que ha cobrado mayor relevancia en las últimas dos décadas es el uso de isótopos estables. Su fundamento es el de verificar si el flujo de macroelementos constitutivos como lo son el C y el N, es proveniente de la materia orgánica o de un potencial hospedero ectomicorrizógeno hacia sus hongos asociados. Los isótopos son variantes de un mismo elemento con masas atómicas únicas, dadas por las diferencias en el número de neutrones que tenga cada uno; por su parte, los isótopos estables de un elemento dado serán aquellos que no atraviesan por un periodo de decaimiento radiactivo (West *et al.*, 2006).

Cuando se someten muestras biológicas a análisis de isótopos estables, se obtiene un valor isotópico de un elemento en particular, generalmente C y N para el caso de los hongos, aunque recientemente se ha incluido al Mg (Fahad *et al.*, 2016). Dicho valor isotópico representa un cociente que involucra la proporción de la forma isotópica común de un elemento y la forma isotópica menos abundante o rara y se expresa con el símbolo delta " δ " (West *et al.*, 2006). En general, se sabe que los HECM se encuentran enriquecidos en ^{15}N y disminuidos en ^{13}C en comparación con los HSAP (Mayor *et al.*, 2009; Hasselquist *et al.*, 2011;

Agerer *et al.*, 2012; Reha y Southworth, 2015). Este patrón diferencial entre ambos grupos funcionales ha sido explicado como una discriminación en contra del isótopo pesado durante la transferencia de N desde el HECM hacia su hospedero, lo que deja como resultado un enriquecimiento en el micelio del isótopo pesado del N. Para el caso del C, se asocia el enriquecimiento en los HSAP a la asimilación de este elemento a partir de la MOS, la cuál está enriquecida en ^{13}C debido a la descomposición. Al fenómeno de discriminación, a favor o en contra del isótopo pesado (en este caso ^{13}C o ^{15}N), se le denomina fraccionamiento isotópico (Dawson *et al.*, 2002; Taylor y Fransson, 2007).

Los valores isotópicos de los hongos constituyen una evidencia independiente, que al ser combinada con otras técnicas (v.g. moleculares y/o filogenéticas), proveen de evidencias robustas de la pertenencia de una especie a un grupo funcional (Mayor *et al.*, 2009). Trabajos que a partir de análisis isotópicos combinados con otras técnicas, han logrado ubicar a diversos taxones dentro de la categoría de los HECM o de los HSAP se indican en la tabla 2.1.

Para el caso particular de *Clavulina*, trabajos como los de Hobbie *et al.* (2001, 2002) han mostrado $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{14}\text{C}$ intermedios entre HECM y HSAP, lo cual indica que podría tener cierto grado de actividad saprótrofa que no ha sido puesto a prueba hasta el momento. Mayor *et al.* (2009) indican que este género tiene una probabilidad superior al 90 % de ser HECM, sin llegar a ser definitiva la evidencia al respecto. Estos resultados no concluyentes, a partir de análisis de isótopos estables, también han sido obtenidos para especies de *Odontia*, pese a que este género está propuesto como grupo hermano de *Tomentella* y *Thelephora*, los cuáles son HECM (Tedersoo *et al.*, 2014b). Si bien, los isótopos estables son un indicador de la transferencia de C y N entre dos almacenes de materia y energía, en este caso MOS u hospederos y hongos, en realidad, no indican una actividad degradativa intensa ni una mineralización de la MOS por parte de los HECM, ya que no detectan cuál es la fuente de la cual surgieron esos macroelementos (v.g. de compuestos lábiles o recalcitrantes) ni los mecanismos empleados para acceder a los mismos.

Tabla 2.1. Trabajos que incluyen isótopos estables para delimitar grupos funcionales.

Taxón	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	GF	Hospederos	Análisis complementarios	Referencia
<i>Calostoma cinnabarinum</i>	12.6 (± 0.3)	-23.1 (± 0.2)	HECM	<i>Quercus</i> spp.	Morfotipos de micorrizas, secuencias de esporomas para identificación y filogenia	Wilson et al. 2007
Boletaceae	8.8 (± 0.6)	-26.1 (± 0.1)	HECM	<i>Caesalpinia gaumeri</i> , <i>Coccoloba diversifolia</i> , <i>Esenbeckia pentaphylla</i> , <i>Lonchocarpus castilloi</i> , <i>Lysiloma latisiliquum</i> y <i>Vitex gaumeri</i>	Secuencias de esporomas para identificación	Hasselquist et al. 2011
Hygrophoraceae	5.1– 17.0	(-29.5)– (-23.3)	HECM	<i>Acer</i> spp., <i>Fagus</i> spp., <i>Larix laricina</i> , <i>Pinus strobus</i> , <i>Sphagnum</i> sp., <i>Tsuga canadensis</i> y <i>Vaccinium</i> spp.	Secuencias de esporomas para identificación y filogenia	Seitzman et al. 2011
<i>Ramaria</i> subgénero <i>Lentoramaria</i>	(-2.3)– (-6.8)	(-24.6)– (-20.7)	HSAP	<i>Acer</i> , <i>Betula</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Cupressus</i> , <i>Fagus</i> , <i>Juniperus</i> , <i>Larix</i> , <i>Laurus</i> , <i>Picea</i> , <i>Pinus</i> , <i>Quercus</i> y <i>Rhododendron</i>	Ninguno	Agerer et al. 2012
<i>Amanita thiersii</i>	7.8– 13.6	(-15.2)– (-10.8)	HSAP	<i>Andropogon gerardii</i> , <i>Elymus canadensis</i> , <i>Koeleria cristata</i> y <i>Panicum virgatum</i>	Cultivo, secuenciación del transcriptoma, análisis de diversidad genética, expansión del área de distribución	Wolfe et al. 2012
<i>Odontia</i> spp.	(-3.2)– (-0.8)	(-29.3)– (-24.5)	NO HECM	<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Quercus robur</i> y <i>Tilia cordata</i>	Bioensayos, secuencias de esporomas y micorrizas para identificación y filogenia	Tedersoo et al. 2014b**
<i>Schenella pityophilus</i>	-2.0 (± 1.8)	-22.3 (± 0.5)	HSAP	<i>Pinus ponderosa</i> , <i>P. jeffreyi</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i> , <i>Quercus garryana</i> y <i>Q. kelloggii</i>	Ninguno	Reha y Southworth, 2015
<i>Sedecula pulvinata</i>	2.5 (± 2)	-20.7 (± 0.8)	HSAP	No referido	Secuencias de esporomas para identificación y filogenia	Trappe et al. 2015
<i>Phlebopus portentosus</i>	5.5 (± 1.4)	-24.9 (± 1)	HECM	<i>Barringtonia acutangula</i> , <i>Dimocarpus longan</i> , <i>Elaeocarpus hygrophilus</i> , <i>Mangifera indica</i> , <i>Quercus</i> sp. y <i>Syzygium cumini</i>	Cultivo, bioensayos, morfotipos de micorrizas, secuencias de esporomas para identificación	Kumla et al. 2016

$\delta^{15}\text{N}$ = isótopo pesado de nitrógeno, $\delta^{13}\text{C}$ = isótopo pesado de carbono. \pm = error estándar. GF = grupo funcional, HECM= hongo ectomicorrizógeno, HSAP: hongo saprófito. **Este autor no indica que *Odontia* spp. son HSAP, solo que no son HECM.

2.5 El género *Clavulina*

Clavulina J. Schröt. pertenece a la familia Clavulinaceae (Donk, 1964), orden Cantharellales (Agaricomycotina, Basidiomycota) (Kirk *et al.*, 2008). Sus estructuras de reproducción sexual (basidiomas) son mayoritariamente cilíndricas, simples o con ramificaciones, de coloraciones variadas, brillantes u opacas. Sus basidiosporas son lisas, generalmente menores a 10 µm de longitud, globosas a ligeramente ovaladas. Los basidios son cilíndricos, ligeramente más anchos hacia los ápices y presentan fíbula basal; generalmente con dos esterigmas recurvados, de 4–8 µm de longitud. El sistema hifal es monomítico, con hifas septadas, fibuladas, hialinas; el subhimenio es angosto, con hifas de 4–10 µm de grosor (Corner, 1950; Petersen, 1988; Olariaga *et al.*, 2009). A la fecha se reconocen 81 especies del género (www.indexfungorum.org); sin embargo, si se consideran las subespecies, variedades y formas reportadas en las bases de datos, este número asciende a 120. Sus taxones están descritos para regiones templadas y tropicales, y son particularmente diversos en las últimas, donde actualmente se han descrito un gran número de especies nuevas con morfología muy variable (Uehling *et al.*, 2012), que incluye formas cerebriformes (*C. cerebriformis*), resupinadas (*C. cinereoglebosa*), efuso-coraloides (*C. effusa*) y cantarelloides (*C. craterelloides*). Tibpromma *et al.* (2017) describieron recientemente tres especies nuevas para regiones tropicales de Brasil (*Clavulina grisea*, *C. ossea* y *C. paraincrustata*).

En años recientes, los análisis moleculares para la determinación de taxones han permitido descubrir una gran diversidad de especies que por medio de la taxonomía clásica no había sido posible diferenciar. En particular, para los hongos la región espaciadora interna transcrita del ribosoma nuclear (ITS) ha sido ampliamente utilizada, dado que presenta un nivel de variabilidad que permite reconocer diferencias entre especies para la mayoría de los grupos. Es por esto que la región ITS constituye el código de barras genético para hongos (Schoch *et al.*, 2012).

En un trabajo realizado a partir de ejemplares de herbario de regiones templadas de Europa para el género *Clavulina*, se encontró que de las cuatro especies de mayor distribución en zonas templadas, es decir *Clavulina amethystina*, *C. cinerea*, *C. coralloides* (= *C. cristata*) y *C. rugosa* y que también se han reconocido en Norteamérica (Moncalvo *et al.*, 2006), únicamente se encuentran bien soportados los clados de *C. coralloides* y *C. rugosa*, mientras

que *C. cinerea* y *C. amethystina* no tienen valores de soporte altos; estas dos últimas especies se encuentran en al menos dos clados independientes cada una (Olariaga *et al.*, 2009). Aunado a estos resultados, Kennedy *et al.* (2012) estimaron que las cuatro especies mencionadas se ubican en un clado que tiene una tasa de especiación 2.6 veces mayor que la del resto de los clados del género, por lo que representan en realidad un complejo de especies (“complejo cristata”). Pese a su utilidad, la región ITS debe ser complementada con otros marcadores moleculares para obtener filogenias más robustas. La región de la ARN polimerasa II dependiente de ADN (RPB2) (Liu *et al.*, 1999), también ha sido utilizada como marcador complementario para el género *Clavulina* (Uehling *et al.*, 2012), aunque su representación en las bases de datos aún es muy baja.

En cuanto a la morfología de los basidiomas, Corner (1950) enfatiza que para el género *Clavulina*, al ser tan similares, su caracterización y clasificación resulta compleja, por lo que son necesarias descripciones detalladas de la macro y micromorfología. Un problema adicional para las especies templadas, es la ausencia de ejemplares de herbario tipo (Olariaga *et al.*, 2009). Una aproximación interesante para delimitar la identidad de las especies de *Clavulina* es desde la taxonomía integrativa (Dayrat, 2005), la cual permite conjuntar y aprovechar distintos atributos de las historias de vida de los organismos (por ejemplo caracteres moleculares, morfológicos, ecológicos y biogeográficos), obtenidos a partir de distintos campos de estudio complementarios, para generar un consenso en la identidad de las especies (Schlick-Steiner *et al.*, 2010). Si bien el concepto de taxonomía integrativa ha sido controversial (ver Valdecasas *et al.*, 2008), la idea de conjuntar distintos atributos de las especies cuya resolución taxonómica es compleja, resulta una opción idónea. Aunado a esto, son pocos los estudios de este tipo que se han empleado para el caso de hongos (ver Moyersoen y Weiß, 2014; Zamora *et al.*, 2015). El trabajo de Zamora *et al.* (2015) constituye además, uno de los pocos trabajos que busca incluir análisis estadísticos aplicados a caracteres taxonómicos, los cuales suelen ser reportados como intervalos. Esto resulta relevante para *Clavulina*, ya que algunas dificultades en la delimitación de las especies, derivan de que los intervalos del largo y ancho de las basidiosporas, reportados comúnmente, se traslapan (ver Corner 1950, Christiansen, 1967, Hansen y Knudsen, 1997 y Olariaga *et al.*,

2009), lo que hace que estos caracteres, tan frecuentemente utilizados en la discriminación entre especies sumamente similares sea ambigua.

El trabajo que aquí se presenta, busca integrar la dinámica de la producción de basidiomas de *Clavulina*, la diversidad morfológica de los mismos, la ecofisiología de los taxones a partir de análisis de isótopos estables, así como las interacciones con las plantas hospederas, en un solo análisis. De esta manera, a partir de distintas herramientas sumadas en una sólo metodología, se busca definir a las especies del género *Clavulina* que se distribuyen en bosques templados de *Abies religiosa*, así como sus funciones ecológicas, haciendo uso de las secuencias de la región ITS de las ectomicorrizas y de los basidiomas.

III. Antecedentes y planteamiento del problema

3.1 Descripción y antecedentes del área de estudio

Las localidades de estudio denominadas El Zarco y El Pantano (Fig. 3.1) se ubican en la región central de la República Mexicana. En particular, forman parte de la Sierra de las Cruces, ubicada entre las cuencas de México y Toluca y a su vez están inmersas dentro de la región este de la Faja Volcánica Transmexicana. De acuerdo con García-Palomo *et al.* (2008), esta Sierra cuenta con una elevación máxima de 3,800 m y tiene una extensión de 110 km, misma que se subdivide en tres grandes bloques: norte, centro y sur. La Sierra de Las Cruces está conformada por ocho estratovolcanes y el área de estudio se ubica en la zona de transición del bloque sur y centro, entre los volcanes San Miguel y Salazar, que se caracterizan por estar orientados en un eje norte-sur. Los suelos del sitio son de origen volcánico y están clasificados como andosoles, los cuáles tienen una buena retención de agua dadas sus propiedades mineralógicas, por lo que permanecen húmedos la mayor parte del año, además de que los niveles de pH de la solución del suelo son ligeramente ácidos. El clima de la región es templado sub-húmedo con lluvias en verano (Cw), con precipitaciones concentradas entre junio y septiembre (CONANP-SEMARNAT, 2006). Los sitios de muestreo señalados en la figura 3.1 corresponden a los puntos en donde se registraron la mayor cantidad de ectomicorrizas y basidiomas de *Clavulina* en estudios previos realizados por Argüelles-Moyao (2013) y Pérez-Pazos (2014), respectivamente.

3.1.1 El Zarco

Se ubica en el Municipio de San Pedro Atlapulco, Estado de México, dentro del Parque Nacional Insurgente Miguel Hidalgo y Costilla (PNIMHC), mismo que cuenta con una superficie de 1,890 ha. La vegetación dominante corresponde a un bosque puro de oyamel [*Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham]. Otros árboles hospederos de HECM que se distribuyen en el sitio con menor abundancia son *Alnus jorullensis* Kunth y *Salix paradoxa* Kunth. Para los sitios de El Zarco se cuenta con análisis de suelos, que han sido descritos con valores de pH de 5.5–6.2, porcentajes de carbono orgánico (% C) de 6.2–10.4, porcentaje de nitrógeno total (% N) de 0.4–0.6 y fósforo disponible (P_{disp}) de 0.3–1.7 mg/kg, de acuerdo con Argüelles-Moyao (2013).

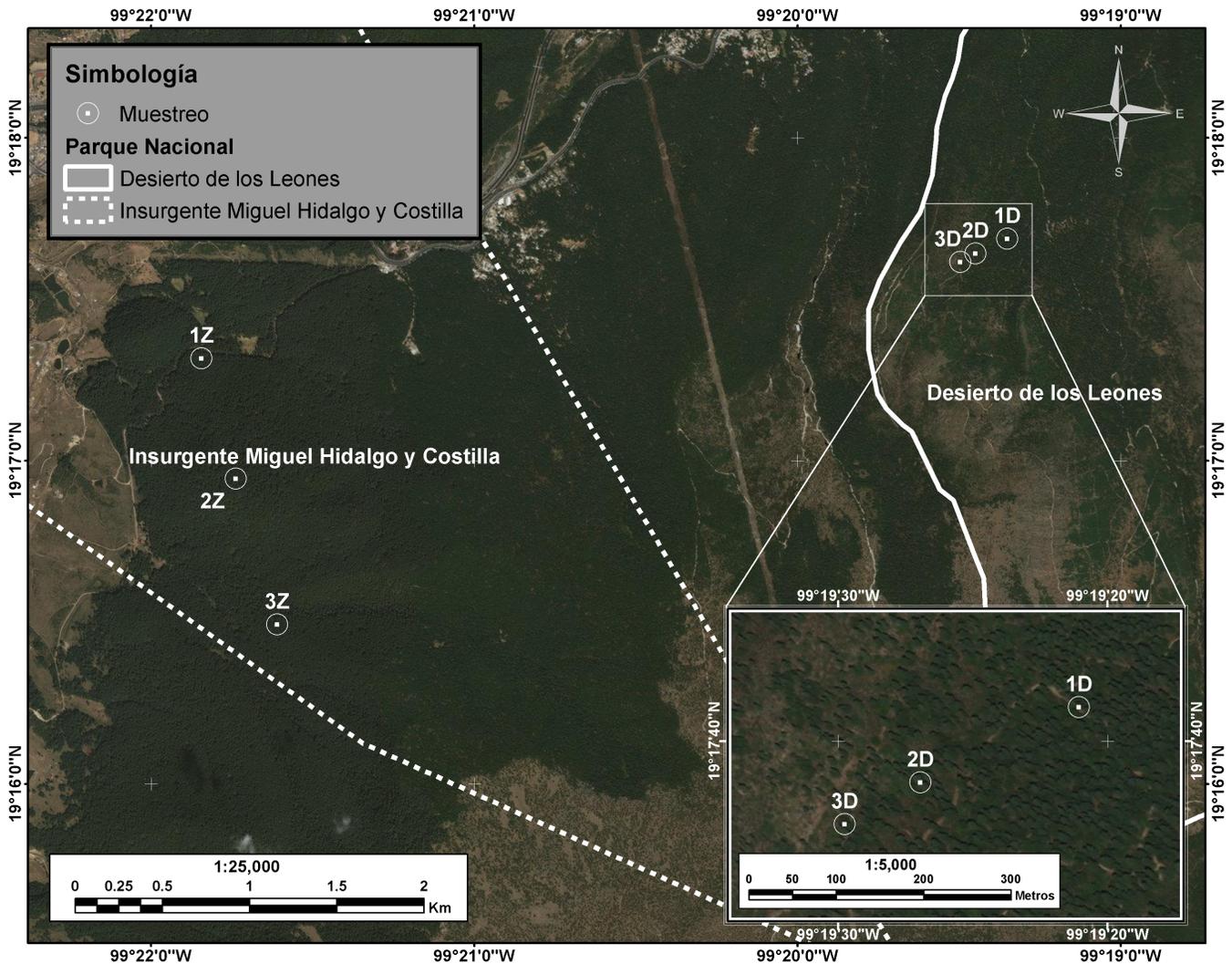


Figura 3.1. Localización del área de estudio. Los puntos 1Z, 2Z y 3Z se localizan en El Zarco, San Pedro Atlapulco, Estado de México. Los puntos 1D, 2D y 3D se localizan en El Pantano, Álvaro Obregón-Cuajimalpa, CDMX. Los polígonos de los Parques Nacionales se obtuvieron a partir de la página de la CONANP y el mapa se realizó en el programa ARCGIS.

3.1.2 El Pantano

El Centro de Administración, Vigilancia y Monitoreo Ecológico El Pantano (en lo sucesivo denominado como El Pantano) se encuentra dentro del Parque Nacional Desierto de Los Leones (PNDL), que se localiza al suroeste de la cuenca de México y cuenta con una superficie de 1,529 ha y una elevación media de 3,500 m (CONANP-SEMARNAT, 2006). La vegetación está representada en su mayoría por bosques de oyamel (*Abies religiosa*), pino (*Pinus hartwegii* Lindl.) y encinos (*Quercus* spp.). También se encuentran otras especies arbóreas

como: *Cupressus lusitanica* Mill., *Prunus serotina* ssp. *capuli* (Cav.) McVaugh, *Buddleia cordata* Kunth y *Salix cana* M. Martens & Galeotti (Pérez-Pazos, 2014). Para el PNDL, Tovar y Valenzuela (2006) reportan 102 especies de hongos, pertenecientes a los Phyla Basidiomycota y Ascomycota. Pese a que ambas localidades tienen dominancia de *Abies religiosa* en el estrato arbóreo, en las parcelas de muestreo de El Pantano también se encuentran individuos de *Pinus* sp., especie hospedera de HECM (Fig. 3.2). Estos individuos fueron introducidos como parte de reforestaciones realizadas por las autoridades del PNDL.

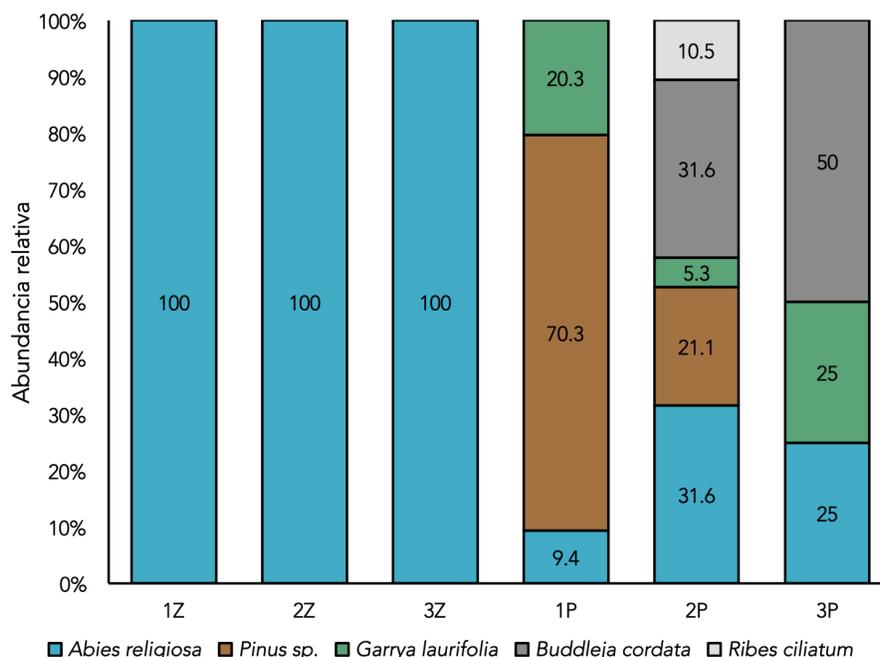


Figura 3.2. Especies arbóreas en las parcelas de muestreo. Las parcelas 1Z (N= 17), 2Z (N= 19) y 3Z (N= 9) se localizan en El Zarco y las parcelas 1P (N= 64), 2P (N= 19), 3P (N= 12) se localizan en El Pantano. Los valores por especie representan abundancias relativas en porcentajes. Datos tomados de Choreño-Parra (2018).

3.2 Planteamiento del problema

Una de las características más relevantes a considerar es el estado de salud de los bosques en ambas localidades. El Zarco constituye una propiedad comunal, por lo que el uso y manejo de los recursos del bosque está directamente regido por los propietarios de la comunidad de San Pedro Atlapulco quienes han mantenido un estado óptimo de conservación del bosque (Argüelles-Moyao, 2013). Por su parte, El Pantano, es un sitio perturbado debido principalmente a tres factores (Pérez-Pazos, 2014): 1) la cercanía con el Valle de México, que ha

provocado el decaimiento crónico de los árboles del sitio, asociado a las emisiones de ozono provenientes de la Ciudad de México (Cibrián, 1989; González-Medina *et al.*, 2010); 2) un incendio ocurrido en 1998 que afectó gran parte de la extensión del parque y que desencadenó un proceso de sucesión secundaria, y 3) el incremento de las poblaciones de insectos descortezadores, lo cual se vio favorecido por los dos eventos de disturbio previamente descritos y continúa afectando al arbolado del sitio. Si bien, de acuerdo con Trumbore *et al.* (2015), un ecosistema forestal sano, es aquél que abarca un mosaico de parches de sucesión que representan todas las etapas de disturbio y resiliencia dentro del área de distribución natural, este sitio se caracteriza por el decaimiento crónico de su vegetación desde hace al menos 28 años (Cibrián, 1989).

En un estudio previo en El Pantano, se registró la presencia frecuente y abundante de los basidiomas de *Clavulina coralloides* (= *C. cristata*) y *C. cinerea*, que se desarrollaban sobre restos leñosos en proceso de descomposición (Pérez-Pazos, 2014). Por su parte, Argüelles-Moyao *et al.* (2017) en un estudio sobre comunidades de ectomicorrizas en El Zarco, registraron a *C. cf. cinerea* como la especie de HECM más abundante; así mismo, recolectaron basidiomas de *C. coralloides*, *C. aff. cinerea* y *C. rugosa* en proporción muy baja en comparación con los datos reportados para El Pantano (Argüelles-Moyao, *com. pers.*). Es importante destacar que especies como *C. coralloides*, son más abundantes y metabólicamente más activas en suelos adelgazados, además de ser tolerantes a la sequía y a suelos con bajos niveles de potencial hídrico (Buée *et al.*, 2005). Es por lo anterior, que planteamos que debido al mal estado del arbolado en El Pantano (González-Medina *et al.*, 2010), las especies de *Clavulina* podrían representar a HECM con capacidad saprótropa, debido a un déficit en el suministro de C por parte de sus hospederos, de acuerdo con “la hipótesis del plan B” (Talbot *et al.*, 2008), mismo que se vería reflejado en los valores isotópicos de los basidiomas.

3.3 Justificación

En distintos trabajos realizados en la Faja Volcánica Transmexicana se ha reportado frecuentemente la presencia de basidiomas del género *Clavulina*; sin embargo, la identidad a nivel de especie no ha sido estudiada a profundidad. La relevancia del linaje *Clavulina*-

Membranomyces ha sido resaltada recientemente por Argüelles-Moyao *et al.* (2017) en comunidades de HECM neotropicales, particularmente en bosques templados de *Abies religiosa* (*ibidem*), *Alnus* (Kennedy *et al.*, 2011) y *Quercus crassifolia* (Morris *et al.*, 2008) del centro del país. Por lo anterior, el análisis de la diversidad y funciones ecológicas de las especies de *Clavulina* en bosques de *Abies religiosa*, una especie endémica de México y severamente amenazada por procesos de cambio climático (Sáenz-Romero *et al.*, 2012), constituirá un avance relevante en el conocimiento de este género, cuyas especies eventualmente deben ser consideradas en programas de restauración.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Describir la diversidad de especies y aspectos ecofisiológicos del género *Clavulina* mediante el estudio de sus basidiomas y ectomicorrizas, en dos bosques templados de *Abies religiosa* colindantes, cuyo estado de conservación es contrastante.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar las especies de los basidiomas recolectados del género *Clavulina* en El Pantano y en El Zarco y comparar las secuencias de ADN de estos y de las ectomicorrizas obtenidas en ambos sitios para saber si constituyen los mismos taxones.
2. Identificar si existen diferencias en la abundancia de basidiomas y de ectomicorrizas de *Clavulina* entre El Pantano y El Zarco.
3. Analizar y comparar los valores isotópicos de ^{13}C y ^{15}N de árboles hospederos, restos leñosos y basidiomas de *Clavulina*, para conocer las funciones ecológicas de las especies del género.

V. Hipótesis

Dada la cercanía espacial de ambos sitios de estudio, se espera que los taxones registrados en ambas localidades correspondan a las mismas especies. Sin embargo, dado que la densidad de árboles hospederos de *Clavulina* está disminuida y en condiciones deterioradas en El Pantano, se espera que la abundancia de ectomicorrizas de este género sea menor que la registrada en El Zarco.

Si las especies de *Clavulina* recolectadas en El Pantano, obtienen energía de los residuos leñosos en donde desarrollan sus basidiomas, entonces se espera que muestren $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ disminuidos y enriquecidos, respectivamente, al compararlos con los valores para las especies recolectadas en El Zarco.

VI. Métodos

6.1. Recolecta y descripción de los basidiomas

6.1.1. Recolecta y discriminación de individuos

El muestreo se realizó en tres parcelas de 20 × 20 m por localidad, es decir tres en El Pantano y tres en El Zarco (Fig. 3.1). La selección de las parcelas de muestreo se basó en estudios previos realizados en El Pantano (Pérez-Pazos, 2014) y en El Zarco (Argüelles-Moyao, 2013), en donde se registró la mayor cantidad de basidiomas (parcelas 5, 9 y 11 de Pérez-Pazos, 2014) y de ectomicorrizas (parcelas 1, 5 y 9 de Argüelles-Moyao, 2013) del género *Clavulina*, respectivamente. La recolecta de basidiomas se hizo quincenalmente en ambos sitios; cada parcela fue visitada en total nueve veces entre agosto y noviembre de 2015 y se realizó un censo de los basidiomas presentes en cada una de ellas. Adicionalmente, se recolectaron todos los basidiomas que se encontraron en los trayectos entre las parcelas en ambos sitios de estudio y se registraron sus coordenadas geográficas con un GPS (Garmin).

Únicamente se recolectaron los basidiomas de más de 1 cm de altura, dado que ejemplares por debajo de esa talla, por lo general, no han desarrollado un himenio maduro y su identidad taxonómica con base en los caracteres macro y microscópicos no puede ser resuelta si no se tienen los datos de los tamaños de las basidiosporas, basidios, pigmentación de los basidiomas en diferentes estadios de desarrollo, así como la forma de los ápices de los basidiomas (Corner, 1950, 1970; Olariaga *et al.*, 2009). Los ejemplares maduros fueron recolectados en contenedores plásticos para su posterior determinación taxonómica. Cada espécimen fue considerado como un individuo independiente, al tomar como criterio de separación que la distancia entre basidiomas o parches de basidiomas fuera superior a 1 m (Ramírez-López, 2011; Pérez-Pazos, 2014). Esto obedece a que el hábito de crecimiento de *Clavulina* es generalmente gregario, es decir, que sus basidiomas crecen a menos de 30 cm de separación entre sí (Delgado *et al.*, 2005). Si bien el criterio de hábito de crecimiento no necesariamente representa a individuos genéticamente distintos (genetos), no existen trabajos que indiquen los tamaños de genetos que en promedio pueden tener los miembros de este género. Por cada basidioma o parche de basidiomas recolectados se registró el tamaño del individuo (largo y ancho en cm) y número de basidiomas por parche o espécimen.

6.1.2 Registro de datos microambientales

Se registraron datos ambientales en cada sitio de recolecta: temperatura del suelo a 5 cm de profundidad (°C), contenido de agua del suelo a 5 cm de profundidad (m^3/m^3), humedad relativa del aire (%) e intensidad de luz superficial (W/m^2), con la ayuda de sensores ambientales (HOBO Micro station Data Logger-H21-002). Los sensores fueron calibrados para detectar las variables ambientales cada minuto. También se registró en cada muestreo el tipo de sustrato en el que crecía cada ejemplar (terricola, húmica y/o lignícola) y el hábito de crecimiento de acuerdo a lo mencionado por Delgado *et al.* (2005).

6.1.3 Descripciones y determinación taxonómica

Se tomó un registro fotográfico por espécimen y se describieron los caracteres precederos de los basidiomas, como son: tamaño, forma del estípote, patrón de ramificación, forma de las axilas, tipos de ápices, textura de la superficie, consistencia, olor, sabor y color. Se utilizaron los caracteres y terminología descrita por Corner (1950) y Petersen (1988) para hongos clavarioides. Para describir los colores de los basidiomas se utilizó la clave de Methven (Wanscher y Kornerup, 1991). Los basidiomas descritos fueron colocados en bolsas de papel estraza y deshidratados durante siete días en una cámara de ambientes controlados a 37 °C en la Facultad de Ciencias, UNAM. Todos los especímenes recolectados dentro de las parcelas de muestreo fueron pesados en una balanza analítica para obtener su biomasa en peso seco.

Los ejemplares recolectados fueron separados por morfoespecies, con base en las descripciones de los materiales en fresco y en las fotografías de los mismos. Adicionalmente, se revisaron nueve ejemplares recolectados por Argüelles-Moyao en El Zarco (de 2011 a 2014) y 11 recolectados por Pérez-Pazos en El Pantano (de 2012 a 2013), que se encontraban depositados en el Herbario FCME. Todos los ejemplares se revisaron microscópicamente, a partir de muestras del himenio (generalmente de la región media de las ramas, evitando tomar de las regiones apicales o basales de los basidiomas, ya que suelen ser estériles). Las preparaciones se realizaron con hidróxido de potasio (KOH) al 10 %. De cada ejemplar se obtuvieron las medidas ($N= 30$) en micrómetros (μm) de: basidiosporas (largo \times ancho), valor de Q (largo/ancho de la basidiospora), basidios (largo \times ancho en la región apical), esterigmas (largo) e hifas del subhimenio (ancho). Las basidiosporas fueron medidas en vista lateral sin

incluir el apéndice hilar; se midieron los basidios maduros desde la base y hasta el ápice sin considerar a los esterigmas. La nomenclatura para describir los caracteres microscópicos es: Lm= Largo promedio de la basidiospora, Am= Ancho promedio de la basidiospora, \bar{Q} = Largo promedio/ancho promedio de la basidiospora. Los valores extremos de cada intervalo aparecen entre paréntesis. La medición de todas las estructuras microscópicas se realizó a un aumento de 1000X. La obtención de los datos microscópicos se realizó a través de una cámara digital de 2 megapíxeles (Olympus DP21) acoplada a un microscopio óptico (Olympus BX51). La determinación taxonómica de los ejemplares, se basó en el trabajo monográfico de Corner (1950) y en las claves de Petersen (ined.), Christiansen (1967), Hansen y Knudsen (1997) y Olariaga *et al.* (2009). Todos los especímenes se depositaron en la colección de hongos del Herbario FCME.

6.2 Muestreo y disección de las ectomicorrizas

6.2.1 Recolecta de núcleos de suelo

Durante los meses de octubre y noviembre de 2015 se realizó la recolecta de los núcleos de suelo para extraer las ectomicorrizas. En cada parcela se tomaron un total de 9 núcleos con tubos de PVC de 2.5 cm de diámetro y 30 cm de profundidad (Reverchon *et al.*, 2012; Argüelles-Moyao *et al.*, 2017); se tomaron las muestras en cada lado de la parcela de muestreo, separadas 10 m entre sí y un núcleo en el centro de la parcela, de acuerdo a la distribución que se observa en la figura 6.1. Una vez extraída la muestra de suelo se colocó en una bolsa de plástico y se rotuló. Las muestras de suelo se refrigeraron a 4 °C, en el Laboratorio de Sistemática y Ecología de Hongos Ectomicorrízicos del Instituto de Biología de la UNAM (IBUNAM), donde posteriormente fueron procesadas.

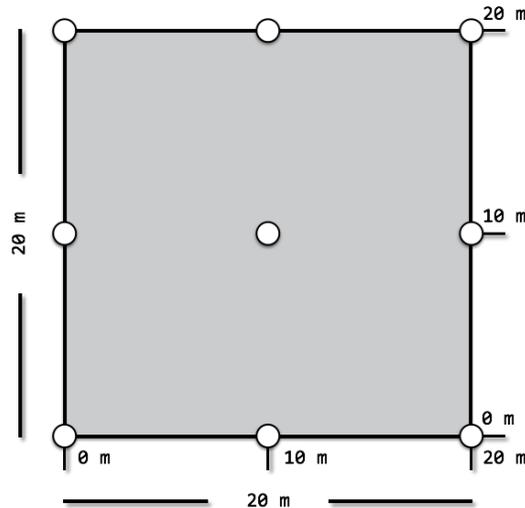


Figura 6.1. Diagrama de muestreo de las ectomicorrizas. El cuadrado en gris representa una parcela de muestreo de 20 × 20 m. Cada círculo en blanco representa la posición en la parcela de donde se obtuvo un núcleo de suelo.

6.2.2 Limpieza de núcleos y obtención de las ectomicorrizas

En el laboratorio se obtuvieron las ectomicorrizas (se utiliza el término ectomicorriza entendiéndose que se recolectaron en realidad los sistemas micorrizados, *sensu* Agerer, 1987-2008) de las muestras de suelo. Para ello, cada muestra se pasó a través de dos tamices con diferente apertura de malla (2 y 0.85 mm). La muestra de suelo se lavó suavemente con agua corriente, procurando separar los agregados y descartar la mayor cantidad de suelo para dejar únicamente las raíces. Posteriormente se colocaron en una bandeja de fondo blanco con agua para hacer más eficiente la detección de las raíces ectomicorrizadas. Todas las raíces con apariencia de estar ectomicorrizadas se recolectaron en frascos de plástico con agua destilada fría y se almacenaron en un refrigerador a 4 °C.

Las raíces extraídas de cada muestra fueron diseccionadas bajo un microscopio estereoscópico para separar aquellas que efectivamente estuvieran ectomicorrizadas, vivas y con un aspecto turgente. Se colocaron en una caja de Petri y esta sobre una hoja de papel cuadriculada (cuadros de 1 cm) y numerada. Fueron seleccionadas con números aleatorios 16 ectomicorrizas por núcleo, que se limpiaron y se colocaron individualmente en viales de plástico con agua destilada fría. Estas 16 ectomicorrizas se utilizaron para obtener los datos moleculares de la comunidad de HECM. Los números aleatorios fueron generados a partir de la plataforma Random (www.random.org), debido a que está basada en ruido espacial y no en

un algoritmo como en una hoja de cálculo (Argüelles-Moyao, 2013). Cuando el número total de ectomicorizas por núcleo no alcanzó un mínimo de 16, se recolectaron todas las ectomicorizas de dicha muestra.

6.3 Caracterización del suelo en las parcelas de muestreo

Se recolectaron las muestras de suelo con un nucleador de PVC de 2.5 cm de diámetro y 30 cm de profundidad en el centro de cada una de las seis parcelas [$N=2$ por parcela (Fig. 6.2)]. Cada muestra se colocó en una bolsa de plástico hermética y se almacenó a 4 °C hasta ser procesada; el suelo se pasó a través de un tamiz de 2 mm de apertura de malla, retirando las raíces, residuos orgánicos y rocas. Estas muestras fueron procesadas en fresco para su posterior análisis de pH y de la concentración de: nitrógeno total (% N), carbono orgánico total (% C) y fósforo disponible (P_{disp} en g^{-1}). El pH se midió en agua relación 1:2.5 con un potenciómetro WTW inoLab pH 720, los % C y % N se obtuvieron simultáneamente en un analizador elemental CNHS/O Perkin Elmer 2400 serie II en el modo CHN y el P_{disp} por la técnica de Bray, utilizando ácido ascórbico como reductor. Todos los procedimientos fueron realizados en el Laboratorio de Edafología Ambiental del Instituto de Geología de la UNAM, a cargo de la Dra. Kumiko Shimada Miyasaka.

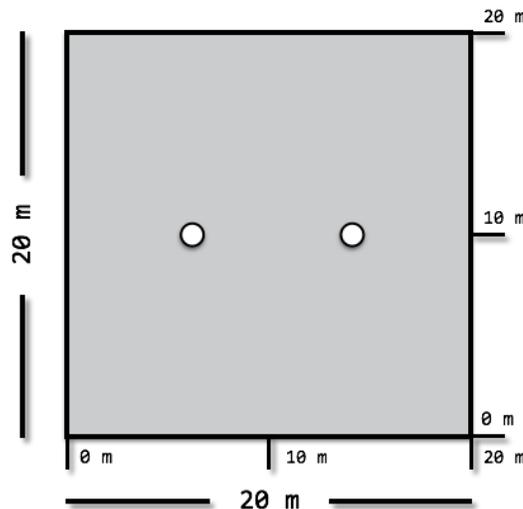


Figura 6.2. Diagrama de muestreo del suelo. El cuadrado en gris representa una parcela de 20 × 20 m. Los dos círculos blancos representan la posición en la parcela de donde se obtuvieron los núcleos de suelo.

6.4 Análisis de isótopos estables

6.4.1 Proceso de las muestras pre-análisis

Se recolectaron muestras de acículas de cuatro individuos de *Abies religiosa* ($N= 2$ por localidad) y de *Pinus* sp. (de este último solo una muestra para El Pantano), así como de restos leñosos ($N= 3$) en donde se encontraron desarrollándose basidiomas de *Clavulina*. En total se seleccionaron 29 ejemplares de *Clavulina* y se incluyeron controles de esporomas de HECM ($N= 4$) y de HSAP ($N= 4$) recolectados en cada localidad durante el mismo periodo de muestreo. Se determinaron los valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de cada muestra. El incluir otras especies de HECM y HSAP recolectados en los mismos sitios de los taxones de interés, contribuye a tener una mejor interpretación de los resultados, ya que existen diferencias potenciales en la composición de los nutrimentos del sitio así como en la adquisición de los mismos por parte de distintos taxones (Taylor *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2007).

Todas las muestras fueron limpiadas con agua desmineralizada para retirar los restos de suelo y material orgánico superficial, como arcillas y briofitas. Posteriormente, las muestras se colocaron en bolsas de papel encerado y se deshidrataron con calor seco en un horno (Binder) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas (Taylor *et al.*, 1997; Hobbie *et al.*, 2005).

6.4.2 Obtención de los valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$

Los valores isotópicos se obtuvieron en dos lotes. Para la obtención del primer lote $N= 21$ (nueve basidiomas de *Clavulina*, dos de HECM, dos de HSAP, cinco muestras de acículas y tres de los restos leñosos), las muestras se molieron con un mortero de ágata y se homogeneizaron con un tamiz de una apertura de malla de 0.5 mm. Cada una de las muestras se montó en una cápsula de estaño (aproximadamente 0.06 g por muestra) y después se introdujeron en un analizador elemental (Flash 2000 HTP Pluss) acoplado a un espectrómetro de masas de isótopos estables (MAT 253). Esta parte se realizó en el Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM.

El segundo lote $N= 25$ (20 basidiomas de *Clavulina*, dos de HECM, dos de HSAP y un HECM del primer lote, que sirvió como control para comparar los resultados de ambos laboratorios) fue analizado en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de Isótopos Estables ("Light Stable Isotope Mass Spectrometry Laboratory"), de la Universidad de Florida, EUA, a

cargo del Dr. Jason Curtis. En este caso las muestras fueron molidas en un TissueLyser (Qiagen) por cinco minutos después de haber sido ultracongeladas por 24 horas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el IBUNAM. Las muestras fueron cargadas en cápsulas de estaño y colocadas en un carrusel automático Zero Blank de 50 muestras. Después de una combustión a $1,020\text{ }^{\circ}\text{C}$ a través de una columna de cuarzo en una atmósfera rica en oxígeno, el gas fue transportado en una corriente con helio y pasada a través de una columna de reducción de calor (a $650\text{ }^{\circ}\text{C}$) de cobre elemental para remover el oxígeno. Posteriormente, el flujo pasó a través de una trampa química de perclorato de magnesio para remover el agua y finalmente a través de una columna GC de 0.7 m a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ para separar el N_2 del CO_2 . El gas pasó a un sistema de preparación ConFlo II y de ahí a un espectrómetro de masas (Thermo Electron Delta V) de flujo continuo donde la muestra de gas fue medida de acuerdo a los gases de referencia de N_2 y CO_2 del laboratorio. Todos los valores de isótopos estables se reportan en $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$, los cuáles se generan a partir de la siguiente fórmula (Sulzman, 2007):

$$\delta X = \left[\left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} \right) - 1 \right] \times 1000 (\text{‰})$$

donde, δX corresponde al valor de la huella isotópica del elemento que se trabaja (en este caso ^{15}N y ^{13}C); R_{muestra} y $R_{\text{estándar}}$ son las relaciones de ^{13}C y ^{12}C y de ^{15}N y ^{14}N , para el C y el N, respectivamente. En el caso del C es relativo a PDB (Pee Dee Belemnite, por sus siglas en inglés) y en el caso del N es con respecto al N_2 atmosférico (West *et al.*, 2006). Las unidades se reportan en partes por mil (‰).

6.5 Biología molecular

6.5.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras biológicas (basidiomas y ectomicorrizas) se realizó con el paquete de extracción XNAP (Sigma-Aldrich). Para esto se utilizaron placas de PCR de 96 pozos; en cada uno de estos se agregaron 20 μl de solución de extracción (ES) para los basidiomas y 10 μl para las ectomicorrizas, así como un fragmento de aproximadamente 1 mm de la muestra. Estas placas se calentaron en un termociclador (Applied Biosystems) de acuerdo con los siguientes parámetros: $65\text{ }^{\circ}\text{C} \times 10$ minutos, $95\text{ }^{\circ}\text{C} \times 10$ minutos y finalmente a

4 °C. Posteriormente se agregaron 20 µl de solución de dilución (DS) a cada pozo y se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 30 minutos. El ADN extraído fue almacenado en un refrigerador a -20 °C.

6.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ITS (nrDNA)

Se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los paquetes: RubyTaq PCR Master Mix (Affymetrix) y REExtract-N-Amp (Sigma Aldrich). Se amplificó la región ITS1-5.8S-ITS2 con los oligonucleótidos ITS1F (ocasionalmente también el ITS1) e ITS4 y para la PCR se siguió el protocolo propuesto por Gardes y Bruns (1993): 94 °C × 3 minutos (iniciación); 40 ciclos de reacción de 94 °C × 1 minuto (desnaturalización), 51 °C × 1 minuto (alineamiento) y 72 °C × 1 minuto (elongación); al culminar los ciclos se mantuvieron a 72 °C × 8 minutos, para finalizar a 4 °C. A cada corrida de PCR se le añadió un control positivo con ADN de *Agaricus bisporus* y un control negativo que consistió en una reacción sin ADN. Las muestras fueron corridas con ADN diluido 1:10 con agua ultrapura para evitar la inhibición de la reacción.

Los productos de PCR resultantes se cargaron (4–8 µl) en un gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed (Biotium). Los geles se corrieron a 100 V por 45 minutos en una cámara de electroforesis. Posteriormente, el gel se observó en un transiluminador de luz UV y se tomó una fotografía para analizar el éxito así como la intensidad de la amplificación. Los productos que mostraron buena amplificación fueron limpiados.

6.5.3 Limpieza de productos de PCR

Los productos de PCR fueron limpiados con el paquete ExoSAP-IT (Affymetrix). Se preparó una mezcla de 1 µl de agua ultrapura y 1 µl de ExoSAP-IT y se agregaron 3.5 µl de cada uno de los productos de PCR. Las muestras se corrieron en el termociclador con los siguientes parámetros: 37 °C × 45 minutos, 80 °C × 15 minutos y finalmente a 4 °C. Los productos de PCR limpios se enviaron al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del IBUNAM. Fueron secuenciados por tecnología de tipo Sanger que involucra el uso de la técnica de electroforesis capilar y utilizando Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems). Las muestras de basidiomas se secuenciaron en ambos sentidos con los dos oligonucleótidos

empleados en los procedimientos de PCR (ITS1F e ITS4), mientras que las de ectomicorrizas únicamente se secuenciaron con el oligonucleótido ITS4.

6.6 Análisis bioinformático

6.6.1 Edición de secuencias

La edición de las secuencias obtenidas se realizó en el programa Geneious 9.0 (Biomatters). En primera instancia, se realizó un recorte de los extremos de las secuencias, debido a la baja calidad en la lectura de las regiones terminales. Posteriormente, se editaron las secuencias "forward" y "reverse" de un mismo ejemplar en conjunto y para las ectomicorrizas únicamente la "reverse". Esta edición consistió en corregir cuando ocurrió un error en la asignación de bases ("base calling") en el secuenciador; detectar ambigüedades en las bases, es decir, diferenciar cuando se trató de una base heteróciga, y para eliminar regiones cuya lectura fuera de baja calidad en los extremos de las secuencias.

6.6.2 Generación de unidades moleculares taxonómicas operativas

Las secuencias provenientes de ectomicorrizas se ensamblaron al 97 % de similitud para generar secuencias consenso y se comparó la similitud genética de cada secuencia consenso con la base de datos de nucleótidos de GenBank (NCBI), mediante el uso del algoritmo BLAST. A partir de esas secuencias al 97 % de similitud fueron seleccionadas aquellas que correspondieran al género *Clavulina*.

Para obtener los MOTUs ("Molecular Operational Taxonomic Units"), las secuencias de las ectomicorrizas de *Clavulina* fueron re-ensambladas al 100 % de similitud en conjunto con las secuencias provenientes de los basidiomas, de tal manera que se obtuvieran genets. Se generaron las secuencias consenso de los genets, mismas que fueron comparadas con la base de datos de nucleótidos de GenBank, mediante BLAST para conocer su similitud genética con las secuencias disponibles. Las comparaciones se acotaron a secuencias provenientes de ejemplares voucher y se analizaron las comparaciones que arrojó el BLAST utilizando como criterios el porcentaje de identidad y la cobertura de la secuencia.

6.7 Análisis filogenético

Con la finalidad de establecer la afinidad filogenética de las secuencias de *Clavulina* obtenidas, se analizaron de manera conjunta con otras disponibles en la base de datos de GenBank y que han sido publicadas en los trabajos de Olariaga *et al.* (2009), Kennedy *et al.* (2012), Uehling *et al.* (2012), He *et al.* (2016) y Argüelles-Moyao *et al.* (2017). Todas las secuencias fueron alineadas por medio del método iterativo MUSCLE en el programa AliView (Larsson, 2014). Se hizo una corrección manual del alineamiento y se corrió un análisis bayesiano en Mr. Bayes, utilizando la plataforma CIPRES (Science Gateway V. 3.3.) El análisis se corrió durante 10 000 000 de generaciones, con *Hydnum repandum* L. (código de acceso de GenBank: AJ547871) como grupo externo. El árbol obtenido fue editado en el programa FigTree (versión 1.4.3).

6.8 Análisis estadísticos

Se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas entre El Pantano y El Zarco, en relación al número de ectomicorrizas recolectadas por sitio. Para ello, se realizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, tomando como valores los 27 núcleos recolectados por sitio de estudio.

Se evaluó si había diferencias estadísticamente significativas entre los valores de %N, %C, pH y P_{disp} , entre El Pantano y El Zarco. Para ello fueron utilizadas pruebas de U de Mann-Whitney.

Se compararon los valores promedio de las mediciones de basidiosporas (largo y ancho) de los ejemplares secuenciados por especie. Para ello fue utilizada la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis entre los valores promedio del ancho y del largo de la basidiospora por especie.

Se evaluó si existían diferencias en el número de ejemplares recolectados de *Clavulina* y de la biomasa en peso seco de los mismos, entre los dos sitios de estudio. Para realizar la comparación se tomó como réplica a la suma de todos los especímenes recolectados por parcela de muestreo (y su biomasa) en cada mes de muestreo, de tal manera que la N de cada sitio fue de 12 (tres parcelas \times cuatro meses). Para la evaluación se realizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, utilizando únicamente los ejemplares recolectados

dentro de las parcelas de muestreo. Así mismo, se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas entre El Pantano y El Zarco, en relación al número de ectomicorrizas de *Clavulina* recolectadas por sitio. Para ello, se realizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney.

Para evaluar si había una relación entre las variables microambientales (ver sección 6.1.2) y el número de ejemplares recolectados en total, se agruparon los valores de los datos microambientales en categorías, utilizando la regla de Sturges para definir el número de clases. De cada variable se obtuvo la amplitud del intervalo de cada clase y el valor medio por intervalo (marca de clase). Se transformó la frecuencia de los ejemplares de *Clavulina* con la transformación de raíz cuadrada (Zar, 2010) y se hicieron correlaciones no paramétricas de Spearman contra las cuatro variables microambientales.

Los datos isotópicos promedio de ^{15}N y ^{13}C para los esporomas de *Clavulina* por sitio de recolecta fueron comparados con una prueba de t para muestras independientes, con la finalidad de evaluar si existían diferencias significativas entre los valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$, respectivamente, de los ejemplares recolectados en El Zarco y en El Pantano. Posteriormente, se realizaron ANOVA de una vía con los valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de los ejemplares de *Clavulina* recolectados en El Zarco, en El Pantano, los HECM y los HSAP. En caso de haber diferencias significativas se realizó una prueba *post hoc* de Tukey HSD. Con los valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ para las diferentes especies de *Clavulina*, se realizaron ANOVA de una vía, con la finalidad de evaluar si existían diferencias entre los valores isotópicos a nivel de especie y en comparación con los HECM y HSAP recolectados. Los datos obtenidos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de *Clavulina* fueron comparados con los reportados en los trabajos de Hobbie *et al.* (2001), Trudell *et al.* (2004), Zeller *et al.* (2007), Mayor *et al.* (2009), Tedersoo *et al.* (2012) y Hou *et al.* (2012).

Para todas las pruebas estadísticas se utilizó el paquete estadístico STATISTICA (Statsoft, versión 8). La representación gráfica de los resultados fue realizada con el programa Sigma Plot (Systat software, versión 11).

VII. Resultados

7.1 Recolección y descripción de los ejemplares

De agosto a noviembre de 2015 fueron recolectados 112 ejemplares de *Clavulina* entre los dos sitios, 34 en El Zarco y 78 en El Pantano. Del total de ejemplares se descartaron 45, debido a que eran materiales inmaduros y no es posible su determinación sin los datos microscópicos de las basidiosporas (ver sección 6.1.1). A los 67 ejemplares maduros, se agregaron 20 ejemplares recolectados previamente en los sitios (ver sección 6.1.3), los cuáles ya contaban con secuencia de la región de los ITS.

7.2 Muestreo y disección de las ectomicorrizas

En total se obtuvieron 718 ectomicorrizas de las 864 que se esperaba como número máximo potencial, equivalente a un 83.10 % del total entre los dos sitios; 407 fueron de El Zarco y 311 de El Pantano. Si tomamos en cuenta el valor máximo potencial de ectomicorrizas por sitio de estudio (432) entonces obtuvimos el 94.21 % y el 71.99 % de las ectomicorrizas de El Zarco y de El Pantano, respectivamente.

La cantidad de ectomicorrizas recuperadas entre los dos sitios (tres parcelas por sitio y nueve núcleos por parcela) fue significativamente mayor (Tabla 7.1) en El Zarco que en El Pantano, a partir de la prueba de U de Mann-Whitney ($U= 237$; $P<0.05$).

Tabla 7.1. Prueba de U de Mann-Whitney del número de ectomicorrizas entre sitios. Los valores estadísticamente significativos aparecen en color rojo.

	SR para ZAR	SR para PAN	U	Z	P
Ectomicorrizas	870	615	237	2.206	0.027

SR= suma de rangos; ZAR= El Zarco; PAN= El Pantano; U= estimador de la prueba de U de Mann-Whitney; P= significancia de 0.05; N= 27 para cada sitio.

7.3 Caracterización del suelo en las parcelas de muestreo

Las características químicas del suelo por localidad se muestran en la tabla 7.2. En El Pantano se registró un valor promedio de carbono orgánico total (C) de 10.1 (± 2.5) %, a diferencia de El Zarco donde el promedio fue de 8.4 (± 1.9) %. En términos del nitrógeno total (N), se registró

un valor promedio de 0.7 (± 0.2) % para El Pantano, mientras que para El Zarco fue de 0.5 (± 0.1) %. El valor de fósforo disponible (P_{disp}) para El Pantano fue de 0.6 (± 0.3) mg/kg y en El Zarco de 1.1 (± 0.6) mg/kg. El valor de pH estuvo por debajo de 6, en El Pantano de 5.7 (± 0.1) y en El Zarco de 5.7 (± 0.3).

Las pruebas estadísticas no indicaron diferencias significativas entre los sitios, en los porcentajes totales de C ($U= 2$; $P>0.05$), de N ($U= 3$; $P>0.05$), P_{disp} ($U= 2$; $P>0.05$) y pH ($U= 4$; $P>0.05$), como se aprecia en la tabla 7.3.

Tabla 7.2. Características químicas del suelo de las parcelas de muestreo por sitio.

Parcela	Loc	% C	% N	pH _{agua}	P_{disp} (mg/kg)
1	PAN	11.21	0.78	5.38	0.63
2	PAN	12.67	0.98	5.85	1.04
3	PAN	7.59	0.49	5.89	0.32
1	ZAR	7.35	0.49	5.88	1.13
2	ZAR	8.17	0.49	5.60	1.72
3	ZAR	9.73	0.63	5.66	0.45

Loc = Localidad, PAN= El Pantano, ZAR= El Zarco. %C= porcentaje del carbono orgánico total; %N= porcentaje de nitrógeno total; pH_{agua}= en proporción 1:2.5 de agua; P_{disp} = fósforo disponible.

Tabla 7.3. Prueba de U de Mann-Whitney de las características químicas del suelo entre sitios.

	SR para ZAR	SR para PAN	U	Z	P
% carbono	8	13	2	-1.091	0.275
% nitrógeno	9	12	3	-0.655	0.513
pH en agua	10	11	4	-0.218	0.827
Fósforo disponible	13	8	2	1.091	0.275

SR= suma de rangos; ZAR= El Zarco; PAN= El Pantano; U= estimador de la prueba de U de Mann-Whitney; P= significancia de 0.05; N= 3 para ambos sitios.

7.4 Biología molecular y análisis bioinformático

7.4.1 Extracción de ADN, PCR y limpieza de productos

Veinte ejemplares recolectados previamente en los sitios, ya contaban con secuencias de ADN pero la revisión microscópica no se había realizado. De los 67 ejemplares recolectados durante 2015 y que estuvieron maduros, se secuenciaron 35. En total, de los 87 ejemplares de *Clavulina* revisados se obtuvieron y analizaron 55 secuencias de la región ITS.

Por su parte, de las 718 ectomicorrizas recolectadas se logró la amplificación de los ITS de 373 entre los dos sitios (52 % del total de extracciones); 187 de El Zarco y 186 de El Pantano. El porcentaje de éxito de la amplificación por sitio de estudio fue de 46 % y 60 %, respectivamente.

Del total de productos de PCR amplificados se obtuvieron 274 secuencias útiles; 142 de El Zarco y 132 de El Pantano, por lo que el porcentaje de secuencias útiles para el primero fue de 75.94 % y de 70.97 % para el segundo. Sin embargo, si se evalúa la eficiencia desde la recolección de las ectomicorrizas hasta la obtención de secuencias útiles, los datos son de 35 % para El Zarco y de 42 % para El Pantano (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Eficiencia en el procesamiento de la comunidad de HECM por sitio de estudio.

Parcela	Ectomicorrizas	%ecm	ADN amplificado	%amp	Secuencias útiles	%sec	MOTUs	Eficiencia
1Z	144	100	92	63.9	86	93.5	13	59.7
2Z	125	86.8	61	48.8	35	57.4	15	28
3Z	138	95.8	34	24.6	21	61.8	8	15.2
Total Z	407	94.2	187	46	142	75.9	30	34.9
1P	80	55.6	68	85	47	69.1	14	58.8
2P	125	86.8	62	49.6	59	95.2	17	47.2
3P	106	73.6	56	52.8	26	46.4	11	24.5
Total P	311	72	186	59.8	132	71	40	42.4
TOTAL	718	83.1	373	52	274	74.5	61	38.2

Z= El Zarco; P= El Pantano. %ecm= porcentaje de ectomicorrizas recolectadas (número máximo potencial de 144 por parcela); %amp= porcentaje de amplificación; %sec= porcentaje de secuencias útiles; MOTUs = Molecular Operative Taxonomic Units; Eficiencia= desde la recolecta de las ectomicorrizas hasta la obtención de secuencias de ITS útiles.

7.4.2 Edición de secuencias y generación de MOTUs de HECM

Las 274 secuencias útiles obtenidas a partir de ectomicorrizas se agruparon al 97 % de similitud para generar MOTUs, lo que resultó en 30 especies (MOTUs) para El Zarco y 40 para El Pantano. Se identificaron un total de 61 especies entre los dos sitios de estudio, 52 fueron del Phylum Basidiomycota y nueve de Ascomycota. Veintiún especies fueron exclusivas de El Zarco, 31 de El Pantano y únicamente nueve compartidas entre ambos sitios, las cuales fueron: *Clavulina* aff. *cinerea*, *Genea* sp. 1, *Inocybe lilacina*, *Laccaria laccata*, *Russula* aff. *firmula*, *Sebacina dimitica* 2, *Sebacina* sp. 1, *Tomentella* sp. 1 y *Tomentella* sp. 3 (Apéndices I y II). Solo dos secuencias (que representan a dos especies), no están reportadas como ectomicorrizógenas (*sensu* Tedersoo et al., 2010), y son Auriculariales sp. 1 y Nectriaceae sp. 1, ambas exclusivas de El Pantano. Si se descartan a estos dos taxones, se encontraron un total de 29 especies de HECM exclusivos para El Pantano y 21 para El Zarco. En el apéndice II se muestra la composición de la comunidad de El Pantano y El Zarco de manera conjunta.

Se registraron 13 familias de hongos entre los dos sitios, entre ellas Clavulinaceae fue la que presentó el mayor número de ectomicorrizas con 69 (25.2 %), seguida de Inocybaceae con 60 (21.9 %) y Thelephoraceae con 44 (16.1 %). Estas tres familias agrupan a 173 ectomicorrizas que representan cerca de dos tercios del total de las ectomicorrizas de la comunidad (63.1 %). Sin embargo, el número de ectomicorrizas por familia difiere entre los sitios; en El Zarco fue Inocybaceae la familia con el mayor número de ectomicorrizas (42), seguido de Clavulinaceae (41) y Russulaceae (30). Estas tres familias agrupan a 113 ectomicorrizas, que representan cuatro quintas partes del total de las ectomicorrizas obtenidas en El Zarco (79.7 %). Por su parte, en El Pantano fue Clavulinaceae la que acumuló el mayor número de ectomicorrizas (28), seguido de Thelephoraceae (25) y Sebacinaceae (22). Estas tres familias agrupan a 75 ectomicorrizas, que representan poco más de la mitad de las obtenidas en este sitio (56.8 %). Además, en El Zarco no se registraron las familias Atheliaceae, Discinaceae, Helvellaceae, Nectriaceae y Tuberaceae, mientras que en El Pantano fue Pezizaceae la única familia que no se registró (Fig. 7.1).

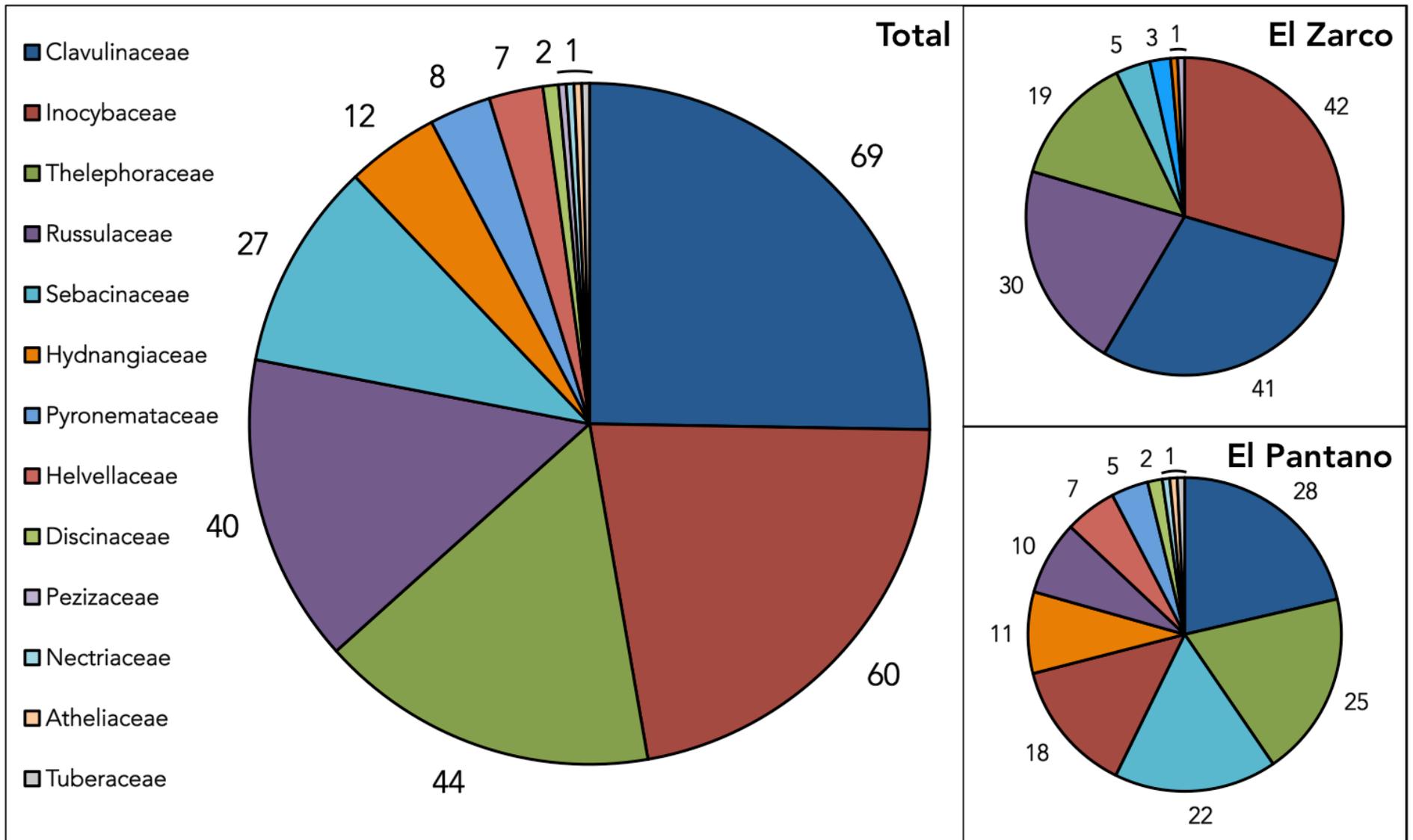


Figura 7.1. Número de ectomicorrizas por familia taxonómica. Se muestran el número del total de la comunidad (N= 274), de la comunidad de El Zarco (N= 142) y de la comunidad de El Pantano (N=132).

Se registraron 18 géneros, de ellos *Inocybe* y *Tomentella* son los que contaron con el mayor número de especies, con 14 cada uno, seguidos de *Russula* con siete, *Sebacina* con seis y *Clavulina* con tres. En términos del número de ectomicorrizas por género, *Inocybe* fue el que acumuló la mayor cantidad con 60, seguido por *Clavulina* con 47, *Tomentella* con 43, *Russula* con 39 y *Sebacina* con 26. Al igual que con el número de ectomicorrizas por familia, el número de especies por género (Fig. 7.2) y de ectomicorrizas por género (Fig. 7.3), difiere entre los sitios.

Inocybe fue el género que más especies presentó en El Zarco (nueve), seguido de *Russula* (cinco) y *Tomentella* (cuatro); en términos del número de ectomicorrizas por género ocurrió algo similar, ya que en este sitio *Inocybe* también tuvo la mayor cantidad (42), seguido de *Russula* (29) y de *Membranomyces* (22). Por su parte, en El Pantano, el género con el mayor número de especies fue *Tomentella* (12), seguido de *Inocybe* y *Sebacina* (seis cada uno); en este sitio, *Clavulina* fue el género que acumuló el mayor número de ectomicorrizas (28), seguido de *Tomentella* (24) y de *Sebacina* (21). La representatividad de los géneros no fue igual en ambos sitios; por ejemplo, en El Zarco no se registró la presencia de *Genabea*, *Helvella*, *Hydnotrya*, *Piloderma*, *Thelephora* y *Tuber*, mientras que en El Pantano no se encontró *Humaria*, *Hydnobolites*, *Lactarius*, *Membranomyces* y *Tarzetta*.

En general, la mayoría de las especies mostraron abundancias absolutas bajas, con pocas como dominantes en la comunidad. Sin embargo, la dominancia fue más marcada en El Pantano, ya que las únicas especies que tuvieron una abundancia mayor o igual a 10 ectomicorrizas fueron *Clavulina* aff. *cinerea* y *Laccaria laccata*, mientras que la dominancia fue menor en El Zarco, ya que cinco especies tuvieron una abundancia mayor o igual a 10 ectomicorrizas, las cuales fueron: *Clavulina* aff. *cinerea*, *Inocybe nitidiuscula*, *Membranomyces spurius*, *Russula* sp. 1 y *Tomentella* sp. 1 (Fig. 7.4).

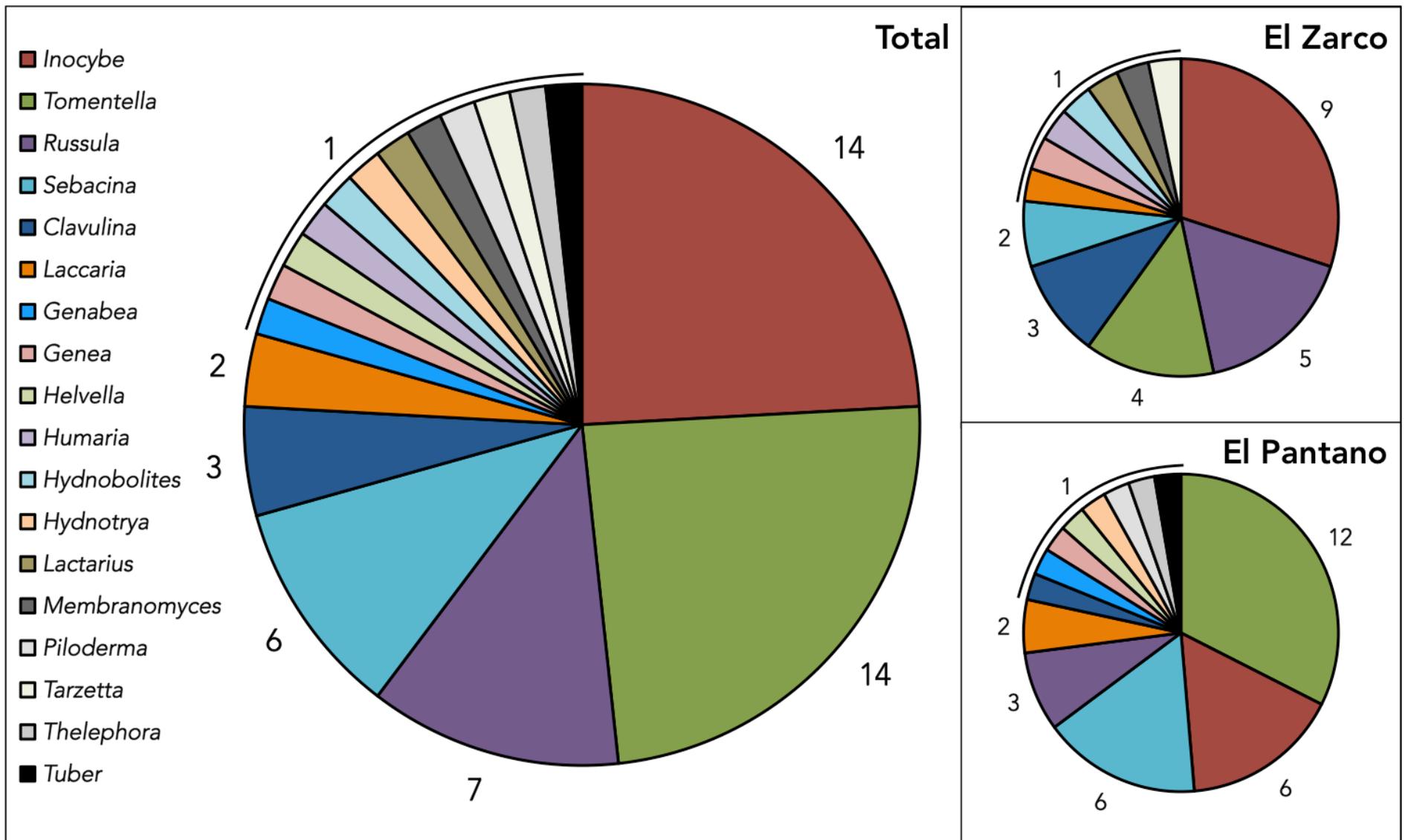


Figura 7.2. Número de especies (MOTUs) por género. Se muestran el número del total de la comunidad (N= 58), de la comunidad de El Zarco (N= 30) y de la comunidad de El Pantano (N= 37).

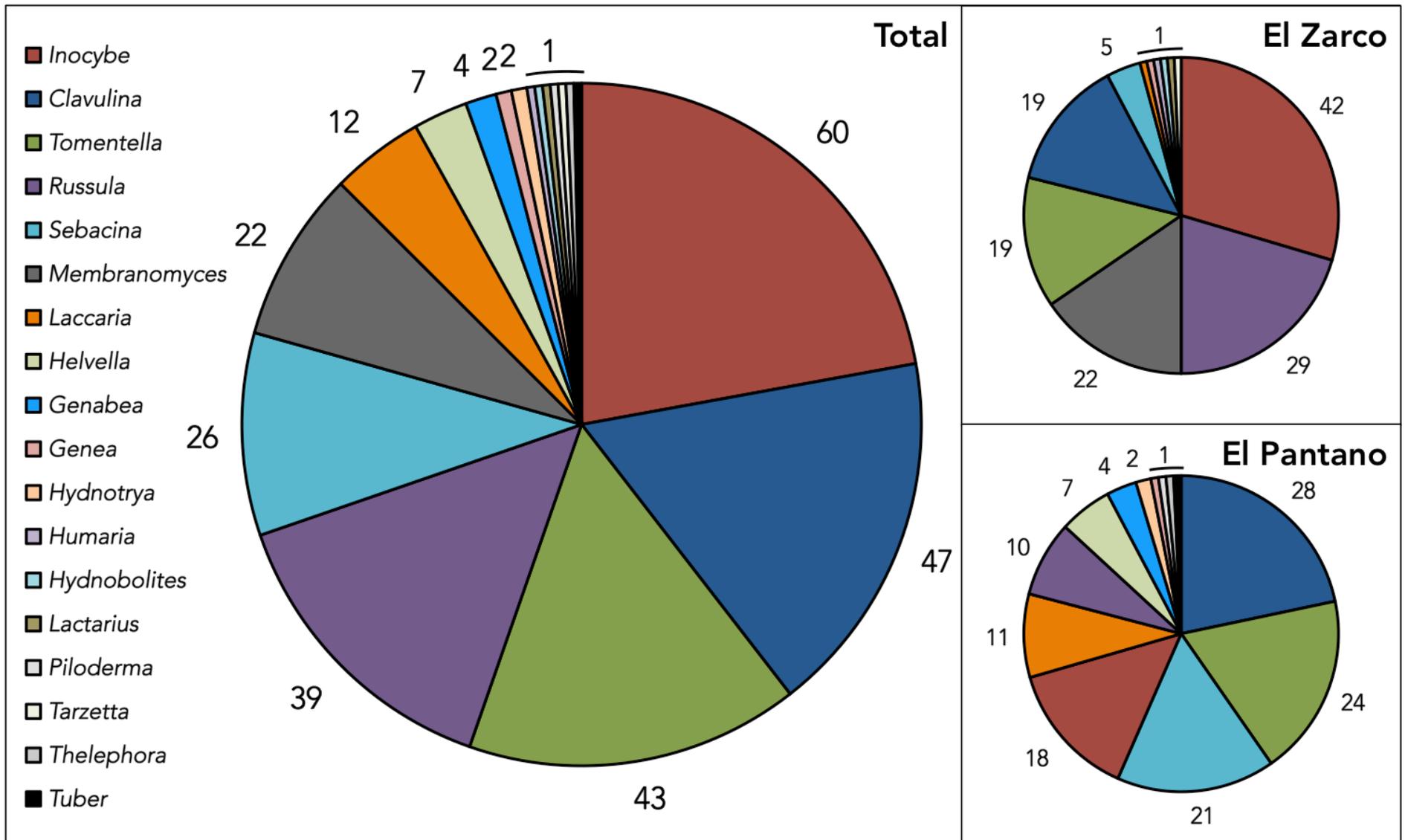


Figura 7.3. Número de ectomicorrizas por género. Se muestran el número del total de la comunidad (N= 271), de la comunidad de El Zarco (N= 142) y de la comunidad de El Pantano (N= 129).

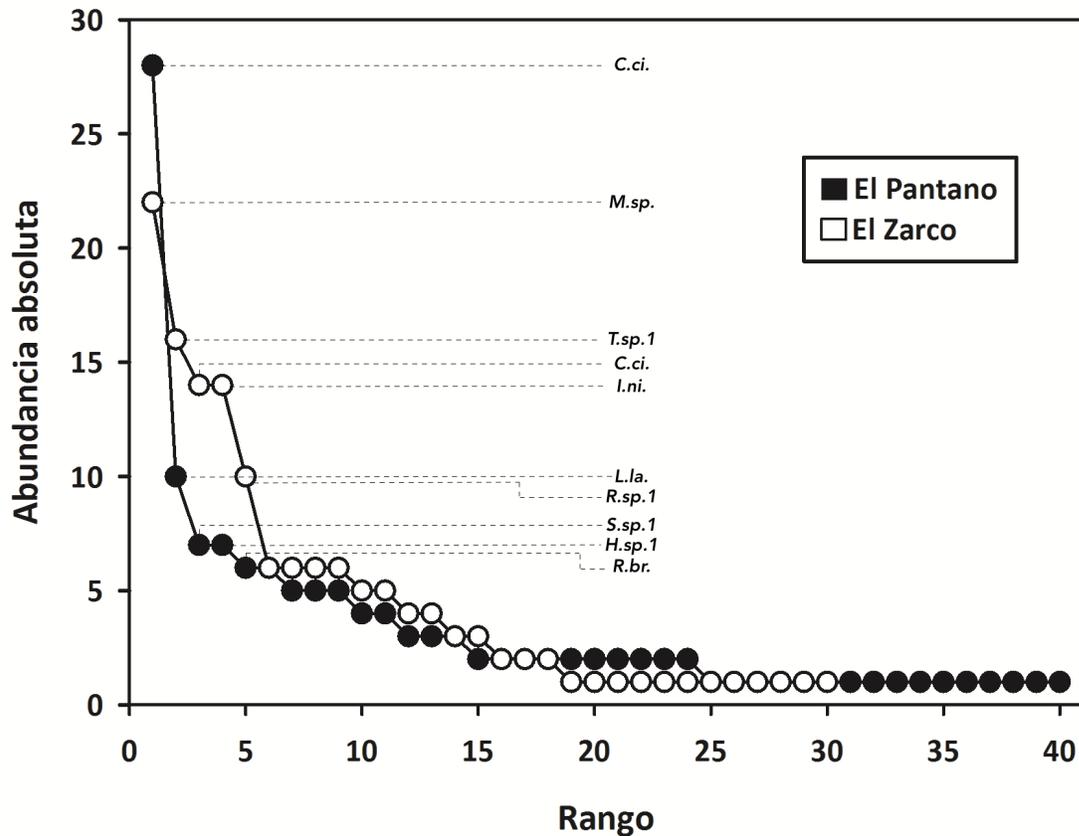


Figura 7.4. Curva de Rango-Abundancia de las especies de HECM. Se muestran en negro las especies de El Pantano y en blanco las de El Zarco. Las especies más abundantes a las menos abundantes están ordenadas de izquierda a derecha. C.ci.= *Clavulina* aff. cinerea, M.sp.= *Membranomyces spurius*, T.sp.1= *Tomentella* sp. 1, I.ni.= *Inocybe nitidiuscula*, L.la.= *Laccaria laccata*, R.sp.1= *Russula* sp. 1, S.sp.1= *Sebacina* sp. 1, H.sp.1= *Helvella* sp. 1 y R.br.= *Russula* cf. *brevipes*.

A partir de estas secuencias se identificó a *Clavulina* aff. *cinerea* con 42 ectomicorrizas como la especie más abundante de la comunidad en su conjunto, seguida de *Membranomyces spurius* con 22 y *Tomentella* sp. 1 con 20 ectomicorrizas. Si se considera a las comunidades por separado, en El Pantano C. aff. *cinerea* también ocupó el primer lugar con 28 ectomicorrizas, seguida de *Laccaria laccata* con 10 y *Sebacina* sp. 1 con siete ectomicorrizas; en contraste, en El Zarco, la abundancia de C. aff. *cinerea* descendió al tercer lugar con 14 ectomicorrizas, y fué *Membranomyces spurius* la especie más abundante en este sitio con 22, seguida de *Tomentella* sp. 1 con 16 ectomicorrizas (Fig. 7.4).

7.5 Taxonomía integrativa de *Clavulina*

7.5.1 Análisis filogenético

Para realizar los análisis filogenéticos se consideraron las secuencias de los 55 basidiomas que se muestran en la tabla 7.5. A estas secuencias, se les adicionaron las secuencias obtenidas a partir de 47 ectomicorrizas de *Clavulina*, mismas que se agruparon en tres genets al 100 % de similitud. A partir de las comparaciones con las bases de datos de GenBank, se reconocieron 37 ejemplares que muestran una afinidad genética con secuencias de *Clavulina* aff. *cinerea*, cinco a *Clavulina* cf. *rugosa* y 12 ejemplares no mostraron afinidad genética por arriba del 97 % de similitud con ninguna secuencia de la base de datos. Estas últimas 12 corresponden a dos taxones diferentes (con ocho y cinco ejemplares cada uno). En la tabla 7.5 se incluyen dos ejemplares inmaduros que contaban previamente con secuencia (AAM-62 y PPE-83). Por otro lado, el ejemplar PPE-261 tiene un tamaño de basidiosporas más grande comparado con el resto de los ejemplares de la misma especie, además de que al deshidratarse quedó de tonalidad ocre, similar a los ejemplares de *C. cf. rugosa* que coinciden en tener basidiosporas grandes; por este motivo se consideró que en esa recolecta se mezclaron especies. Los ejemplares PPE-52, PPE-454 y PPE-368 mostraron valores atípicos en el tamaño de basidiosporas con respecto al resto de los especímenes de su grupo, desafortunadamente los dos últimos fueron destruidos en los análisis de isótopos estables y no se pudo corroborar la precisión de la mediciones. Los ejemplares AAM-79 y PPE-353 también mostraron valores atípicos en las basidiosporas con respecto al resto de los ejemplares de su grupo; sin embargo, para el primero de estos no se cuenta con una descripción en fresco suficiente ni registro fotográfico, por lo que no se pudo corroborar con los caracteres macroscópicos. Estos seis ejemplares (AAM-62, AAM-79, PPE-83, PPE-261, PPE-368 y PPE-454) no se muestran en las figuras 7.6 y 7.7, ni fueron utilizados en los análisis estadísticos.

Tabla 7.5. Afinidad genética y tamaño de las basidiosporas de los ejemplares de *Clavulina* con secuencia de ITS.

Especie	Ejemplar	Loc	Lm	Am	Q	p.b.	Similitud	Cobertura	Acceso NCBI	Bit score	ID NCBI
<i>C. reae</i>	PPE-361*	Z	8.6 (±0.6)	6.4 (±0.6)	1.3 (±0.1)	680	99.9	95.0	KT874986	1190.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-441*	Z	8.5 (±0.5)	6.8 (±0.6)	1.3 (±0.1)	680	99.9	95.0	KT874986	1190.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-468*	Z	8.2 (±0.6)	7.2 (±0.6)	1.2 (±0.1)	680	99.9	95.0	KT874986	1190.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-383*	Z	8.4 (±0.5)	6.4 (±0.5)	1.3 (±0.1)	680	99.9	95.0	KT874986	1190.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-454*	P	7.6 (±0.5)	6.2 (±0.5)	1.2 (±0.1)	680	99.9	95.0	KT874986	1190.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-52	P	7.6 (±0.6)	6.1 (±0.4)	1.2 (±0.1)	624	99.9	100	KT874986	1149.7	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-24	P	8.6 (±0.5)	6.8 (±0.5)	1.3 (±0.1)	619	99.9	100	KT874986	1140.5	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-47	P	8.8 (±0.5)	6.7 (±0.5)	1.3 (±0.1)	409	99.9	99.8	KT874986	750.9	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-294	P	8.5 (±0.4)	6.8 (±0.4)	1.3 (±0.1)	624	99.9	100	KT874986	1149.7	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-447*	Z	8.6 (±0.4)	6.9 (±0.6)	1.3 (±0.1)	680	99.9	95.0	KT874986	1190.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-480*	P	8.3 (±0.4)	6.4 (±0.4)	1.3 (±0.1)	664	99.9	93.8	KT874986	1147.9	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-356*	Z	8.3 (±0.2)	6.2 (±0.4)	1.4 (±0.1)	680	99.9	95.0	KT874986	1190.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-354*	Z	8.4 (±0.3)	6.5 (±0.4)	1.3 (±0.1)	685	99.9	94.3	KT874986	1190.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-483	P	8.4 (±0.5)	6.7 (±0.5)	1.3 (±0.1)	680	99.9	95.0	KT874986	1190.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-353*	Z	9.3 (±0.3)	7.2 (±0.5)	1.3 (±0.1)	665	99.7	94.6	KT874986	1151.6	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	AAM-79	Z	9.2 (±0.5)	7.6 (±0.4)	1.2 (±0.1)	611	99.9	99.5	KT874986	1120.2	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	AAM-102	Z	8.9 (±0.3)	6.9 (±0.4)	1.3 (±0.1)	624	99.9	100	KT874986	1149.7	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	AAM-326	Z	8.9 (±0.3)	7.1 (±0.4)	1.3 (±0.1)	603	99.9	100	KT874986	1110.9	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-429	P	8.4 (±0.2)	6.5 (±0.4)	1.3 (±0.1)	337	100	100	KT874986	623.4	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-425*	P	8.4 (±0.2)	6.4 (±0.4)	1.3 (±0.1)	643	99.9	97.9	KT874986	1160.8	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-342*	P	8.1 (±0.3)	6.3 (±0.4)	1.3 (±0.1)	666	99.9	98.2	KT874986	1205.1	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-458*	P	8.5 (±0.3)	6.2 (±0.3)	1.4 (±0.1)	643	99.9	97.9	KT874986	1160.8	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-352*	Z	8.6 (±0.3)	6.2 (±0.4)	1.4 (±0.1)	534	100	100	KT874986	987.2	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-393*	P	8.3 (±0.3)	6.3 (±0.4)	1.3 (±0.1)	517	100	100	KT874986	955.8	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-485*	P	8.6 (±0.3)	6.6 (±0.5)	1.3 (±0.1)	644	99.7	97.9	KT874986	1155.3	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-463*	P	8.7 (±0.3)	6.7 (±0.3)	1.3 (±0.1)	566	100	100	KT874986	1046.3	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-338*	P	8.5 (±0.4)	6.4 (±0.5)	1.3 (±0.1)	643	99.9	97.9	KT874986	1160.8	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-388*	P	8.3 (±0.6)	7.0 (±0.6)	1.2 (±0.1)	563	100	100	KT874986	1040.8	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-368*	P	7.7 (±0.5)	6.2 (±0.5)	1.2 (±0.1)	663	99.9	98.6	KT874986	1205.1	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-475*	Z	8.5 (±0.3)	6.1 (±0.4)	1.4 (±0.1)	603	99.9	97.8	KT874986	1086.9	<i>C. aff. cinerea</i>

Especie	Ejemplar	Loc	Lm	Am	Q	p.b.	Similitud	Cobertura	Acceso NCBI	Bit score	ID NCBI
<i>C. reae</i>	PPE-439	P	8.7 (±0.2)	6.6 (±0.3)	1.3 (±0.1)	565	100	100	KT874986	1044.5	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-430	P	8.8 (±0.2)	7.0 (±0.3)	1.3 (±0.1)	603	99.9	97.8	KT874986	1086.9	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	AAM-96	Z	8.4 (±0.3)	6.5 (±0.2)	1.3 (±0.1)	618	99.9	100	KT874986	1138.7	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-371*	P	8.0 (±0.5)	6.6 (±0.5)	1.2 (±0.1)	532	100	100	KT874986	983.5	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-389	P	8.5 (±0.3)	6.5 (±0.4)	1.3 (±0.1)	643	99.9	97.9	KT874986	1160.8	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	AAM-62	Z	–	–	–	610	99.9	100	KT874986	1123.9	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. reae</i>	PPE-83	P	–	–	–	625	99.9	100	KT874986	1151.6	<i>C. aff. cinerea</i>
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-360*	Z	7.3 (±0.3)	6.0 (±0.2)	1.2 (±0.1)	658	95.6	94.2	KP454011	968.8	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-21	P	7.1 (±0.5)	5.9 (±0.4)	1.2 (±0.1)	617	95.6	98.2	KP454011	965.1	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-261	P	9.5 (±0.3)	7.6 (±0.3)	1.3 (±0.1)	616	95.6	100	KP454011	983.5	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-299	P	8.0 (±0.6)	6.2 (±0.6)	1.3 (±0.1)	616	95.6	100	KP454011	983.5	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-23	P	7.5 (±0.5)	5.8 (±0.5)	1.3 (±0.1)	631	95.7	98.3	KP454011	990.9	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-431*	P	7.5 (±0.4)	5.8 (±0.3)	1.3 (±0.1)	573	96.1	99.8	KP454011	928.1	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-453	P	7.5 (±0.3)	5.9 (±0.3)	1.3 (±0.1)	573	96.1	99.8	KP454011	928.1	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-461*	P	7.3 (±0.3)	5.9 (±0.3)	1.2 (±0.1)	571	96.1	99.8	KP454011	924.5	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 2</i>	PPE-341*	Z	9.2 (±0.3)	7.5 (±0.3)	1.2 (±0.1)	564	94.9	96.8	KT874989	857.9	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 2</i>	AAM-41	Z	9.8 (±0.4)	8.3 (±0.5)	1.2 (±0.1)	558	93.6	99.8	KT874989	841.3	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 2</i>	AAM-77	Z	9.4 (±0.3)	7.8 (±0.4)	1.2 (±0.1)	572	93.5	99.8	KT874989	861.6	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 2</i>	PPE-415	Z	9.6 (±0.3)	7.9 (±0.4)	1.2 (±0.1)	412	94.9	95.6	KT874989	619.7	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 2</i>	PPE-94	P	9.1 (±0.5)	6.6 (±0.4)	1.2 (±0.1)	626	93.6	100	EU569245	942.9	<i>C. sp.</i>
<i>C. sp. nov. 3</i>	PPE-466*	Z	9.5 (±0.4)	7.4 (±0.4)	1.3 (±0.1)	572	99.7	100	KT874987	1046.3	<i>C. cf. rugosa</i>
<i>C. sp. nov. 3</i>	PPE-467*	Z	9.4 (±0.3)	7.7 (±0.4)	1.2 (±0.1)	628	99.7	99.2	KT874987	1136.8	<i>C. cf. rugosa</i>
<i>C. sp. nov. 3</i>	PPE-472*	Z	9.5 (±0.5)	7.4 (±0.5)	1.3 (±0.1)	666	99.8	93.9	KT874987	1149.7	<i>C. cf. rugosa</i>
<i>C. sp. nov. 3</i>	PPE-43	P	9.0 (±0.5)	7.2 (±0.4)	1.3 (±0.1)	407	99.4	99.5	KT874987	734.2	<i>C. cf. rugosa</i>
<i>C. sp. nov. 3</i>	AAM-104	Z	9.6 (±0.2)	8.0 (±0.4)	1.2 (±0.1)	612	99.8	100	KT874987	1123.9	<i>C. cf. rugosa</i>

AAM= Argüelles-Moyao y PPE= Pérez-Pazos. Loc= localidad; Z= El Zarco, P= El Pantano. Lm= Largo promedio de la basidiospora, Am= Ancho promedio de la basidiospora, Q= Largo promedio/ancho promedio de la basidiospora. El valor entre paréntesis indica una desviación estándar. Todos los promedios fueron obtenidos a partir de 30 basidiosporas por ejemplar. p.b. = número de pares de bases de la secuencia. Similitud= con respecto a una secuencia disponible en GenBank. Cobertura= con respecto a la longitud de una secuencia disponible en GenBank. Acceso NCBI= código de acceso en GenBank de la secuencia utilizada en la comparación. Bit score= espacio de búsqueda expresado en bits. ID NCBI= nombre asignado a la secuencia en la base de datos de GenBank. AAM-62 y PPE-83 eran inmaduros. *ejemplares con $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$.

En el análisis filogenético se recuperaron cuatro clados con las secuencias aquí obtenidas (Fig. 7.5). El clado de *Clavulina* sp. nov. 1, con un soporte de probabilidad posterior (PP)= 1, se ubicó como grupo hermano de *C. coralloides* (= *C. cristata*) de Europa (clado C3 de Olariaga et al., 2009) (PP= 0.83). Las secuencias de *C. sp. nov. 1* tuvieron porcentajes de similitud por debajo del 97 % al compararse con las secuencias de las bases de datos de GenBank (ver Tabla 7.5). El clado de *C. sp. nov. 2*, con PP= 1, se ubica cercano a *C. rugosa* de Europa (clado R2 de Olariaga et al., 2009) (PP= 0.91). En este clado se agrupan además, secuencias de ectomicorrizas y esporomas de bosques de *Quercus crassifolia* de Guerrero y de *Abies religiosa* de El Zarco, referidas en los trabajos de Morris et al. (2008) y de Argüelles-Moyao et al. (2017).

Clavulina sp. nov. 3 se ubica en un clado diferente (PP= 1) al de *C. sp. nov. 2*, pese a que su morfología es muy similar. En este clado se agrupan también secuencias provenientes de Finlandia y de Noruega, representadas en el clado R1 referido por Olariaga et al. (2009), así como una secuencia referida como *Clavulina* sp. de Estados Unidos. Finalmente, *C. reae*, se ubica en un clado (PP= 0.88) que incluye al grupo de secuencias de *C. reae* (Olariaga et al., 2009, 2012). En este clado de *C. reae* además se incluyen ejemplares de "*C. coralloides*" de Estados Unidos, secuencias de ectomicorrizas de *A. religiosa* de El Zarco (Argüelles-Moyao et al., 2017) y una secuencia de ectomicorriza de *Alnus acuminata* (Kennedy et al., 2011).

Los clados de *Clavulina reae* y *C. sp. nov. 3* estuvieron representados por secuencias de esporomas y de ectomicorrizas. *Clavulina reae* se registró en ambos sitios, tanto de ectomicorrizas como con esporomas. Los esporomas de *C. sp. nov. 3* se encontraron en ambas localidades, pero solo en El Zarco se registraron sus ectomicorrizas. Los clados de *C. sp. nov. 1* y *C. sp. nov. 2* se registraron en ambas localidades, pero únicamente representados por secuencias de esporomas.

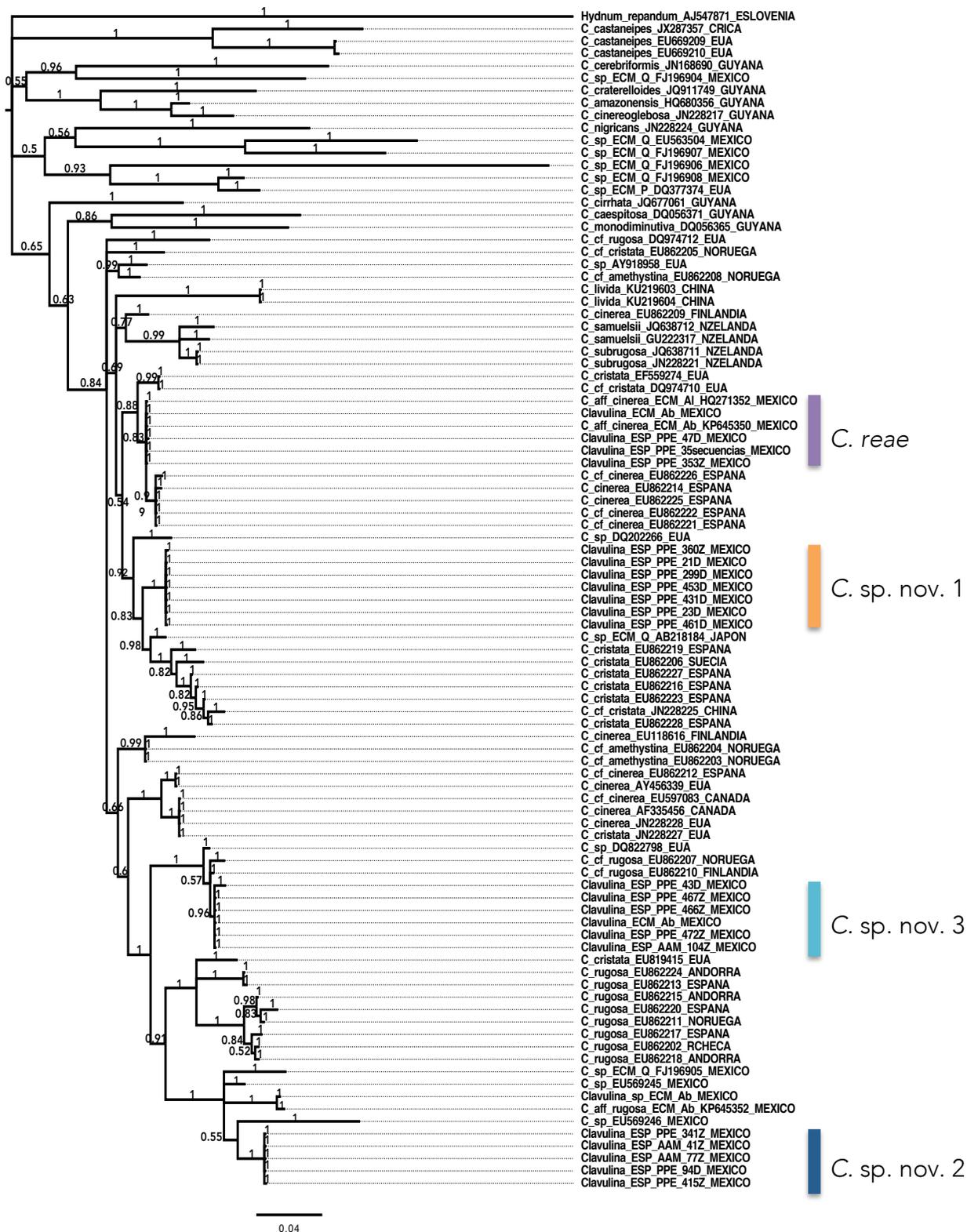


Figura 7.5. Árbol filogenético de las especies de *Clavulina* en las localidades de estudio. Se indican los valores de probabilidad posterior del análisis bayesiano. Se resaltan con las barras laterales en color las secuencias obtenidas en este trabajo. ECM= ectomicorriza; ESP= esporoma. Ab= *Abies*; Q= *Quercus*; Al= *Alnus*; P= *Pinus*.

7.5.2 Determinación taxonómica y descripción de las especies de *Clavulina*

En los representantes del clado de *Clavulina reae* se registró la mayor plasticidad macromorfológica en los patrones de ramificación de los basidiomas y la forma de los ápices (Apéndice V), con basidiomas simples o ramificados, ápices crestados, agudos, subagudos o romos. No obstante, todos los ejemplares en este clado presentan coloraciones grisáceo-moradas en alguna etapa de su desarrollo. Sin embargo, el tamaño de las basidiosporas fue en su mayoría de 8.0–9.0 μm de longitud (Fig. 7.6). Por su parte, el clado de *C. sp. nov. 1* presentó ejemplares con basidiomas de talla pequeña en comparación con las otras especies, así como ápices copiosamente crestados. Únicamente el ejemplar PPE-360 desarrolló basidiomas más grandes que el resto del clado y ápices agudos a subagudos. En este clado los ejemplares presentan las basidiosporas de menor tamaño (≤ 8.0 μm de longitud) en comparación con las otras tres especies (Fig. 7.6). *Clavulina sp. nov. 2* y *C. sp. nov. 3* son muy similares macromorfológicamente. Ambas desarrollan basidiomas escasamente ramificados y con ápices romos. Así mismo, comparten la característica de tener una coloración blanquecina homogénea en fresco, en todo el cuerpo del basidioma, pero al deshidratarse viran a tonalidades amarillo ocre. Estas dos especies presentan las basidiosporas de mayor tamaño (> 9.0 μm). La única diferencia entre *Clavulina sp. nov. 2* y *C. sp. nov. 3* es la presencia de cistidios esferopedunculados en la segunda, mismos que no habían sido descritos previamente en ninguna especie del género *Clavulina*.

Las basidiosporas de *Clavulina reae* presentan valores de Q que van desde 1.15–1.41 ($N= 32$), *C. sp. nov. 1* de 1.21–1.29 ($N= 7$), *C. sp. nov. 3* de 1.20–1.29 ($N= 5$) y *C. sp. nov. 2* de 1.19–1.23 ($N= 5$). El 94 % de las basidiosporas de todas las especies son de forma subglobosa, entre los límites de 1.15–1.35 (Fig. 7.7).

Una vez delimitadas las especies, se exploraron las diferencias en los tamaños de las basidiosporas. Como se observa en la figura 7.8, se encontraron diferencias significativas entre el largo ($H= 34.11$; $P<0.001$) y el ancho ($H= 33.10$; $P<0.001$) de las basidiosporas por especie. Únicamente no difirieron los tamaños de las basidiosporas de *Clavulina* sp. nov. 2 y *C. sp. nov. 3*; sin embargo, en comparación con *C. sp. nov. 1* y *C. reae* sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

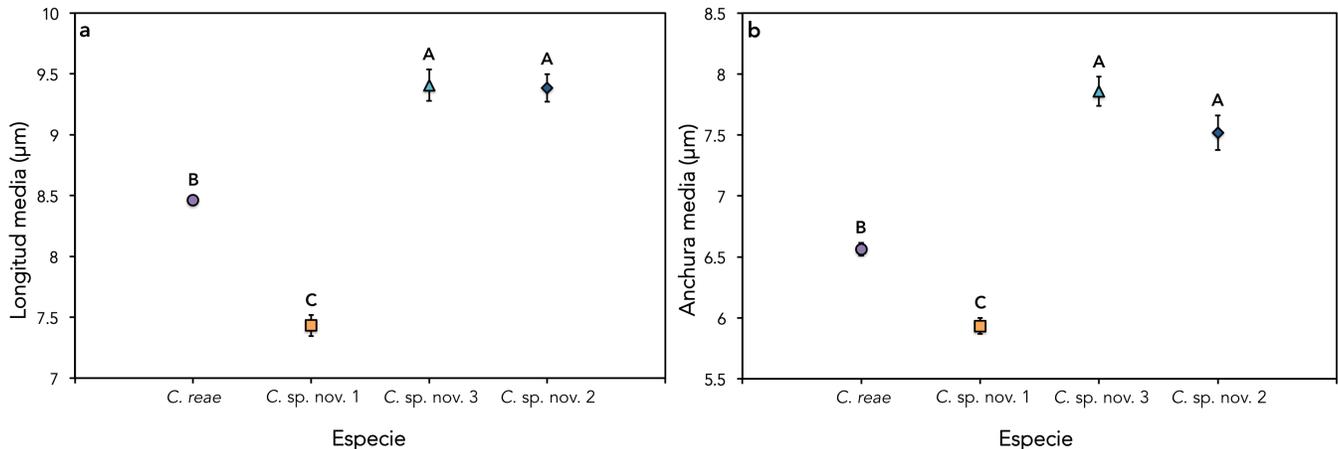


Figura 7.8. Diferencias en el tamaño de las basidiosporas por especie de *Clavulina*. a) longitud y b) ancho promedio (\pm error estándar). *Clavulina reae* (N= 32); *C. sp. nov. 1* (N= 7); *C. sp. nov. 2* (N= 5); *C. sp. nov. 3* (N= 5). Las letras señalan diferencias significativas.

7.5.2.1 *Clavulina reae* Olariaga

Descripción: basidiomas de 9–100 × 1–13 mm, algunos ramificados desde la base. En su mayoría con estípites, de 6–56 mm de longitud, superficie pubescente en la base y hasta el primer tercio, blanquecino (4A2) y liso. Ramificaciones primarias simples y gruesas (2–3 mm), politómicas y con axilas en forma de V y U, ligeramente comprimida de manera irregular, lisas, blanquecinas a amarillo pálido en la base (4A2–4B2), grises opacos hacia las ramas en los primeros estadios de desarrollo (5B2–6D3); ramificaciones secundarias en diferentes niveles, la mayoría de las ramas se recurvan ligeramente y en los que ramifican desde la base se recurvan de forma más pronunciada; a medida que el himenio madura, adquiere tonalidades grisáceo-moradas en las ramas primarias y secundarias (6C2–8C2) que pueden ser más oscuras (7D2–8D2), con tonalidades grisáceo-moradas más evidentes (10D2–11D2) en los esporomas maduros, aunque también se presentan en ejemplares jóvenes; ramas terminales alargadas y

aplanadas ligeramente hacia las puntas; ápices agudos a subagudos, recurvados, a veces romos y redondeados, o crestados y aplanados, blanquecinos (4A2) que se oscurecen al deshidratarse (6D3). Consistencia carnosafibrosa, contexto hueco y blanquecino (4A2). Olor dulce, sabor amargo en la mayoría.

Himenio anfígeno. Basidios de (25–)28–67(–79) × (4–)5–8(11) μm de (N= 1,050), cilíndricos a clavados, de pared delgada, hialinos, algunos con contenido oleoso, con fíbula basal, septo postpartal frecuente, (1–)2(–3) esterigmas, de (2.5–)4.5–7.5(9) μm de longitud (N= 1,050), recurvados. Sistema hifal monomítico, con hifas fibuladas, hialinas, de pared delgada. Hifas del subhimenio de (3–)4–8(–9.5) μm de diámetro (N= 1,050), hialinas, de pared delgada. Basidiosporas de (7.0–)7.3–9.2(–10.0) × (5.2–)5.5–7.5(–8.3) μm, [Lm= 8.0–8.9± 0.2–0.6, Am= 6.0–7.1± 0.2–0.6, \bar{Q} = 1.15–1.41± 0.05–0.13 (N= 960)], subglobosas, con un apéndice hilar corto, hialinas, algunas con contenido oleoso, de pared delgada, lisa.

Hábitat y hábito: terrícolas, humícolas y lignícolas, entre y sobre restos leñosos, en zonas cercanas a caminos y bordes, crecimiento gregario.



Figura 7.9. *Clavulina reae* Olariaga. a) Basidiomas ramificados, con ápices subagudos, de color grisáceo-morado, b) basidio bi-esterigmado con esterigmas curvos, c) microscopía electrónica de barrido (MEB) de la basidiospora, de pared lisa, apéndice hilar corto y obtuso, d) MEB del himenio, se observa un basidio bi-esterigmado con una espóra colapasada. Escalas en a= 1 cm, b= 20 μm, c–d= 1 μm.

7.5.2.2 *Clavulina* sp. nov. 1

Descripción: basidiomas de 8–42 × 1–8 mm, hasta de 40–96 × 5–10 mm. Estípite diferenciado o no, cuando presente de 3–12 mm, raras veces de 20–25 mm de longitud, pubescente y color blanquecino claro (1A2–2A2). Ramificaciones cilíndricas a irregularmente comprimidas, en su mayoría politómicas desde la base y con axilas en forma de V y U, lisas, con tonalidades beige claro (3A2–4A2), o ligeramente rosada (6A2) que vira a beige oscuro al deshidratarse (7C2–8D2), ramas adelgazadas abruptamente hacia la parte apical (<1–2 mm de grosor), ligeramente recurvadas y cortas, generalmente dispuestas en un solo plano; ápices aplanados, copiosamente crestados que al deshidratarse se oscurecen. Consistencia fibrosa a fibrosa-carnosa, contexto hueco y blanquecino (4A2). Olor ligeramente dulce y sabor inapreciable (algunos pueden ser ligeramente amargos).

Himenio anfígeno. Basidios de (31.5–)37–55(–72) × (4–)5–7(7.5) μm (N= 210), cilíndricos a clavados, de pared delgada, hialinos, con fíbula basal, septo postpartal casi ausente, 2(–3) esterigmas por basidio, de (4–)4.5–6.5(–9) μm de longitud (N= 210), recurvados. Sistema hifal monomítico, con hifas fibuladas, hialinas. Hifas del subhimenio de (3.5–)4–5.5(–6) μm de diámetro (N= 210), hialinas, de pared delgada. Basidiosporas de (6.2–)6.8–8.1(–8.8) × (4.9–)5.4–6.6(–6.9) μm [Lm= 7.1–7.7 ± 0.3–0.5, Am= 5.8–6.2 ± 0.3–0.5, \bar{Q} = 1.21–1.29 ± 0.06–0.11 (N= 210)], subglobosas, hialinas, de pared delgada, lisa, con un apéndice hilar corto.

Hábitat y hábito: terrícolas, principalmente a la orilla de caminos, gregarios.

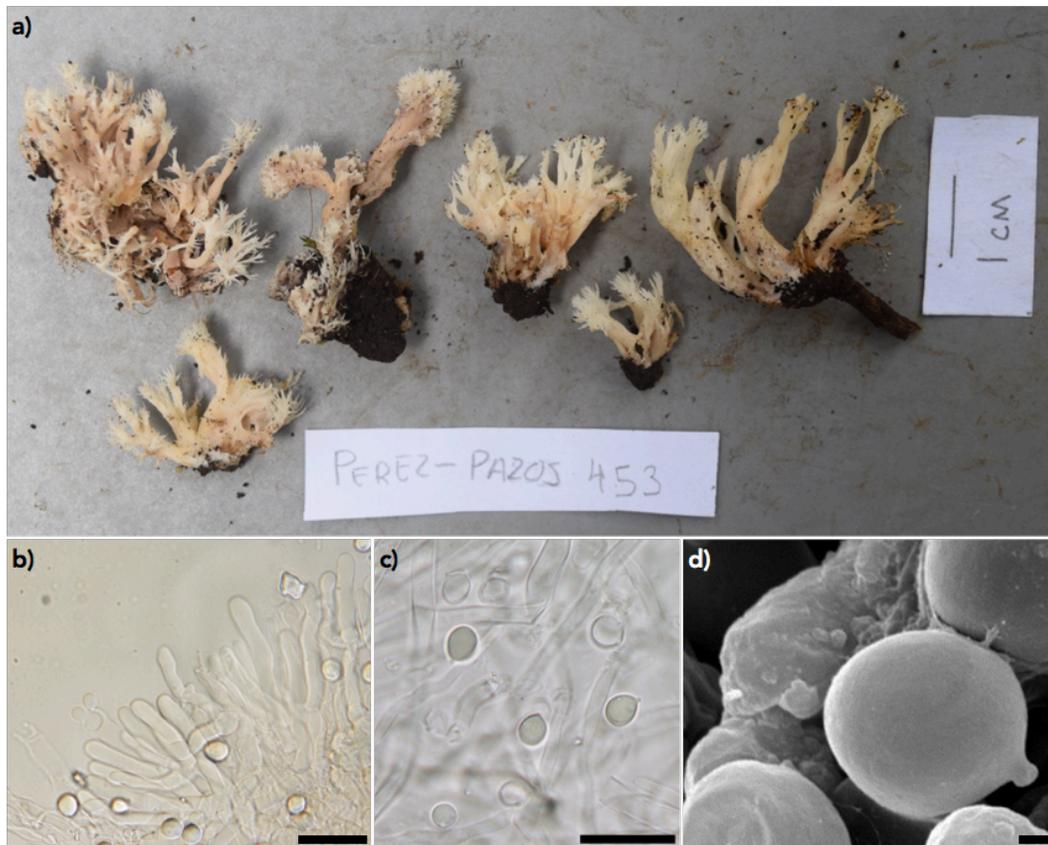


Figura 7.10. *Clavulina* sp. nov. 1. a) Basidiomas pequeños y copiosamente crestados, b) basidios bi-esterigmados con esterigmas curvos, c) basidiosporas subglobosas d) microscopía electrónica de barrido (MEB) de las basidiosporas, apéndice hilar pequeño y obtuso. Escalas en a= 1 cm, b-c= 20 μ m, d= 1 μ m.

7.5.2.4 *Clavulina* sp. nov. 2

Descripción: basidiomas de 7–74 \times 1–5 mm. Estípite de 19–53 mm de longitud, ligeramente pubescente y blanquecino (3A2–4A2). Ramificaciones escasas, simples, dispuestas en el último tercio del basidioma, con axilas en forma de V, más cercanas al ápice; cilíndricas, algunas ligeramente comprimidas, politómicas de manera abrupta, ápices simples, pocas veces crestados y aplanados, coloración homogénea, blanquecinas a amarillo muy claro casi indistinguible (3A2–4A2), al deshidratarse amarillo ocre. Consistencia carnosafibrosa, contexto blanquecino, sólido, en algunos hueco y consistencia esponjosa. Olor en algunos ligeramente dulce, sabor inapreciable.

Himenio anfígeno. Basidios de (50–)56–74(–83.5) \times 6–8(–9) μ m ($N= 150$), cilíndricos a clavados, de pared delgada, hialinos, con fíbula basal, septo postpartal escaso, 2(–3) esterigmas por basidio, de (4.5–)5–7.5(–8.5) μ m de longitud ($N= 150$), recurvados. Sistema hifal

monomítico, con hifas fibuladas, hialinas. Hifas del subhimenio de (4–)4.5–6(–6.5) μm de diámetro, hialinas, de pared delgada ($N=140$). Basidiosporas de (8.4–)9.0–9.9(–10.7) \times (6.8–)7.1–8.8(–9.4) μm [$L_m=9.1–9.8 \pm 0.3–0.5$, $A_m=7.5–8.2 \pm 0.3–0.5$, $\bar{Q}=1.19–1.23 \pm 0.04–0.07$ ($N=150$)], subglobosas, hialinas, de pared delgada, lisa, con apéndice hilar corto.

Hábitat y hábito: terrícolas, humícolas y lignícolas, sobre restos de madera con pudrición café, gregarios.



Figura 7.11. *Clavulina* sp. nov. 2. a) Basidiomas simples, blanquecinos, b) basidios bi-esterigmados con esterigma curvos y basidio con septo postpartal, c) basidiosporas subglobosas. Escalas en a= 1 cm, b-c= 20 μm .

7.5.2.3 *Clavulina* sp. nov. 3

Descripción: basidiomas de 10–84 \times 1–5 mm. Estípite de 8–37 mm de longitud, liso y de color blanquecino (2A2–4A2). Ramificaciones escasas, rectas, gruesas (>3 mm de diámetro), cilíndricas a subaplanadas irregularmente, lisas, con axilas en forma de V y U, algunos con surcos superficiales, blanquecinas (2A2–4A2) a beige-claro (5A2), en algunos ejemplares con zonas un poco más oscuras (4A3), en estadios jóvenes blancas homogéneas; culmina en ramificaciones aplanadas, ápices agudos, subagudos y redondeados, pocos crestados, de color café por deshidratación. Consistencia fibrosa-carnosa, contexto hueco. Olor ligeramente dulce, sabor inapreciable.

Himenio anfrígeno. Basidios de (32-)40-70(-81.5) × (4.5-)6-7.5(-9) μm (N= 150), cilíndricos a clavados, de pared delgada, hialinos, pocos con contenido oleoso, con fíbula basal, septo postpartal poco frecuente, 2 esterigmas por basidio, de (4-)4.5-9(-9.5) μm de longitud (N= 150), recurvados. Sistema hifal monomítico, con hifas fibuladas, hialinas. Hifas del subhimenio hialinas, de pared delgada, de (4-)4.5-6(-7.5) μm de diámetro (N= 90). Cistidios de 31-50 × 11.5-22 μm, esferopedunculados, globosos. Basidiosporas de (7.7-)8.8-9.9(-10.4) × (6.3-)6.8-8.4(-8.8) μm [Lm= 8.9-9.6± 0.2-0.5, Am= 7.2-8.0± 0.3-0.5, \bar{Q} = 1.20-1.29± 0.04-0.07 (N= 150)], subglobosas, hialinas, de pared delgada, lisa, con apéndice hilar corto. Hábitat y hábito: terrícolas y lignícolas, en suelo y restos de madera en descomposición, junto a *Abies religiosa*, gregarios.

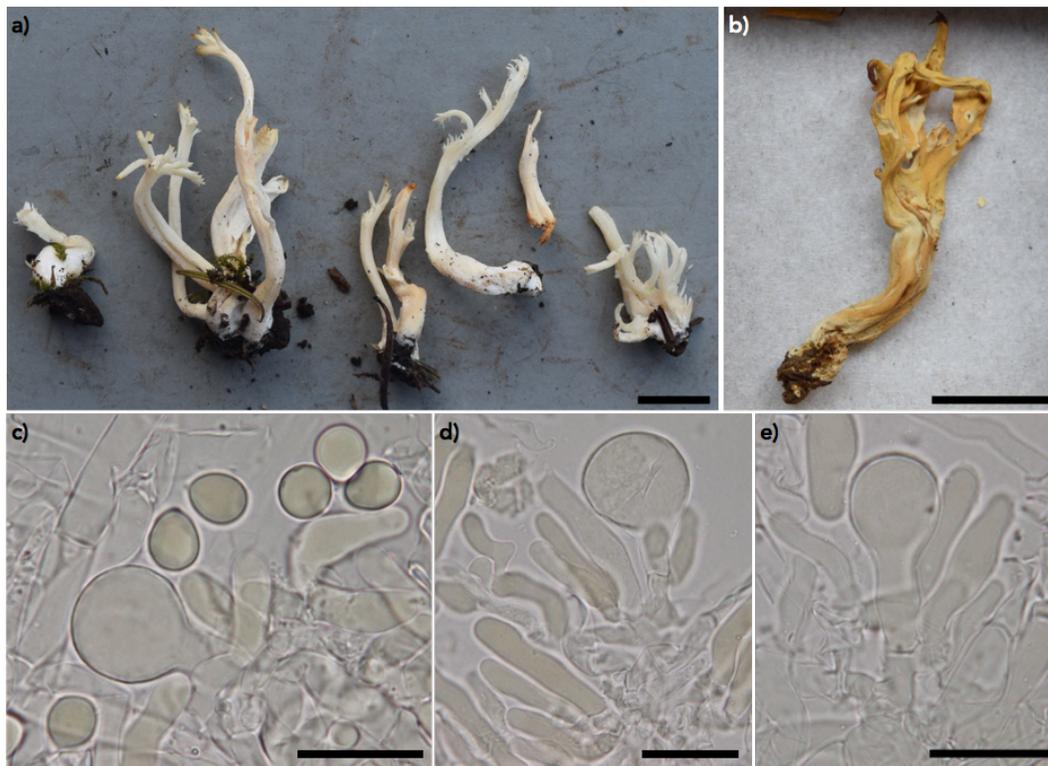


Figura 7.12. *Clavulina* sp. nov. 3. a) Basidiomas escasamente ramificados, blancos con ápices agudos, b) basidioma deshidratado amarillo ocre, c) basidiosporas subglobosas y cistidio esferopedunculado, d-e) cistidios esferopedunculados, hialinos y globosos. Escalas en a-b= 1 cm, c-e= 20 μm.

7.6 Disyuntivas ecológicas del género en bosques de *Abies religiosa*

7.6.1 Formación de basidiomas

De agosto a noviembre de 2015 se recolectaron 112 ejemplares de *Clavulina* entre los dos sitios (Tabla 7.6). En la parcela 2 de El Zarco no se registró la producción de basidiomas durante el muestreo, mientras que en las otras dos parcelas, así como en las tres parcelas de El Pantano, se observó la producción de basidiomas durante al menos tres de los cuatro meses que duró el muestreo (Apéndice IV). En términos de la biomasa en peso seco, el pico de producción mas alto para El Pantano se tuvo en el mes de agosto, mientras que en El Zarco, fue en el mes de noviembre cuando se acumuló mayor biomasa.

Tabla 7.6. Número de recolectas y biomasa en peso seco de ejemplares de *Clavulina*.

Localidad	Parcela	Frecuencia					Biomasa (g)				
		Ago	Sep	Oct	Nov	Total	Ago	Sep	Oct	Nov	Total
El Zarco	1	1	1	3	8	13	0.23	0.10	0.21	1.31	1.85
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	2	2	3	0	7	0.26	0.20	0.32	0	0.88
	Fuera	9	0	2	3	14	–	–	–	–	–
	Total-Zarco	12	3	8	11	34	–	–	–	–	–
El Pantano	1	5	5	2	5	17	7.71	0.50	0.79	0.40	9.40
	2	5	5	0	7	17	1.51	0.44	0	1.13	3.07
	3	4	1	0	4	9	0.47	0.02	0	0.41	0.90
	Fuera	5	9	9	12	35	–	–	–	–	–
	Total-Pantano	19	20	11	28	78	–	–	–	–	–
Total-conjunto		31	23	19	39	112	–	–	–	–	–

Ago= agosto, Sep= septiembre, Oct= octubre, Nov= noviembre. "Fuera" son las recolectas realizadas fuera de las parcelas. "Total-Zarco", "Total Pantano" y "Total conjunto" es la suma de recolectas realizadas en El Zarco, en El Pantano y en los dos sitios, respectivamente. Únicamente se pesaron los ejemplares recolectados en las parcelas de muestreo.

Al comparar el número de recolectas entre sitios se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto para la frecuencia de basidiomas ($U= 37$; $P<0.05$) como para la biomasa en peso seco de los mismos ($U= 33$; $P<0.05$), tal como se observa en la tabla 7.7. Esto quiere decir

que la producción de basidiomas y la biomasa que acumulan los mismos, es mayor en El Pantano que en El Zarco (Fig. 7.13).

Tabla 7.7. Prueba de U de Mann-Whitney de la frecuencia y biomasa de basidiomas entre sitios. Los valores estadísticamente significativos aparecen en rojo.

	SR para ZAR	SR para PAN	U	Z	P
Frecuencia	115	185	37	-2.021	0.043
Biomasa	111	189	33	-2.252	0.024

SR= suma de rangos; ZAR= El Zarco; PAN= El Pantano; U= estimador de la prueba de U de Mann-Whitney; P= significancia de 0.05; N= 12 para cada sitio.

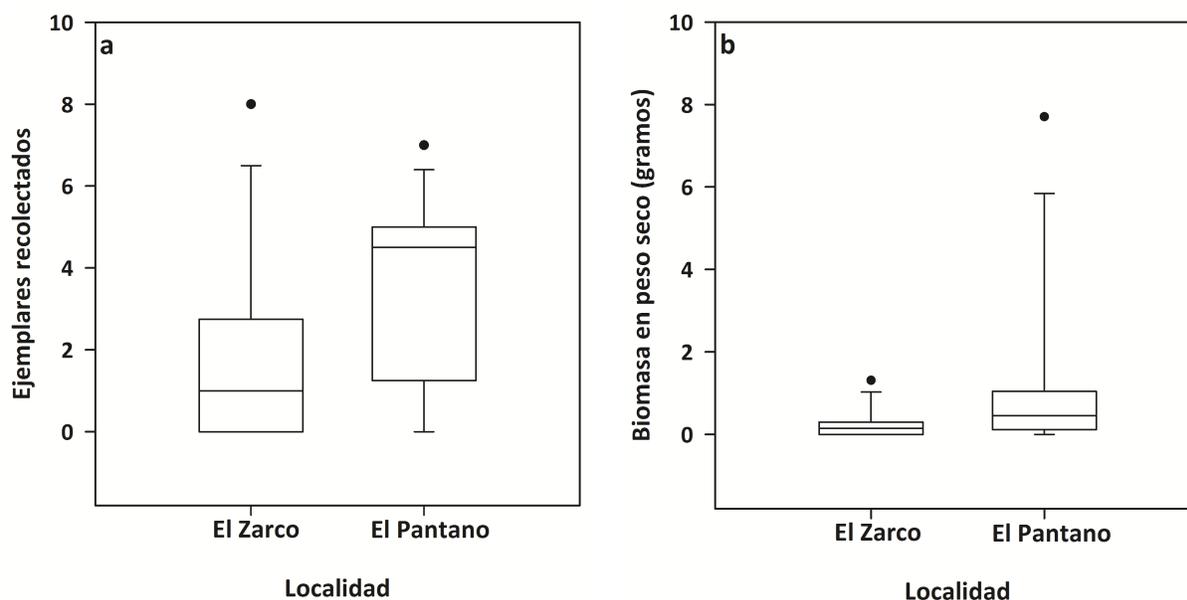


Figura 7.13. Ejemplares recolectados y biomasa en peso seco por localidad. Se comparan el número de recolectas (a) y su biomasa (b) en tres parcelas de 20 × 20 m por sitio de estudio. N= 12 por sitio.

7.6.2 Formación de ectomicorrizas

De las 274 secuencias útiles, 47 correspondieron a ectomicorrizas del género *Clavulina*, 42 a *C. reae*, cuatro a *C. sp. nov.* 2 y una ectomicorriza no correspondió a ninguna especie del trabajo, por lo que se designó *Clavulina sp.* (Tabla 7.8). Esta última secuencia tuvo una longitud de 424 pb, razón por la cuál es probable que no correspondiera a ningún taxón en los análisis.

Tabla 7.8. Ectomicorrizas de especies de *Clavulina* por sitio.

	Parcela						Total
	1Z	2Z	3Z	1P	2P	3P	
<i>C. reae</i>	11	3	0	8	17	3	42
<i>C. sp. nov. 2</i>	4	0	0	0	0	0	4
<i>C. sp.</i>	1	0	0	0	0	0	1
Total	16	3	0	8	17	3	47

1Z, 2Z, 3Z= Parcelas de El Zarco, 1P, 2P, 3P= Parcelas de El Pantano.

Al comparar el número de ectomicorrizas de *Clavulina* recolectadas entre los sitios, no se encontraron diferencias significativas ($U= 2.5$; $P>0.05$). Esto quiere decir que la cantidad de ectomicorrizas recolectadas del género, no difiere entre los sitios de muestreo (Tabla 7.9).

Tabla 7.9. Prueba de U de Mann-Whitney del número de ectomicorrizas de *Clavulina* entre sitios.

	SR para Z	SR para P	U	Z	P
Ectomicorrizas <i>Clavulina</i>	8.5	12.5	2.5	-0.873	0.383

SR= suma de rangos; Z= El Zarco; P= El Pantano; U= estimador de la prueba de U de Mann-Whitney; P= significancia de 0.05; N= 3 para cada sitio.

7.7 Características microambientales de las recolectas de *Clavulina*

Los datos de las variables microambientales se obtuvieron a partir de 60 sitios de recolectas de *Clavulina*. En la tabla 7.10 se muestran los valores promedio, máximos y mínimos de cada variable por localidad. Así mismo se muestran los valores registrados *Clavulina reae*, la cuál fue la más abundante de las cuatro especies registradas (Tabla 7.11). El dato más variable fue la radiación solar superficial (RSS) y fue más amplio en El Pantano. La temperatura (T) en ambos sitios fue similar, y la humedad relativa del aire (HR) registró los valores más bajos para los basidiomas recolectados en El Pantano. Finalmente, el contenido de agua en el suelo (CAS) no fue diferente entre ambas localidades.

Los análisis de correlación indicaron valores significativos entre la frecuencia de los basidiomas de *Clavulina* y la RSS ($r_s= 0.857$; $P= 0.014$); por otra parte no se obtuvieron correlaciones significativas entre la frecuencia de los basidiomas de *Clavulina* y la T ($r_s= 0.666$;

$P= 0.102$), la HR ($r_6= 0.643$; $P= 0.120$), ni el CAS ($r_6= 0.643$; $P= 0.120$). Todas las variables microambientales mostraron un patrón en el cual, alcanzan un valor máximo en la distribución de frecuencias, por encima y por debajo del cual, la frecuencia de basidiomas disminuye. Para la RSS, el pico máximo de la frecuencia se presentó entre los 10–20 W/m²; para la T este pico se encontró entre los 12–14 °C; para la HR el máximo estuvo entre el 85–90 %; y para el CAS el valor más alto se encontró entre el 25–30 %. Lo anterior se observó para los basidiomas de todo el género y para los basidiomas de *Clavulina reae* (Fig. 7.14).

Tabla 7.10. Datos microambientales para la producción de los basidiomas de *Clavulina* spp.

Localidad		RSS (W/m ²)	T (°C)	HR (%)	CAS (m ³ /m ³)	Ns
El Pantano	\bar{X} (\pm d.e.)	14.41 (\pm 10.12)	12.86 (\pm 2.03)	83.18(\pm 5.34)	0.28(\pm 0.07)	42
	Max	49.64	17.98	90.93	0.42	
	Min	2.65	9.08	67.24	0.05	
El Zarco	\bar{X} (\pm d.e.)	12.40 (\pm 7.00)	12.70 (\pm 1.63)	83.53(\pm 4.46)	0.28(\pm 0.09)	18
	Max	23.89	17.09	91.09	0.39	
	Min	1.55	9.97	75.30	0.05	
\bar{X}_{TOTAL} (\pm d.e.)		13.81 (\pm 9.28)	12.81 (\pm 1.91)	83.28(\pm 5.05)	0.28(\pm 0.08)	60

\bar{X} (\pm d.e.)= promedio más una medida de desviación estándar; Max= valores máximos; Min= valores mínimos; \bar{X}_{TOTAL} (\pm d.e.)= promedio de todos los datos más una medida de desviación estándar. RSS (W/m²)= radiación solar superficial, T (°C)= temperatura del suelo a 5 cm de profundidad, HR (%)= humedad relativa del aire, CAS (m³/m³)= contenido de agua en el suelo a 5 cm de profundidad. Ns= tamaño de muestra con sensores.

Tabla 7.11. Datos microambientales para la producción de los basidiomas de *Clavulina reae*.

Localidad		RSS (W/m ²)	T (°C)	HR (%)	CAS (m ³ /m ³)	Ns
El Pantano	\bar{X} (\pm d.e.)	15.13 (\pm 10.42)	13.37 (\pm 1.98)	82.04 (\pm 5.98)	0.27 (\pm 0.08)	28
	Max	49.64	17.98	90.93	0.42	
	Min	2.65	9.08	67.24	0.05	
El Zarco	\bar{X} (\pm d.e.)	12.77 (\pm 7.59)	12.72 (\pm 2.05)	83.44 (\pm 4.83)	0.29 (\pm 0.06)	10
	Max	23.89	17.09	91.09	0.39	
	Min	1.55	9.97	75.3	0.2	
\bar{X}_{TOTAL} (\pm d.e.)		14.51 (\pm 9.71)	13.20 (\pm 1.99)	82.41 (\pm 5.67)	0.27 (\pm 0.08)	38

\bar{X} (\pm d.e.)= promedio más una medida de desviación estándar; Max= valores máximos; Min= valores mínimos; \bar{X}_{TOTAL} (\pm d.e.)= promedio de todos los datos más una medida de desviación estándar. RSS (W/m²)= radiación solar superficial, T (°C)= temperatura del suelo a 5 cm de profundidad, HR (%)= humedad relativa del aire, CAS (m³/m³)= contenido de agua en el suelo a 5 cm de profundidad. Ns= tamaño de muestra con sensores.

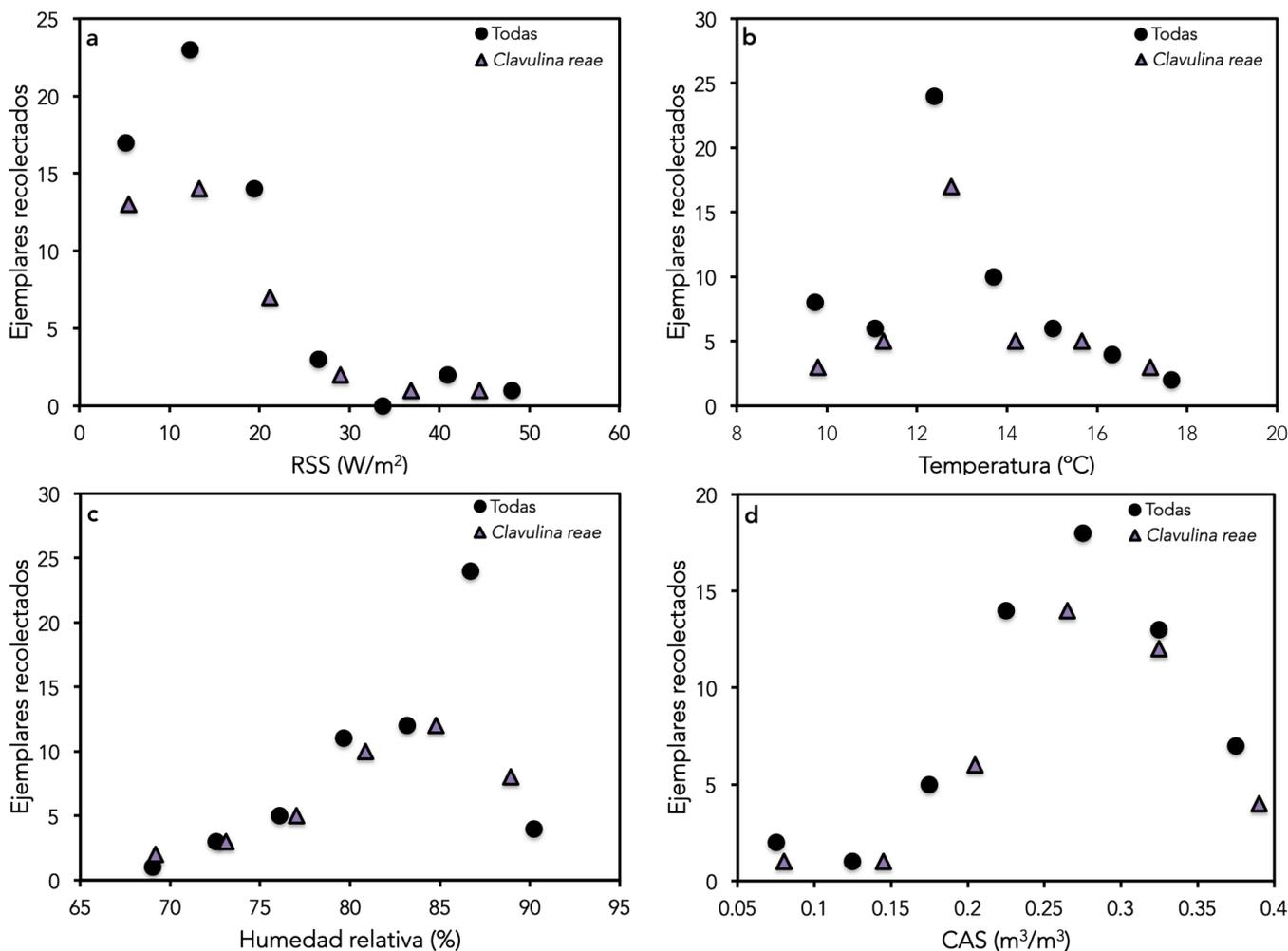


Figura 7.14. Variables microambientales asociadas a la producción de basidiomas de *Clavulina* en bosques de *Abies religiosa*. Relación entre el número de ejemplares recolectados de todas las especies de *Clavulina* (círculos) y de *C. reae* (triángulos) y a) la radiación solar superficial (RSS), b) temperatura del suelo a 5 cm de profundidad, c) humedad relativa del aire y d) contenido de agua en el suelo a 5 cm de profundidad (CAS).

7.8 Ecofisiología isotópica de *Clavulina* en bosques de *Abies religiosa*

En general, las proporciones C:N fueron en decremento desde los restos leñosos (42.09–86.27), a las acículas de los árboles hospederos (19.01–29.31), a los HSAP (5.08–19.48) y finalmente a los HECM (8.78–12.41). Los resultados de los valores isotópicos de los materiales seleccionados (ver sección 6.6) se muestran en la tabla 7.12. Únicamente los valores isotópicos de ^{15}N para los restos leñosos no pudieron ser obtenidos, debido a la baja concentración de N en estos residuos (0.60–1.10 %N). El $\delta^{15}\text{N}$ de los árboles hospederos fue de -3.27 a -1.93 ‰ y el

de $\delta^{13}\text{C}$ de -31.81 a -29.36 ‰, por su parte los HECM, mostraron el $\delta^{15}\text{N}$ de 2.07 a 11.02 ‰ y de $\delta^{13}\text{C}$ de -26.34 a -25.40 ‰, mientras que los HSAP mostraron $\delta^{15}\text{N}$ de -3.84 a 1.26 ‰ y $\delta^{13}\text{C}$ de -23.57 a -21.54 ‰ (Fig. 7.15).

El $\delta^{15}\text{N}$ (promedio= $-2.41 \pm$ desviación estándar= 0.58 ‰) y de $\delta^{13}\text{C}$ (-30.32 ± 0.98 ‰) de las acículas de los árboles hospederos fueron bajos en comparación con los de los HECM ($\delta^{15}\text{N}= 5.22 \pm 4.09$ ‰, $\delta^{13}\text{C}= -25.88 \pm 0.43$ ‰; $N= 4$), de los HSAP ($\delta^{15}\text{N}= -0.83 \pm 2.17$ ‰, $\delta^{13}\text{C}= -22.93 \pm 0.96$ ‰; $N= 4$) y de los esporomas de *Clavulina* ($\delta^{15}\text{N}= 1.46 \pm 1.81$ ‰, $\delta^{13}\text{C}= -25.49 \pm 0.86$ ‰; $N= 29$) (Fig. 7.15).

Dentro de los HECM, el $\delta^{15}\text{N}$ más elevado correspondió a *Tylophilus porphyrosporus* mientras que las especies de *Russula* e *Inocybe* sp. 1 mostraron valores menores (Tabla 7.12). En términos del $\delta^{15}\text{N}$, los HECM mostraron un dato mayor (8.95 ‰) en comparación con la de los HSAP (5.10 ‰). En contraste, dentro de los HSAP el valor más alto de $\delta^{13}\text{C}$ y más bajo de $\delta^{15}\text{N}$ lo registró *Cyptotrama asprata*, que crece en restos leñosos, mientras que las especies de *Marasmius* y *Agaricus* sp. 1, que se desarrollan sobre mantillo y suelo, respectivamente, tuvieron valores más bajos de $\delta^{13}\text{C}$ y menos disminuidos de $\delta^{15}\text{N}$. En términos del $\delta^{13}\text{C}$, los HECM fueron más altos (0.94 ‰) en comparación con los HSAP (2.03 ‰).

Los 29 ejemplares de *Clavulina* tuvieron $\delta^{15}\text{N}$ de -2.93 ‰ a 5.82 ‰, con un promedio para los basidiomas de El Zarco de 0.99 ± 2.17 ‰ ($N= 15$), mientras que para los basidiomas de El Pantano fue de 1.96 ± 1.22 ‰ ($N= 14$). En términos del $\delta^{13}\text{C}$ se registraron valores de -27.65 ‰ a -23.85 ‰, con un promedio para los basidiomas de El Zarco de -25.67 ± 0.77 ‰ ($N= 15$), mientras que para los basidiomas de El Pantano fue de -25.31 ± 0.95 ‰ [($N= 14$) (Fig. 7.15)]. Como se observa en la figura 7.15, los valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de *Clavulina* de los dos sitios se encuentran intermedios entre los valores de los HSAP y de los HECM.

Si bien los ejemplares de *Clavulina* recolectados en El Pantano se encuentran enriquecidos de $\delta^{13}\text{C}$ con respecto a los ejemplares recolectados en El Zarco, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($t_{0.05,27}= 1.12$; $P>0.05$). Por su parte, los ejemplares de El Pantano se encontraron enriquecidos de $\delta^{15}\text{N}$, con respecto a los de El Zarco, sin ser tampoco estas diferencias estadísticamente significativas ($t_{0.05,27}= 1.47$; $P>0.05$).

Tabla 7.12. $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de las muestras biológicas.

Especie	Ejemplar	Loc	Sus	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIRE}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	%N	%C	C:N	GF
<i>C. reae</i>	PPE-388	P	H,T	2.32	-25.79	5.83	44.97	7.71	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-368	P	L	0.86	-24.24	5.54	45.78	8.27	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-454	P	L,T	3.19	-24.82	6.05	44.77	7.40	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-371	P	H,T	2.29	-24.64	6.16	45.06	7.32	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-338	P	L,T	3.49	-25.91	4.79	42.37	8.85	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-342	P	T	0.82	-25.10	4.27	42.11	9.86	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-458	P	T	2.66	-25.95	4.38	43.22	9.87	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-463	P	H,T	1.88	-25.51	4.26	43.13	10.12	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-425	P	T	0.43	-23.85	4.16	43.01	10.34	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-480	P	T	4.72	-25.89	5.32	42.50	7.99	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-485	P	H,T	1.20	-27.65	4.37	43.01	9.84	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-393	P	T	1.25	-24.46	3.52	42.25	12.00	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-447	Z	L	4.50	-26.86	4.36	44.16	10.13	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-361	Z	T	1.04	-25.57	5.60	43.98	7.85	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-441	Z	T	1.09	-25.68	5.04	45.86	9.10	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-468	Z	H,T	2.00	-25.91	4.47	43.82	9.81	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-383	Z	L,T	0.16	-25.76	5.49	45.42	8.27	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-353	Z	L,T	1.09	-25.26	5.43	41.26	7.60	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-352	Z	L	0.38	-25.31	4.59	40.57	8.84	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-354	Z	T	-0.06	-25.80	4.77	39.35	8.25	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-356	Z	L,T	1.58	-24.78	5.64	41.57	7.37	HECM
<i>C. reae</i>	PPE-475	Z	L,T	5.82	-27.36	5.14	42.06	8.18	HECM
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-431	P	T	1.20	-25.28	4.81	42.01	8.73	HECM
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-461	P	T	1.11	-25.22	4.76	42.02	8.83	HECM
<i>C. sp. nov. 1</i>	PPE-360	Z	T	0.21	-25.18	4.28	42.76	9.99	HECM
<i>C. sp. nov. 2</i>	PPE-341	Z	L	-2.93	-26.11	4.25	42.53	10.01	HECM
<i>C. sp. nov. 3</i>	PPE-467	Z	L,T	1.48	-25.96	4.45	42.08	9.46	HECM
<i>C. sp. nov. 3</i>	PPE-472	Z	H	0.64	-24.16	4.66	42.18	9.05	HECM
<i>C. sp. nov. 3</i>	PPE-466	Z	T	-2.19	-25.31	3.92	43.05	10.98	HECM
<i>Cyptotrama asprata</i>	PPE-496	P	L	-3.84	-21.54	2.21	43.05	19.48	HSAP
<i>Inocybe sp. 1</i>	PPE-626	Z	T	2.07	-26.34	4.87	42.78	8.78	HECM
<i>Russula sp. 1</i>	PPE-632	P	T	2.65	-26.14	3.45	42.82	12.41	HECM
<i>Marasmius sp. 1</i>	PPE-624	Z	L	1.26	-23.05	6.74	40.34	5.99	HSAP
<i>Tylopilus porphyrosporus</i>	MRGA-02	P	T	11.02	-25.40	7.98	44.32	5.55	HECM
<i>Marasmius sp. 2</i>	LORANT-01	P	H	-0.74	-23.56	8.63	43.84	5.08	HSAP
<i>Agaricus sp. 1</i>	AAM-124	Z	T	0.00	-23.57	7.86	46.68	5.94	HSAP
<i>Russula sp. 2</i>	AAM-125	Z	T	5.16	-25.65	5.00	45.80	9.16	HECM
<i>Abies religiosa</i>	-	P	-	-1.93	-29.36	2.52	47.81	19.01	-
<i>Abies religiosa</i>	-	P	-	-2.74	-29.55	2.25	46.10	20.48	-
<i>Abies religiosa</i>	-	Z	-	-2.07	-31.81	1.84	46.84	25.44	-

<i>Abies religiosa</i>	–	Z	–	-3.27	-30.58	1.65	48.42	29.31	–
<i>Pinus</i> sp.	–	P	–	-2.01	-30.30	2.37	47.98	20.28	–
Resto leñoso	–	Z	–	ND	-25.75	1.10	46.09	42.09	–
Resto leñoso	–	P	–	ND	-26.59	0.60	51.49	86.27	–
Resto leñoso	–	P	–	ND	-24.15	0.76	48.28	63.77	–

Esporomas de *Clavulina*, acículas, restos leñosos, hongos ectomicorrizógenos (HECM) y hongos saprótrofos (HSAP). Los valores isotópicos están en partes por mil (‰). Loc= localidad; Z= El Zarco, P= El Pantano. Sus= sustrato; L= lignícola, H= humícola, T= terrícola. GF= grupo funcional (*sensu* Tedersoo et al., 2010).

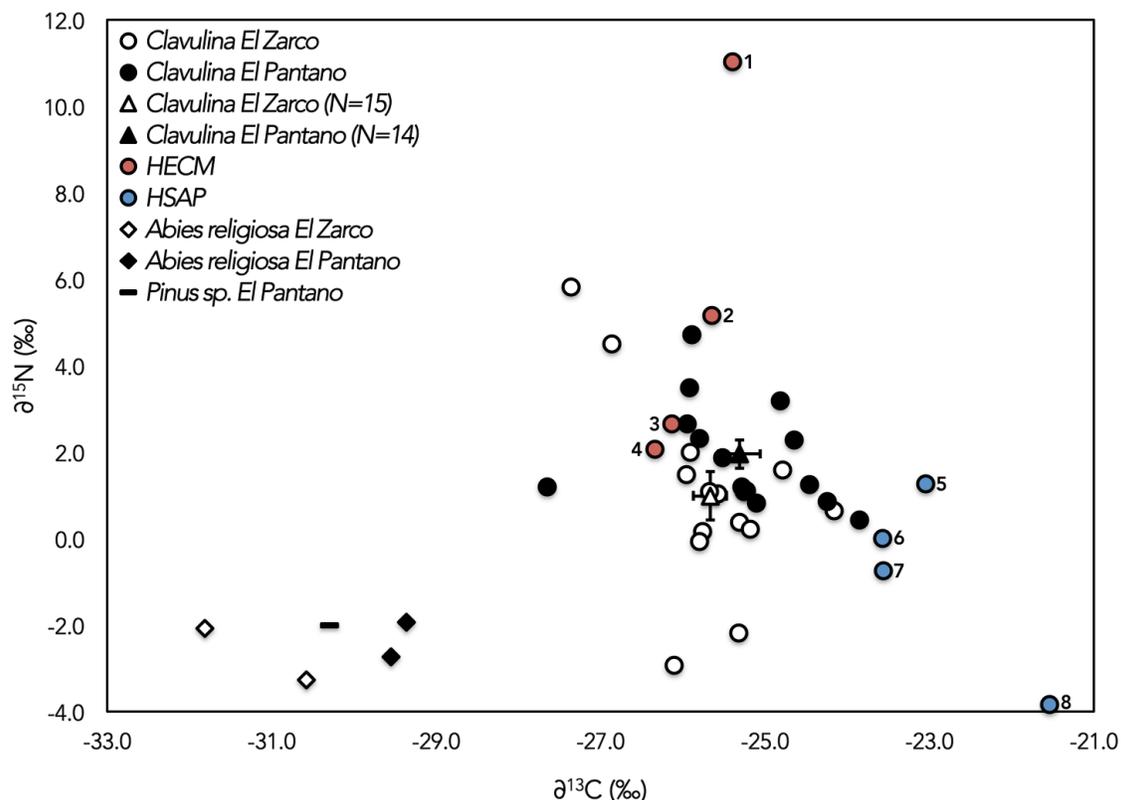


Figura 7.15. $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de las muestras biológicas. Se muestran los valores obtenidos para los árboles hospederos, para los basidiomas de *Clavulina* y para los esporomas de los HECM (1= *Tylophorus porphyrosporus*, 2= *Russula* sp. 1, 3= *Russula* sp. 2, 4= *Inocybe* sp. 1) y los HSAP (5= *Marasmius* sp. 1, 6= *Agaricus* sp. 1, 7= *Marasmius* sp. 2 y 8= *Cyptotrama asprata*). Los triángulos representan valores promedio y las barras errores estándar. Los símbolos en negro provienen de El Pantano y en blanco de El Zarco.

Los HECM mostraron valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ promedio enriquecidos en comparación con los HSAP; en términos del $\delta^{13}\text{C}$, los HECM estuvieron disminuidos en comparación con los HSAP (Fig. 7.15). Al ser comparados con los valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de los ejemplares de *Clavulina* por sitio, se encontraron diferencias significativas en el

$\delta^{15}\text{N}$ de *Clavulina* de ambos sitios y los HSAP, al compararse contra los HECM ($F_{3,33}= 6.15$; $P<0.01$). En contraste, se encontraron diferencias significativas en el $\delta^{13}\text{C}$ de *Clavulina* de ambos sitios y los HECM, al compararse contra los HSAP ($F_{3,33}= 12.16$; $P<0.0001$) (Fig. 7.16).

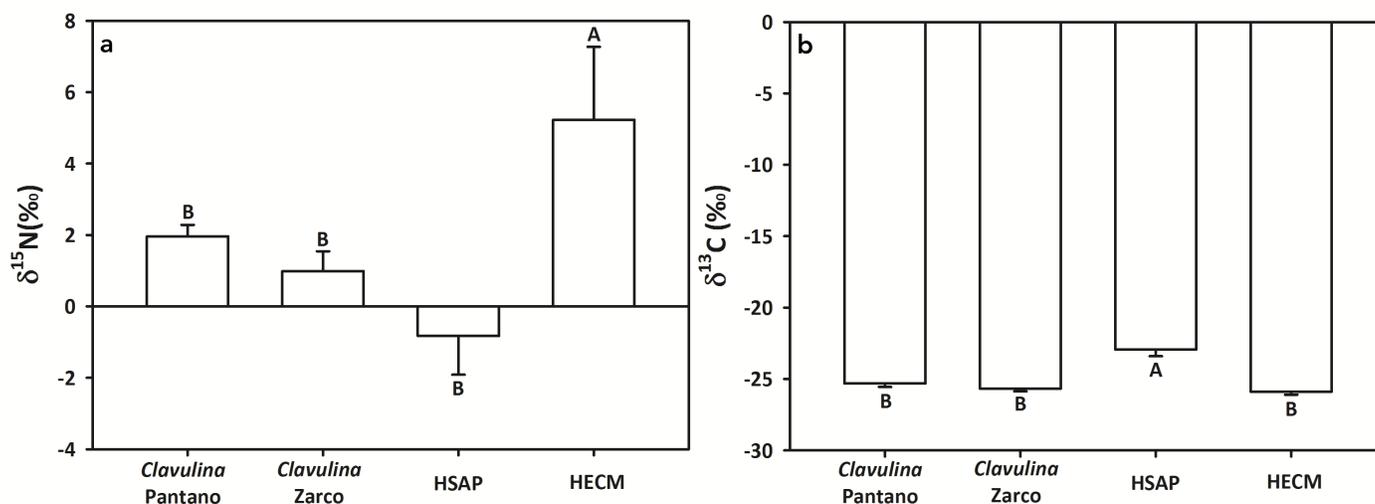


Figura 7.16. ANOVA de los valores isotópicos promedio de *Clavulina* por sitio. a) $\delta^{15}\text{N}$ y b) $\delta^{13}\text{C}$ de los basidiomas de *Clavulina* por sitio, de los HECM y los HSAP. Las letras representan diferencias significativas a un nivel de significancia de 0.05.

Se compararon los valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ para las especies de *Clavulina* que tenían al menos tres ejemplares con datos isotópicos. En este caso fueron *Clavulina reae* ($N=22$), *C. sp. nov. 1* ($N=3$) y *C. sp. nov. 3* ($N=3$). Dado que no se registraron diferencias en las huellas isotópicas de *Clavulina* a nivel de género entre los sitios (Fig. 7.16), únicamente se compararon a nivel de especie sin considerar el sitio en el que se recolectaron (Fig. 7.17).

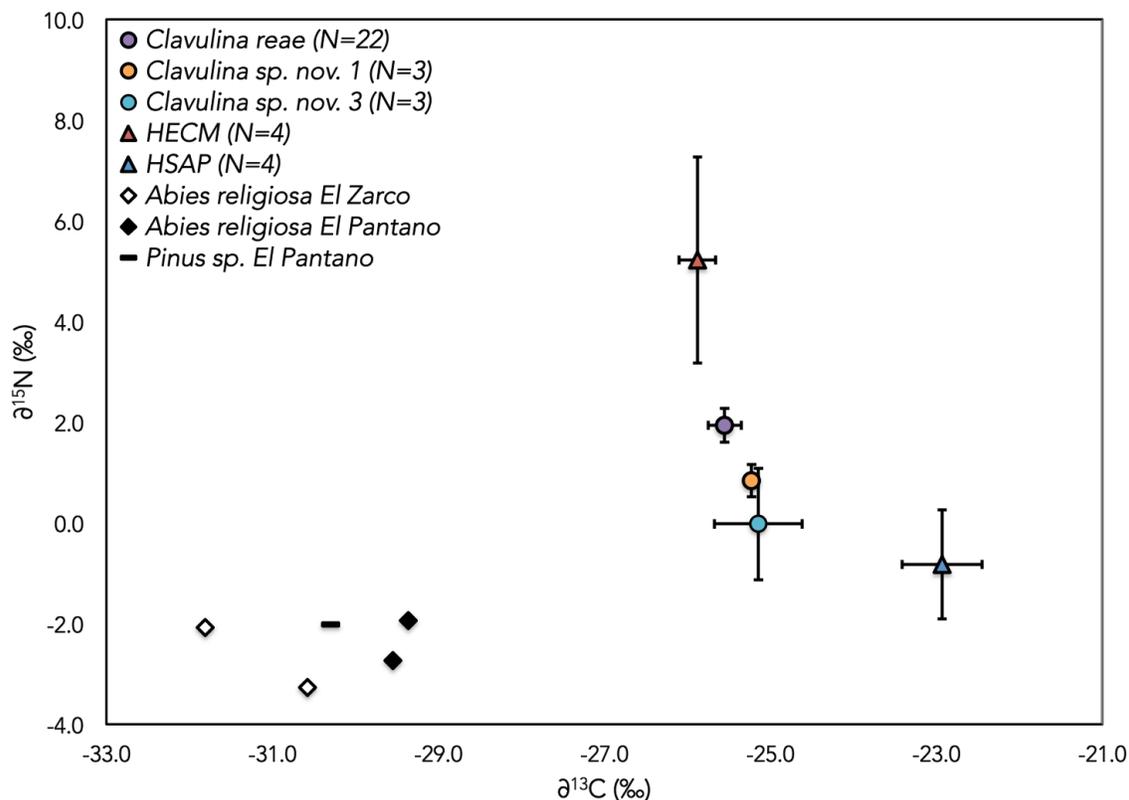


Figura 7.17. Valores promedio de $\delta^{15}N$ y $\delta^{13}C$ de *Clavulina* por especie y de los HECM y HSAP. Los símbolos en negro indican muestras provenientes de El Pantano y en blanco de El Zarco. Las barras representan el error estándar del promedio de cada valor.

Los resultados del ANOVA indicaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre $\delta^{15}N$ ($F_{2,25} = 2.545$; $P > 0.05$) y $\delta^{13}C$ ($F_{2,25} = 0.40$; $P > 0.05$) de las tres especies de *Clavulina* comparadas (Tabla 7.13).

Tabla 7.13. Análisis de varianza (ANOVA) del $\delta^{15}N$ y $\delta^{13}C$ entre las especies de *Clavulina*.

	Fuente	SC	g.l.	CM	F	P
$\delta^{15}N$	Especie	12.182	2	6.090	2.545	0.098
	Error	59.822	25	2.393		
$\delta^{13}C$	Especie	0.641	2	0.321	0.40	0.679
	Error	19.914	25	0.797		

SC= suma de cuadrados, g.l.= grados de libertad, CM= suma de cuadrados medios, F= valor estimado de Fisher, P= significancia de 0.05.

Sin embargo, al compararse los valores isotópicos promedio de las tres especies, con el promedio de los HECM y HSAP recolectados, se encontraron diferencias significativas en el $\delta^{15}\text{N}$ de *C. reae*, *C. sp. nov. 1* y *C. sp. nov. 3*, y los HSAP al compararse contra los HECM ($F_{4,31}=5.47$; $P<0.01$). En contraste, se encontraron diferencias significativas en el $\delta^{13}\text{C}$ de las tres especies, y los HECM al compararse contra los HSAP [$F_{4,31}=8.39$; $P<0.001$; (Fig. 7.18)].

Tabla 7.14. Análisis de varianza (ANOVA) del $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de *Clavulina* por especie, HECM y HSAP. Los valores estadísticamente significativos aparecen en rojo.

	Fuente	SC	g.l.	CM	F	P
$\delta^{15}\text{N}$	Especie	87.568	4	21.892	5.467	0.00189
	Error	124.134	31	4.004		
$\delta^{13}\text{C}$	Especie	25.14	4	6.29	8.39	0.00010
	Error	23.22	31	0.75		

SC= suma de cuadrados, g.l.= grados de libertad, CM= suma de cuadrados medios, F= valor estimado de Fisher, P= significancia de 0.05.

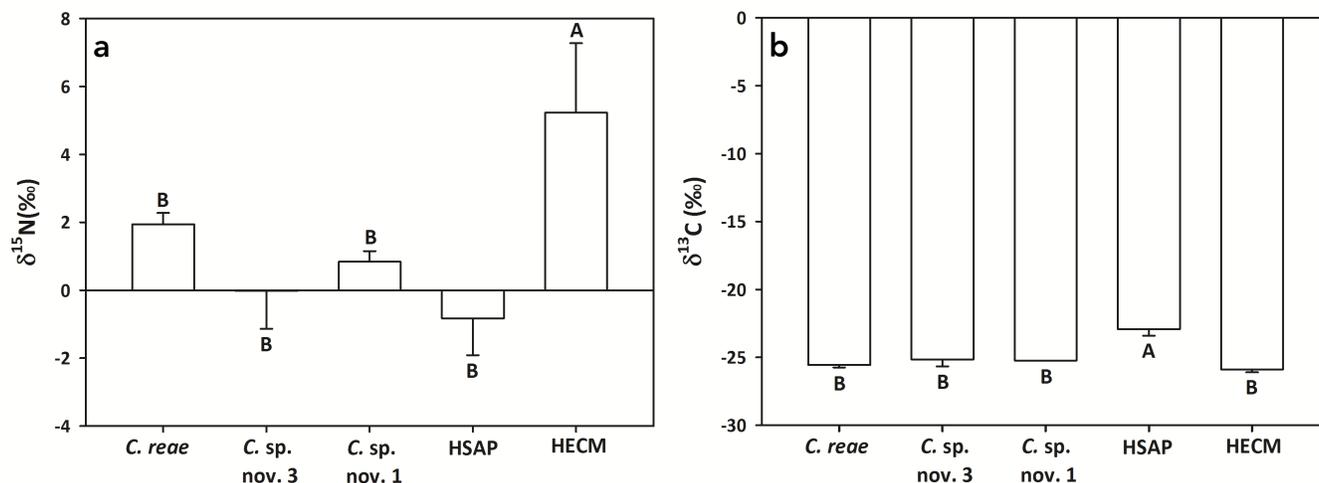


Figura 7.18. ANOVA de los valores isotópicos promedio de *Clavulina* por especie. a) $\delta^{15}\text{N}$ y b) $\delta^{13}\text{C}$ de los basidiomas de las especies de *Clavulina*, los HECM y los HSAP. Las letras representan diferencias significativas a un nivel de significancia de 0.05.

Los valores obtenidos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ para los basidiomas de *Clavulina* fueron comparados con los reportados en los trabajos de Hobbie *et al.* (2001), Trudell *et al.* (2004), Zeller *et al.* (2007), Mayor *et al.* (2009), Tedersoo *et al.* (2012) y Hou *et al.* (2012), que se

muestran en la tabla 7.15. Estos valores, con separación de las especies de zonas templadas de las de zonas tropicales, se muestran en la figura 7.19. Este trabajo aporta por primera vez valores isotópicos para los basidiomas de la especie *Clavulina reae*. En comparación con los valores isotópicos reportados previamente para zonas templadas, los especímenes de *C. reae* muestran un intervalo más amplio de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ que el resto de las especies de regiones templadas.

Tabla 7.15. $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ reportados en la literatura para especies de *Clavulina*.

Especie	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Referencia	Distribución
<i>C. coralloides</i>	2.40	-26.10		Tem
<i>C. coralloides</i>	3.50	-26.40	Hobbie et al. (2001)	Tem
<i>C. rugosa</i>	3.40	-26.40		Tem
<i>C. coralloides</i>	1.60	-25.50	Trudell et al. (2004)	Tem
<i>C. coralloides</i>	2.00	-24.30	Zeller et al. (2007)	Tem
<i>C. coralloides</i>	3.99	-24.85	Hou et al. (2012)	Tem
<i>C. caespitosa</i>	3.30	-25.90		Tro
<i>C. caespitosa</i>	5.80	-26.20		Tro
<i>C. caespitosa</i>	7.40	-24.80	Mayor et al. (2009)	Tro
<i>C. humicola</i>	4.80	-25.10		Tro
<i>C. "coral tiny wood"</i>	3.00	-24.70		Tro
<i>C. "kunmudlutse grey"</i>	9.70	-24.90		Tro
<i>Clavulina</i> sp.	5.15	-26.83		Tro
<i>Clavulina</i> sp.	8.51	-27.13	Tedersoo et al. (2012)	Tro
<i>Clavulina</i> sp.	9.00	-26.78		Tro

Se tomaron los nombres científicos de acuerdo a los trabajos de referencia. $\delta^{15}\text{N}$ (‰)= valor isotópico del isótopo de nitrógeno, $\delta^{13}\text{C}$ (‰)= valor isotópico del isótopo de carbono, Tro= tropical, Tem= templada.

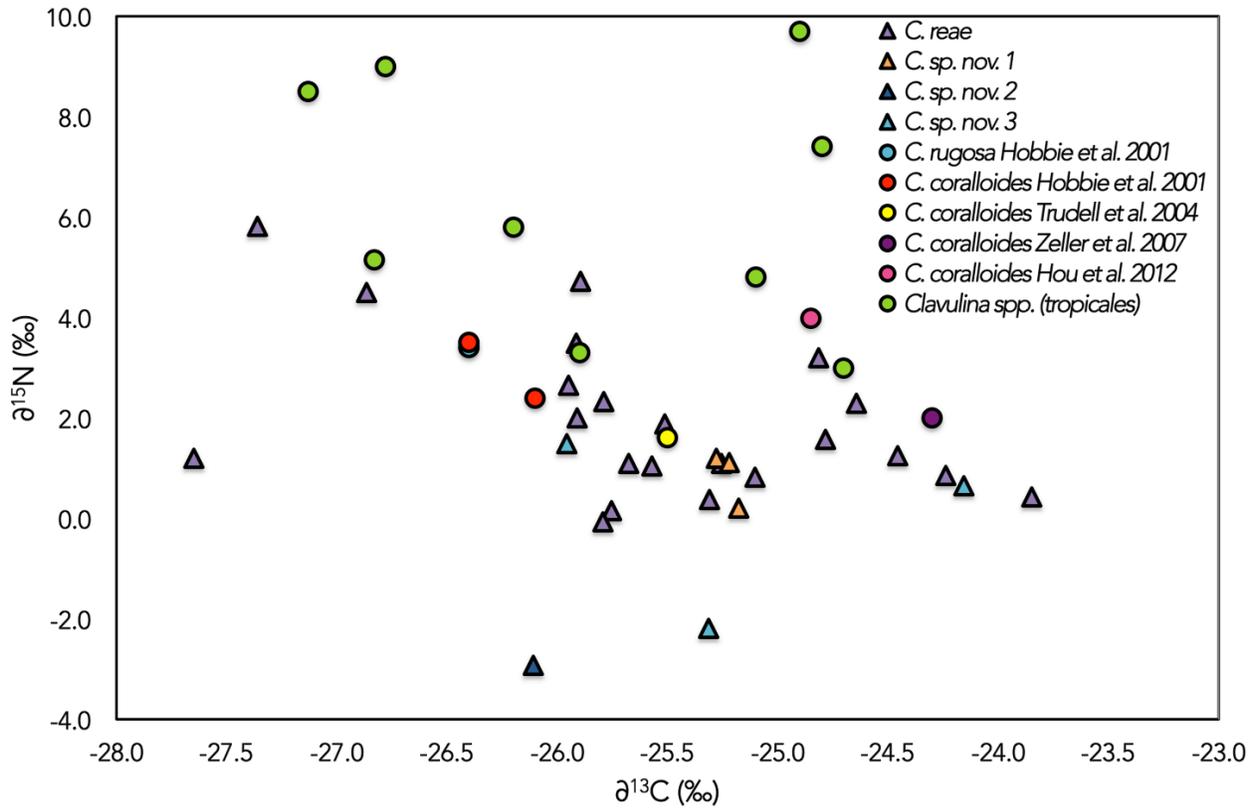


Figura 7.19. $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de los basidiomas del género *Clavulina*. Se muestran los valores obtenidos en este trabajo (triángulos) y los reportados en la literatura (círculos).

VIII. Discusión

En este trabajo se describieron cuatro diferentes especies del género *Clavulina*: *C. reae*, *C. sp. nov. 1*, *C. sp. nov. 2* y *C. sp. nov. 3*. Todas las especies se registraron en ambos sitios, sin embargo, de las cuatro especies, solo se encontraron las ectomicorrizas de *C. reae* y *C. sp. nov. 3* (Fig. 7.5). Si bien estas dos especies fueron recolectadas en ambas localidades, únicamente se registraron las ectomicorrizas de *C. sp. nov. 3* en El Zarco. Por su parte, no se encontraron las ectomicorrizas de *C. sp. nov. 1* ni de *C. sp. nov. 2*.

Clavulina reae, es una de las especies dominantes en los sitios de estudio, tanto en la formación de ectomicorrizas como en la de basidiomas. Macroscópicamente, expone la mayor variación morfológica de las cuatro especies, particularmente en sus ápices, los cuales pueden ir desde romos hasta crestados, aunque en su mayoría son agudos a subagudos (Fig. 7.9; Apéndice V). Microscópicamente se diferencian de las otras especies, de manera significativa (Fig. 7.8), al tener basidiosporas de tamaño intermedio entre *C. sp. nov. 1* (de basidiosporas pequeñas) y *C. sp. nov. 2* y *C. sp. nov. 3* (de basidiosporas grandes).

Los basidiomas de *Clavulina reae* se agruparon en el mismo clado que las ectomicorrizas de *Abies religiosa* reportadas por Argüelles-Moyao *et al.* (2017) como *C. cinerea* var. *gracilis* (Código de acceso de GenBank: KP645352) y de ectomicorrizas de *Alnus acuminata* reportadas por Kennedy *et al.* (2011) (HQ271352); en este clado se agruparon dos secuencias de basidiomas reportados como *C. coralloides* para Estados Unidos, mismas que se asume están mal identificadas (EF559274 y DQ974710). En este mismo clado, pero de manera independiente se agrupan cinco basidiomas reportados por Olariaga *et al.* (2009) como *Clavulina cinerea* var. *gracilis*; estos autores reportan que los basidiomas de dicho clado, presentan ramificaciones acrotónicas, es decir que se presentan hacia la parte apical de los basidiomas, y delgadas, lo que concuerda con la descripción en este trabajo (Fig. 7.9). Esta especie reconocida posteriormente por Olariaga y Salcedo (2012) con el nombre de *Clavulina reae* (debido a la mayor semejanza con la reportada por Rea, 1920), representa el primer reporte de esta especie para México, a partir de datos morfológicos y filogenéticos.

Clavulina sp. nov. 1, es una especie cercana al clado de *C. coralloides* (= *C. cristata*) reportado en parte por Olariaga *et al.* (2009) para Europa, con el que comparte la característica de tener las basidiosporas más pequeñas de las especies de distribución

templada. Sin embargo, a partir del análisis filogenético, los ejemplares de *C. sp. nov. 1* se separan de la especie europea en un clado distinto, aunque con niveles de soporte moderados (Fig. 7.5). Morfológicamente esta especie tiene los basidiomas más pequeños de las cuatro especies descritas en este trabajo; presenta ápices copiosamente crestados y coloraciones rosadas en el himenio maduro (Fig. 7.10); microscópicamente presenta las basidiosporas más pequeñas de las cuatro especies, siendo estas diferencias estadísticamente significativas con *C. reae*, *C. sp. nov. 2* y *C. sp. nov. 3* (Fig. 7.8). A partir de estos resultados, se separa a *Clavulina sp. nov. 1* como una nueva especie para la ciencia, reportada para bosques templados de *Abies religiosa* del centro de México.

El clado de *Clavulina sp. nov. 2* de este trabajo, se ubica a su vez dentro de un grupo con diferentes taxones. En dicho grupo también se encuentran ectomicorrizas (KP645352) de *C. aff. rugosa* (*sensu* Argüelles-Moyao *et al.*, 2017) de bosques de *Abies religiosa* de El Zarco, así como ectomicorrizas (FJ196905) y basidiomas (EU569245 y EU569246) provenientes de bosques de *Quercus crassifolia* de Guerrero (Morris *et al.*, 2008). En todo este grupo dentro del árbol filogenético, se conjuntan secuencias de basidiomas y ectomicorrizas exclusivas de México (Fig. 7.5), por lo que además de representar una nueva especie para la ciencia, podría constituir un taxón endémico de México. Morfológicamente, *C. sp. nov. 2* comparte la macromorfología de *C. sp. nov. 3*, en términos de las coloraciones blancas y homogéneas a lo largo de todo el basidioma, así como ramificaciones escasas. Adicionalmente, ambas especies comparten la característica de tomar coloraciones amarillo ocre al deshidratarse, lo que ya ha sido reportado para *Clavulina rugosa* (Corner, 1950; Olariaga *et al.*, 2009). Microscópicamente, estas dos especies comparten la característica de tener las basidiosporas más grandes de las especies descritas en este trabajo, sin embargo entre estas especies el tamaño de las basidiosporas no permite diferenciarlas (Fig. 7.8). La única característica que permitió diferenciar a estos taxones, fue la presencia de cistidios esferopedunculados en *C. sp. nov. 3* (Fig. 7.12c–e); la presencia de cistidios, es una característica que se había reportado únicamente para especies de distribución tropical [*C. leveillei* (Sacc.) Overeem y *C. pilosa* Corner] y para *Clavulina cristata var. incarnata* Corner, siendo para estas especies de tipo subventricosos, de pared delgada, muy largos (de $100 \times 5\text{--}10 \mu\text{m}$), lisos y hialinos (Corner, 1950); en *C. sp. nov. 3* de este trabajo, los cistidios esferopedunculados se encontraron en

baja frecuencia en las revisiones microscópicas, pero constituyen el primer reporte de la presencia de cistidios de este tipo en especies templadas del género.

Clavulina sp. nov. 3, se ubica en un clado independiente del grupo de *C. rugosa* reportado como R2 por Olariaga *et al.* (2009). Sin embargo, estas especies se agruparon con dos secuencias de basidiomas (EU862207 y EU862210) reportados para Europa dentro del clado R1 nombrado como *C. aff. rugosa (ibidem)*; esta especie por consiguiente representa una nueva especie para el género, que a diferencia de *C. sp. nov. 1* y *C. sp. nov. 2*, ya ha sido registrada en Finlandia y Noruega previamente. Para definir si la presencia de cistidios esferopedunculados, constituye una característica estable para los ejemplares de esta especie, deben ser revisados los ejemplares descritos para Europa como *C. aff. rugosa*.

Es de suma importancia recalcar la necesidad de designar ejemplares tipo para las especies templadas de *Clavulina*. En general, el uso de los epítetos *rugosa*, *cinerea* y *coralloides*, sin la designación de ejemplares de herbario tipo, ha conducido a una subrepresentación de la diversidad de las especies templadas del género. Otro problema asociado a la delimitación de los taxones, se debe a que las características de los basidiomas de *Clavulina*, que suelen ser utilizadas como caracteres diagnósticos para diferenciar entre especies, pueden ser muy plásticas, en particular para *C. reae* (Apéndice V). Con base en los resultados, se considera que los factores determinantes para diferenciar a las especies templadas de estos sitios, son las coloraciones de los basidiomas, el tamaño de las basidiosporas y la presencia de cistidios. Utilizando estos caracteres morfológicos y los análisis filogenéticos, fue posible identificar a las cuatro especies de este trabajo.

La producción de basidiomas y su biomasa difirió significativamente entre los sitios de estudio (Tabla 7.7; Fig. 7.13), siendo mayor en El Pantano que en El Zarco. Aunado a esto, si se consideran las recolectas fuera de las parcelas en ambas localidades, se registraron más del doble de ejemplares de *Clavulina* en El Pantano en comparación con El Zarco (Tabla 7.6). Es importante mencionar que hasta ahora, no se ha podido predecir los sitios en donde los hongos producirán sus esporomas, es por esto que la selección de las parcelas en este trabajo no fue aleatoria, sino que se basó en los resultados de investigaciones previas (Argüelles-Moyao, 2013; Pérez-Pazos, 2014). Se sabe que la producción de estructuras de reproducción

sexual es un fenómeno multifactorial (Crockatt, 2012), en este sentido la apertura del dosel del estrato arbóreo puede promover una mayor producción de esporomas (Richard *et al.*, 2004), por lo que la mayor apertura en sitios perturbados como El Pantano, puede explicar la mayor cantidad de basidiomas de *Clavulina* en comparación con El Zarco.

En términos de la cantidad de ectomicorrizas recolectadas por sitio, también se encontraron diferencias significativas (Tabla 7.1), siendo mayor la cantidad de ectomicorrizas recolectadas en El Zarco que en El Pantano. Sin embargo, el número de ectomicorrizas de *Clavulina*, no difirió entre los sitios de estudio (Fig. 7.9). El género *Clavulina* desarrolla ectomicorrizas de contacto (Buée *et al.*, 2005; Agerer, 2001) lo que les confiere propiedades hidrofílicas de acuerdo con lo reportado por Hobbie y Agerer (2010); por su parte, Argüelles-Moyao (2013) destaca que los suelos de El Zarco con mayor espacio poroso (densidades aparentes de 0.5) y pH menos ácidos (entre 5.7 y 6.0), promueven la formación de ectomicorrizas de *Clavulina* y aumenta la dominancia de las especies de este género dentro de la comunidad. En este trabajo, no se obtuvieron mediciones de densidad aparente del suelo, pero sí se registraron valores de pH, los cuales son similares a lo reportado previamente (*ibidem*) yendo de 5.3 a 6.0 (Tabla 7.2).

En la parcela 2 de El Zarco se recolectaron tres sistemas ectomicorizógenos de *C. reae* (Tabla 7.8), pese a que en dicho sitio no se registró la producción de basidiomas (Tabla 7.6). Por su parte, en la parcela 3 del mismo sitio, se registraron siete basidiomas pero no se encontraron ectomicorrizas de ninguna especie de *Clavulina*. Debido al criterio de recolecta, es posible que no se hayan muestreado ejemplares inmaduros en la parcela 2 de El Zarco; a su vez, la falta de representación de *Clavulina* en las ectomicorrizas, pudo deberse a los bajos niveles de eficiencia de procesamiento de la comunidad de HECM (Tabla 7.4). En particular en la parcela 3 de El Zarco, se tuvo el valor más bajo de eficiencia de las seis parcelas de estudio (15.22 %), por lo que es muy probable que sí se hayan muestreado ectomicorrizas de *Clavulina* en esa parcela, mismas que no pudieron ser amplificadas durante el procesamiento de las muestras. En general, se tuvieron porcentajes de eficiencia bajos en todo el muestreo de ambos sitios (15.22–59.72 % en El Zarco y 24.53–58.75 % en El Pantano), lo que generó una subrepresentación de la comunidad de HECM reportada en este estudio. Esto pudo deberse a que la cantidad de ADN extraído de las muestras biológicas no fue suficiente para realizar

las reacciones de PCR, a compuestos químicos de la raíz que inhibieran la amplificación, entre otros factores. Para solventar estos problemas durante la amplificación se pudo diluir el ADN o modificar los ciclos de reacción durante la PCR, sin embargo este trabajo no pretendía caracterizar a toda la comunidad de HECM de los sitios, sino únicamente pretendía recuperar secuencias de ectomicorrizas correspondientes al género *Clavulina*.

Pese a la baja eficiencia de procesamiento, la estructura de la comunidad de HECM en términos de sus especies dominantes, coincide con lo reportado por Argüelles-Moyao (2013) quien tuvo porcentajes de eficiencia de amplificación superiores a los reportados en este trabajo (58.8–81.7 %). Por lo anterior, los resultados sustentan que la comunidad de HECM en El Zarco, está dominada por la familia Clavulinaceae, siendo particularmente dominante *C. reae*, tanto en ectomicorrizas como en basidiomas. Así mismo, la dominancia de esta especie se extiende hasta El Pantano, sitio en donde sólo había sido descrita la comunidad de HECM a partir de los esporomas (Pérez-Pazos, 2014). Es importante mencionar que *C. reae* y *Membranomyces spurius* dominan en la comunidad en su conjunto, sin embargo todas las secuencias registradas de *M. spurius* provinieron de El Zarco (Fig. 7.3; Apéndices I, II) por lo que esta especie puede ser más sensible al disturbio propio de El Pantano. Además, hubo especies de los géneros *Helvella*, *Hydnotrya*, *Piloderma* y *Tuber* registradas en El Pantano, que no fueron registradas en El Zarco en este trabajo, pero que sí las reportó Argüelles-Moyao (2013); por otra parte hubo géneros reportados para las mismas parcelas de El Zarco (*ibidem*), que no fueron registrados en ninguno de los muestreos de este trabajo en ambos sitios, pertenecientes a los géneros *Fischerula*, *Hebeloma*, *Pseudotomentella* y *Trichophaea*, razón por la cuál se asume que su ausencia se debe a los bajos porcentajes de eficiencia en la obtención de secuencias. De estos géneros únicamente *Hebeloma* había sido reportado previamente para El Pantano en esporomas (Pérez-Pazos, 2014).

De las 83 especies de HECM reportadas por Argüelles-Moyao *et al.* (2017) para El Zarco, a partir de 570 secuencias útiles, en este trabajo se registraron 20, que equivalen a un 24.1 % de la riqueza reportada para este sitio. Únicamente se encontró un nuevo registro de *Laccaria laccata*. Sin embargo, la asignación de un nombre a nivel de especie sólo pudo realizarse en el 47.5 % de los HECM; al compararse los nombres de las 20 especies de HECM de El Zarco de este trabajo, con la comunidad de HECM reportada por Argüelles-Moyao *et al.*

(2017), se observó que *Clavulina reae*, *Membranomyces spurius*, *Tomentella* sp. 1 y *Russula* sp. 1 estuvieron entre las seis especies dominantes en El Zarco en 2011 (Argüelles-Moyao, 2013) y en 2015 (este trabajo) pese a que la abundancia relativa de las mismas sea diferente entre estos trabajos (Apéndice III). Las diferencias en la posición que ocupan en términos de su abundancia relativa, son más evidentes en las restantes 16 especies, por lo que se considera que el sesgo metodológico, producto de la baja eficiencia de obtención de secuencias útiles de este trabajo, se ve evidenciada en las especies más raras de la comunidad y no en los taxones dominantes.

Los basidiomas de *Clavulina* fueron registrados en su mayoría, fructificando a la orilla de los caminos, por lo que se esperaba que la frecuencia de registro de basidiomas guardara una relación positiva con la radiación solar superficial (RSS) y la temperatura (T) y negativa con la humedad relativa del aire (HR) y el contenido de agua en el suelo (CAS). Sin embargo únicamente se encontraron correlaciones significativas entre la frecuencia y la RSS (Fig. 7.14a). Aunado a esto, la mayor cantidad de ejemplares recolectados fueron a temperaturas más bajas, de 12–14 °C (Fig. 7.14b), a HR altas, entre el 85–90 % (Fig. 7.14c) y a CAS del 25–30 % (Fig. 7.14d). Para el caso del CAS, si se considera que el micelio se distribuye en los espacios porosos del suelo, los resultados indican que la producción de basidiomas comienza a decrecer a niveles superiores a 35 % de CAS. Posiblemente esto sea debido a que *Clavulina* prefiere sitios con menor cantidad de agua; en relación a lo anterior trabajos como el de Buée *et al.* (2005) han reportado que *C. coralloides* es tolerante a la sequía y a suelos con niveles bajos de potencial hídrico, además de ser más abundante y metabólicamente más activa en suelos adelgazados.

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de las acículas de los hospederos, mostraron valores típicos, es decir, disminuidos en relación con los valores de los esporomas de los HECM y los HSAP (Tedersoo *et al.*, 2014b). No se encontraron diferencias entre los ejemplares de *Clavulina* recolectados en El Pantano y en El Zarco, a nivel de género ni a nivel de especie (Figs. 7.15–7.18). Este resultado refuta la hipótesis planteada, en el sentido de que se esperaba que los ejemplares de El Pantano mostraran valores isotópicos promedio de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ disminuidos y

enriquecidos respectivamente, al compararlos con los valores para los ejemplares de El Zarco. Pese a que no fueron encontradas diferencias significativas entre los valores promedio por sitio, hubo ejemplares de *Clavulina* que sí mostraron valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ disminuídos y enriquecidos, respectivamente en comparación con los HECM de referencia (Tabla 7.12; Fig. 7.15). *Clavulina reae* (PPE-425), mostró un valor isotópico similar al de *Agaricus* sp. 1. Sin embargo, este ejemplar tuvo un sustrato terrícola. En contraparte, el ejemplar PPE-475, de la misma especie, mostró valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ enriquecidos y disminuídos, respectivamente (típicos de HECM); este ejemplar tuvo sustratos lignícolas y terrícolas (Tabla 7.12). Lo anterior nos indica que el sustrato en donde se recolectó cada basidioma, no fue determinante para mostrar valores similares a HECM o a HSAP. Un ejemplo de esto es el trabajo de Hasselquist *et al.* (2011), en donde ejemplares de boletáceos, que se desarrollaron sobre restos leñosos, presentaron valores isotópicos que los ubicaron dentro de los HECM.

De los trabajos que han obtenido valores isotópicos de esporomas de *Clavulina*, únicamente el trabajo de Hobbie *et al.* (2001), destaca que el posicionamiento dentro del grupo funcional de los HECM de *C. coralloides* y *C. rugosa* es dudoso (Tabla 7.15; Fig. 7.19). El resto de los autores describen a las especies de *Clavulina* como HECM basados en sus valores isotópicos (Tabla 7.15), incluso cuando estas están más enriquecidas en el $\delta^{13}\text{C}$ que las reportadas por Hobbie *et al.* (2001). Resulta interesante que pese a que este trabajo aporta en total 29 valores isotópicos de *Clavulina*, mismas que superan a los 15 reportados en toda la literatura hasta el momento, estos valores siguen apareciendo intermedios entre los HECM y los HSAP (Figs. 7.15 y 7.17). El posicionamiento intermedio entre los HECM y los HSAP, ya se ha observado para *Ramaria* subgen. *Asteroramaria* (= género *Phaeoclavulina*) (Agerer *et al.*, 2012) y para *Odontia* spp. (Tedersoo *et al.*, 2014b); estos últimos autores sugieren que *Odontia* no suministra N a sus hospederos y que pueden actuar como patógenos generalistas u oportunistas del micelio de otros hongos.

El hecho de que *Clavulina* sea más parecido al $\delta^{13}\text{C}$ de los HECM y a su vez al $\delta^{15}\text{N}$ de los HSAP (Tabla 7.14; Fig. 7.18), así como la obtención de ADN a partir de las ectomicorrizas, consolida la ubicación del género *Clavulina* dentro de los HECM, pero no de manera estricta, ya que nuestros resultados sugieren, en el contexto del gradiente saprotrofia-biotrofia (Koide

et al., 2008), que las especies de *Clavulina* en nuestros sitios de estudio, representan a HECM con la capacidad de descomponer la materia orgánica. Actualmente, existe un genoma anotado del género *Clavulina*, (referido como *Clavulina* sp. PMI_390 en JGI, 2014, www.jgi.doe.gov). El genoma presenta familias de genes codificantes de enzimas hidrolíticas como lo son: moléculas de unión a la celulosa 1 (CBM1, por sus siglas en inglés), glucosido hidrolasa 1 (GH1), y glucosido hidrolasa 5 (GH5), todas ellas asociadas a la despolimerización de celulosa mediante mecanismos de hidrólisis. Dados estos antecedentes, la hipótesis sustentada por los resultados obtenidos es la de los descomponedores coincidentes (Talbot *et al.*, 2008) o el modelo de adquisición de nutrimentos (Hupperts *et al.*, 2017). Esta hipótesis señala que los HECM pueden descomponer la materia orgánica del suelo asociado a la búsqueda de nutrimentos como el N o el P, mas no como fuente primaria de carbono. A su vez los resultados refutan nuestra hipótesis que planteaba que debido al mal estado del arbolado en El Pantano (González–Medina *et al.*, 2010) las especies de *Clavulina* podrían constituir HECM con capacidad saprótrofa, asociado a un déficit en el suministro de C por parte de sus hospederos, de acuerdo con la hipótesis del plan B (Talbot *et al.*, 2008).

IX. Conclusiones

1. Los análisis morfológicos y filogenéticos fueron coincidentes. Las coloraciones de los basidiomas, el tamaño de las basidiosporas y la presencia de cistidios, son los caracteres que separan a las cuatro especies presentes en los sitios de estudio, mismas que son: *Clavulina reae*, *C. sp. nov. 1*, *C. sp. nov. 2*, *C. sp. nov. 3*.
2. *Clavulina sp. nov. 1*, *C. sp. nov. 2* y *C. sp. nov. 3* se proponen como nuevas especies para la ciencia. Particularmente *C. sp. nov. 2* es una especie potencialmente endémica de México.
3. Se registraron 59 especies de hongos ectomicorrizógenos entre los dos sitios de estudio, con 29 especies exclusivas para El Pantano, 21 para El Zarco y nueve especies compartidas entre ambos sitios.
4. *Clavulina reae*, *Membranomyces spurius*, *Russula sp. 1* y *Tomentella sp. 1* estuvieron entre las seis especies más abundantes en El Zarco en 2011 (Argüelles-Moyao, 2013) y en 2015 (este trabajo).
5. *Clavulina reae*, es la especie más común del género en basidiomas y la más abundante en la formación de ectomicorrizas en los sitios de estudio. *C. sp. nov. 1* sólo fue recolectada en basidiomas. *C. sp. nov. 2* y *C. sp. nov. 3* son escasas tanto en la formación de ectomicorrizas como de basidiomas.
6. Los ejemplares de *Clavulina* forman basidiomas preferencialmente en sitios abiertos del bosque, razón por la que posiblemente se recolectaron más ejemplares en El Pantano que en El Zarco. Por otra parte, no se encontraron diferencias en la abundancia de ectomicorrizas del género recolectadas entre El Pantano y El Zarco.
7. Las especies de *Clavulina* en estos bosques de *Abies religiosa* representan a hongos ectomicorrizógenos con la capacidad para descomponer la materia orgánica, posiblemente asociada a la búsqueda de nutrimentos para su hospedero.

X. Perspectivas

Para investigar a profundidad la ecofisiología de *Clavulina* en los sitios de estudio, se puede obtener el valor isotópico de radiocarbono (^{14}C) a partir de los basidiomas. El único trabajo que incluye datos de ^{14}C para *Clavulina* es el de Hobbie *et al.* (2002), los cuales llevaron a resultados no concluyentes, similares a los obtenidos a partir de isótopos estables. El obtener los valores de radiocarbono de los basidiomas de este género permitiría rastrear la edad del C que se encuentra conformando a los basidiomas y así discernir si el C es más reciente o es más viejo. Una edad pequeña del C (<2 años) indicaría que estos hongos están obteniendo C principalmente vía simbiosis ectomicorrizógena; el C de una mayor edad, sugeriría que proviene de residuos mas viejos, característicos de la MOS (Hobbie *et al.*, 2002).

Una de las líneas a desarrollar, sería el entender porqué las especies de este género dominan la comunidad de HECM (particularmente *Clavulina reae*). Una hipótesis a probar sería que estas especies se distribuyen en el mantillo y en el horizonte Of del suelo, lo que les permite ser dominantes y evitar competir con otras especies de HECM (Read y Pérez-Moreno, 2003) con mayor capacidad en el forrajeo de nutrimentos minerales, en horizontes más profundos. Se sugiere poner a prueba la hipótesis evaluando la distribución vertical en el suelo de la comunidad de HECM. Se esperaría encontrar una abundancia y frecuencia de *Clavulina* que decrezca conforme aumenta la profundidad del suelo. Esto se ha evaluado en comunidades de HSAP y HECM en bosques templados de *Pinus sylvestris* en Jädraas, Suecia, (Lindahl *et al.*, 2007), donde en los estratos superficiales, dominan los HSAP, mientras que en estratos mas profundos dominan los HECM.

La segunda hipótesis es que *Clavulina* no es eficiente en la translocación de N a sus hospederos, en comparación con otros HECM del sitio a partir del fraccionamiento isotópico del ^{15}N registrado en este trabajo. El que *Clavulina* sea dominante en la comunidad de HECM de los sitios, puede ser debido a su eficiencia en la translocación de otros elementos tales como el fósforo, un elemento limitante en diferentes ecosistemas. Sin embargo, este elemento no presenta variaciones isotópicas estables. Esto deberá ser complementado mediante estudios de actividad enzimática, particularmente para *C. reae* al ser esta la especie dominante. Con la finalidad de poner a prueba las hipótesis previas, metodológicamente se requiere obtener cepas de *C. reae* de los sitios de estudio.

Referencias

- Agerer, R. 1987-2008. Colour atlas of ectomycorrhizae: with glossary. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger. Schwäbisch Gmünd, Alemania.
- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae: a proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107-114.
- Agerer, R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress* 5: 67-107.
- Agerer, R., Christan, J., Mayr, C. y Hobbie, E. 2012. Isotopic signatures and trophic status of *Ramaria*. *Mycological Progress* 1: 47-59.
- Álvarez-Manjarrez, J. 2014. Diversidad de ectomicorrizas en la selva tropical de Chamela, Jalisco. Tesis de maestría. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 193 pp.
- Argüelles-Moyao, A. 2013. Efecto del suelo del bosque de *Abies religiosa* en la comunidad de hongos ectomicorrízicos en El Zarco, San Pedro Atlapulco, Estado de México. Tesis de maestría. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 114 pp.
- Argüelles-Moyao, A., Garibay-Orijel, R., Márquez-Valdelamar, L. y Arellano-Torres, E. 2017. *Clavulina-Membranomyces* is the most important lineage within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza* 27: 53-65.
- Baldrian, P. 2008. Enzymes of saprotrophic basidiomycetes, pp. 19-41, en: Boddy, L., Frankland, J. y Van West, P. (eds.) Ecology of saprotrophic basidiomycetes. Academic Press. Londres, Inglaterra.
- Baldrian, P. 2009. Ectomycorrhizal fungi and their enzymes in soils: is there enough evidence for their role as facultative soil saprotrophs? *Oecologia* 161: 657-660.
- Baldrian, P., Kolařík, M., Štursová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Větrovský, T., Žifčáková, L., Šnajdr, J., Rídl, J., Vlček, Č. y Voříšková, J. 2012. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *The ISME Journal* 6: 248-258.

- Berg, B. 2014. Decomposition patterns for foliar litter—a theory for influencing factors. *Soil Biology and Biochemistry* 78: 222-232.
- Blackwell, M. 2011. The fungi: 1,2,3...5.1 million species? *American Journal of Botany* 94: 426-438.
- Boberg, J., Finlay, R., Stenlid, J., Ekblad, A. y Lindahl, B. 2014. Nitrogen and carbon reallocation in fungal mycelia during decomposition of boreal forest litter. *PLoS One* 9: e92897.
- Bödeker, I., Clemmensen, K., de Boer, W., Martin, F., Olson, Å. y Lindahl, B. 2014. Ectomycorrhizal *Cortinarius* species participate in enzymatic oxidation of humus in northern forest ecosystems. *New Phytologist* 203: 245-256.
- Brady, N. y Weil, R. 2008. The nature and properties of soils. Décimo cuarta edición. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, EUA.
- Brundrett, M. 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 Soil* 320: 37-77.
- Buée, M., Vairelles, D. y Garbaye, J. 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus silvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15: 235-245.
- Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N. y Zoppini, A. 2013. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58: 216-234.
- Burrola-Aguilar, C., Garibay-Orijel, R. y Argüelles-Moyao, A. 2013. *Abies religiosa* harbor the highest species density and sporocarp productivity of wild edible mushrooms among five different vegetation types in a neotropical temperate forest region. *Agroforestry Systems* 87: 1101-1115.
- Chapin, S., Matson, P. y Vitousek, P. 2011. Principles of terrestrial ecosystem ecology. Segunda edición. Springer. Nueva York, EUA.
- Choreño-Parra, E.M. 2018. Modificación de la composición química y la actividad microbiana del mantillo por el incremento en la heterogeneidad del estrato arbóreo

- en un bosque de *Abies religiosa*. Tesis profesional (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. 80 pp.
- Christiansen, M.P. 1967. Clavariaceae Daniae species especially collected in the isle of Zealand. *Friesia* 8: 117-160.
- Cibrián, D. 1989. Air pollution and forest decline near Mexico City. *Environmental Monitoring and Assessment* 12: 49-58.
- CONANP-SEMARNAT, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2006. *Programa de Conservación y Manejo Parque Nacional Desierto de Los Leones*. México, D.F.
- Corner, E. 1950. A monograph of *Clavaria* and allied genera. *Annals of Botany Memoirs*. Oxford University Press. Londres, Inglaterra.
- Corner, E. 1970. Supplement to "A monograph of *Clavaria* and allied genera". *Nova Hedwigia Beihefte* 47: 22-51.
- Courty, P., Buée, M., Diedhiou, A., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M.P., Uroz, S. y Garbaye, J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 679-698.
- Courty, P., Pritsch, K., Schloter, M., Hartmann, A. y Garbaye, J. 2005. Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. *New Phytologist* 167: 309-319.
- Crockatt, M. 2012. Are there edge effects on forest fungi and if so do they matter? *Fungal Biology Reviews* 26: 94-101.
- Dahlberg, A., Genney, D. y Heilmann-Clausen, J. 2010. Developing a comprehensive strategy for fungal conservation in Europe: current status and future needs. *Fungal Ecology* 3: 50-64.
- Dawson, T., Mambelli, S., Plamboeck, A., Templer, P. y Tu, K. 2002. Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 507-559.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.

- Dearnaley, J. y Bougoure, J. 2010. Isotopic and molecular evidence for saprotrophic Marasmiaceae mycobionts in rhizomes of *Gastrodia sesamoides*. *Fungal Ecology* 3: 288-294.
- Delgado, A., Villegas, M. y Cifuentes, J. 2005. Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomycetes con himenio laminar. Las Prensas de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Donk, M.A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* 3: 199-324.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Žifčáková, L., Lisá, L., Dobiášová, P. y Baldrian, P. 2015. Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. *Fungal Ecology* 13: 10-22.
- Fahad, Z., Bolou-bi, E., Köhler, S., Finlay, R. y Mahmood, S. 2016. Fractionation and assimilation of Mg isotopes by fungi is species dependent. *Environmental Microbiology Reports* 8: 956-965.
- Feng, X. y Simpson, M.J. 2011. Molecular-level methods for monitoring soil organic matter responses to global climate change. *Journal of Environmental Monitoring* 13: 1246-1254.
- Frank, B. 2005. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an english translation of A. B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15: 267-275.
- García-Palomo, A., Zamorano, J., López-Miguel, C., Galván-García, A., Carlos-Valerio, V., Ortega, R. y Macías, J. 2008. El arreglo morfoestructural de la Sierra de Las Cruces, México central. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 25: 158-178.
- Garcia, K., Delaux, P., Cope, K.R. y Ané, J. 2015. Molecular signals required for the establishment and maintenance of ectomycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 208: 79-87.
- Gardes, M. y Bruns, T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gartner, T.B. y Cardon, Z.G. 2012. Decomposition dynamics in mixed-species leaf litter. *Oikos* 104: 230-246.

- Gebauer, G. y Taylor, F.S. 1999. ^{15}N natural abundance in fruit bodies of different functional groups of fungi in relation to substrate utilization. *New Phytologist* 142: 93-101.
- González-Medina, R.E., Mendoza, M. y Alvarado-Rosales, D. 2010. Exposición a ozono en relación a vitalidad en un bosque de oyamel (*Abies religiosa* (Kunth) Schlttdl. & Cham). *Madera y Bosques* 16: 7-19.
- Hansen, L. y Knudsen, H. 1997. Nordic Macromycetes Vol. 3 Heterobasidioid, Aphyllophoroid and Gastromycetoid Basidiomycetes. Primera edición. Nordsvamp, Dinamarca.
- Hasselquist, N., Douhan, G. y Allen, M. 2011. First report of the ectomycorrhizal status of boletes on the northern Yucatan peninsula, Mexico determined using isotopic methods. *Mycorrhiza* 21: 465-471.
- Hawksworth, D. y Lücking, R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum* 5: FUNK-0052-2016.
- He, G., Chen, S-L. y Yan, S-Z. 2016. Morphological and molecular evidence for a new species in *Clavulina* from southwestern China. *Mycoscience* 57: 255-263.
- Henn, M. y Chapela, I. 2001. Ecophysiology of ^{13}C and ^{15}N isotopic fractionation in forest fungi and the roots of the saprotrophic-mycorrhizal divide. *Oecologia* 128: 480-487.
- Hibbett, D., Gilbert, L-B. y Donoghue, M. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbiosis in basidiomycetes. *Nature* 407: 506-508.
- Hobbie, E. 2005. Using isotopic tracers to follow carbon and nitrogen cycling of fungi, pp. 361-381, en: Dighton, J., White, J. y Oudemans, P. (eds.) *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. CRC Press. Boca Ratón, EUA.
- Hobbie, E. y Agerer, R. 2010. Nitrogen isotopes in ectomycorrhizal sporocarps correspond to belowground exploration types. *Plant Soil* 327: 71-83.
- Hobbie, E., Jumpponen, A. y Trappe, J. 2005. Foliar and fungal $^{15}\text{N}:$ ^{14}N ratios reflect development of mycorrhizae and nitrogen supply during primary succession: testing analytical models. *Oecologia* 146: 258-268.
- Hobbie, E., Weber, N. y Trappe, J. 2001. Mycorrhizal vs. saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytologist* 150: 601-610.

- Hobbie, E., Weber, N., Trappe, J. y Van Klinken, G. 2002. Using radiocarbon to determine the mycorrhizal status of fungi. *New Phytologist* 156: 129-136.
- Hupperts, S.F., Karst, J., Pritsch, K. y Landhausser, S.M. 2017. Host phenology and potential saprotrophism of ectomycorrhizal fungi in the boreal forest. *Functional Ecology* 31: 116-126.
- Kennedy, P., Garibay-Orijel, R., Higgins, L. y Angeles-Argaiz, R. 2011. Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza* 21: 559-568.
- Kennedy, P., Matheny, P., Ryberg, K., Henkel, T., Uehling, J. y Smith, M. 2012. Scaling up: examining the macroecology of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21: 4151-4154.
- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D. y Stalpers, J. (eds.). 2008. Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi. Cromwell Press, Trowbridge.
- Kögel-Knabner, I. 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 139-162.
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L., Morin, E., Barry, K., Buscot, F., et al. 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics* 47: 410-415.
- Koide, R., Sharda, J., Herr, J. y Malcolm, G. 2008. Ectomycorrhizal fungi and the biotrophy-saprotrophy continuum. *New Phytologist* 178: 230-233.
- Kumla, J., Bussaban, B., Suwannarach, N., Lumyong, S. y Danell, E. 2012. Basidiome formation of an edible wild, putatively ectomycorrhizal fungus, *Phlebopus portentosus* without host plant. *Mycologia* 104: 597-603.
- Kumla, J., Danell, E. y Lumyong, S. 2015. Improvement of yield for a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, cultivation in northern Thailand. *Mycoscience* 56: 114-117.
- Kumla, J., Hobbie, E., Suwannarach, N. y Lumyong, S. 2016. The ectomycorrhizal status of a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, assessed using mycorrhizal synthesis and isotopic analysis. *Mycorrhiza* 26: 333-343.
- Larsson, A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30: 3276-3278.

- Lehman, J. y Kleber, M. 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* 528: 60-68.
- Lindahl, B. y Boberg, J. 2008. Distribution and function of litter basidiomycetes in coniferous forests, pp. 183-196, en: Boddy, L., Frankland, J. y Van West, P. (eds.) *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Academic Press. Londres, Inglaterra.
- Lindahl, B. y Tunlid, A. 2015. Ectomycorrhizal fungi-potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist* 205: 1443-1447.
- Lindahl, B., Ihrmark, K., Boberg, J., Trumbore, S., Högberg, P. Stenlid, J. y Finlay, R. 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist* 173: 611-620.
- Liu, Y., Whelen, S. y Hall, B. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799-1808.
- Martos, F., Dulormne, M., Pailler, T., Bomfante, P., Faccio, A., Fournel, J., Dubois M.-P. y Selosse, M-A. 2009. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* 184: 668-681.
- Mayor, J., Schuur, E. y Henkel, T. 2009. Elucidating the nutritional dynamics of fungi using stable isotopes. *Ecology Letters* 12: 171-183.
- Moncalvo, J., Nilsson, R., Koster, B., Dunham, S., Bernauer, T., Matheny, P., Porter, T., Margaritescu, S., Weiss, M., Garnica, S., Danell, E., Langer, G., Langer, E., Larsson, E., Larsson, K. y Vilgalys, R. 2006. The cantharelloid clade: dealing with incongruent gene trees and phylogenetic reconstruction methods. *Mycologia* 98: 937-948.
- Morris, M., Pérez-Pérez, M., Smith, M. y Bledsoe, C. 2008. Multiple species of ectomycorrhizal fungi are frequently detected on individual oak root tips in a tropical cloud forest. *Mycorrhiza* 18: 375-383.
- Moyersoen B, y Weiß, M. 2014. New Neotropical sebacinales species from a *Pakaraimaea dipterocarpacea* forest in the Guayana Region, southern Venezuela: structural diversity and phylogeography. *PLoS ONE* 9: e103076.
- Olariaga, I. y Salcedo, I. 2012. New combinations and notes in clavarioid fungi. *Mycotaxon* 121: 37-44.

- Olariaga, I., Jugo, B., García-Etxebarria, K. y Salcedo, I. 2009. Species delimitation in the European species of *Clavulina* (Cantharellales, Basidiomycota) inferred from phylogenetic analyses of ITS region and morphological data. *Mycological Research* 113: 1261-1270.
- Osono, T. 2007. Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research* 22: 955-974.
- Peay, K. 2016. The mutualistic niche: mycorrhizal symbiosis and community dynamics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 47: 143-164.
- Pérez-Pazos, E. 2014. Estructura de la comunidad de macromicetos del paraje "El Pantano" del Parque Nacional Desierto de los Leones, México, D.F. Tesis Profesional (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 96 pp.
- Petersen, R. 1988. The clavarioid fungi of New Zealand. *Mycologia* 80: 571-576.
- Plett, J., Kemppainen, M., Kale, S., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B., Pardo, A. y Martin, F. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* 21: 1197-1203.
- Rajala, T., Peltoniemi, M., Hantula, J., Mäkipää, R. y Pennanen, T., 2011. RNA reveals a succession of active fungi during the decay of Norway spruce logs. *Fungal Ecology* 4: 437-448.
- Ramírez-López, I. 2011. Diversidad y aspectos relevantes en torno a la distribución de Homobasidiomycetes clavarioides en la Estación de Biología de Chamela, Jalisco. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 126 pp.
- Rea, C. 1920. New or rare British fungi. *Transactions British Mycological Society* 6: 61-64.
- Read, D. J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47: 376-391.
- Read, D. J. y Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? *New Phytologist* 157: 475-492.
- Reha, C. y Southworth, D. 2015. Stable isotope evidence for the saprotrophic status of the truffle *Schenella pityophilus*. *North American Fungi* 10: 1-7.

- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.D.P., Bonilla-Rosso, G. y Pérez-Moreno, J. 2012. Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican Neotropical forests. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 479-487.
- Richard, F., Moreau, P., Selosse, M. y Gardes, M. 2004. Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Canadian Journal of Botany* 82: 1711-1729.
- Riley, R., Salamov, A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., et al. 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 9923-9928.
- Rinaldi, C., Comandini, O. y Kuyper, T. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33: 1-45.
- Sáenz-Romero, C., Rehfeldt, G., Duval, P. y Lindig-Cisneros, R. 2012. *Abies religiosa* habitat prediction in climatic change scenarios and implications for monarch butterfly conservation in Mexico. *Forest Ecology and Management* 275: 98-106.
- Schlick-steiner, B., Steiner, F., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. y Crozier, R. 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology* 55: 421-438.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6241-6246.
- Seitzman, B., Ouimette, A., Mixon, R., Hobbie, E. y Hibbett, D. 2011. Conservation of biotrophy in Hygrophoraceae inferred from combined stable isotope and phylogenetic analyses. *Mycologia* 103: 280-290.
- Smith, G., Finlay, R., Stenlid, J., Vasaitis, R. y Menkins, A. 2017. Growing evidence for facultative biotrophy in saprotrophic fungi: data from microcosm test with 201 species of wood-decay basidiomycetes. *New Phytologist*: 1-10.

- Smith, S. y Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Tercera edición. Academic Press. Londres, Inglaterra.
- Sulzman, E. 2007. Stable isotope chemistry and measurements: a primer, pp. 1-21, en: Michener, R. y Lajtha, K. (eds.) *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Segunda edición. Blackwell Publishing. Hoboken, EUA.
- Talbot, J.M., Allison, S.D. y Treseder, K. 2008. Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Functional Ecology* 22: 955-963.
- Taylor, A. y Fransson, P. 2007. Natural abundance of ^{15}N and ^{13}C in saprotrophic fungi: what can they tell us? en: Gadd, G., Watkinson, S. y Dyer, P. (eds.) *Fungi in the environment*. Primera edición. Cambridge University Press. Nueva York, EUA.
- Taylor, A., Fransson, P., Högbom, L., Högbom, M. y Plamboeck, A. 2003. Species level patterns in ^{13}C and ^{15}N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. *New Phytologist* 159: 757-774.
- Taylor, A., Högbom, L., Högbom, M., Lyon, A., Näsholm, T. y Högbom, P. 1997. Natural ^{15}N abundance in fruit bodies of ectomycorrhizal fungi from boreal forests. *New Phytologist* 136: 713-720.
- Tedersoo, L. y Smith, M.E. 2013. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews* 27: 83-99.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., et al. 2014a. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346: 1078-1089.
- Tedersoo, L., Harend, H., Buegger, F., Pritsch, K., Saar, I., y Kõljalg, U. 2014b. Stable isotope analysis, field observations and synthesis experiments suggest that *Odontia* is a non-mycorrhizal sister genus of *Tomentella* and *Thelephora*. *Fungal Ecology* 11: 80-90.
- Tedersoo, L., May, T. y Smith, M. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217-263.
- Tedersoo, L., Naadel, T., Bahram, M., Pritsch, K., Buegger, F., Leal, M., Kõljalg, U. y Põldmaa, K. 2012. Enzymatic activities and stable isotope patterns of ectomycorrhizal

- fungi in relation to phylogeny and exploration types in an afro-tropical rain forest. *New Phytologist* 195: 832-843.
- Tibbpromma, S., Hyde, J., Jeewon, R., Maharachchikumbura, S., Liu, J. et al. 2017. Fungal diversity notes 111-252: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity* 83: 1-261.
- Tovar, J. y Valenzuela, R. (eds.). 2006. Los Hongos del Parque Nacional Desierto de Los Leones Primer Espacio de Conservación Biológica en México. Gobierno del Distrito Federal, México, D.F. 131 pp.
- Trappe, M., Smith, M. y Hobbie, E. 2015. Exploring the phylogenetic affiliations and the trophic mode of *Sedecula pulvinata* (Sedeculaceae). *Mycologia* 107: 688-696.
- Trudell, S., Rygiewicz, P. y Edmonds, R. 2004. Patterns of nitrogen and carbon stable isotope ratios in macrofungi, plants and soils in two old-growth conifer forests. *New Phytologist* 164: 317-335.
- Trumbore, S., Brando, P. y Hartmann, H. 2015. Forest health and global change. *Science* 349: 814-819.
- Uehling, J., Henkel, T., Aime, M., Vilgalys, R. y Smith, M. 2012. New species of *Clavulina* (Cantharellales, Basidiomycota) with resupinate and effused basidiomata from the Guiana Shield. *Mycologia* 104: 547-556.
- Vaario, L-M., Heininsalo, J., Spetz, P., Pennanen, T., Heinonen, J., Tervahauta, A. y Fritze, H. 2012. The ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* is a facultative saprotroph *in vitro*. *Mycorrhiza* 22: 409-418.
- Valdecasas, A., Williams, D. y Wheeler, Q. 2008. "Integrative taxonomy" then and now: a response to Dayrat (2005). *Biological Journal of the Linnean Society* 93: 211-216.
- van der Heijden, M., Martin, F., Selosse, M-A. y Sanders, I. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present and the future. *New Phytologist* 205: 1406-1423.
- Vasiliauskas, R., Menkis, A., Finlay, R. y Stenlid, J. 2007. Wood-decay fungi in fine living roots of conifer seedlings. *New Phytologist* 174: 441-446.
- Wanscher, J. y Kornerup, A. 1991. Farver I Farver Bestemmelse af farver. Politikens Forlag. Primera edición. Dinamarca.

- West, J., Bowen, G., Cerling, T. y Ehleringer, J. 2006. Stable isotopes as one of nature's ecological recorders. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 408-414.
- Wilson, A., Hobbie, E. y Hibbett, D. 2007. The ectomycorrhizal status of *Calostoma cinnabarinum* determined using isotopic, molecular and morphological methods. *Canadian Journal of Botany* 85: 385-393.
- Wolfe, B., Kuo, M. y Pringle, A. 2012. *Amanita thiersii* is a saprotrophic fungus expanding its range in the United States. *Mycologia* 104: 22-33.
- Zamora, J.C., Calonge, F.D. y Martin, M.P. 2015. integrative taxonomy reveals an unexpected diversity in *Geastrum* section *Geastrum* (Geastrales, Basidiomycota). *Persoonia* 34: 130-165.
- Zar, J. 2010. Biostatistical analysis. Quinta edición. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, EUA.
- Zeller, B., Brechet, C., Maurice, J. y Le Tacon, F. 2007. ¹³C and ¹⁵N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. *Annals of Forest Sciences* 64: 1-11.

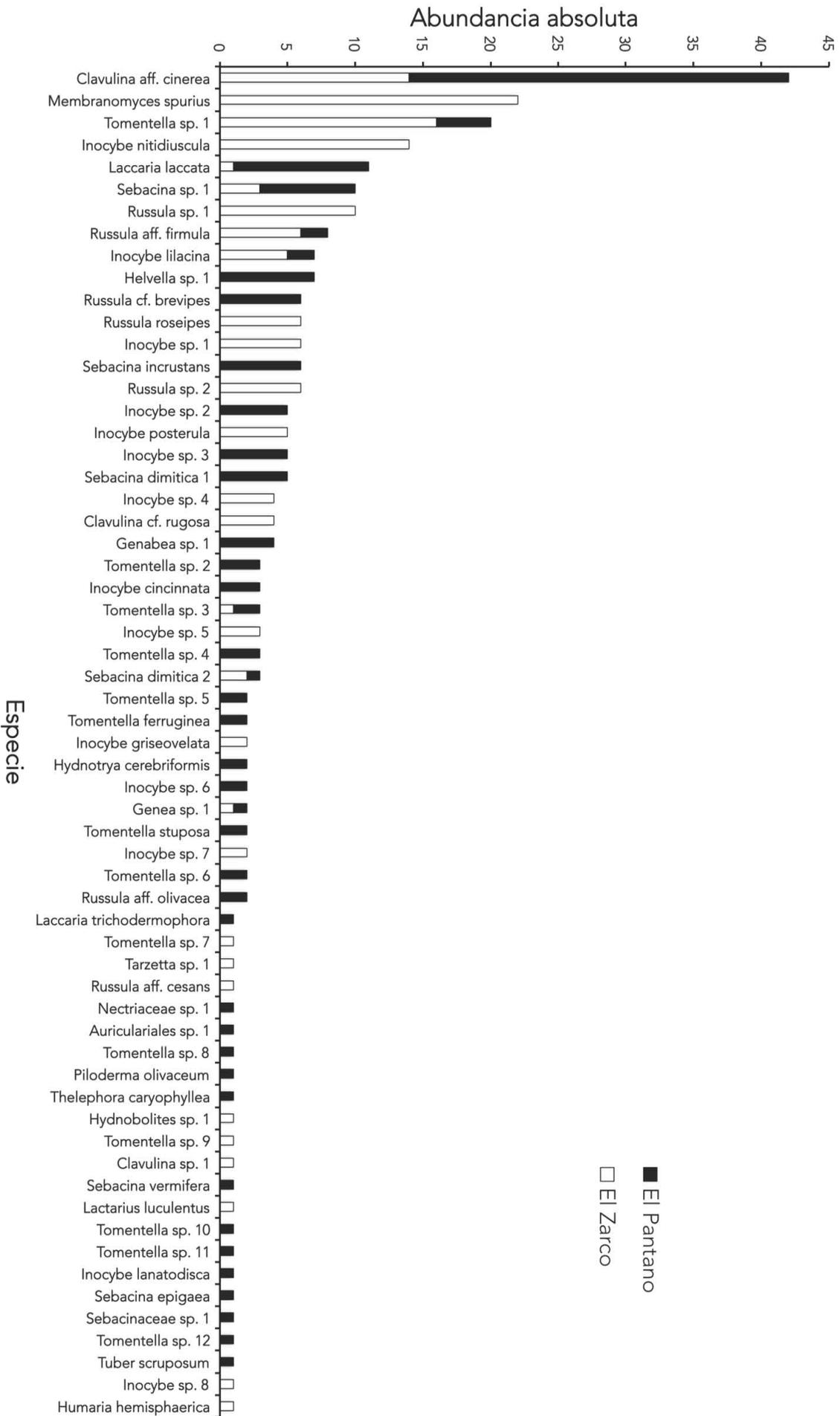
Apéndice I. Listado de especies de hongos ectomicorrizógenos obtenidos en El Zarco y El Pantano.

No.	No. sec.	Zarco	Pantano	Identificación	p.b.	Similitud	Cobertura	Acceso NCBI	Bit-score	ID NCBI	GF
1	42	14	28	<i>Clavulina</i> aff. <i>cinerea</i>	613	99.9%	99.2%	KT874986	1120.19	<i>Clavulina</i> aff. <i>cinerea</i>	E
2	22	22	0	<i>Membranomyces</i> <i>spurius</i>	605	98.7%	88.3%	JQ638713	946.605	<i>Membranomyces</i> <i>spurius</i>	E
3	20	16	4	<i>Tomentella</i> sp. 1	590	97.6%	92.4%	AB848654	933.678	<i>Tomentella</i> sp.	E
4	14	14	0	<i>Inocybe</i> <i>nitidiuscula</i>	612	98.8%	91.8%	KR019844	998.311	<i>Inocybe</i> <i>nitidiuscula</i>	E
5	11	1	10	<i>Laccaria</i> <i>laccata</i>	595	99.6%	91.9%	DQ149853	1000.16	<i>Laccaria</i> <i>laccata</i> var. <i>palidifolia</i>	E
6	10	3	7	<i>Sebacina</i> sp. 1	597	95.9%	93.5%	FN669246	904.132	<i>Sebacina</i> sp.	E
7	10	10	0	<i>Russula</i> sp. 1	447	100.0%	100.0%	KT875106	826.573	<i>Russula</i> sp.	E
8	8	6	2	<i>Russula</i> aff. <i>firmula</i>	589	99.8%	100.0%	JF834342	1083.26	<i>Russula</i> aff. <i>firmula</i>	E
9	7	5	2	<i>Inocybe</i> <i>lilacina</i>	587	99.3%	100.0%	KP454032	1062.94	<i>Inocybe</i> <i>lilacina</i>	E
10	7	0	7	<i>Helvella</i> sp. 1	631	94.1%	90.5%	KY654713	872.739	<i>Helvella</i> sp.	E
11	6	0	6	<i>Russula</i> cf. <i>brevipes</i>	619	99.8%	99.2%	KT875098	1129.42	<i>Russula</i> cf. <i>brevipes</i>	E
12	6	6	0	<i>Russula</i> <i>roseipes</i>	610	98.3%	94.3%	KF850413	1003.85	<i>Russula</i> <i>roseipes</i>	E
13	6	6	0	<i>Inocybe</i> sp. 1	605	91.9%	100.0%	FJ904174	835.806	<i>Inocybe</i> <i>quietiodor</i>	E
14	6	0	6	<i>Sebacina</i> <i>incrustans</i>	587	98.8%	90.6%	EF655701	946.605	<i>Sebacina</i> <i>incrustans</i>	E
15	6	6	0	<i>Russula</i> sp. 2	463	99.8%	98.5%	KC152213	837.653	<i>Russula</i> sp.	E
16	5	0	5	<i>Inocybe</i> sp. 2	608	96.0%	57.2%	HQ604194	566.195	<i>Inocybe</i> <i>sororia</i>	E
17	5	5	0	<i>Inocybe</i> <i>posterula</i>	618	98.1%	90.8%	JF908152	979.845	<i>Inocybe</i> <i>posterula</i>	E
18	5	0	5	<i>Inocybe</i> sp. 3	625	92.4%	100.0%	EU819475	880.126	<i>Inocybe</i> sp.	E
19	5	0	5	<i>Sebacina</i> <i>dimitica</i> 1	592	97.3%	100.0%	KF061273	1003.85	<i>Sebacina</i> <i>dimitica</i>	E
20	4	4	0	<i>Inocybe</i> sp. 4	617	93.5%	98.9%	JF9008170	893.052	<i>Inocybe</i> <i>substraminea</i>	E
21	4	4	0	<i>Clavulina</i> cf. <i>rugosa</i>	613	100.0%	97.1%	KT874987	1099.88	<i>Clavulina</i> cf. <i>rugosa</i>	E
22	4	0	4	<i>Genabea</i> sp. 1	597	80.4%	80.6%	JF908764	351.984	<i>Genabea</i> <i>sphaerospora</i>	E
23	3	0	3	<i>Tomentella</i> sp. 2	637	98.7%	92.6%	KT353051	1048.17	<i>Tomentella</i> sp.	E
24	3	0	3	<i>Inocybe</i> <i>cincinnata</i>	596	97.3%	99.2%	FN550923	1003.85	<i>Inocybe</i> <i>cincinnata</i>	E
25	3	1	2	<i>Tomentella</i> sp. 3	613	94.9%	99.7%	KR019826	955.838	<i>Tomentella</i> <i>coerulea</i>	E
26	3	3	0	<i>Inocybe</i> sp. 5	596	84.6%	95.8%	KM873369	538.495	<i>Inocybe</i> <i>mixtilis</i>	E
27	3	0	3	<i>Tomentella</i> sp. 4	587	90.6%	99.0%	KT275628	773.02	<i>Tomentella</i> sp.	E
28	3	2	1	<i>Sebacina</i> <i>dimitica</i> 2	580	97.7%	99.3%	KF061273	990.925	<i>Sebacina</i> <i>dimitica</i>	E
29	2	0	2	<i>Tomentella</i> sp. 5	597	94.8%	97.0%	AJ534914	900.439	<i>Tomentella</i> sp.	E
30	2	0	2	<i>Tomentella</i> <i>ferruginea</i>	626	97.3%	100.0%	EU819524	1062.94	<i>Tomentella</i> <i>ferruginea</i>	E
31	2	2	0	<i>Inocybe</i> <i>griseovelata</i>	604	98.4%	100.0%	KC305453	1059.25	<i>Inocybe</i> <i>griseovelata</i>	E
32	2	0	2	<i>Hydnotrya</i> <i>cerebriformis</i>	600	100.0%	100.0%	KC152119	1109.11	<i>Hydnotrya</i> <i>cerebriformis</i>	E
33	2	0	2	<i>Inocybe</i> sp. 6	604	94.6%	100.0%	AJ534897	939.218	<i>Inocybe</i> sp.	E

No.	No. sec.	Zarco	Pantano	Identificación	p.b.	Similitud	Cobertura	Acceso NCBI	Bit-score	ID NCBI	GF
34	2	1	1	<i>Genea</i> sp. 1	559	99.4%	100.0%	FN669199	1013.08	<i>Genea</i> sp.	E
35	2	0	2	<i>Tomentella stuposa</i>	596	97.8%	100.0%	KR019860	1027.86	<i>Tomentella stuposa</i>	E
36	2	2	0	<i>Inocybe</i> sp. 7	595	91.2%	95.5%	JF908184	774.866	<i>Inocybe</i> sp.	E
37	2	0	2	<i>Tomentella</i> sp. 6	593	94.5%	98.2%	KX438352	900.439	<i>Tomentella</i> sp.	E
38	2	0	2	<i>Russula</i> aff. <i>olivacea</i>	311	99.2%	100.0%	EU284014	560.655	<i>Russula</i> aff. <i>olivacea</i>	E
39	1	0	1	<i>Laccaria trichodermophora</i>	599	100%	100%	KT875034	1101.72	<i>Laccaria trichodermophora</i>	E
40	1	1	0	<i>Tomentella</i> sp. 7	623	96.3%	98.9%	AB605659	1011.24	<i>Tomentella</i> sp.	E
41	1	1	0	<i>Tarzetta</i> sp. 1	389	99.4%	40.4%	KY462675	285.504	<i>Tarzetta</i> sp.	E
42	1	1	0	<i>Russula</i> aff. <i>cesans</i>	498	96.9%	100.0%	FJ845437	830.266	<i>Russula cessans</i>	E
43	1	0	1	Nectriaceae sp. 1	421	97.1%	97.4%	KT182907	691.767	Nectriaceae sp.	-
44	1	0	1	Auriculariales sp. 1	481	91.9%	87.7%	AB847046	580.968	Auriculariales sp.	-
45	1	0	1	<i>Tomentella</i> sp. 8	534	95.5%	99.6%	KP814535	850.579	<i>Tomentella</i> sp.	E
46	1	0	1	<i>Piloderma olivaceum</i>	341	98.5%	100.0%	KP814544	601.281	<i>Piloderma olivaceum</i>	E
47	1	0	1	<i>Thelephora caryophyllea</i>	592	100%	100%	AJ889980	1077.72	<i>Thelephora caryophyllea</i>	E
48	1	1	0	<i>Hydnobolites</i> sp. 1	541	94.4%	89.7%	JN102461	743.473	<i>Hydnobolites</i> sp.	E
49	1	1	0	<i>Tomentella</i> sp. 9	535	96.1%	99.8%	KX438354	869.046	<i>Tomentella</i> sp.	E
50	1	1	0	<i>Clavulina</i> sp. 1	424	99.2%	100.0%	KT874989	763.787	<i>Clavulina</i> sp.	E
51	1	0	1	<i>Sebacina vermifera</i>	620	98.7%	100.0%	JQ711843	1101.72	<i>Sebacina vermifera</i>	E
52	1	1	0	<i>Lactarius luculentus</i>	531	100%	100%	KX394292	981.691	<i>Lactarius luculentus</i> var. <i>laetus</i>	E
53	1	0	1	<i>Tomentella</i> sp. 10	594	93.4%	96.6%	EF644116	852.426	<i>Tomentella</i> sp.	E
54	1	0	1	<i>Tomentella</i> sp. 11	601	90.7%	99.3%	HQ215825	785.946	<i>Tomentella</i> sp.	E
55	1	0	1	<i>Inocybe lanatodisca</i>	422	99.8%	98.8%	JQ408762	763.787	<i>Inocybe lanatodisca</i>	E
56	1	0	1	<i>Sebacina epigaea</i>	591	97.8%	99.7%	KF000421	1016.78	<i>Sebacina epigaea</i>	E
57	1	0	1	Sebacinaceae sp. 1	599	97.9%	93.5%	AJ534907	966.918	Sebacinaceae sp.	E
58	1	0	1	<i>Tomentella</i> sp. 12	593	96.9%	99.3%	HQ215814	989.078	<i>Tomentella</i> sp.	E
59	1	0	1	<i>Tuber scruposum</i>	513	98.0%	98.8%	EU819525	881.972	<i>Tuber scruposum</i>	E
60	1	1	0	<i>Inocybe</i> sp. 8	635	94.6%	89.3%	JF908184	885.665	<i>Inocybe</i> sp.	E
61	1	1	0	<i>Humaria hemisphaerica</i>	559	99.8%	99.6%	KC152113	1024.16	<i>Humaria hemisphaerica</i>	E

No. sec.= Número de secuencias obtenidas por especie. Identificación= nombre asignado a cada secuencia en este trabajo. p.b.= número de pares de bases de la secuencia. Similitud= con respecto a una secuencia disponible en GenBank. Cobertura= con respecto a la longitud de una secuencia disponible en GenBank. Acceso NCBI= código de acceso en GenBank de la secuencia utilizada en la comparación. Bit score= espacio de búsqueda expresado en bits. ID NCBI= nombre asignado a la secuencia en la base de datos de GenBank. GF= grupo funcional *sensu* Tedersoo *et al.*, 2010. E= ectomicorrizógeno, -= no ectomicorrizógeno. Se destacan en color azul las secuencias del género *Clavulina*.

Apéndice II. Comunidad de hongos ectomicorizógenos en El Zarco y El Pantano.



Apéndice III. Hongos ectomicorrizógenos mencionados por Argüelles-Moyao *et al.* (2017) y registrados en este trabajo.

Especie (este trabajo)	Sim.	Cob.	Max-sc.	Acceso NCBI	Especie (A-M 2017)	AR (este trabajo)	Lugar (este trabajo)	Lugar (A-M 2017)	AR (A-M 2017)
<i>Membranomyces spurius</i>	100	100	1118	KP645353	<i>Membranomyces</i> sp.	0.155	1	1	0.140
<i>Tomentella</i> sp. 1	99	84	913	KF041400	<i>Tomentella</i> sp. 2	0.113	2	2	0.140
<i>Clavulina</i> aff. <i>cinerea</i>	100	99	1125	KP645350	<i>Clavulina</i> cf. <i>cinerea</i>	0.099	3	4	0.038
<i>Russula</i> sp. 1	99	90	745	KF041353	<i>Russula</i> sp. 1	0.070	5	6	0.035
<i>Russula</i> aff. <i>firmula</i>	99	85	920	KF041401	<i>Russula</i> aff. <i>firmula</i>	0.042	6	11	0.022
<i>Russula</i> <i>roseipes</i>	100	81	915	KF041433	<i>Russula</i> sp. 3	0.042	7	12	0.020
<i>Inocybe</i> sp. 1	99	92	1027	KF041384	<i>Inocybe</i> sp. 11	0.042	8	17	0.018
<i>Russula</i> sp. 2	100	90	771	KF041353	<i>Russula</i> sp. 1	0.042	9	20	0.015
<i>Inocybe</i> <i>lilacina</i>	99	93	1007	KF041376	<i>Inocybe</i> <i>lilacina</i>	0.035	10	24	0.010
<i>Sebacina</i> sp. 1	99	91	1002	KF041413	<i>Sebacina</i> <i>dimitica</i> 3	0.021	14	25	0.010
<i>Sebacina</i> <i>dimitica</i> 2	98	91	950	KF041414	<i>Sebacina</i> <i>dimitica</i> 1	0.014	16	29	0.008
<i>Inocybe</i> <i>griseovelata</i>	99	86	950	KF041367	<i>Inocybe</i> <i>griseovelata</i>	0.014	17	31	0.008
<i>Inocybe</i> sp. 7	100	94	1040	KF041420	<i>Inocybe</i> sp. 17	0.014	18	28	0.008
<i>Genea</i> sp. 1	99	71	734	KF041369	<i>Genea</i> sp. 2	0.007	21	42	0.005
<i>Tarzetia</i> sp. 1	99	97	686	KF041371	<i>Tarzetia</i> sp. 1	0.007	23	38	0.004
<i>Russula</i> sp. 3	99	92	843	KF041349	<i>Russula</i> sp. 2	0.007	24	44	0.004
<i>Hydnobolites</i> sp. 1	100	92	924	KF041380	<i>Hydnobolites</i> sp. 1	0.007	25	40	0.004
<i>Tomentella</i> sp. 12	99	95	1033	KF041406	<i>Tomentella</i> sp. 4	0.007	26	55	0.003
<i>Clavulina</i> sp. 1	99	99	773	KP645352	<i>Clavulina</i> aff. <i>rugosa</i>	0.007	27	49	0.003
<i>Inocybe</i> sp. 8	99	78	918	KF041403	<i>Inocybe</i> sp. 2	0.007	29	76	0.001
<i>Humaria</i> <i>hemisphaerica</i>	100	66	684	KF041357	<i>Humaria</i> <i>hemisphaerica</i>	0.007	30		

Sim.= con respecto a una secuencia disponible en GenBank. Cob.= con respecto a la longitud de una secuencia disponible en GenBank. Acceso NCBI= código de acceso en GenBank de la secuencia utilizada en la comparación. Max-sc.= valor máximo en el espacio de búsqueda expresado en bits (Bit-score). AR= abundancia relativa. AR (este trabajo) relativa a un N= 142; AR (A-M 2017) relativa a un N= 570. Lugar (este trabajo) representa la posición en función de la AR de cada especie, relativa a 30 posiciones en este trabajo y a 83 posiciones en A-M 2017. El mismo color de las celdas representa a una misma especie.

Apéndice IV. Fenología reproductiva de *Clavulina* de agosto a noviembre de 2015, en bosques de *Abies religiosa* de El Zarco y El Pantano.

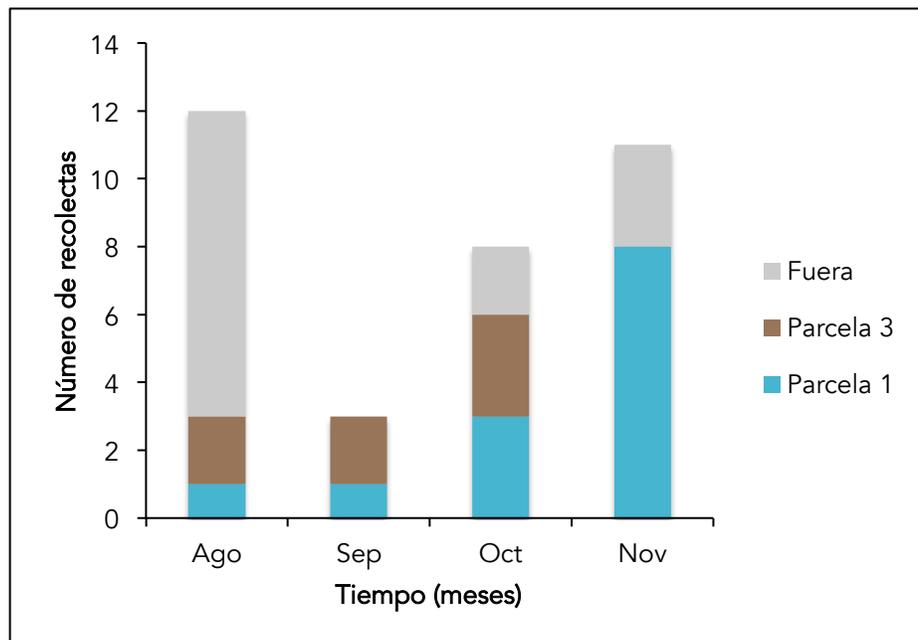


Figura 1. Fenología reproductiva de *Clavulina* en El Zarco. Ago= agosto, Sep= septiembre, Oct= octubre, Nov= noviembre. Las recolectas de la categoría de "Fuera" se realizaron en los trayectos entre las parcelas de muestreo. No se encontraron especímenes de *Clavulina* en la parcela 2.

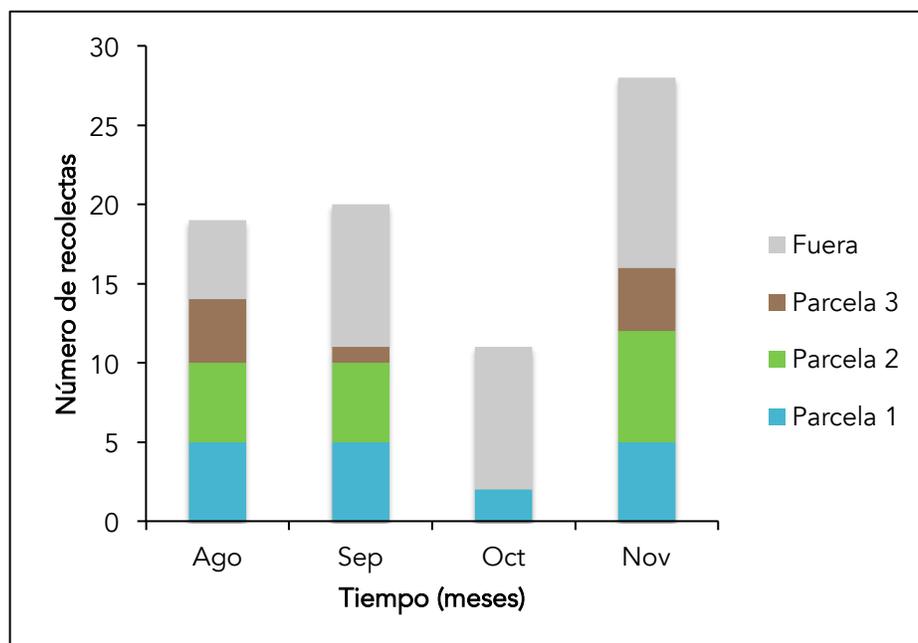
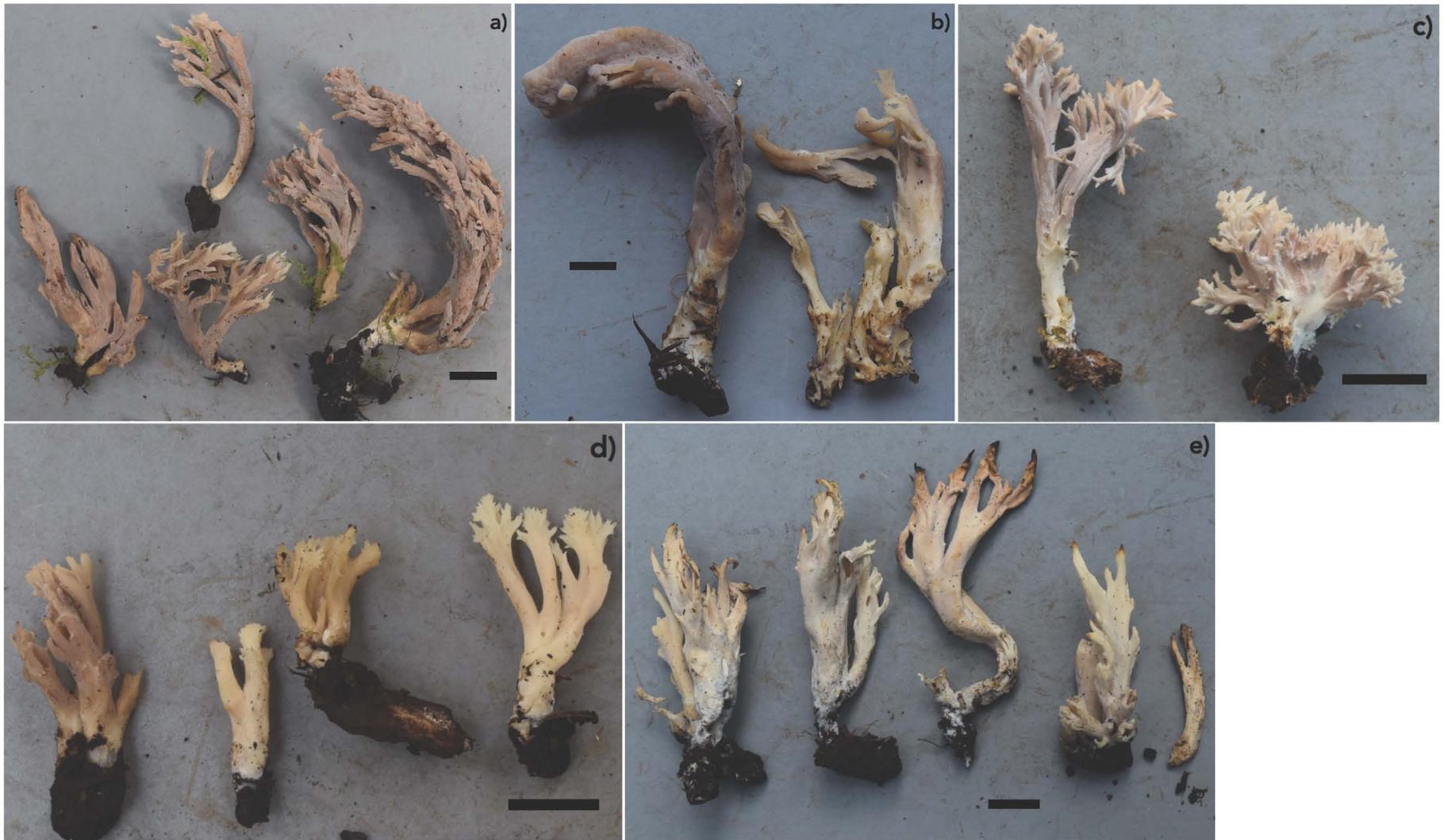


Figura 2. Fenología reproductiva de *Clavulina* en El Pantano. Ago= agosto, Sep= septiembre, Oct= octubre, Nov= noviembre. Las recolectas de la categoría de "Fuera" se realizaron en los trayectos entre las parcelas de muestreo.

Apéndice V. Variación morfológica de *Clavulina reae*.



a) Basidiomas ramificados, ápices subagudos y superficie rugosa (ejemplar PPE-458); b) basidiomas sin ramificaciones, ápices romos y superficie rugosa (ejemplar PPE-352); c) basidiomas ramificados, ápices crestados y superficie lisa (ejemplar PPE-475); d) basidiomas ramificados, ápices subagudos, superficie lisa y con tonalidades grisáceo-moradas desde estadios jóvenes (ejemplar PPE-454); e) basidiomas ramificados, ápices subagudos, superficie pubescente, con tonalidades café al deshidratarse (ejemplar PPE-429). Escalas= 1 cm.