



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

Taxonomía, sistemática y ecología de poblaciones de importancia forestal del género *Laccaria* Berk & Broome en el Neotrópico Mexicano

TESIS

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

PRESENTA:

IBETH RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO ANTONIO LINDIG CISNEROS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2020



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
OFICIO CPCB/574/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1° de junio de 2020, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ IBETH** con número de cuenta **99290252** con la tesis titulada: “**Taxonomía, sistemática y ecología de poblaciones de importancia forestal del género *Laccaria* Berk & Broome en el Neotrópico Mexicano**”, realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente:	DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
Vocal:	DR. SIGFRIDO SIERRA GALVÁN
Secretario:	DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
Suplente:	DRA. ADRIANA MONTOYA ESQUIVEL
Suplente	DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de septiembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme llevar a cabo los estudios de doctorado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca doctoral y al proyecto UNAM PAPIIT IN210217 por el financiamiento.

Un agradecimiento especial al Dr. Roberto Garibay Orijel por darme la oportunidad de entrar a su equipo de trabajo, por las observaciones en cada fase de la investigación y sobre todo por el apoyo al final de esta etapa.

Al comité tutor agradezco el apoyo en cada semestre, Dr. Roberto A. Lindig Cisneros por todas las veces que me atendió, por esta última etapa en la que con su ojo crítico y colaboración para la realización del capítulo II, mil gracias; Dr. Joaquín Cifuentes Blanco por todo el apoyo desde siempre, desde la licenciatura, maestría y ahora en el doctorado, muchas gracias y sabes que eres inspiración y te admiro mucho. Ambos gracias por su apoyo durante los estudios de doctorado, por sus observaciones enriquecedoras en cada etapa de mi formación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco al jurado por la revisión del presente trabajo, por sus observaciones y comentarios, enriqueciendo el contenido de la presente investigación, Dr. María del Carmen Auxilio González Villaseñor, Dr. Sigfrido Sierra Galván, Dra. Adriana Montoya Esquivel, Dra. Patricia Vélez Aguilar y la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea.

Agradezco al Biólogo Daniel Ramírez Martínez por todo el apoyo en el trabajo de campo y de laboratorio, Dany sabes que crecí contigo en el ámbito forestal. El tercer capítulo de este trabajo es nuestro.

A la Bióloga Beatriz Santiago Morales, mi primer estudiante graduada hace algunos años atrás en Oaxaca, Bety contigo no solo fue tu tesis, nuestro capítulo dos de esta investigación, sino muchas aventuras juntas en la Sierra.

Agradezco el apoyo de los curadores de los herbarios que nos apoyaron con el préstamo de ejemplares de *Laccaria* como son el Dr. Víctor Manuel Gómez Reyes de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Dra. Miroslava Quiñones Martínez de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; Biól. Florencia Ramírez Guillén del Instituto de Ecología, Xalapa; M. en C. Celia Elvira Aguirre Acosta del Instituto de Biología, UNAM; Biól. Lilia Pérez Ramírez de la Facultad de Ciencias, UNAM.

De igual forma a la Dra. Mayra Elena Gavíto Pardo y al Dr. Roberto Antonio Lindig Cisneros del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM; Dra. Adriana Montoya Esquivel de la Universidad Autónoma de Tlaxcala; Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez y al Dr. Sigfrido Sierra Galván de la Facultad de Ciencias, UNAM; todos y cada uno de ustedes por su apoyo, su crítica constructiva y por ser parte de mi comité de candidatura.

Agradezco a la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea y la M. en C. Iris Suárez Quijada por el apoyo en la realización del experimento de micorrización, el invernadero a su cargo nos permitió cumplir ese objetivo. De igual forma agradezco al Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad del Instituto de Biología de la UNAM, en particular a las áreas de Microscopía Electrónica de Barrido y Fotografía Multifocal, muchas gracias por el apoyo a la M. en C. Berenit Mendoza y a la Bióloga Susana Guzmán, encargadas de dichas áreas.

Mis más sincero reconocimiento y gratitud al Dr. Jesús Pérez Moreno y a su grupo de trabajo, siempre tan amables y gentiles conmigo, si hay alguien que admiro en este momento de mi vida profesional es a usted, por ser un gran investigador, pero sobre todo por ser un buen ser humano. Muchas gracias por el apoyo en COLPOS, fue grato tomar un curso con usted, gracias por participar en el capítulo tres de la presente investigación.

Durante el desarrollo del proyecto parte del trabajo en campo fue en La Malinche, Tlaxcala donde la candidata a Doctora Amaranta Ramírez Terrazo fue la guía, la colega y la amiga. Muchas gracias.

Otro de los lugares importantes para la realización de la tesis fue Ixtlán de Juárez, Oaxaca, lugar lleno de magia, donde solo es necesario ir una vez para querer vivir por siempre ahí, gracias Roberto por llevarme a tan hermoso lugar. Ingeniero Forestal Julio Aurelio Ruiz Aquino por todo el apoyo que me brindaste siendo encargado de Servicios Técnicos Forestales, por el apoyo en campo, en el traslado de la planta, pero sobre todo por abrirme las puertas de tu casa, Julio mil gracias.

De esta gran comunidad muy buenas experiencias adquirí en el doctorado, grandes personas conozco como son el Ing. Elías, Don Aparicio Martínez e

Ingeniero Baudiel Santiago, gracias por el apoyo en campo. Que bueno seguir frecuentándolos y saber de ustedes.

Hay gente que siempre va estar apoyando en las buenas y en las no tan buenas etapas de la vida, saben que las amo y les agradezco todo el apoyo, recuerdo el día que metimos el experimento en el INIFAP, de regar mis pinos, de pasarlos a campo en Oaxaca, miles de millones de gracias Emma y Gaby. Compañeras de carrera y de vida.

Gracias a una persona muy especial, que paso de ser la persona encargada del invernadero a ser una buena amiga y colega, muchas gracias Virginia Jacob Cervantes, sabes que te aprecio y admiro mucho.

A mi familia que le tocó ir a regar arbolitos conmigo los fines de semana, a Gustavo que siendo mi novio ahí estaba regando cada tercer día. Muchas gracias.

A todos y cada uno de los que en este largo andar estuvieron y siguen estando, mucha gente se unió a este gran circulo de mi vida, a gente como mis actuales tesisas Ana Palacios, Laura Casimiro, Pablo Delgado, Brenda Mariano, Bibiana Cordero y Nayeli Guadalupe, cada uno me llena de energía, de ganas de seguir, con ustedes crezco, aprendo en cada uno de sus proyectos. Ya es hora de que empiecen a salir esas tesis con asesora Dra. Ibeth.

Nuevo grupo de amigos y colegas, que el Tecnológico de Estudios Superiores me ha dado la gran dicha de conocer. Marlen, que si bien nos enojamos, seguimos contado nuestras penas y alegrías. Mónica, muchas gracias por ser amiga y colaboradora en los proyectos, somos muy buen equipo. Dionicio si bien a veces creo que me caes mal jaja otras muchas sabes que te quiero mucho, que bueno que seamos equipo. Carlos, gracias por hacer mis días llenos de risa, sé que no eres gracioso pero como me burlo de usted. Jefa, sabe que la aprecio y que más que solo mi superior es una persona a la que considero mi amiga, maestra

Margarita sabe que la aprecio mucho y que le agradezco su apoyo en estos cinco años en el TESH.

Gracias a todos mis amigos, compañeros y colegas, Magdalena Contreras, Silvia Bautista, Tania Raymundo, Patricia Ávila, Sandra Casto, porque a pesar de todo nos reímos de las cosas.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a ese motor que me da energía, que a veces ya no quiero jugar pero juego, que me hace contar cuentos aburridísimos, que cada día me duermo a su lado y le digo lo mucho que la amo. A ti Laila Donaji, te dedico mi esfuerzo por culminar este proceso, que es pesado y a veces frustrante no ser tu mamá de tiempo completo, pero que con gusto sacrifico el tiempo porque tu estés bien, que no te falte nada. Cuando sepas leer, espero entiendas que llegar a este punto llevó mucho esfuerzo, mucha dedicación, pero sobre todo mucho apoyo de la familia.

Gracias Gustavo, por ser un buen padre, por amar a nuestra hija, por amarme a mi, sabes que te amo y que siempre desde que éramos niños te amaba.

Mamá, sé que peleamos mucho porque somos iguales, eres fuerte, luchas por los tuyos, te amo AMA. Marisol, Mireya y Arturo, saben que los amo y que cada uno de ustedes siempre serán responsables de mis éxitos. Mis sobrinos los amo; Pili eres mi guerrera incansable, todos los días libras una batalla, eres nuestra fuerza.

CONTENIDO

RESUMEN	11
ABSTRACT	14
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	16
CAPÍTULO II. DIVERSIDAD DE ESPECIES DE <i>Laccaria</i> DE IMPORTANCIA FORESTAL EN EL NEOTRÓPICO MEXICANO	
Resumen.....	27
Abstract.....	28
Introducción.....	28
Materiales y métodos.....	31
Obtención de ejemplares.....	31
Descripción de ejemplares.....	32
Secuenciación de DNA de esporomas.....	32
Análisis filogenético.....	33
Resultados.....	34
Discusión.....	47
Conclusiones.....	49
Referencias.....	50
CAPÍTULO III. COMPARACIÓN ENTRE LA ABUNDANCIA DE ESPOROMAS Y ECTOMICORRIZAS DEL GÉNERO <i>Laccaria</i> EN IXTLÁN DE JUÁREZ, OAXACA	
Resumen.....	56
Abstract.....	57
Introducción.....	58
Método.....	61
Área de estudio.....	61
Trabajo de campo.....	62
Secuenciación de DNA de micorrizas.....	63
Análisis de resultados.....	64
Resultados.....	64

Discusión.....	69
Conclusiones.....	73
Referencias.....	73
CAPÍTULO IV. SYMPATRIC SPECIES DEVELOP MORE EFFICIENT ECTOMYCORRHIZAE IN THE <i>Pinus-Laccaria</i> SYMBIOSIS	
Abstract.....	80
Resumen.....	81
Introduction.....	82
Materials and methods.....	83
Results.....	84
Discussion.....	87
References.....	88
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL.....	92
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES GENERALES.....	96
CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS.....	98
REFERENCIAS.....	100
ANEXO.....	103

RESUMEN

Las comunidades en México aprovechan los recursos forestales no maderables como fuente de alimento, en particular los hongos, los cuales son abundantes en las temporadas de lluvias. En los bosques templados del país, el género más abundante es *Laccaria*, el cual además de ser comestible, sirve como inóculo experimental en los procesos de micorrización a nivel de invernadero.

Los criterios con los cuales se han establecido las identidades taxonómicas de las especies de *Laccaria* son diversos, todos basados exclusivamente en morfología, por ello se estableció en primera instancia, conocer bajo un criterio unificador basado en caracteres morfológicos y secuencias moleculares, la identidad de las especies reportadas como más abundantes en términos de esporomas en los bosques del Neotrópico Mexicano.

Al saber que las especies de *Laccaria* son las más abundantes a nivel de esporoma, y que estas se aprovechan para la obtención de inóculo, conocer si este mismo fenómeno de abundancia se tendría a nivel de micorrizas fue una de las preguntas planteadas en la presente investigación.

Uno de los problemas que se enfrentan los programas de reforestación, aforestación, restauración ecológica o migración asistida es la falta de micorrización en las especies vegetales para manejar o bien la presencia de micorriza pero de distribución alopátrica con respecto al huésped. Es por ello que también se planteó conocer si la distribución de las especies de *Laccaria* influyen en las características morfológicas, nutrimentales y de micorrización del hospedero.

Es por lo anterior que la tesis se dividió en tres capítulos y un anexo: I) Diversidad de especies de *Laccaria* de importancia forestal en el Neotrópico Mexicano; II) Comparación entre la abundancia de esporomas y ectomicorrizas del género *Laccaria* en Ixtlán de Juárez, Oaxaca; III) Especies simpátricas que desarrollan ectomicorrizas más eficientes en la simbiosis *Pinus-Laccaria*.

En el capítulo I se hizo la revisión morfológica de los ejemplares de *Laccaria* reportados como los más abundantes a nivel de esporoma para los estados de

Michoacán, Estado de México, Oaxaca, Tlaxcala y Veracruz. De igual forma para cada uno de los ejemplares se extrajo el DNA, amplificando y secuenciando la región ITS rDNA. Esto tuvo como resultado que las especies más abundantes son *L. cf. laccata*, *L. trichodermophora*, *L. squarrosa*, *L. cf. vinaceobrunnea* y *L. nobilis*. Se amplió el conocimiento de la distribución de *L. squarrosa* al estado de Oaxaca, así como hospedero a *Quercus* sp.

En el capítulo II se escogió la comunidad de Ixtlán de Juárez, Oaxaca para hacer la comparación entre la abundancia de esporomas y micorrizas de *Laccaria*; para ello se realizó muestreo en tres sitios con dominancia de *Pinus patula*, los esporomas fueron recolectados para su determinación taxonómica y se tomaron datos de abundancia y producción (unidades y peso). No existió una correspondencia entre la abundancia relativa (AR) de las especies más abundantes a nivel de esporoma (*Laccaria* c.f. *laccata* AR=0.43, *Cantharellus tubaeformis* AR=0.27, *Lactarius chrysorrehus* AR=0.10 y *L. c.f. vinaceobrunnea* AR=0.08) y las más abundantes a nivel de micorrizas (*Lactarius* aff. *deceptivus* AR=0.25, *Cortinarius* aff. *ochrophyllus* AR=0.12, *Hydnum* aff. *cuspidatum* AR=0.05, *Russula* sp.1 AR=0.05 y *Sebacina* aff. *dimitica* AR=0.05).

En el capítulo III se trabajó con dos especies simpátricas de *Laccaria* (*Laccaria trichodermophora* y *L. bicolor*) y dos alopátricas (*L. cf. laccata* y *L. cf. vinaceobrunnea*), además de *Pseudomonas fluorescens* para evaluar su efecto en el crecimiento y contenido de nutrientes de plántulas de *Pinus montezumae*. Los tratamientos que mostraron una mayor eficiencia fueron los inoculados con especies simpátricas; todos los tratamientos con *Laccaria*, en presencia o ausencia de bacterias, mostraron una mejor respuesta en comparación con los controles no inoculados.

Las especies de *Laccaria* en el Neotrópico Mexicano son un recurso forestal no maderable disponible para las comunidades; estos hongos por su abundancia permiten ser aprovechadas en el ámbito forestal. No obstante, a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo es necesario pensar en utilizar las especies simpátricas en los procesos de micorrización y en consorcios de especies abundantes tanto a nivel de esporoma como de micorriza, para

garantizar la supervivencia en invernadero, establecimiento en campo y desarrollo de la planta.

ABSTRACT

Communities in Mexico use non-timber forest resources as a source of food, particularly mushrooms, which can be abundant in the rainy season. In the country's temperate forests, the most abundant genus is *Laccaria*, which in addition to being edible, serves as an experimental inoculum in the mycorrhization process at the greenhouse level.

The criteria with which the taxonomic identities of *Laccaria* species have been established are diverse, all based exclusively on morphological characters. For this reason, it was first established to know, under a unifying criterion based on morphology and molecular biology, the identity of the species reported as most abundant in terms of basidiomata in the forests of the Mexican Neotropics.

Knowing that *Laccaria* species are the most abundant at the basidiomata level, and that these are used to obtain inoculum, one of the questions raised in this research was whether this same phenomenon of abundance would occur at the mycorrhizal level.

One of the problems faced by reforestation, afforestation or ecological restoration programs is the lack of mycorrhization in the plant to work or the presence of mycorrhizae but with an allopatric distribution with respect to the host. That is why I propose to know out whether or not the distribution of *Laccaria* species influences the morphological, nutritional and mycorrhizal characteristics of the host.

Therefore, the thesis was divided into three chapters and an annex: I) Diversity of *Laccaria* species of forest importance in Mexican Neotropics; II) Comparison between *Laccaria* basidiomata and ectomycorrhizae abundante in Ixtlan de Juarez, Oaxaca; III) Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis.

In chapter I, a morphological review was made of the *Laccaria* specimens reported as the most abundant at basidiomata level for the states of Michoacan, State of Mexico, Oaxaca, Tlaxcala and Veracruz. Similarly, DNA was extracted from each of the specimens, amplifying and sequencing the ITS rDNA region. As a result, the most abundant species are *L. cf. laccata*, *L. trichodermophora*, *L. squarrosa*, *L. cf.*

vinaceobrunnea and *L. nobilis*. Knowledge of the distribution of *L. squarrosa* is extended to the state of Oaxaca, as well as the host *Quercus* sp.

In chapter II, the community of Ixtlan de Juarez, Oaxaca was chosen to make the comparison between the abundance of basidiomata and mycorrhizae of *Laccaria*; The sampling took place in three sites with *Pinus patula* dominance. The fungi basidiomata were collected to determine their taxonomic identity and production data (quantity and weight). Mycorrhizae were obtained from soil core samples, whose ITS DNA was sequenced for molecular identification. There was no correspondence between the species with higher basidiomata production (*L. laccata* AR=0.43, *Cantharellus tubaeformis* AR=0.27, *Lactarius chrysorrehus* AR=0.10, and *L. vinaceobrunnea* AR=0.08) and those with more abundant mycorrhizae (*Lactarius* aff *deceptivus* AR=0.25, *Cortinarius* aff *ochrophyllus* AR=0.12, *Hydnum* aff *cuspidatum* AR=0.05, *Russula* sp.1 AR=0.05, and *Sebacina* aff *dimitica* AR=0.05).

In chapter III, two sympatric (*Laccaria trichodermophora* and *L. bicolor*) and two allopatric (*L. cf. laccata* and *L. cf. vinaceobrunnea*) species of *Laccaria* and *Pseudomonas fluorescens* were chosen to assess their effect on the growth and nutrient content of seedlings of *Pinus montezumae*. The treatments that showed the highest efficiency were those inoculated with sympatric species; all treatments with *Laccaria*, in presence or absence of bacteria, showed a better response compared to non-inoculated controls.

Laccaria species in the Mexican Neotropics are a non-timber forest resource available to communities, which due to their abundance allow them to be harvested in the forest and at the research level in Mexico. However, based on the results obtained in this work, it is necessary to consider the use of sympatric species in mycorrhization processes and in consortiums of species both abundant at spore and mycorrhizal level, in order to guarantee the survival in greenhouses, field establishment and development of the plant.

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las interacciones ecológicas y fisiológicas entre organismos están determinadas por factores bióticos y abióticos los cuales contribuyen a los procesos de desarrollo y reproducción de las especies que integran la asociación. Una de las interacciones más importantes para el funcionamiento de los ecosistemas, son las micorrizas. Estas asociaciones que se definen como “una estructura en la cual la unión simbiótica entre un hongo y el órgano de absorción de las plantas, confiere un incremento en el adecuación sobre una o ambas partes” (Smith y Read, 2008), contribuyen a la supervivencia de la planta en campo, facilitando hasta el 75% de absorción de P y el 80% de N que necesita (Rosinger et al., 2018).

Las ectomicorrizas están integradas por las hifas que rodean a las raíces secundarias de especies de Gymnospermas y Angiospermas formando un pseudotejido llamado manto; en el interior de la raíz el hongo se desarrolla rodeando las células corticales, constituyendo la red de Hartig, además presentan una masa de hifas externa llamadas micelio extraradical. Estos tres elementos presentan características únicas entre especies, por lo que describirlos detalladamente es una contribución importante para diferenciarlas (Agerer, 1987-2002). Esta simbiosis la conforman especies de los *Phyla* Basidiomycota, Ascomycota y Mucoromycota. Se estima que existen entre 20 000 y 25 000 especies de hongos ectomicorrizógenos a nivel global, de los cuales se han descrito cerca de 6 000, asociados en aproximadamente el 2.2% de plantas vasculares, en dos líneas de Gymnospermas y 28 de Angiospermas llevando a cabo este tipo de simbiosis (Smith y Read, 2008; Tedersoo et al., 2009, 2012; O’Hanlon, 2012; Brundrett y Tedersoo, 2018).

La importancia de la asociación ectomicorrízica en las plantas fue notoria cuando se establecieron las primeras plantaciones experimentales de pinos

exóticos en diversas partes del mundo y éstos fracasaron (Castellano y Molina, 1989. Mikola (1973) consideró que dicho fracaso se debió a la falta de los hongos simbioses y sugirió la inoculación de las plantas para garantizar el éxito de las plantaciones (Pérez-Moreno et al., 2010). A partir de estos estudios pioneros es que los hongos ectomicorrízicos cobran importancia; se demostró experimentalmente que la supervivencia de los pinos depende de la simbiosis (Read y Pérez-Moreno, 2003), dando como resultado numerosos estudios enfocados en la diversidad y composición de las comunidades.

Estas comunidades pueden ser descritas a partir de las estructuras sexuales de los hongos y por las puntas de raíces micorrizadas extraídas del suelo; cada una de estas fases de estudio mostrarán una parte del ciclo de vida de las comunidades. Sin embargo, la baja correspondencia reportada entre la fase sexual y la vegetativa micorrízica hace necesario que se realicen estudios para ampliar la comprensión de toda la comunidad (Gardes y Bruns, 1996; Horton y Bruns, 2001). Además estas comunidades son altamente heterogéneas dada su variación en el tiempo, por la especie de hospedero y por las características del suelo de diferentes regiones geográficas (Reverchon et al., 2012). Entre éstas sobresalen la disponibilidad de fósforo (Twieg et al., 2009), contenido de nitrógeno (Lileskov et al., 2002; Trudell y Edmonds, 2004) y humedad (Trudell y Edmonds, 2004).

Unos de los hongos ectomicorrízicos importantes para el establecimiento y supervivencia de las plantas en las primeras etapas de desarrollo son las especies del género *Laccaria*, las cuales establecen simbiosis con una amplia variedad de familias de plantas como son: Pinaceae, Dypterocarpaceae, Fagaceae, Betulaceae, Myrtaceae, Tiliaceae, Juglandaceae y Salicaceae (Ramos et al., 2017). Por esto, es el género por excelencia utilizado en la ciencia de la tecnificación micorrízica en el mundo (Parladé y Álvarez, 1993; Pera y Parladé, 2005; Quoreshi et al., 2009; Teramoto et al., 2012; Onwuchekma et al., 2014).

Además de esto, se ha visto que las cinergias con la microbiota juegan un papel importante en la asociación ectomicorrízica, su presencia o ausencia pueden incrementar o inhibir la colonización del hospedero (Vik et al., 2013). Existen bacterias promotoras de micorrización (MHB por sus siglas en inglés Mycorrhiza Helper Bacteria) de los géneros *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Kumari et al., 2013; Gupta y Chakraborty, 2020). Las MHB pueden promover la tasa de infección micorrízica en diferentes estados de la interacción bacteria-hongo-planta. Por instantes, la fase de pre-infección, germinación de la espora y crecimiento del micelio a través del suelo y sobre la superficie de la raíz puede ser mejorada por MHB, y la susceptibilidad de la raíz se puede incrementar. Esto se ha observado en *Laccaria bicolor* con *Pseudomonas fluorescens* (Deveau et al., 2007; Deveau et al., 2010). Actualmente se sabe que muchas de las MHB como el género *Pseudomonas* son consideradas Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR) (Gupta y Chakraborty, 2020).

La diversidad de *Laccaria* a nivel mundial se estima entre 75 hasta 116 especies (Kirk et al., 2008; Wilson et al., 2017), las cuales se encuentran comúnmente en un intervalo amplio de hábitats. El uso de las técnicas de biología molecular, está evidenciando una restricción en la distribución de éstas tanto geográfica como de especificidad, teniendo implicaciones de importancia taxonómica, ecológica y fisiológica (Osmundson et al., 2005; Vincenot et al., 2012; Hortal et al., 2012; Wilson et al., 2013, 2017a, 2017b; Sheedy et al., 2013; Popa et al., 2014, 2016; Luo et al., 2016; Ramos et al., 2017; Cho et al., 2018).

El conocimiento del género *Laccaria* en México es de 15 especies y una variedad: *L. amethysteo-occidentalis*, *L. amethystina*, *L. bicolor*, *L. bullulifera*, *L. glabripes*, *L. laccata*, *L. nobilis*, *L. maritima*, *L. proxima*, *L. proximella*, *L. squarrosa*, *L. striatula*, *L. tetraspora*, *L. trichodermophora*, *L. vinaceobrunnea* y *L. laccata* var. *pallidifolia* (Aguirre-Acosta y Pérez-Silva, 1978; Valdés et al. 1983; Mueller, 1992; Nava y Valenzuela 1997; Montoya et al. 2005; Quiñonez et al. 2005; Landeros et

al. 2006; Pérez-Silva et al., 2006; Chanona-Gómez et al. 2007; Garibay et al. 2009; Pérez-Moreno et al. 2010; Montoya et al. 2015; Ramos et al., 2017).

A nivel ecológico, el género con mayor abundancia de esporomas en los bosques templados de México es *Laccaria*, teniendo una dominancia en la abundancia y producción (cantidad y peso). Las especies reportadas son *L. cf. laccata*, *L. bicolor s. l.*, *L. trichodermophora*, *L. cf. vinaceobrunnea* y *L. amethystina* (Villarreal, 1996; Gómez-Reyes, 2005; Montoya et al. 2005; Quiñonez et al. 2005; Garibay et al. 2009; Reverchon et al., 2012; Gómez-Hernández et al., 2019; Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019). A nivel de micorriza, en los bosques con dominancia de esporomas de *Laccaria* no se conoce cuál es su frecuencia, es por ello que se eligió Ixtlán de Juárez, Oaxaca como sitio de estudio ya que en 2002 (Garibay-Orijel et al., 2009), 2013 (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2020) y 2019 (Gómez-Hernández et al., 2019) a nivel de esporoma fue muy abundante las especies de *Laccaria*.

Siendo de las especies más disponibles a nivel de esporomas en México, los procesos de micorrización se centran en evaluar la calidad de la planta en términos morfológicos y nutrimentales, generalmente del género *Pinus*, teniendo como resultados un porcentaje estadísticamente significativo mayor en las plantas inoculadas de aquellas no inoculadas (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019; Vicente-Arbona et al., 2019; Gómez-Romero et al., 2013; Carrasco-Hernández et al., 2011; Méndez-Neri et al., 2011; Carrera-Nieve y López-Ríos, 2004). Si bien el inóculo y la planta están presentes en los bosques de México, la distribución del hospedero y los hongos no es una variable evaluada en dichos trabajos.

Se estudió a las especies de importancia forestal del género *Laccaria* desde las perspectivas taxonómica, ecológica y de aprovechamiento. Con esto se generó conocimiento de uno de los géneros más importantes en los procesos de micorrización y cultura en México. El documento está dividido en tres capítulos y un anexo:

Capítulo I. Tuvo como objetivo conocer la diversidad y taxonomía de las especies de *Laccaria* reportadas como las más abundantes a nivel de esporoma en el Neotrópico mexicano usando herramientas morfológicas y moleculares (ITS).

Capítulo II. Dado que el género *Laccaria* es de los más abundantes a nivel de esporoma y que este patrón persiste a lo largo del tiempo en los bosques de Ixtlán de Juárez, Oaxaca, el objetivo planteado fue conocer si a nivel de micorriza la abundancia de *Laccaria* es la misma.

Capítulo III. El objetivo fue evaluar los efectos de la micorrización (eficiencia en términos de crecimiento de la planta y contenido de nutrientes K, P y K) en *Pinus montezumae* con dos especies de hongos simpátricos (*Laccaria bicolor s. l.* y *L. trichodermophora*) y dos alopátricos (*L. cf. laccata* y *L. cf. vinaceobrunnea*), así como el efecto de *Pseudomonas fluorescens* sobre la micorrización de las cuatro especies de hongos.

Anexo I. Capítulo titulado “Xocoyol” dentro del libro titulado “Las plantas, animales y hongos fundamentales para los pueblos de México”. Este tiene como objetivo dar a conocer aquellas especies más representativas de importancia cultural para las comunidades de México. Siendo *Laccaria cf. vinaceobrunnea*, *L. cf. laccata*, *L. trichodermophora* y *L. bicolor s. l.* las especies representativas del género.

REFERENCIAS

- Agerer, R. (Ur. 1987-2002). *Color Atlas of Ectomycorrhiza*. Germany Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Aguirre-Acosta, E. y Pérez-Silva, E. (1978). Descripción de algunas especies del género *Laccaria* (Agaricales) de México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 12, 33-58.

- Brundrett, M.C. y Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 2020, 1108-1115.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J.J., Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. (2011). Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural*, 84, 83-96.
- Carrera-Nieva, A. y López-Ríos, G.F. (2004). Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 10, 93-98.
- Castellano, M.A. y Molina, R. (1989). *The container nursery*. Manual, Vol. 5 In Landis et al. Ed. *Mycorrhizae*. Agric Handbook 674. USDA Forest Service Washinton D.C.
- Chanona-Gómez, F., Andrade-Gallegos, R.H., Castellanos-Albores, J. y Sánchez, J.E. (2007). Macromicetos del parque educativo laguna Bélgica, municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78, 369-381.
- Cho, H.J., Park, M.S., Lee, H., Oh, SY, Wilson, A.W., Mueller, M. y Lim, Y.W. (2018). A systematic revision of the ectomycorrhizal genus *Laccaria* from Korea. *Mycologia*, doi 10.1080/00275514.2018.1507542.
- Deveau A., Palin B., Delaruelle C., Peter M., Kohler A., Pierrat J.C., Sarniguet A., Garbaye J., Martin F. y Frey-Klett P. (2007). The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist*, 175, 743-755.
- Deveau A., Brulé C., Palin b., Champmartin D., Rubini O., Garbaye J., Sarniguet A. y Frey-Klett P. (2010). Role of fungal trahalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 560-568.
- Garibay-Orijel, R., Martínez-Ramos, M. y Cifuentes, J. (2009). Disponibilidad de

- esporomas de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80, 521-534.
- Gardes, M. y Bruns, T.D. (1996). Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany*, 74, 1572-1583.
- Gómez-Hernández, M., Ramírez-Antonio, K.G. y Gándara, E. (2019). Ectomycorrhizal and Wood-decay macromycete communities along development stage of managed *Pinus patula* in Southwest Mexico. *Fungal Ecology*, 39, 109-116.
- Gómez-Reyes, V.M. (2005). *Diversidad de hongos ectomicorrízicos y su relación con diferentes unidades ambientales en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan*. Tesis de maestría, Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Gómez-Romero, M., Villegas, M., Sáenz-Romero, C. y Lindig-Cisneros, R.A. (2013). Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudoestrobus* en cárcavas. *Madera y Bosque*, 19, 51-63.
- Gupta, S.K. y Chakroborty, A.P. (2020). Mycorrhiza Helper Bacteria: Future Prospects. *International Journal of Research and Review*, 7, 387-391.
- Hortal, S., Trocha, L.K., Mura, t C., Chybicki, I.J., Buée, M., Trojankiewicz, M., Burczyk, J. y Martin, F. (2012). Beech roots are simultaneously colonized by multiple genets of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria amethystina* clustered in two genetic groups. *Molecular Ecology*, 21, 2116-2129.
- Horton, T.R. y Bruns, T.D. (2001). The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, 10, 1855-1871.
- Kirk, P.M., Cannon, P.R., Minter, D.W. y Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*. CAB. Gran Bretaña.
- Kumari D., Sudhakara M. y Ramesh C. (2013). Diversity of cultivable bacteria associated with fruiting bodies of wild Himalayan *Cantharellus* spp. *Ann Microbiol*, 63, 845-853.
- Landeros, F., Castillo, J., Guzmán, G. y Cifuentes, J. (2006). Los hongos

- (Macromicetos) conocidos en el cerro El Zamorano (Querétaro-Guanajuato), México. *Revista Mexicana de Micología*, 22, 25-31.
- Lilleskov, E.A., Fahey, T.J., Horton, T.R. y Lovett, G.M. (2002). Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology*, 83, 104-115.
- Luo, X., Ye, L., Chen, J., Karunarathna, S.C., Xu, J., Hyde, K.D. y Mortimer, P.E. (2016). *Laccaria rubroalba* sp. nov. (Hydnangiaceae, Agaricales) from Southwestern China. *Phytotaxa*, 284, 41-50.
- Méndez-Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero-Lizaola, R., Hernández-Acosta, E. y Lara-Herrera, A. (2011). Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana*, 29, 73-81.
- Montoya, L., Bandala, V.M., Baroni, T.J. y Hortan, T.R. (2015). A new species of *Laccaria* in montane cloud forest from Eastern Mexico. *Mycoscience*, 56, 597-605.
- Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A., Cifuentes, J. y Caballero, J. (2005). Useful wild of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity*, 17, 115-143.
- Mueller, G.M. (1992). Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana Botany*, 30, 1-58.
- Nava, M.R. y Valenzuela, G.R. (1997). Los macromicetos de la Sierra de Nanchititlan. *Polibotanica*, 5, 21-36.
- O'Hanlon, R. (2012). Below-ground ectomycorrhizal communities: the effect of small scale spatial and short term temporal variation. *Symbiosis*, 57, 57-71.
- Onwuchekwa, N.E., Zwuiazek, J.J., Quoreshi, A. y Khasa, D.P. (2014). Growth of mycorrhizal Jack pine (*Pinus banksiana*) and White spruce (*Picea glauca*) seedling planted in oil sands. *Mycorrhiza*, 24, 431-441.
- Osmundson, T.W., Cripps, C.L. y Mueller, G. (2005). Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. *Mycologia*, 97, 949-972.
- Parladé, J. y Alvarez I.F. (1993). Coinoculation of aseptically grown Douglas fir

- pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 3, 93-96.
- Pera, J. y Parladé, J. (2005). Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales*, 14, 419-433.
- Pérez-Moreno, J., Lorenzana-Fernández, A., Carrasco-Hernández, V. y Yescas-Pérez, A. (2010). *Los Hongos Comestibles Silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos*. Colegio de Posgraduados. México.
- Pérez-Silva, E., Esqueda, M., Herrera, T. y Coronado, M. (2006). Nuevos registros de Agaricales de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77, 23-33.
- Popa, F., Rexer, K.H., Donges, K., Yang, Z.L. y Kost, G. (2014). Three new *Laccaria* species from South-west China (Yunnan). *Mycological Progress*, 13, 1105-1117.
- Popa, F., Jiménez, S.Y.C., Weisenborn, J., Donges, K., Rexer, K.H. y Piepenbring, M. (2016). A new *Laccaria* species from cloud forest of Fortuna, Panama. *Mycological*, 15, 1-8.
- Quiñonez-Martínez, M., Garza, F. y Vargas, M. (2005). Aspectos ecológicos y diversidad de hongos ectomicorrízicos en bosque de pino encino de cinco localidades del municipio de Bocoyna, Chihuahua. *Ciencia en la Frontera*, 3, 29-38.
- Quoreshi, A.M., Kernaghan, G. y Hunt, G.A. (2009). Micorrhizal fungi in Canadian forest nurseries and field performance of inoculated seedlings. En. Khasa D., Piché Y. y Coughlan A. (Eds.). *Advances in Mycorrhizal Science and Technology* (pp. 115-128). Press Ottawa: NRC.
- Ramos, A., Bandala V.M. y Montoya, L. (2017). A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relic forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycKeys*, 27, 77-94.
- Read, D.J., y Pérez-Moreno, J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems. A journey towards relevance? *New Phytologist*, 157, 475-492.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Bonilla-Rosso, G. y Pérez-Moreno, J.

- (2012). Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedling and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forest. *FEMS Microbiology Ecology*, *80*, 479-487.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., Ortega-Larrocea, M.P. y Arellano-Torrez, E. (2019). Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizas in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *90*, e902868.
- Rosinger, C., Sandén, H., Matthews, B., Mayer, M. y Godbold, D. (2018). Patterns in Ectomycorrhizal Diversity, Community Composition, and Exploration Types in European Beech, Pine, and Spruce Forests. *Forest*, *9*, 445.
- Sheedy, M.E., Van de Wouw, P.A., Holett, J.B. y May, W.T. (2013). Multigene sequence data reveal morphologically cryptic phylogenetic species within the genus *Laccaria* in southern Australia. *Mycologia*, *105*, 547-563.
- Smith, S.E. y Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic, London.
- Tedersoo, L., May, T.W. y Smith, M.E. (2009). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, *20*, 217-263.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Toots, M., Diédhiou, G., Henkel, W.T., Kjeller, R., Morris, M.H., Nara, K., Nouhra, E., Peay, K.G., Pölme, S., Ryberg, M., Smith, M.E. y Kõljalg. (2012). Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, *21*, 4160-4170.
- Teramoto, M., Wu, B. & Hogetsu, T. (2012). Transfer of ¹⁴C-photosynthate to the sporocarp of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria amethystina*. *Mycorrhiza*, *22*, 219-225.
- Trudell, S.A. y Edmonds, R.L. (2004). Macrofungus communities correlate with moisture and nitrogen abundance in two old-growth conifer forest. *Canadian Journal of Botany*, *82*, 781-800.
- Twieg, B.D., Durall, D.M., Simard, S.W. y Jones, M.D. (2009). Influencia of soil nutrients on ectomycorrhizal communities in a chronosequence of mixed temperate forest. *Mycorrhiza*, *19*, 305-316.

- Valdés, M., Piña, F. y Grada, R. (1983). Inoculación micorrízica y crecimiento de plántulas de pino en suelo erosionado. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 18, 56-70.
- Vicenot, L. Nara, K., Sthultz, C., Labbé, J., Dubois, M.P., Tedersoo, L., Martin, F. y Selosse, M.A. (2012). Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria amethystine* complex. *Molecular Ecology*, 21, 281-299.
- Vicente-Arbona, J.C., Carrasco-Hernández, V., Rodríguez-Trejo, D.A. y Villanueva-Morales, A. (2019). Calidad de planta de *Pinus greggii* producida en sustratos a base de aserrín. *Madera y Bosque*, 25, e2521784.
- Vik U., Logares R., Blaaid R., Halvorsen R., Carlsen T., Bakke I., Kolsto A.B., Okstad O. y Kauserud H. (2013). Different bacterial communities in ectomycorrhizae and surrounding soil. *Scientific Reports*, 3, 3471: 1-8.
- Villarreal, L. (1996). Los hongos silvestres: componentes de la biodiversidad y alternativas para la sustentabilidad de los bosques templados de México. Colegio de Posgraduados. Edo. de Méx.
- Wilson, A.W., Hosaka, K., Perry, B.A. y Mueller, G.M. (2013). *Laccaria* (Agaricomycetes, Basidiomycota) from Tibet (Xizang Autonomous Region, China). *Mycoscience*, 54, 406-419.
- Wilson, A.W., Perry, B.A. y Mueller, G.M. (2017a). Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist*, 213, 1862-1873.
- Wilson, A.W., May, T.W. y Mueller, G.M. (2017b). Biogeography of ectomycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. En: L. Tederoo (Ed.), *Ecological studies: biogeography of mycorrhizal symbiosis* (pp. 273-297). Gewerbestrasse, Switzerland: Springer.

CAPÍTULO II.

Diversidad de especies de *Laccaria* de importancia forestal en el Neotrópico Mexicano

Diversity of *Laccaria* species of forest importance in Mexican Neotropics

Ibeth Rodríguez-Gutiérrez^{ab}, Roberto Garibay-Orijel^{a*}, Joaquín Cifuentes Blanco^c

^aInstituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

^bTecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan, Estado de México, México.

^cFacultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Ibeth.rodriguez@tesh.edu.mx, *rgaribay@ib.unam.mx, jcb@hp.fciencias.unam.mx

Resumen

Las especies del género *Laccaria* en los bosques del Neotrópico Mexicano son de las más abundantes a nivel de esporoma, siendo un recurso forestal disponible para las comunidades por ser comestibles, así como fuente de inóculo para micorrizar plantas en invernadero. En el presente trabajo se determinó la identidad taxonómica de las especies reportadas previamente como las más abundantes en dichos bosques: *L. amethystina*, *L. amethysteo-occidentalis*, *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, *L. trichodermophora* y *L. vinaceobrunnea*; mediante análisis filogenéticos con la región ITS de 49 ejemplares, así como el análisis micromorfológico de los mismos. Se agruparon cinco clados los cuales corresponden con *L. nobilis*, *L. squarrosa*, *L. trichodermophora*, *L. cf. laccata* y *L. cf. vinaceobrunnea*.

Palabras claves:

ITS, sistemática, taxonomía, México.

Abstract

The species of the genus *Laccaria* in the forests of the Mexican Neotropics are most productive at basidiomata level, being a forest resource available to the communities for their edibility, as well as a source of inoculum to mycorrhizae plant in the greenhouse. In the present work, the taxonomic identity of the species previously reported as the most productive at basidiomata level, in these forests: *L. amethystina*, *L. amethysteo-occidentalis*, *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, *L. trichodermophora* y *L. vinaceobrunnea*. In de present work, the taxonomic identity of the species; by phylogenetic analysis with its 49 examples, as well as the micromorphological description of them. Five clades were grouped which correspond to *L. nobilis*, *L. squarrosa*, *L. trichodermophora*, *L. cf. Laccata* y *L. cf. vinaceobrunnea*.

Key words:

ITS, systematics, taxonomy, Mexico.

Introducción

La salud y calidad de los bosques dependen de las interacciones que suceden en las raíces. Una de las simbiosis más importantes es la ectomicorriza, que se define como una estructura en la cual la unión entre un hongo y el órgano de absorción de las plantas, confiere un incremento en la adecuación sobre una o ambas partes (Smith y Read, 2008). Esta simbiosis contribuye al éxito de la planta en el campo, ya que los hongos ectomicorrízicos facilitan la absorción de hasta el 75% de P y el 80% del N que la planta necesita (Rosinger et al., 2018).

Uno de los géneros de hongos ectomicorrízicos más importantes para el establecimiento y supervivencia de las plantas en sus primeras etapas de desarrollo es *Laccaria*. Sus especies establecen simbiosis con raíces de diversas familias tales como: Pinaceae, Dypterocarpaceae, Fagaceae, Betulaceae, Myrtaceae, Tiliaceae, Junlandaceae y Salicaceae (Ramos et al., 2017; Cho et al.,

2018). Encontrándose en un intervalo amplio de distribución, sin embargo, gracias a las técnicas de biología molecular, se está evidenciando una restricción en su distribución, teniendo implicaciones de importancia taxonómica, ecológica y fisiológica (Vincenot et al., 2012; Wilson et al., 2017a, 2017b).

Los patrones de distribución geográficos en la mayoría de los hongos ectomicorrízicos han sido poco estudiados, ya que muchos poseen una naturaleza críptica y/o adaptaciones ecológicas las cuales algunas veces pueden ser específicas; sugiriendo una dispersión limitada, eventos recientes de especiación y potencial endemismo (Vincenot et al., 2012; Wilson et al., 2017a, 2017b). Por ejemplo, la diversidad genética de *Laccaria amethystina* demuestra una posible especiación entre las poblaciones Norteamericanas, Europeas y Asiáticas, existiendo un aislamiento genético completo entre estas poblaciones, sin una correlación significativa con la latitud, longitud, elevación o factores climáticos como temperatura o precipitación (Vincenot et al., 2012). Sin embargo, el nombre de *L. amethystina* se ha utilizado para ejemplares que presentan color morado como carácter morfológico distintivo de esta especie en todo el mundo. En general, la taxonomía de *Laccaria* es compleja debido a la poca variación microscópica y la plasticidad de sus caracteres morfológicos.

Entre especies, los caracteres morfológicos se traslapan y esto dificulta su delimitación y subestima su riqueza, no obstante estudios filogenéticos empiezan a dar luz sobre la diversidad y los patrones biogeográficos del género (Wilson et al., 2017a, 2017b). El principal marcador molecular utilizado en la sistemática de *Laccaria* es la región de los ITS; que si bien por sí solo no resuelve las relaciones filogenéticas, sí permite la delimitación de las especies (Osmundson et al., 2005; Vincenot et al., 2012; Hortal et al., 2012; Wilson et al., 2013, 2017a, 2017b; Sheedy et al., 2013; Popa et al., 2014, 2016; Montoya et al., 2015; Luo et al., 2016; Ramos et al., 2017; Cho et al., 2018).

Laccaria Berkeley & Broome pertenece a la familia Hydnangiaceae en el orden Agaricales (Matheny et al., 2006). El género presenta una diversidad de especies estimada entre 75 y 116 a nivel mundial (Kirk et al., 2008; Wilson et al., 2017a). Se distribuye en ecosistemas templados, tropicales, mesófilo de montaña y ambientes alpinos asociados con una amplia gama de hospederos ectomicorrízicos (Osmundson et al., 2005; Montoya et al., 2015; Sheedy et al., 2013; Ramos et al., 2017; Wilson et al., 2017a, 2017b; Cho et al., 2018;). El género se caracteriza por presentar basidiosporas globosas a oblongas, equinuladas, multinucleadas; basidiomas de color marrón, anaranjado o púrpura; láminas anchas, gruesas, separadas, adnadas; base micelial blanca o púrpura (Singer, 1977; Mueller, 1991, 1992; Vesterholt, 2008).

La diversidad del género *Laccaria* en México es de 16 especies y una variedad: *L. amethysteo-occidentalis* G.M. Muell., *L. amethystina* Cooke, *L. bicolor* (Maire) P..D. Orton, *L. bullulifera* Singer, *L. glabripes* McNabb, *L. laccata* (Scop.) Cooke, *L. nobilis* A.H. Sm., *L. maritima* (Theodor.) Singer ex Huhtinen, *L. proxima* (Boud.) Pat., *L. proximella* Singer, *L. squarrosa* Bandala, Montoya & A. Ramos, *L. striatula* (Peck) Peck, *L. tetraspora* Singer, *L. trichodermophora* G.M. Muell., *L. vinaceobrunnea* G.M. Muell. y *L. laccata* var. *pallidifolia* (Peck) Peck. Ha sido registrado en 17 estados (Ciudad de México, Chiapas, Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro San Luis Potosí, Sonora, Tlaxcala y Veracruz), en bosques monodominantes y mixtos de *Quercus*, *Pinus*, *Abies religiosa*, *Fagus grandifolia* var. *mexicana* y Mesófilo de Montaña principalmente (Aguirre-Acosta y Pérez-Silva, 1978; Valdés et al. 1983; Mueller, 1992; Nava y Valenzuela 1997; Montoya et al. 2005; Quiñonez et al. 2005; Landeros et al. 2006; Pérez-Silva et al., 2006; Chanona-Gómez et al. 2007; Villarruel-Ordaz y Cifuentes, 2007; Garibay et al. 2009; Pérez-Moreno et al. 2010; Montoya et al. 2015; Ramos et al., 2017; Kong et al. 2018; Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019).

En México las investigaciones de ecología de comunidades de esporomas de hongos ectomicorrízicos en bosques de coníferas, frecuentemente encuentran que el género *Laccaria* es el más abundante. Por ejemplo: *L. amethystina* y *L. laccata* en el estado de Veracruz (Villarreal, 1996); *L. laccata* s.l., *L. proxima*, *L. bicolor* s.l. y *L. amethystina* s.l. en Michoacán (Gómez-Reyes, 2005); *L. laccata* s.l., *L. amethystina* s.l. y *L. bicolor* s.l. en Chihuahua (Quiñonez-Martínez et al., 2005); *L. trichodermophora*, *L. bicolor* s.l. y *L. amethystina* s.l. en Tlaxcala (Montoya et al., 2005); *L. laccata* var. *pallidifolia*, *L. vinaceobrunnea* y *L. amethysteo-occidentalis* en Oaxaca (Garibay-Orijel et al., 2009); *L. bicolor* s.l. y *L. laccata* s.l. en Morelos (Reverchon et al., 2012); *Laccaria* sp. 1 y *Laccaria* sp. 2 en Oaxaca (Gómez-Hernández et al., 2019), *L. cf. laccata*, *L. cf. vinaceobrunnea* en Oaxaca (Rodríguez-Gutiérrez, et al., 2019).

Dada la complejidad taxonómica e importancia forestal de las especies de *Laccaria* en los bosques mixtos y de coníferas en México, se planteó el objetivo de conocer la diversidad y taxonomía de las especies reportadas como muy abundantes a nivel de esporoma en el Neotrópico mexicano usando herramientas morfológicas y moleculares.

Materiales y métodos

Obtención de ejemplares. Se llevó a cabo la revisión de ejemplares de las siguientes colecciones: Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (FCME); Herbario Nacional de México, Instituto de Biología, UNAM (MEXU); Herbario del Instituto de Ecología, Xalapa (XAL); Escuela de Biología de la Universidad Michoacana (EBUM); así como de recolectas en algunas localidades de los estados de México, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Tlaxcala y Veracruz. Estos ejemplares corresponden con aquellas especies que son las más abundantes en cuanto a producción de esporomas en los bosques del Neotrópico mexicano, siendo de importancia forestal por su simbiosis ectomicorrízica. Estas especies se

desarrollan de los 1847 a 4069 msnm, en bosques mixtos de *Pinus* y *Quercus* dominados por coníferas.

Descripción de ejemplares. Los ejemplares recolectados en fresco se caracterizaron bajo el método propuesto por Cifuentes et al. (1986) y se deshidrataron para su posterior análisis micromofológico. Los colores se describieron con las claves COMEX, Methuen (Kornerup y Wanscher, 1978) y Munsell (1978). Se utilizó un microscopio óptico (Olympus BX51 con contraste diferencial). Se tomaron fotografías de las diferentes estructuras con la cámara digital Infinity 1, adaptada al microscopio óptico. Las basidiosporas se fotografiaron con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5310LV) del Instituto de Biología de la UNAM. La forma de las basidiosporas así como su ornamentación se determinaron con el sistema propuesto por Wilson et al. (2013); forma: Q=1.0 verdaderamente globosas, Q>1.0 elipsoides y en aquellas esporas ligeramente más anchas que largas la forma es llamada obelipsoide.

Secuenciación de DNA de los esporomas. La extracción de DNA se llevó a cabo con el kit Xnap (Sigma-Aldrich) utilizando placas para PCR (GENEMate, ISC BioEXpress) de 96 pozos, en cada pozo se agregaron diez μm de solución de extracción adicionando en cada uno un fragmento de 1 mm de esporoma. Posteriormente en el termociclador (Applied biosystems) se colocaron las muestras con el siguiente programa: 65 °C por diez minutos y 95 °C por diez minutos. Posteriormente se añadieron 20 μm de solución de disolución, se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se guardaron a 4 °C (Kennedy et al., 2011; Garibay-Orijel et al., 2013). Una vez que se obtuvo el DNA se amplificó la región de los interespaciadores ribosomales (ITS). La región ITS de ADNr se amplificó utilizando los cebadores ITS1F e ITS4 (White et al., 1990; Gardes y Bruns, 1996) y la mezcla maestra Redextract-N-Amp (Sigma-Aldrich). La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo: 94 °C por 3 min (desnaturalización); 34 ciclos de 94 °C por 1 min (desnaturalización), 51 °C por 1 min (alineamiento), 72 °C por 1 min (elongación); un ciclo de elongación final

de 72 °C por 8 min y finalmente 4 °C (Garibay-Orijel et al., 2013; Argüelles-Moyao et al., 2016). La calidad de los amplicones se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, aquellos amplicones de buena calidad (una sola banda intensa con entre 500 y 900 pb) se limpiaron con 1 µm de EXO-SAP-IT (Affymetrix) y 1 µm de agua de PCR por cada 3.5 µm de muestra de PCR en un termociclador a 37 °C durante 45 min, seguido de 80 °C durante 15 min y manteniéndola a 4 °C (Garibay-Orijel et al., 2013; Argüelles-Moyao et al., 2016). Los productos de PCR limpios se secuenciaron en ambos sentidos con los mismos cebadores de la PCR en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México .

Para conocer las relaciones filogenéticas de las especies de *Laccaria* mexicanas se incluyeron las secuencias generadas en el presente trabajo junto con las secuencias de referencia de la filogenia mundial de *Laccaria* publicada por Wilson et al. (2017a) y otras especies descritas recientemente en un análisis de Máxima Verosimilitud. En dicho análisis solo se incluyeron las secuencias de la región ITS de especies del hemisferio norte, las cuales conforman un clado monofilético. Como grupo externo se uso la secuencia (KU685755) de *Laccaria* sp. PNG5 siendo el taxón del hemisferio sur más cercano al grupo basal del hemisferio norte (Wilson et al., 2017a).

Las secuencias se descargaron de GenBank y se alinearon con MAFFT v7 (<http://mafft.cbcr.jp.alignment/server/>). El alineamiento final consta de 128 secuencias con un 95.1% de similitud nucleotídica promedio y 637 pb. Se usó jModelTest v2.1.3 (Darriba et al., 2012) para encontrar el mejor modelo de sustitución por medio de los criterios informativos Akaike y Bayesianos. Ambos criterios coincidieron en que el mejor modelo fue TPM2uf+I+G. Dicho modelo se implementó manualmente en PhyML usando la partición 010212, estimando el radio de Transición/Transversión y la proporción de sitios invariables, optimizando en el análisis la topología, largo de las ramas y el radio de sustitución. El soporte

de las ramas se estimó por medio de 1 000 réplicas de bootstrap; los algoritmos de alineamiento y Máxima Versimilitud se implementaron en Geneious 10.2.6.

Resultados

Se analizaron 49 ejemplares de *Laccaria* identificados como las especies de mayor abundancia a nivel de esporomas en algunas regiones del Neotrópico Mexicano, citadas en los trabajos de Gómez-Reyes (2005), Montoya et al. (2005), Garibay-Orijel et al. (2009) y Rodríguez-Gutiérrez, et al. (2019). Se generaron 47 secuencias de ITS de esporomas de *Laccaria*. El análisis filogenético muestra a los ejemplares mexicanos agrupados en cinco clados (**Tabla 1, Figura 1**).

Tabla 1 Secuencias de *Laccaria* incluidas en el análisis filogenético.

VOUCHERS	ESPECIES	PAÍS Y ESTADO
JX504102	<i>L. acanthospora</i>	China: Linzhi Co., Xizang
JX504126	<i>L. alba</i>	China
JX504166	<i>L. alba</i>	China: Xizang (Tibet), Gongjue
JX504112	<i>L. amethysteo-occidentalis</i>	USA: Oregon
JX504107	<i>L. amethysteo-occidentalis</i>	USA: California
KX449421	<i>L. amethystina</i>	Francia: Champenoux
JX504150	<i>L. amethystina</i>	France: Forest comaniale de Ste. Croix
KU685654	<i>L. amethystina</i>	Rusia: Caucasus
AB211270	<i>L. amethystina</i>	Japón: Shizuoka
KU685645	<i>L. aurantia</i>	China: Yunnan
KM067892	<i>L. bicolor</i>	Portugal
KM067831	<i>L. bicolor</i>	China: Jiling Provence
KM067817	<i>L. bicolor</i>	USA: Illinois
KM067810	<i>L. bicolor</i>	USA: California
KM067809	<i>L. bicolor</i>	USA: Washington
JX504172	<i>L. bicolor</i>	Portugal
JX504159	<i>L. bicolor</i>	China: Yunnan
DQ179123	<i>L. bicolor</i>	
VOUCHERS	ESPECIES	PAÍS Y ESTADO
JX504100	<i>L. bullipellis</i>	China: Linzhi
KU685639	<i>L. gomezii</i>	Costa Rica
KU685644	<i>L. gomezii</i>	Costa Rica
JX504121	<i>Hydnangium</i> sp. AWW-212b	Japón: Tottori
JX504101	<i>L. himalayensis</i>	China: Linzhi
KU962988	<i>L. japonica</i>	Japón

NR_158485	<i>L. japonica</i>	Japón
KM067887	<i>L. "laccata" PORT1</i>	Portugal
KM067886	<i>L. laccata</i>	Portugal
KM067883	<i>L. laccata</i>	Portugal
KM067891	<i>L. laccata</i>	Portugal
*VMGR482	<i>L. complex laccata</i>	México: Michoacán
*Rdz-Gtzi 201228	<i>L. complex laccata</i>	México: Michoacán
*GO2009359	<i>L. complex laccata</i>	México: Michoacán
*GO2009355	<i>L. complex laccata</i>	México: Michoacán
*GO2009165	<i>L. complex laccata</i>	México: Estado de México
*GO2009158	<i>L. complex laccata</i>	México: Estado de México
*GO2009153	<i>L. complex laccata</i>	México: Estado de México
*GO2006123	<i>L. complex laccata</i>	México: Michoacán
*GO2006025	<i>L. complex laccata</i>	México: Michoacán
*GO2009437	<i>L. complex laccata</i>	México: Michoacán
KU685637	<i>L. longipes</i>	USA: Michigan
KM067856	<i>L. macrocystidia</i>	France: Toulouse
AB211271	<i>L. murina</i>	Japón: Shizuoka
JX50497	<i>L. aff. montana AWW446</i>	China: Xizang
NR_160455	<i>L. moshuijun</i>	China
KU962989	<i>L. moshuijun</i>	China
KU685636	<i>L. nobilis</i>	USA: Michigan
*GO2009033	<i>L. nobiles</i>	México: Estado de México
*PerezSilva09T45	<i>L. nobilis</i>	México: Estado de México
KU685733	<i>L. ochropurpurea</i>	USA: Illinois
KU685732	<i>L. ochropurpurea</i>	USA: Illinois
KU685717	<i>L. proxima</i>	Russia: Komorav
KU685633	<i>L. proximella</i>	Argentina: Neuquen
DQ149871	<i>L. pseudomontana</i>	USA: Colorado
KX449360	<i>L. rubroalba</i>	China
KX449359	<i>L. rubroalba</i>	China
KX449358	<i>L. rubroalba</i>	China
KX449357	<i>L. rubroalba</i>	China
MF669958	<i>L. squarrosa</i>	México: Veracruz
NR_154138	<i>L. squarrosa</i>	México: Veracruz
*VMGR501	<i>L. squarrosa</i>	México: Michoacán
*GO2008145	<i>L. squarrosa</i>	México: Michoacán
KY777385	<i>L. striatula</i>	USA: Tennessee
MH979278	<i>L. striatula</i>	USA: Wisconsin
MF992161	<i>L. striatula</i>	USA: North Carolina
KM406967	<i>L. striatula</i>	Canadá: St Augustin
KU685760	<i>Laccaria sp.</i>	USA: Wisconsin
VOUCHERS	ESPECIES	PAÍS Y ESTADO
KU685758	<i>Laccaria sp. AW_2016a</i>	Costa Rica
KU685755	<i>Laccaria sp.</i>	Paua New Guinea
KU685655	<i>Laccaria sp.</i>	Costa Rica: CATIE Experimental Forest
KU685653	<i>Laccaria sp.</i>	Russia: Caucasus
KU685647	<i>Laccaria sp.</i>	Costa Rica: San Gerardo de

		Dota
KU685646	<i>Laccaria</i> sp.	Costa Rica
KU685640	<i>Laccaria</i> sp.	Costa Rica
KU685638	<i>Laccaria</i> sp.	Costa Rica
KU685627	<i>Laccaria</i> sp.	China
KU685620	<i>Laccaria</i> sp.	Japón: Makamanai
KU685616	<i>Laccaria</i> sp.	Japón: Makamanai
KU685614	<i>Laccaria</i> sp.	Japón: Fugikawaguchiko
KM067827	<i>Laccaria</i> sp. AWW572	Usa: Michigan
KM067824	<i>Laccaria</i> sp. AWW567	USA: Michigan
JX504138	<i>Laccaria</i> sp. GMM7302	Papua New Guinea
JX504110	<i>Laccaria</i> sp. AWW584	USA: Oregon
JX504108	<i>Laccaria</i> sp. AWW569	USA: Michigan
JX50492	<i>Laccaria</i> sp. ALB183tibet	China:Tibet
DQ149868	<i>L. trichodermophora</i>	
KM067881	<i>L. trichodermophora</i>	USA: Louisiana
KM067866	<i>L. trichodermophora</i>	USA: Texas
JX504157	<i>L. trichodermopora</i>	USA: Texas
*DanielP11101509	<i>L. trichodermophora</i>	México: Tlaxcala
*CB08167	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*GO2009305	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*GO2009266	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*GO2009228	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*GO2009225	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*GO2009210	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*HCPNNT157	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*HCPNNT112	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*HCPNNT099	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*GO2010176	<i>L. trichodermophora</i>	México: Ciudad de México
*HCPNNT192	<i>L. trichodermophora</i>	México: Estado de México
*GO2010126	<i>L. trichodermophora</i>	México: Veracruz
*GO2010124	<i>L. trichodermophora</i>	México: Veracruz
KU685749	<i>L. trullisata</i>	
KM067882	<i>L. trullisata</i>	
KU685641	<i>L. tortilis</i>	USA: Illinois
*VBandala611	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Veracruz
*VillegasRiosM2373	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Oaxaca
*Rdz-Gtzi 201118	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Oaxaca
*Rdz-Gtzi 201117	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Oaxaca
*GO2010168	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Ciudad de México
*GO2010082	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Tlaxcala
*GO2009484	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Tlaxcala
VOUCHERS	ESPECIES	PAÍS Y ESTADO
*GO2009426	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Michoacán
*GO2009360	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Michoacán
*HCPNNT189	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Estado de México
*GO2009316	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Jalisco
*GO2009308	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Jalisco
*GO2009157	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Estado de México

*GO2009142	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Estado de México
*GO2009115	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Estado de México
*GO2008146	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Michoacán
*GO2006018	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Michoacán
*GO2006015	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Michoacán
*AR09781	<i>L. complex vinaceobrunnea</i>	México: Estado de México
MK141034	<i>L. violaceotincta</i>	India
JN942810	<i>L. vinaceovellanea</i>	Japón

*Secuencias generadas en el presente estudio

Los ejemplares determinados como *Laccaria squarrosa* provenientes del estado de Michoacán (VMGR501 y GO2008145) corresponden morfológica y molecularmente al 98.0% al ejemplar tipo descrito por Ramos et al. (2017) para el estado de Veracruz, México (MF669958).

Los ejemplares mexicanos (Pérez-Silva09T45 y GO2009033) determinados como *Laccaria nobilis* provenientes del Estado de México corresponden con un 98.0% de similitud con la secuencia de referencia utilizada por Wilson et al. (2017a), así como la descripción morfológica de Mueller (1992).

Los ejemplares HCPNNT112, GO2009266, CB08167, DanielP11101509, GO2009210, GO2009228, GO2009305, GO2010126, GO2010176, HCPNNT157, GO2010124, GO2009225, HCPNNT099 y HCPNNT192, fueron determinados morfológicamente como *Laccaria trichodermophora* bajo el concepto de Mueller (1992), molecularmente las secuencias mexicanas se encuentran en un clado en medio de la secuencia *L. trichodermophora* KM067866 de Wilson et al. (2017a) y la secuencia del ejemplar tipo DQ149868 de Osmundson et al. (2005). Por lo que efectivamente corresponden al complejo *L. trichodermophora*.

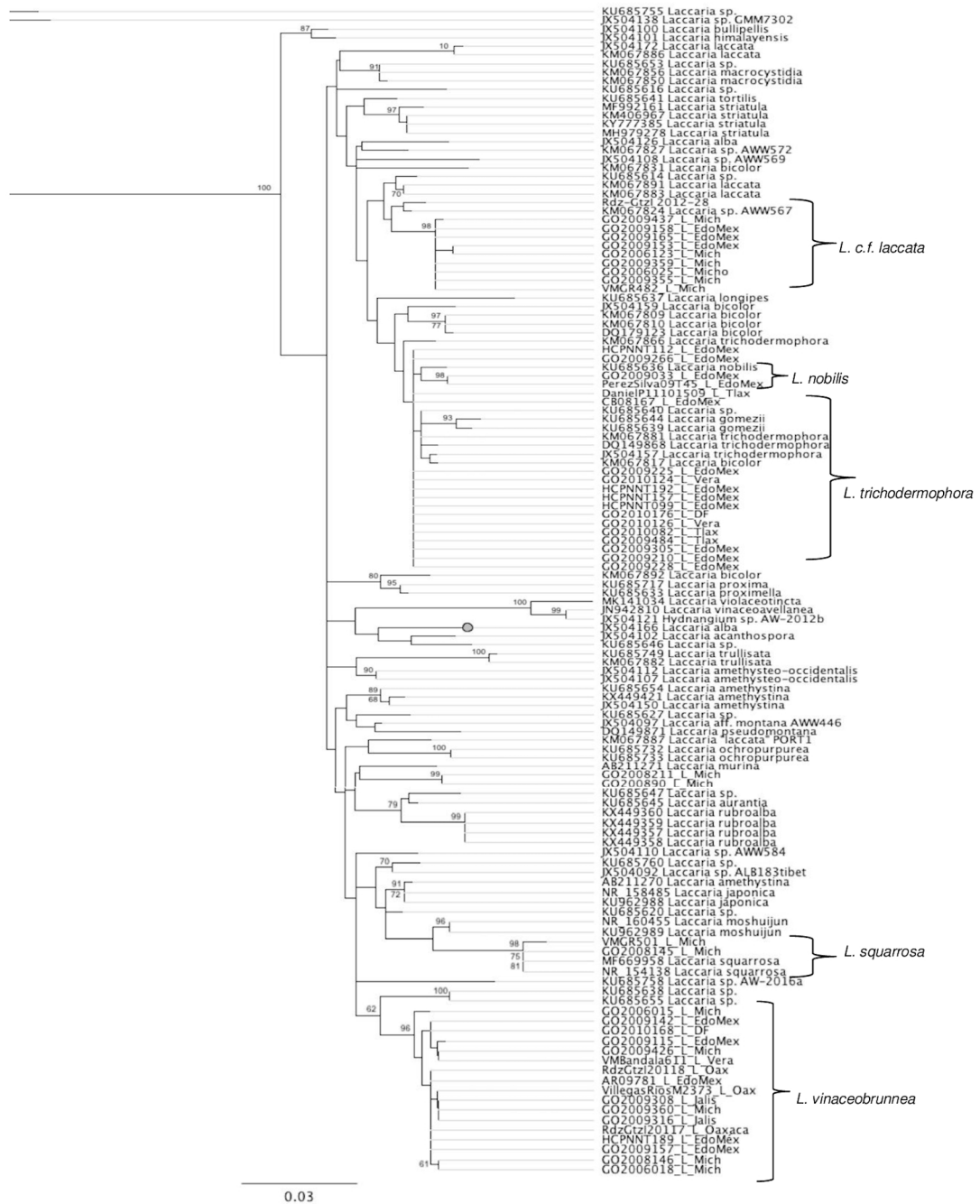


Figura 1 Análisis Filogenético de Máxima Verosimilitud de *Laccaria* con base en ITS. Muestra cinco especies mexicanas: *L. squarrosa*, *L. cf. vinaceobrunnea*, *L. cf. laccaria*, *L. nobilis* y *L. trichodermophora*.

Taxonomía

Laccaria cf. *laccata* (**Figuras 2b y 3b**).

Macromorfología: Píleo de 20 a 33 mm de diámetro, plano algunas veces plano-convexo, centro deprimido cuando maduro, margen recto a incurvado, borde ondulado, translucido-estriado, café-naranja (6B4) a café-rojizo (7D7), higrófono. Láminas poco separadas, subadheridas, anchas, borde ondulado, naranja-rosado (6A3 a 7C4). Lamélulas truncadas 1:2-3. Estípites cilíndricos, huecos, ligeramente fibriloso, base blanca a crema hasta la mitad, arriba concoloro al píleo. Micelio basal de color blanco.

Micromorfología: Basidiosporas elipsoides (8.68-)9.22-10.0(-10.64) x (-8.12)8.51-9.30(-9.99) μm Q=1.10 μm , equínulas (0.70-)0.80-1.00(-1.10) x 0.70-1.00 μm Q=1.20-1.50 μm , apéndice hilar 1.00-1.20 x (-0.80)1.00-1.20(-1.40) μm , basidios (34.86-)40.11-50.56 x (-9.84) 11.25-12.54 μm , basidiolos (20.90-)34.84-42.17 x 8.01-11.25 μm , 4 esterigmas (7.59-) 8.72-10.67(-12.12) x (-2.00)2.29-3.50 μm . Queilocistidios 26.83-32.28 x 6.21-10.10 μm ; hifas cilíndricas, algunas ensanchadas 4.91-6.39 μm . Pileipelis con hifas intermedias, en fascículos dispersos.

Hábitat y distribución: gregarios en suelos de bosques de coníferas (*Pinus-Quercus*, *Pinus-Abies*; *Pinus chiapanensis*), a una elevación que va de los 2 010 a 3 305 m.s.n.m.

Material Estudiado: ESTADO DE MÉXICO Temascaltepec, Pista de despegue de parapente, **GO-2009-165** (MEXU 26148); carr. San Lucas del Pulque km. 2.5, **GO-2009-158** y **GO-2009-153** (MEXU 26143, 26139); MICHOACÁN Ciudad Hidalgo, al Noreste del cerro San Andrés, **GO-2009-437** (MEXU 26492), El Tren, **GO-2006-025** (MEXU 26437); Cuitzeo, Las adjuntas 1, **GO-2006-123** (MEXU 26438); Patamban, Tangancicuaro, **GO-2009-355** y **GO-2009-359** (MEXU 26477, 26478); Uruapan, Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, **VMGR-482**.

Comentario taxonómico: *Laccaria laccata* pertenece a un complejo de especies difícil de delimitar taxonómicamente, debido a que los caracteres

morfológicos tienen una plasticidad fenotípica y la gran cantidad de secuencias determinadas con este nombre, aunado a la falta de secuencias del ejemplar tipo, y al uso mundial del nombre. En su filogenia, Wilson et al. (2017a), muestran cuatro clados con el nombre de *L. laccata*; los ejemplares mexicanos no se encuentran cercanamente relacionados con el clado *L. laccata sensu* Wilson. *Laccaria laccata* s. l. presenta una distribución amplia y se caracteriza por el color rojizo a carne, traslúcido al margen, láminas ligeramente pálidas, estípites con coloro con el píleo, basidiosporas globosas a ampliamente elipsoides, con equínulas superiores a 1.5 μm . Se puede confundir con *L. proxima* la cual es robusta, esporas subglobosas y el color del esporoma más fuerte (rojizo), lo cual las diferencia.

Laccaria nobilis (**Figura 3c**).

Macromorfología: Píleo plano-convexo, margen recto, borde entero, cutícula con tomento con puntas levantadas, color rosado que se pierde con la deshidratación y puede variar hasta tener un color café-rosado. Láminas juntas, subadheridas, estrechas, enteras, color carne. Lamélulas atenuadas, 1:3. Estípites cilíndricos, huecos, fibrilosos, base blanca y el resto concoloro con el píleo. Micelio basal de color blanco.

Micromorfología: Basidiosporas elipsoides (8.34-)8.44-9.00(-9.44) x 6.89-7.48(-8.84) μm Q=1.13 μm , equínulas (0.75-)0.89-1.20(-1.33) x 0.70-1.10(-1.15) μm Q=1.20 μm , apéndice hilar 1.54-1.79 Q=1.67 μm , 4 esterigmas (6.53-)8.05-10.10(-12.99) x (-1.75)2.14-3.17(-4.21) μm . Queilocistidios ausentes. Pileipielis con hifas intermedias, en fascículos dispersos.

Hábitat y distribución: gregarios en suelos de bosques de coníferas (*Pinus-Quercus*), a una elevación que va de los 1874 a 1969 m.s.n.m.

Material Estudiado: ESTADO DE MÉXICO Temascaltepec, Km 7 carretera Temascaltepec-Tejupilco, **GO-2009-033** (MEXU 26088); Km 7,8 carretera Temascaltepec-Zacazonapa, **Pérez-Silva-09T45** (MEXU 25802).

Comentario taxonómico: *Laccaria nobilis* puede confundirse con *L. laccata* s. l., se distingue por la ausencia de queilocistidios. Los ejemplares mexicanos poseen una ligera variación en el tamaño de las basidiosporas, no obstante se encuentran en el intervalo descrito por Mueller (1992); filogenéticamente existe una similitud del 99.0% con la secuencia utilizada y determinada por Wilson et al. (2017a) bajo el nombre de *L. nobilis*.

Laccaria squarrosa (Figuras 2c y 3d).

Macromorfología: Píleo 40-50 mm de diámetro, convexo, obtuso, margen recto, sulcado, con escamas por fascículos de fibrillas principalmente en el centro, color naranja pálido, rosaseo (6B3) cuando fresco al secarse de color café-naranja (5B6-5), higrófono. Láminas poco separadas, adheridas, ventricosas, dentadas, algunas veces crenuladas, de color rosado cuando frescas al secarse con un tono de color café. Estípote 67 x 4 mm, cilíndrico, fibrillas evidentes, concoloro con el píleo en fresco y seco. Micelio basal de color blanco.

Micromorfología: Basidiosporas globosas (7.83-)8.10-9.30(-9.62) x (-7.99)8.20-9.21(-9.61) μm Q= 1.00 μm , equínulas (0.64-)0.70-1.10(-1.30) x (-0.50)0.70-1.00(-1.10) μm Q=1.20-1.50 μm , apéndice hilar 0.46-0.73 x 0.50-0.66 μm , basidios 40.46-47.24 x 10.53-11.97 μm , basidiolos 30.40-41.20(-48.00) x (-6.75)7.70-10.0 μm , 4 esterigmas (6.44-)8.00-10.40(-10.99) x 2.28-2.93 μm . Hifas cilíndricas, algunas ensanchadas de 4.54-6.04 μm . Queilocistidios (13.5-) 14.0-40 x 20.-5.3 μm . Pileipelis con hifas intermedias, en fascículos dispersos.

Hábitat y distribución: gregarios a dispersos en suelos de bosques de *Quercus*, a una elevación que va de los 1950 a 2380 m.s.n.m.

Material Estudiado: MICHOACÁN Uruapan, Parque Nacional Barrancas de Cupatitzio, **VMGR-501**; Zitácuaro, El Jaral, **GO-2008-145** (MEXU 25996).

Comentario taxonómico: *Laccaria squarrosa* fue descrita para México por primera vez por Ramos et al. (2017) teniendo como caracteres diagnósticos una superficie escuarrosa principalmente en el píleo, basidiosporas con un tamaño ligeramente superior (7-10 (-11.5) x 7-10.5 μm) a las del presente estudio ((7.83-

)8.10-9.30(-9.62) x (-7.99)8.20-9.21(-9.61) μm), con equinuladas ligeramente más pequeñas (0.5-1.4 x 0.45-0.9 μm) que las revisadas (0.64-)0.70—1.10 (-1.30) x (-0.5)0.70-1.0(-1.10) μm , y con pileipelis en fascículos dispersos. La distribución de esta especie se restringía para el estado de Veracruz, asociada estrictamente con *Fagus grandifolia* var. *mexicana* (Ramos et al., 2017); los ejemplares del presente estudio se distribuyen en el estado de Michoacán teniendo como hospedero en todos los caso a *Quercus*. Se amplía el conocimiento de *L. squarrosa* en términos de distribución con afinidad Neotropical de la especie y asociación con la familia Fagaceae.

***Laccaria trichodermophora* (Figuras 2d y 3e).**

Macromorfología: Píleo 25-50 mm de diámetro, convexo a plano-convexo con el centro deprimido, margen entero cuando pequeños e incurvado conforme crecen, plicado-estriado, fibriloso, de color café-naranja (6D8 a 7D7). Láminas juntas a separadas, adheridas, ventricosas, borde regular a crenado, tonos de color violáceos a rosados (6A3 a 6B3, 7A4 a 7B3, 8A2). Lamélulas atenuadas (1:2-3). Estípite 60-70 x 5-8 mm, cilíndrico, robusto en general, velutinoso a hispido cerca del píleo, fibriloso algunas fibrillas se desprenden individualmente, consistencia fibrosa, algunos ejemplares con tomento basal de color violeta que sube cerca del himenóforo, de color naranja claro a café-naranja (7F5 a 7D4). Micelio basal de color violeta que persiste con el tiempo, aunque se decolora con el sol en algunos ejemplares.

Micromorfología: Basidiosporas subglobosas a elipsoides (6.23-)7.10-9.00(-9.84) x (-6.00)6.30-8.50(-9.55) μm Q=1.10-1.20 μm , equínulas (0.60-)0.80-1.50 x (-0.60)0.70-1.00 μm Q=1.10-1.50 μm , apéndice hilar (0.70-)0.90-1.20 x (-0.60) 0.80-1.10 μm Q=1.10 μm , basidios 28.37-38.57(-44.80) x 5.54-10.31(-12.60) μm , basidiolos 20.23-31.30 x 7.15-9.79 μm , 4 esterigmas (5.50-)6.50-9.58 x 2.21-3.44 μm . Queilocistidios 12.5-53 x 2.5-7.5 μm . Hifas cilíndricas, algunas ensanchadas 5.11-5.67 μm . Pileipelis con hifas intermedias, en fascículos dispersos.

Hábitat y distribución: gregarios en suelos de bosques de coníferas (*Abies religiosa*-*Pinus*, *Pinus*, *Abies religiosa*, *Pinus-Alnus*, *Pinus-Quercus*, *Pinus-zacatonal*, pastizal inducido), a una elevación que va de los 2 282 a 4 069 m.s.n.m.

Material Estudiado: CIUDAD DE MÉXICO Tlalpan, San Miguel Topilejo, Chichinautzin, **GO-2010-176** (MEXU 26269); ESTADO DE MÉXICO Ajusco, Volcán Ajusco Ladera Norte, **GO-2009-305** (MEXU 26466); Amanalco, Capilla vieja, **CB08167**; Coatepec de Harinas, Nevado de Toluca, **GO-2009-210** (MEXU 26452); Tlalmanalco, Mercado de Amecameca, **GO-2009-266** (MEXU 26194); Ozumba, Popocatepetl, **GO-2009-228** y **GO-2009-225** (MEXU 26178; 26176); Zinacatepec, El varal, **HCPNNT-11**; Agua blanca, **HCPNNT-099**; Raíces, **HCPNNT-192**; Buenavista, **HCPNNT-157**. TLAXCALA Altamira Hyamatlán, San Isidro Buen Suceso, **DanielP11101509** y **Rdz-Gtzi-2011**; Volcán La Malinche, **GO-2009-484** y **GO-2010-082**. VERACRUZ La Perla, Camino al Pico de Orizaba desde la Perla, **GO-2010-124** y **GO-2010-126** (MEXU 26243, MEXU 26245).

Comentario taxonómico: *Laccaria trichodermophora* fue descrita en 1984 por Mueller, de un bosque de *Pinus*; los ejemplares mexicanos se agrupan todos en un solo clado en medio de dos grupos de secuencias bajo el mismo nombre, no obstante los valores de bootstrap son bajos. Morfológicamente la descripción del tipo y los ejemplares mexicanos son muy similares, con ciertas variaciones discretas que caen dentro del intervalo, como por ejemplo el tamaño de las basidiosporas con (6.2-) 6.8-8.7(-10.6) x 6-8(-9.2) μm mientras que para los ejemplares mexicanos es de (6.2-)7.1-9.0(-9.8) x (-6.0)6.3-8.5(-9.5) μm , largo de las equínulas (0.5-)0.9-1.8 μm , en el presente estudio con (0.6-)0.8-1.5 μm . Ecológicamente existe una amplia gama de hospederos como son: *Pinus*, *Abies religiosa*, *Alnus* y *Quercus*. Filogenéticamente los ejemplares mexicanos presentan una cercanía con la secuencia tipo de Osmunson (2005), así como las secuencias de Wilson et al. (2017a), con valores bajos de bootstrap.

Laccaria cf. *vinaceobrunnea* (**Figuras 2a y 3a**).

Macromorfología: Píleo 50-70 mm de diámetro, plano-convexo a convexo, deprimido, margen recto, borde entero, velutinoso, de color naranja-amarillento (6D6 a 6C7) con tonos de color violáceos (15D4) cuando joven, y al secarse de color amarillento (5A5). Láminas juntas, adheridas, estrechas, borde entero, de color rosa claro (8A2) a color vináceo (956). Lamélulas atenuadas 1:3. Estípite cilíndrico, hueco, velutinoso a hispido cerca del píleo, de color naranja-grisáceo a café claro (6D5 a 6C4). Micelio basal de color violeta, al secarse se torna de color blanco.

Micromorfología: Basidiosporas subglobosas a elipsoides (7.32-)8.05-10.84(-11.40) x (-7.31) 9.04-9.97 μm Q=1.10 μm , equínulas (0.62-) 0.70-1.20 (-1.50) x 0.50-1.00(-1.10) μm Q=1.20-1.50 μm , apéndice hilar (0.60-)1.10-1.40 x 1.00-1.40 μm Q=1.0, basidios (11.24-)27.79-51.64 x 6.43-9.50 μm , 4 esterigmas (6.35-)7.13-7.51(-9.43) x (-1.91)2.03-2.90 μm . Queilocistidios (26.83-)30-14-35.29 x 3.62-6.21(-10.10) μm . Hifas cilíndricas, algunas ensanchadas con el diámetro de 5.98-7.91 μm . Pileipelis con hifas intermedias, con numerosas hifas perpendiculares.

Hábitat y distribución: dispersos en suelos de bosques de coníferas (*Abies religiosa-Pinus*, *Pinus* y *Quercus*), a una elevación que va de los 2 030 a 3 129 m.s.n.m.

Material Estudiado: ESTADO DE MÉXICO Topilejo, Chichinautzin, **GO-2010-168** (MEXU 26264); Temascaltepec, San Lucas Pulque **GO-2009-142** y **GO-2009-115**, **GO-2009-157** (MEXU 26134, 26115, 26142); Zinacatepec, La Joya, **HCPNNT-189**; Amanalco, San Juan, **ARO-9781** (MEXU 25905). JALISCO Tepalpan, Nevado de Colima, **GO-2009-308** y **GO-2009-316** (MEXU 26210, 26469). MICHOACÁN Ciudad Hidalgo, Ladera sur del cerro de San Andrés, Las Palomas, **GO-2009-426** (MEXU 26491); Patamba, Tangancicuaro, **GO-2009-360** (MEXU 26435); Morelia, Sobre el camino a Atecuaro, **GO-2006-018** (MEXU 25973); Zinapecuaro, El Jaral, **GO-2008-146** (MEXU 25997). OAXACA Ixtlán de Juárez, **VillegasRiosM-2373** (FCME 20651); Alrededor de las cabañas de Ecoturixtlán, **Rdz-Gtzi-20117**; Ixtepeji, El Punto, **Rdz-Gtzi-20118**. VERACRUZ

Xico, Los gallos, 1.5km al N de Ingenio El Rosario, zona E de Cofre de Perote, **VMBandala-611**(Xal).

Comentario taxonómico: *L. vinaceobrunnea* fue descrita por Mueller (1984) con las siguientes características diagnósticas: esporoma de color violáceo-vináceo a café canela cuando seco, láminas de color lilas a vináceas, micelio basal de color violeta. Basidiosporas subglobosas a ampliamente elipsoides, equinuladas, cuatro esterigmas de hasta de 9.0 μm de largo. Hábitat en bosques de *Quercus virginiana*. Los ejemplares mexicanos presentan la diferencia en cuanto a lo largo en general de los esterigmas (6.35-)7.13-7.51(-9.43) x (-1.91)2.03-2.90 μm , así como una distribución ecológica más amplia en *Quercus*, *Pinus* y *Abies religiosa*; sin embargo, no existen secuencias de ITS de esta especie para otras partes del mundo. La especie fue descrita originalmente de Lousiana, Estados Unidos. En la filogenia presentada por Wilson et al. (2017a) la especie hermana de *L. vinaceobrunnea* es *L. trulisata* especie que con base en varios genes queda cercana a las secuencias de Wilson et al. (2017a), no obstante, comparada con las secuencias de ITS de *L. trulisata* (no se compararon con las de *L. vinaceobrunnea* de Wilson et al. (2017a) ya que ellos no trabajaron con ITS) queda muy alejada de las secuencias mexicanas. Cabe resaltar que los ejemplares de color morado, tradicionalmente se les ha asignado el nombre de *L. amethystina*, sin embargo, el clado de dicha especie no se hubica cerca de los ejemplares analizados en el presente estudio.



Figura 2. Diversidad de especies de *Laccaria* más abundantes en los bosques del Neotrópico mexicano: a) *L. cf. vinaceobrunnea*; b) *L. laccata cf. laccata*; c) *L. squarrosa*; d) *L. trichodemphora*.

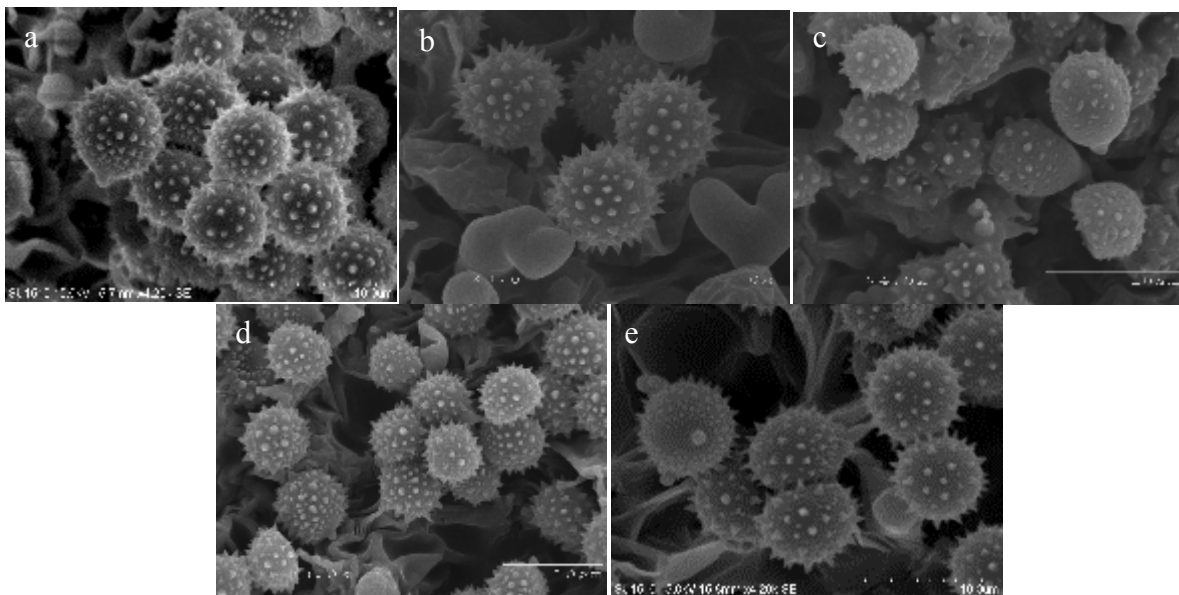


Figura 3. Diversidad de basidiosporas equinuladas de *Laccaria*: a) *L. cf. vinaceobrunnea*; b) *L. laccata cf. laccata*; c) *L. nobilis*; d) *L. squarrosa*; e) *L. trichodemphora*.

Discusión

La determinación taxonómica de las especies del género *Laccaria* mediante morfología es muy compleja, ya que los caracteres microscópicos no son muy variables y los caracteres macroscópicos presentan mucha plasticidad, así que las herramientas moleculares son un apoyo importante para la delimitación de las especies. Algunas especies tal como lo es *L. laccata* no se han podido delimitar aún con secuencias de varios genes, esto debido a la falta de secuencias del ejemplar tipo, así como al un uso del nombre en todo el mundo.

Las especies reportadas como más abundantes en los bosques del Neotrópico mexicano han sido: *L. amethystina*, *L. amethysteo-occidentalis* y *L. vinaceobrunnea* siendo estas especies nombradas por la coloración morada del basidioma principalmente; *L. bicolor*, *L. laccata* y *L. proxima* especies con el micelio basal de color blanco y coloración del basidioma que va de los tonos café-rojizo a café-rosado; *L. trichodermophora* nombre dado a los esporomas con presencia de abundantes fibrillas que se desprenden individualmente en el estípite y micelio basal de color morado que puede llegar hasta parte del estípite. Sin embargo, el análisis filogenético (**Figura 1**) muestra que los ejemplares provenientes del Estado de México, Jalisco, Michoacán, Oaxaca y Veracruz que habían sido reportados bajo nombres tales como *L. amethystina*, *L. amethysteo-occidentalis* y *L. vinaceobrunnea* para el presente estudio se consideran bajo el nombre de *L. cf. vinaceobrunnea* ya que morfológicamente poseen las características de esta especie (Mueller, 1992); no obstante al no estar cerca del clado hermano de la especie, es decir de *L. trullisata* se tomó la decisión de dejarla como cf. Wilson et al. (2017a) reconocen un clado denominado *Laccaria complex amethystina* donde ubican a *L. amethystina*, *L. amethysteo-occidentalis*, *L. ochropurpurea*, *L. trullisata* y *L. vinaceobrunnea*, todas estas especies con color del basidioma violáceo a morado. Cabe mencionar que el clado de las secuencias mexicanas determinadas como *L. cf. vinaceobrunnea* no se encuentran dentro del clado *L. complex amethystina* reportado por Wilson et al. (2017a).

En el caso de *L. cf. laccata* es la especie con mayor número de referencias en el mundo, reconociendo con el nombre una aparentemente amplia distribución; los ejemplares mexicanos morfológicamente coinciden con la descripción para la especie (Mueller, 1992); no obstante filogenéticamente no corresponden al concepto de *L. laccata sensu* Wilson et al. (2017a). La falta de claridad de esta especie se debe entre otras cosas a que no existe secuencias de la especie tipo o de un neotipo.

En el caso de *L. nobilis* las secuencias mexicanas son 99.0% similares a lo reportado por Wilson et al. (2017a), así como con la morfología descrita para la especie por Mueller (1992). No existe duda de que los ejemplares de los bosques templados de México determinados como *L. nobilis* si corresponden con la descripción de la especie, por lo que se confirma su identidad.

Los ejemplares determinados como *L. squarrosa* son morfológica y molecularmente iguales a los reportados por Ramos et al. (2017), con ligeras variaciones de tamaño de basidiosporas y equínulas, no obstante esta plasticidad podría ser propia del hospedero con el cual se asocia. La distribución aparentemente restringida al estado de Veracruz, así como del hospedero *Fagus grandifolia* var. *mexicana* no lo es, lo que sí se piensa es que esta especie se asocia exclusivamente con la familia Fagaceae.

Finalmente los ejemplares determinados como *L. trichodermophora*, quedaron entre el clado de Wilson et al. (2017a) y Odsmunson (2005) determinado como *L. trichodermophora* con la secuencia del ejemplar tipo, la morfología coincide con base en la descripción de Mueller (1992). Esta es una de las especies reportadas como la más abundante en términos de número de esporomas en bosques de alta montaña, siendo además aprovechada para procesos de micorrización garantizando el éxito en invernadero y ventajas morfológicas sobre uno de sus hospederos con quien comparte distribución *Pinus*

montezumae (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019). Los ejemplares mexicanos con respecto a los norteamericanos (especie reportada para *Pinus*) poseen un intervalo amplio de hospederos (*Pinus*, *Abies religiosa*, *Alnus* y *Quercus*), observándose una plasticidad fenotípica aparentemente relacionada con el ambiente.

Conclusiones

Las especies de *Laccaria* son un recurso forestal no maderable aprovechado por muchas comunidades de México con fines alimenticios, así como con potencial uso biotecnológico en micorrización. Por lo tanto, reconocer las especies, así como su distribución es importante en la toma de decisiones para el aprovechamiento sustentable del recurso y de las zonas forestales. Si bien el género *Laccaria* incluye varios complejos de especies, es necesario determinar con exactitud aquellas de interés forestal, es decir, aquellas que se puedan usar para inocular plantas nativas. Como sucedió en este trabajo en el cual se confirma la presencia y distribución en México y en el Neotrópico de cinco especies.

Las siete especies de *Laccaria* registradas como las más abundantes para los bosques del Neotrópico Mexicano (*L. amethystina*, *L. amethysteo-occidentalis*, *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, *L. trichodermophora* y *L. vinaceobrunnea*) analizadas en el presente estudio, encontramos que morfológica y molecularmente en realidad corresponden con *L. complex laccata*, *L. nobilis*, *L. squarrosa*, *L. trichodermophora* y *L. complex vinaceobrunnea*.

Tener lo mejor representada la muestra de ejemplares a estudiar, permitirá conocer la plasticidad fenotípica de la especie, así como su distribución, en el caso particular de *L. squarrosa* en el presente trabajo se amplía su distribución al estado de Michoacán, así como de hospedero (*Quercus*) con el cual hace simbiosis ectomicorrízica, permitiendo sugerir que ésta se relaciona exclusivamente con la familia Fagaceae.

Es importante mencionar que el uso de varios marcadores moleculares es la mejor opción para la delimitación de las especies y la reconstrucción filogenética. Si bien ITS funciona para dar un panorama de la diversidad, esté no produce clados con buenos valores de soporte. Es por ello que se propone utilizar más genes como son RBP2, 28S y Ef1 α (Ramos et al., 2017; Wilson et al., 2017a, b) en estas especies abundantes y aprovechables a nivel forestal.

Referencias

- Aguirre-Acosta, E. y Pérez-Silva, E. (1978). Descripción de algunas especies del género *Laccaria* (Agaricales) de México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 12: 33-58.
- Argüelles-Moyao, A., Garibay-Orijel, R., Márquez-Valdelamar, L.M. y Arellano-Torrez, E. (2016). *Clavulina-Membranomyces* is the most important linaje within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza*, 27: 53-65.
- Cifuentes, J., Villegas, R.M. y Pérez-Ramírez, L. (1986). Hongos En: A. Lot y F. Chiang (Eds.). *Manual de Herbario*. México. Consejo Nacional de la Flora de México. México.
- Chanona-Gómez, F., Andrade-Gallegos, R.H., Castellanos-Albores, J. y Sánchez, J.E. (2007). Macromicetos del parque educativo laguna Bélgica, municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78: 369-381.
- Cho, H.J., Park, M.S., Lee, H., Oh, S.Y., Wilson, A.W., Mueller, M. y Lim, Y.W. (2018). A systematic revision of the ectomycorrhizal genus *Laccaria* from Korea. *Mycologia*, DOI 10.1080/00275514.2018.1507542
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*, 9, 772-772.

- Gardes, M. y Bruns, T.D. (1996). Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany*, 74: 1572-1583.
- Garibay-Orijel, R., Martínez, R.M. y Cifuentes, J. (2009). Disponibilidad de esporas de hongos comestibles en los bosques de Pino-Encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80: 521-534.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M. y Flores-García, A. (2013). Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84: 153-169.
- Gómez-Hernández, M., Ramírez-Antonio, K.G. y Gándara, E. (2019). Ectomycorrhizal and Wood-decay macromycete communities along development stage of managed *Pinus patula* in Southwest Mexico. *Fungal Ecology*, 39: 109-116.
- Gómez-Reyes, V.M. (2005). *Diversidad de hongos ectomicorrízicos y su relación con diferentes unidades ambientales en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan*. Tesis de maestría, Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Hortal, S., Trocha, L.K., Mura, C., Chybicki, I.J., Buée, M., Trojankiewicz, M., Burczyk, J. y Martin, F. (2012). Beech roots are simultaneously colonized by multiple genets of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria amethystina* clustered in two genetic groups. *Molecular Ecology*, 21: 2116-2129.
- Kennedy, P.G., Garibay-Orijel, R., Higgins, L.M. y Ángeles-Argáiz, R. (2011). Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests supports the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhizal*, 6: 559-568.
- Kirk, P.M., Cannon, P.R., Minter, D.W. y Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*. CAB. Gran Bretaña.
- Kong, A., Montoya, A., García-de Jesús, A., Ramírez-Terrazo, A., Andrade, R.,

- Ruan-Soto, F., Rodríguez-Palma, M.M. y Estrada-Torres, A. (2018). Hogos ectomicorrizógenos del Parque Nacional Lagunas de Montebello, Chiapas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89: 741-756.
- Kornerup, A. y Wanscher, J.H. (1967). *Methuen Handbook of Colour*. Methuen, London.
- Landeros, F., Castillo, J., Guzmán, G. y Cifuentes, J. (2006). Los hongos (Macromicetos) conocidos en el cerro El Zamorano (Querétaro-Guanajuato), México. *Revista Mexicana de Micología*, 22: 25-31.
- Luo, X., Ye, L., Chen, J., Karunarathna, S.C., Xu, J., Hyde, K.D. y Mortimer, P.E. (2016). *Laccaria rubroalba* sp. nov. (Hydnangiaceae, Agaricales) from Southwestern China. *Phytotaxa*, 284: 41-50.
- Matheny, P.B., Curtis, J.J., Hofstetter, V., Aime, M.C., Moncalvo, J.-M., Ge, Z.W., Yang, Z.L., Slot, J.C. Ammirati, J.F., Baroni, T.J., Bougher, N.L., Hughes, K.W., Lodge, D.J., Kerrigan, R.W., Seidl, M.T., Aanen, D.K., DeNitis, M., Daniele, G.M., Desjardin, D.E., Kropp B.R., Norvell, L.L., Parker, A., Vellinga, E.C., Vilgalys, R. y Hibbett, D.S. (2006). Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia* 98: 982-995.
- Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A., Cifuentes, J. y Caballero, J. (2005). Useful wild of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity*, 17: 115-143.
- Montoya, L., Bandala, V.M., Baroni, T.J. y Hortan, T.R. (2015). A new species of *Laccaria* in montane cloud forest from Eastern Mexico. *Mycoscience*, 56: 597-605.
- Morales, O., Bran, M.A., Cáceres, R. y Flores, R. (2003). Las especies del género *Laccaria* en Guatemala. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 16: 89-94.
- Mueller, G.M. (1984). New North American species of *Laccaria* (Agaricales). *Mycotaxon*, 20: 1010-1016.
- Mueller, G.M. (1991). *Laccaria longipes*, a new North American species of the *Laccaria laccata* complex. *Mycotaxon*, 28: 145-150.
- Mueller, G.M. (1992). Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental

- United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana Botany*, 30: 1-58.
- Munsell Color Company. (1978). *Munsell Soil Color Chart*. United State Departament of Agriculture. Kollmorgen-Maryland.
- Nava, M.R. y Valenzuela, G.R. (1997). Los macromicetos de la Sierra de Nanchititlan. *Polibotanica*, 5: 21-36.
- Osmundson, T.W., Cripps, C.L. y Mueller, G. (2005). Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. *Mycologia*, 97: 949-972.
- Pérez-Moreno, J., Lorenzana-Fernández, A., Carrasco-Hernández, V. y Yescas-Pérez, A. (2010). *Los hongos comestibles silvestres del parque nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos*. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACYT. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Pérez-Silva, E., Esqueda, M., Herrera, T. y Coronado, M. (2006). Nuevos registros de Agaricales de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77: 23-33.
- Popa, F., Rexer, K.H., Donges, K., Yang, Z.L. y Kost, G. (2014). Three new *Laccaria* species from South-west China (Yunnan). *Mycological Progress*, 13: 1105-1117.
- Popa, F., Jimenéz, S.Y.C., Weisenborn, J., Donges, K., Rexer, K.H. y Piepenbring, M. (2016). A new *Laccaria* species from cloud forest of Fortuna, Panama. *Mycological*, 15: 1-8.
- Quiñonez, M.M., Garza, F. y Vargas, M. (2005). Aspectos ecológicos y diversidad de hongos ectomicorrízicos en bosque de pino encino de cinco localidades del municipio de Bocoyna, Chihuahua. *Ciencia en la Frontera*, 3: 29-38.
- Ramos, A., Bandala V.M. y Montoya, L. (2017). A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relic forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycKeys*, 27: 77-94.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Bonilla-Rosso, G. y Pérez-Moreno, J.

- (2012). Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedling and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 80: 479-487.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacobo-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., Ortega-Larrocea, M.P. y Arellano-Torrez, E. (2019). Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90: e902868
- Rosinger, C., Sandén, H., Matthews, B., Mayer, M. y Godbold, D.L. (2018). Patterns in Ectomycorrhizal Diversity, Community Composition, and Exploration Types in European Beech, Pine, and Spruce Forests. *Forest*, 9: 245.
- Sheedy, M.E., Van de Wouw, P.A., Holett, J.B. y May, W.T. (2013). Multigene sequence data reveal morphologically cryptic phylogenetic species within the genus *Laccaria* in southern Australia. *Mycologia*, 105: 547-563.
- Singer, R. (1976). Die gruppe der *Laccaria laccata* (Agaricales). *Plant System Evolution*, 126: 347-370.
- Smith, S. E. & Read, D. J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. New York: Academic Press
- Valdés, M., Piña, F. y Grada, R. (1983). Inoculación micorrízica y crecimiento de plántulas de pino en suelo erosionado. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 18: 56-70.
- Vesterholt, J. (2008). *Laccaria*. En: Knudsen, H. y Vesterholt, J. (Eds.). *Funga Nordica*. Nordsvamp.
- Vincenot, L. Nara, K., Sthultz, C., Labbé, J., Dubois, M.P., Tedersoo, L., Martin, F. y Selosse, M.A. (2012). Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria amethystine* complex. *Molecular Ecology*, 21: 281-299.
- Villarreal, L. (1996). *Los hongos silvestres: componentes de la biodiversidad y alternativas para la sustentabilidad de los bosques templados de México*. Colegio de Posgraduados. Edo. de Méx.
- Villarruel-Ordaz, J.L. y Cifuentes, B.J. (2007). Macromicetos de la Cuenca del Río

- Magdalena y zonas adyacentes, Delegación la Magdalena Contreras, México, D.F. *Revista Mexicana de Micología*, 25: 59-68.
- Wilson, A.W., Hosaka, K., Perry, B.A. y Mueller, G.M. (2013). *Laccaria* (Agaricomycetes, Basidiomycota) from Tibet (Xizang Autonomous Region, China). *Mycoscience*, 54: 406-419.
- Wilson, A.W., Perry, B.A. y Mueller, G.M. (2017a). Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist*, 213: 1862-1873.
- Wilson, A.W., May, T.W. y Mueller, G.M. (2017b). Biogeography of ectomycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. En: L. Tedderoo (Ed.), *Ecological studies: biogeography of mycorrhizal symbiosis* (PP. 273-297). Gewerbestrasse, Switzerland: Springer.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: M.A. Innis, D.H.Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. (Eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315-322). Academic Press, San Diego.

CAPÍTULO III.

Revista Mexicana de Biodiversidad en prensa (2020)

COMPARACIÓN ENTRE LA ABUNDANCIA DE ESPOROMAS Y ECTOMICORRIZAS DEL GÉNERO *Laccaria* EN IXTLÁN DE JUÁREZ, OAXACA

Comparison between *Laccaria* basidiomata and ectomycorrhizae
abundance in Ixtlán de Juárez, Oaxaca

Ibeth Rodríguez Gutiérrez^{ab}, Roberto Garibay Orijel^{c*}, Beatriz Santiago Morales^d,
Roberto Lindig Cisneros^e

^aPosgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
Ciudad de México, México.

^bTecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan, Estado de México, México.

^cInstituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de
México, México.

^dInstituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Oaxaca.

^eInstituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad
Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán.

*Autor para correspondencia: rgaribay@ib.unam.mx

Resumen

En los bosques de Ixtlán de Juárez, Oaxaca, el género *Laccaria* es de los más productivos a nivel de esporomas, teniendo a *Laccaria laccata* como la especie de mayor abundancia. En este trabajo se comparó la posición que ocupa el género *Laccaria* en la estructura de la comunidad de hongos ectomicorrízicos medida a través de la abundancia de esporomas *versus* micorrizas. El muestreo se desarrolló en tres sitios con dominancia de *Pinus patula*. Los esporomas de

hongos fueron recolectados para determinación taxonómica y se tomaron los datos de producción (cantidad y peso). Las micorrizas se obtuvieron de muestras de suelo, de éstas se secuenció la región ITS para su identificación molecular. No existió una correspondencia entre la abundancia relativa (AR) de las especies más abundantes a nivel de esporoma (*L. laccata* AR=0.43, *Cantharellus tubaeformis* AR=0.27, *Lactarius chrysorrehus* AR=0.10 y *L. vinaceobrunnea* AR=0.08) y las más abundantes a nivel de micorrizas (*Lactarius aff. deceptivus* AR=0.25, *Cortinarius aff. ochrophyllus* AR=0.12, *Hydnum aff. cuspidatum* AR=0.05, *Russula* sp.1 AR=0.05 y *Sebacina aff. dimitica* AR=0.05). Potencialmente los géneros abundantes a nivel de esporomas y micorrizas como *Laccaria*, *Cantharellus*, *Lactarius* y *Cortinarius* tendrían que usarse en programas de micorrización y evaluarse en invernadero para desarrollar inóculo de consorcios de los hongos ectomicorrízicos más importantes en la comunidad.

Palabras clave:

Pinus patula, *Lactarius deceptivus*, *Laccaria laccata*, ecología, macromicetos, Oaxaca

Abstract

In the forests of Ixtlán de Juárez, Oaxaca, the genus *Laccaria* is one of the most productive at basidiomata level, being *L. laccata* the most abundant. In this work, we compared the placement of *Laccaria* in the edible ectomycorrhizal fungi community measured by basidiomata abundance versus mycorrhizae. The sampling took place in three sites with *Pinus patula* dominance. The fungi basidiomata were collected to determine their taxonomic identity and production data (quantity and weight). Mycorrhizae were obtained from soil core samples, whose ITS DNA was sequenced for molecular identification. There was no correspondence between the species with higher basidiomata production (*L. laccata* AR=0.43, *Cantharellus tubaeformis* AR=0.27, *Lactarius chrysorrehus* AR=0.10, and *L. vinaceobrunnea* AR=0.08) and those with more abundant mycorrhizae (*Lactarius aff. deceptivus* AR=0.25, *Cortinarius aff. ochrophyllus*

AR=0.12, *Hydnum aff cuspidatum* AR=0.05, *Russula* sp.1 AR=0.05, and *Sebacina aff dimitica* AR=0.05). Potentially the genera with most basidiomata and mycorrhizae such as *Laccaria*, *Cantharellus*, *Lactarius*, and *Cortinarius* should be used in mycorrhization programs and tested in greenhouse experiments. This would allow the production of ectomycorrhizal inoculum consortia based on most ecologically outstanding species.

Key words:

Pinus patula, *Lactarius deceptivus*, *Laccaria laccata*, ecology, mushrooms, Oaxaca

Introducción

Las comunidades microbianas del suelo presentan un papel importante en la mediación de los procesos del ecosistema, estas interacciones ecológicas y fisiológicas entre los organismos, están determinadas por factores bióticos y abióticos. Las plantas han desarrollado diferentes adaptaciones para contrarrestar sus limitaciones nutricionales, estrés hídrico, resistencia a patógenos o contaminantes (Lambers et al., 2008; Smith y Read, 2008; van der Heijden et al., 2015; Gil-Martínez et al., 2018; Martin et al., 2018). Una de las estrategias, es el establecer asociaciones mutualistas con microorganismos, como bacterias y hongos en las raíces; lo que se logra, entre otros mecanismos, a través de los exudados de las raíces que regulan las comunidades microbianas facilitando la simbiosis mutualista (Bais et al., 2004; Sanon et al., 2009).

La simbiosis ectomicorrízica se define como “una estructura en la cual la unión simbiótica entre un hongo y el órgano de absorción de las plantas, confiere un incremento en la adecuación sobre una o ambas partes” (Smith y Read, 2008), este tipo de interacción se lleva a cabo con cientos de especies de los *Phylum*: Basidiomycota, Ascomycota y Zigomycota. Se estima que existen entre 20 000 y 25 000 especies de hongos ectomicorrízicos a nivel global, de los cuales se han descrito cerca de 6 000, asociadas a cerca del 2.2% de plantas vasculares (Smith y Read, 2008; Tedersoo et al., 2009, 2012; O’Hanlon, 2012; Brundrett y Tedersoo,

2018). Los hongos ectomicorrízicos (HEC) facilitan hasta el 75% de P y el 80% del N que absorbe la planta, esto mediante diferentes tipos de exploración ya sea corta, mediana y de larga distancia (Rosinger et al., 2018). Por lo tanto, las comunidades fúngicas en los bosques son esenciales para la salud forestal, la productividad y recuperación de los eventos de disturbio (Bowman et al., 2018).

Los HEC presentan un ciclo de vida con una fase asexual o vegetativa (micelio y micorrizas), y una fase sexual (esporomas y esporas); por lo tanto, el estudio de las comunidades de hongos ectomicorrízicos puede realizarse a partir de esporomas y esporas encontradas en la superficie del suelo y/o por micelio y micorrizas extraídas del mismo. De hecho, cada una de estas fases del ciclo de vida reflejan un diferente nivel de estructura de la comunidad.

Los estudios a través de la producción de esporomas tienen como objetivo medir la disponibilidad del recurso y hacer propuestas de manejo, por ejemplo, como recursos alimenticios o como inóculo nativo para procesos de micorrización (Nantel y Peter, 1992; Salo, 1993, Schmitt et al., 1999; Montoya et al., 2005; Montoya, 2005; Garibay-Orijel et al., 2009; Gómez-Hernández et al., 2019). Mientras que el estudio a partir de las micorrizas se ha centrado en conocer la presencia, abundancia y diversidad de las especies en su fase de interacción con sus hospederos (Tedersoo et al., 2003; Dickie y Reich, 2005; Izzo et al., 2005; Kranabetter et al., 2009; Dickie *et al.*, 2013; Garibay-Orijel *et al.*, 2013; Argüelles-Moyao *et al.*, 2016, 2018; Baeza-Guzmán et al., 2017; García-Guzmán et al., 2017).

Pocos estudios se han llevado a cabo con ambas fases del ciclo de vida. Gardes y Bruns (1996), encontraron que la producción de esporomas por *Suillus pungens* y *Amanita franchetii* es prolífica en *Pinus muricata*, pero la abundancia relativa de micorrizas formadas por estas dos especies es baja. En contraste, las micorrizas formadas por *Russula amoenolens* forman cerca del 30% del número total de micorrizas que se analizaron, sin embargo, el número de estructuras

reproductoras producidas por esta especie es baja. Reverchon et al. (2012) reportan la estructura de la comunidad en ambas fases de la asociación fúngica en *Pinus montezumae* en la Sierra Chichinautzin, México, teniendo que a nivel de esporoma los géneros *Inocybe* y *Laccaria* son los dominantes en los sitios jóvenes e intermedios, mientras que *Amanita flavoconia*, *Cantharellus cibarius* y *Tricholoma imbricatum* son dominantes en sitios antiguos. Al estudiar las micorrizas, las especies más abundantes fueron *Cenococcum geophilum*, una especie del género *Clavulina* y muestras pertenecientes a la familia Atheliaceae en los sitios jóvenes, mientras que los sitios intermedios y antiguos fueron dominados por muestras de especies de la familia Thelephoraceae.

En México las investigaciones se han enfocado en la ecología de comunidades de hongos ectomicorrízicos en bosques de coníferas a nivel de esporomas, estos trabajos frecuentemente encuentran que el género *Laccaria* es de los que produce esporomas más abundantemente. Por ejemplo: *L. amethystina* y *L. laccata* en el estado de Veracruz (Villarreal, 1996); *L. laccata* s.l., *L. proxima*, *L. bicolor* s.l. y *L. amethystina* s.l. en Michoacán (Gómez-Reyes, 2005); *L. laccata* s.l., *L. amethystina* s.l. y *L. bicolor* s.l. en Chihuahua (Quiñonez-Martínez et al., 2005); *L. trichodermophora*, *L. bicolor* s.l. y *L. amethystina* s.l. en Tlaxcala (Montoya et al., 2005); *L. laccata* var. *pallidifolia*, *L. vinaceobrunnea* y *L. amethysteo-occidentalis* en Oaxaca (Garibay-Orijel et al., 2009); *L. bicolor* s.l. y *L. laccata* s.l. en Morelos (Reverchon et al., 2012); *L. sp. 1* y *L. sp. 2* en Oaxaca (Gómez-Hernández et al., 2019).

En contraste, los estudios de estructura de comunidades a nivel de ectomicorrizas registran que los géneros más abundantes son: *Tuber* en Guerrero en un bosque de *Quercus* (Morris et al., 2008a; 2008b); *Clavulina* y *Cortinari* en Tlaxcala en *Alnus* (Kennedy et al., 2011); *Clavulina* cf. *cinerea* en el Estado de México en *Abies religiosa* (Argüelles-Moyao et al., 2016); *Tomentella* y *Russula* en Michoacán en *Quercus* (García-Guzmán et al., 2017); *Russula* aff. *olivobrunnea* en el Estado de México en *Abies religiosa* (Argüelles-Moyao et al., 2018).

Ixtlán De Juárez, Oaxaca es una comunidad modelo desde el punto de vista forestal. Tiene la certificación internacional del Forest Stewardship Council (FSC) desde 2001 hasta la fecha (Pacheco-Aquino et al., 2015). También es un modelo micológico pues diversos estudios de estructura de la comunidad a nivel de esporoma se han llevado a cabo en dicha zona (Garibay-Orijel et al., 2009; Gómez-Hernández et al., 2019) en los cuales el género *Laccaria* es de los más abundantes. Dado que este patrón persiste a lo largo del tiempo, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: siendo el género *Laccaria* el más abundante a nivel de esporomas, también debe de serlo a nivel de micorrizas.

Método

Área de estudio. Ixtlán de Juárez, Oaxaca, se ubica entre los grados 17° 18' 16" y 17° 34' 00" N; y entre 96° 31' 38" y 96° 20' 00" O, en un intervalo altitudinal de 1 900 a 2 900 m. Tiene clima templado húmedo con lluvias en verano C(m) (w') b(i')g (Ruíz-Aquino et al., 2015), con temperatura media anual de 15 °C, precipitaciones que van de 1 000 a 1 300 mm concentradas en junio a noviembre (Castellanos-Bolaños et al., 2010). El tipo de suelo predominante es acrisol húmico (Ah) con textura media limosa. La región se encuentra incluida en la provincia fisiográfica denominada "Sistema Montañoso del Norte de Oaxaca". Es un área de topografía muy accidentada, una parte de esta provincia podría considerarse como prolongación de la Sierra Madre Occidental (Castellanos-Bolaños et al., 2010).

La superficie total del municipio es de 19 310 hectáreas, de las cuales 12 389 están bajo manejo forestal; la comunidad es pionera en el manejo forestal sustentable, desde el año de 2001 hasta la fecha cuenta con la certificación forestal internacional SmartWood de Rainforest Alliance, que ejecuta la certificación para FSG (Forest Stewardship Council), así como la certificación por parte del Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF). La estructura del bosque está

integrada por *Pinus patula*, *P. oaxacana*, *P. pseudostrobus*, *P. douglasiana*, *P. ayacahuite*, *P. teocote*, *P. hartwegii* (=rudis), *P. leiophylla*, *Quercus corrugata*, *Q. crassifolia*, *Q. rugosa*, *Clethra lanata* y *Arbutus xalapensis* (Castellanos-Bolaños et al., 2010; Ruiz-Aquino et al., 2015); si bien la diversidad es amplia, cabe mencionar que existen rodales de uso forestal que son estrictamente de *P. patula* y en sus alrededores domina *Q. crassifolia* generalmente.

Trabajo de campo. Para conocer la importancia del género *Laccaria* en la comunidad de esporomas de hongos ectomicorrízicos comestibles, se eligieron tres parcelas al azar (**Tabla 1**) monitoreando la producción de esporomas durante la temporada de lluvias (junio-octubre de 2013) cada 15 días, teniendo un total de nueve muestreos en cada sitio. Las parcelas tuvieron una extensión de 100 x 100 m, y en cada una de ellas se realizaron diez transectos aleatorios de 34 m de largo por 4 m de ancho. Se tomó el dato de número de esporomas y peso fresco por especie presente; teniendo en consideración el rango de hongos raros (uno a diez esporomas), escasos (11-100), abundantes (101-1 000) y muy abundantes (más de 1 000 esporomas) (Garibay-Orijel et al., 2009); la determinación taxonómica se llevó a cabo con literatura especializada de los diversos géneros encontrados.

En el caso de las ectomicorrizas el muestreo se llevó a cabo en el mes de septiembre del mismo año, en las mismas parcelas en las que se muestrearon los esporomas, se realizaron tres transectos de 60 m de largo separados entre sí por 20 m. En éstos, en los metros 20, 40 y 60 se recolectó suelo con un tubo de PVC de 30 cm de largo por 2.5 cm de diámetro (Kennedy et al., 2011; Reverchon et al., 2012). En total se muestrearon nueve núcleos de suelo por parcela cada uno de 30 cm de profundidad, los cuales se almacenaron en bolsas de plástico en campo y se colocaron en el refrigerador para ser procesados en laboratorio.

Para la obtención de las ectomicorrizas se tamizó el suelo a través de dos tamices, uno de 850 micras y otro de 2 mm de apertura. Con agua corriente se enjuagó el suelo y se colocó el contenido de raíces que quedó sobre estos en una

tina de color blanco (para facilitar la observación de raíces) llena de agua. Se tomaron las raíces ectomicorrizadas con ayuda de pinzas de punta fina y se colocaron en frascos con agua destilada fría. La disección se realizó sobre una caja Petri bajo el microscopio estereoscópico.

Tabla 1 Características de las parcelas estudiadas a nivel de esporomas y ectomicorrizas en Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

	SITIO I "Camino Real"	SITIO II "Viveros"	SITIO III "Madroños"
Ubicación (UTM)	1921348 N 770298 E	1920835 N 768728 E	1923044 N 767783 E
Altitud	2796	2480	2461
Pendiente	22°	15°	47°
Exposición de ladera	Sur (S)	Noreste (NE)	Sureste (SE)
Compactación de suelo	Baja	Media	Baja
Tipo de vegetación	<i>Pinus</i> (70%) <i>Quercus</i> (30%)	<i>Pinus</i> (90%) <i>Quercus</i> (10%)	<i>Pinus</i> (60%) <i>Quercus</i> (40%)
Altura dominante	24.1 m en promedio	31.2 m en promedio	25.2 m en promedio
Especie arbórea dominante	<i>Pinus patula</i>	<i>Pinus patula</i>	<i>Pinus patula</i>

Secuenciación de DNA de micorrizas. La extracción de DNA se llevó a cabo con el kit Xnap (Sigma-Aldrich) utilizando placas para PCR (GENEMate, ISC BioEXpress) de 96 pozos, en cada pozo se agregaron diez μm de solución de extracción adicionando en cada uno un fragmento de 1 mm de micorriza. Posteriormente en el termociclador (Applied biosystems) se colocaron las muestras con el siguiente programa: 65 °C por diez minutos y 95 °C por diez minutos (Kennedy et al., 2011; Garibay-Orijel et al., 2013). Posteriormente se añadieron 20 μm de solución de disolución, se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se guardaron a 4 °C. Una vez que se obtuvo el DNA se amplificó la región de los interespaciadores ribosomales (ITS). La región ITS de ADNr se amplificó utilizando los cebadores ITS1F e ITS4 (White et al.,

1990; Gardes y Bruns, 1996) y la mezcla maestra Redextract-N-Amp (Sigma-Aldrich).

La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo: 94 °C por 3 min (desnaturalización); 34 ciclos de 94 °C por 1 min (desnaturalización), 51 °C por 1 min (alineamiento), 72 °C por 1 min (elongación); un ciclo de 72 °C por 8 min y finalmente 4 °C (Izzo et al., 2005; Garibay-Orijel et al., 2013; Argüelles-Moyao et al., 2016). La calidad de los amplicones se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, aquellos amplicones de buena calidad se limpiaron con 1 µm de EXO-SAP-IT (Affymetrix) y 1 µm de agua de PCR por cada 3.5 µm de muestra de PCR en un termociclador a 37 °C durante 45 min, seguido de 80 °C durante 15 min y manteniéndola a 4 °C. Los productos de PCR limpios se secuenciaron en sentido inverso con el cebador ITS4 en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Garibay-Orijel et al., 2013; Argüelles-Moyao et al., 2016).

Las secuencias de ADN fueron editadas y agrupadas en Unidades Moleculares de Operación Taxonómica (MOTUs) con una similitud de nucleótidos del 97% en Geneious R8. Para asignar identidad taxonómica a los MOTUs, realizamos una búsqueda BLAST en GenBank (NCBI) utilizando solo secuencias de especímenes voucher (Argüelles-Moyao et al., 2016; Argüelles-Moyao y Garibay-Orijel, 2018). Las secuencias representativas de cada MOTU se depositaron en Genbank con los códigos MT329593-MT329618.

Análisis de resultados: Se comparó la abundancia de las especies de hongos ectomicorrízicos encontrados a nivel de esporomas contra la abundancia de las micorrizas en tres parcelas en el año de 2013.

La diversidad de hongos comestibles a nivel de esporomas fue de 17 taxa (13 ectomicorrízicos y 4 saprobios). Los sitios muestreados con mayor diversidad de especies fueron el S1 y S2 con 12 taxa cada uno; el sitio con menos especies fue el S3 con diez. Teniendo que los sitios más parecidos entre sí fueron S1-S3 con similitudes del 54%, mientras que los sitios más distintos entre sí fueron S1-S2 y S2-S3 con 25% y 10% respectivamente.

Se registraron en total 2 380 esporomas, teniendo en promedio 793 esporomas por sitio de muestreo; durante el mes de agosto el S1 y S3 alcanzaron un promedio de 500 esporomas, mientras que para septiembre el S1 disminuyó a 180 y el S3 aumento a 1 050. *Laccaria laccata* fue la única especie que produjo más de 1 000 esporomas; de tal forma que siete especies fueron comunes y seis raras (**Tabla 2, Figura 1**).

En el caso de la producción de biomasa total, *Laccaria laccata* fue la especie de mayor producción con 2.107kg/3 SM, seguida de *Cantharellus tubaeformis* con 1.428kg/3 SM; el resto de las especies obtuvieron una biomasa menor a los 500g/3 SM. La producción de esporomas comenzó desde principios de junio hasta finales de octubre para *Lactarius chrysorrhoeus* (FT = 0.88), seguida de *Suillus tomentosus* (FT = 0.66) y *L. laccata*, *C. tubaeformis* e *Hydnum repandum* (FT = 0.55) (**Tabla 2**). Se encontró que *Russula cyanoxantha* solo apareció en el S1, así como *L. proxima* exclusivamente en el S2; cuatro especies estuvieron presentes en todos los sitios de muestreo: *S. tomentosus*, *L. laccata*, *L. vinaceobrunnea* y *L. chrysorrhoeus*.

Tabla 2 Variables ecológicas en la producción de esporomas de hongos ectomicorrízicos de Ixtlán de Juárez, Oaxaca

Especie	AA	AR	FT	FE	FER	EBT	EBR
* <i>Laccaria laccata</i>	1033	0.43	0.5	1	0.09	2107.3	0.34
* <i>Cantharellus tubaeformis</i>	648	0.27	0.5	0.6	0.05	1428.8	0.23
* <i>Lactarius chrysorrhoeus</i>	230	0.10	0.8	1	0.09	1007.3	0.16
* <i>Laccaria vinaceobrunnea</i>	201	0.08	0.4	1	0.09	346.2	0.06

<i>*Otidea onotica</i>	58	0.02	0.4	0.6	0.05	91.8	0.02
<i>*Gymnopus confluens</i>	54	0.02	0.2	0.3	0.03	37.5	0.01
<i>*Laccaria proxima</i>	45	0.02	0.1	0.3	0.03	91.5	0.01
<i>**Hydnum repandum</i>	28	0.01	0.5	1	0.09	265.1	0.04
<i>**Suillus tomentosus</i>	28	0.01	0.6	1	0.09	487.7	0.08
<i>**Cantharellus lutescens</i>	22	0.009	0.1	0.3	0.03	11.5	0.002
<i>**Gymnopus dryophilus</i>	16	0.007	0.3	1	0.09	62.4	0.01
<i>**Amanita vaginata</i>	9	0.004	0.3	1	0.09	174.5	0.03
<i>**Lactarius deterrimus</i>	6	0.003	0.1	1	0.05	74.8	0.01

AA: Abundancia Absoluta. AR: Abundancia Relativa. FT: Frecuencia Temporal. FE: Frecuencia Espacial. FER: Frecuencia Espacial Relativa. EBT: Estimación de Biomasa Total. EBR: Estimación de Biomasa Relativa. *Especies comunes. **Especies raras.

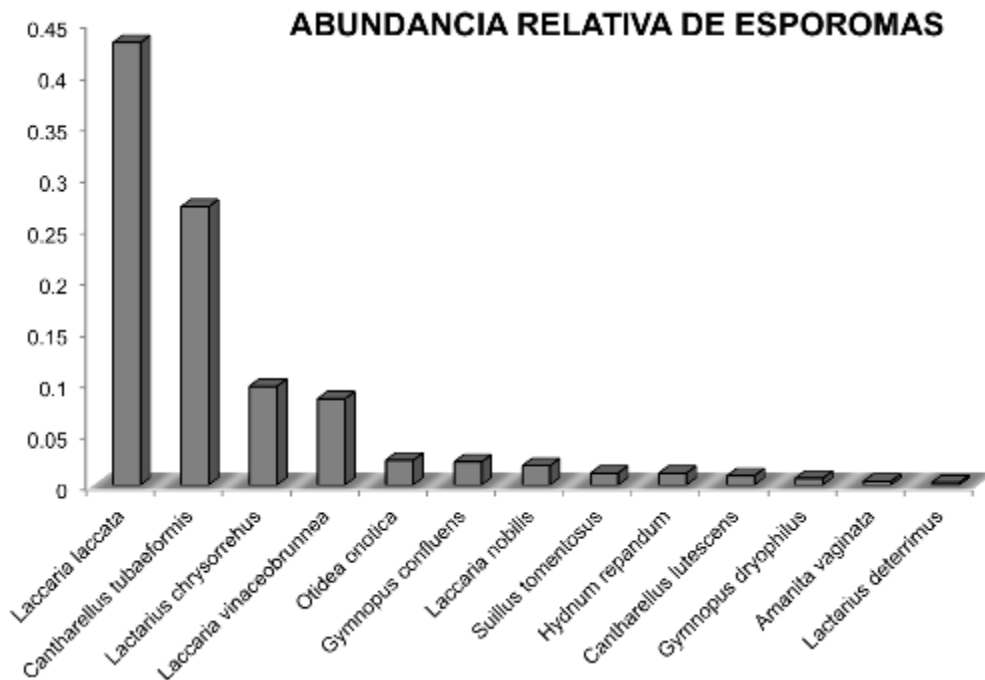


Figura 1 Abundancia relativa de esporomas de hongos comestibles en los bosques de Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

A nivel de micorrizas se obtuvieron 57 secuencias de ectomicorrizas, las cuales correspondieron con 26 taxa de hongos ectomicorrízicos, 14 identificadas a nivel de especie, 10 nivel de género, 1 a nivel de familia y 1 a nivel de orden. Las

especies pertenecieron principalmente a la familia Russulaceae (dos géneros, seis especies) siendo también la familia más abundante, seguida de Cortinariaceae (un género, cuatro especies) y Thelephoraceae (un género, tres especies). Se encontró una riqueza de 13 géneros ectomicorrízicos: *Byssocorticium*, *Cenococcum*, *Cortinarius*, *Elaphomyces*, *Hydnum*, *Hygrophorus*, *Lactarius*, *Piloderma*, *Ramaria*, *Russula*, *Sebacina*, *Sistotrema* y *Tomentella* (Tabla 3). El género más diverso fue *Russula* con cinco especies, seguido de *Cortinarius* con cuatro y *Piloderma* y *Tomentella* con tres especies cada uno. Las especies con mayor frecuencia fueron *Lactarius* aff *deceptivus* (catorce micorrizas) con una AR=0.25, *Cortinarius* aff *ochrophyllus* AR=0.12 (siete micorrizas), *Hydnum* aff *cuspidatum*, *Russula* sp.1 y *Sebacina* aff *dimitica* (tres micorrizas cada una) AR=0.05; el resto fueron encontradas en dos (AR=0.04) o una micorriza (AR=0.02) (Tabla 3, Figura 2).

Tabla 3 Identificación molecular y abundancia de las ectomicorrizas.

Acceso GenBank	Identidad en Genbank	% Id	Especie	# Mic	AR
KF937330	<i>Lactarius deceptivus</i>	97.2	<i>Lactarius</i> aff <i>deceptivus</i>	14	0.25
FJ039605	<i>Cortinarius ochrophyllus</i>	96.4	<i>Cortinarius</i> aff <i>ochrophyllus</i>	7	0.12
NR_164032	<i>Hydnum cuspidatum</i>	97.8	<i>Hydnum</i> aff <i>cuspidatum</i>	3	0.05
MH496786	<i>Russula</i> sp.	98.5	<i>Russula</i> sp.1	3	0.05
KF061273	<i>Sebacina dimitica</i>	99.1	<i>Sebacina</i> aff <i>dimitica</i>	3	0.05
LC095108	<i>Cenococcum geophilum</i>	98.6	<i>Cenococcum geophilum</i>	2	0.04
KY626136	<i>Ramaria magnifica</i>	96.7	<i>Ramaria</i> aff <i>magnifica</i>	2	0.04
JF834357	<i>Russula</i> <i>chameleontina</i>	96.1	<i>Russula</i> aff <i>chameleontina</i>	2	0.04
AJ277910	<i>Russula cremoricolor</i>	98.4	<i>Russula cremoricolor</i>	2	0.04
MK532794	<i>Russula subsulphurea</i>	96.4	<i>Russula</i> aff <i>subsulphurea</i>	2	0.04
KX389136	<i>Tomentella</i> sp.	96.0	<i>Tomentella</i> sp.1	2	0.04
KX899032	Uncultured <i>Albatrellaceae</i>	85.5	<i>Albatrellaceae</i> sp.	1	0.02
KY548875	<i>Byssocorticium</i> sp.	96.5	<i>Byssocorticium</i> sp.	1	0.02

MH211780	<i>Cortinarius</i> sp.	93.4	<i>Cortinarius</i> sp.1	1	0.02
MF153055	<i>Cortinarius</i> sp.	95.2	<i>Cortinarius</i> sp.2	1	0.02
JX630789	Uncultured <i>Cortinarius</i>	97.0	<i>Cortinarius</i> sp.3	1	0.02
KX238833	<i>Elaphomyces asperulus</i>	96.9	<i>Elaphomyces</i> aff <i>asperulus</i>	1	0.02
JQ991728	Uncultured Helotiales	99.3	Helotiales sp.	1	0.02
FJ196923	Uncultured <i>Hygrophorus</i>	100	<i>Hygrophorus</i> sp.	1	0.02
JQ711915	<i>Piloderma olivaceum</i>	99.5	<i>Piloderma olivaceum</i>	1	0.02
DQ469280	<i>Piloderma byssinum</i>	95.2	<i>Piloderma</i> aff <i>byssinum</i>	1	0.02
KF476783	Uncultured <i>Piloderma</i>	94.2	<i>Piloderma</i> sp.	1	0.02
JF834373	<i>Russula</i> sp.	97.7	<i>Russula</i> sp.2	1	0.02
NR_158892	<i>Sistotrema luteoviride</i>	98.2	<i>Sistotrema luteoviride</i>	1	0.02
U83480	<i>Tomentella</i> <i>ramosissima</i>	96.6	<i>Tomentella</i> aff <i>ramosissima</i>	1	0.02
FJ210770	Uncultured <i>Tomentella</i>	98.1	<i>Tomentella</i> sp.2	1	0.02

% Id: Porcentaje de similitud nucleotídica. AR: Abundancia Relativa. # Mic: Número de micorrizas.

ABUNDANCIA RELATIVA DE MICORRIZAS

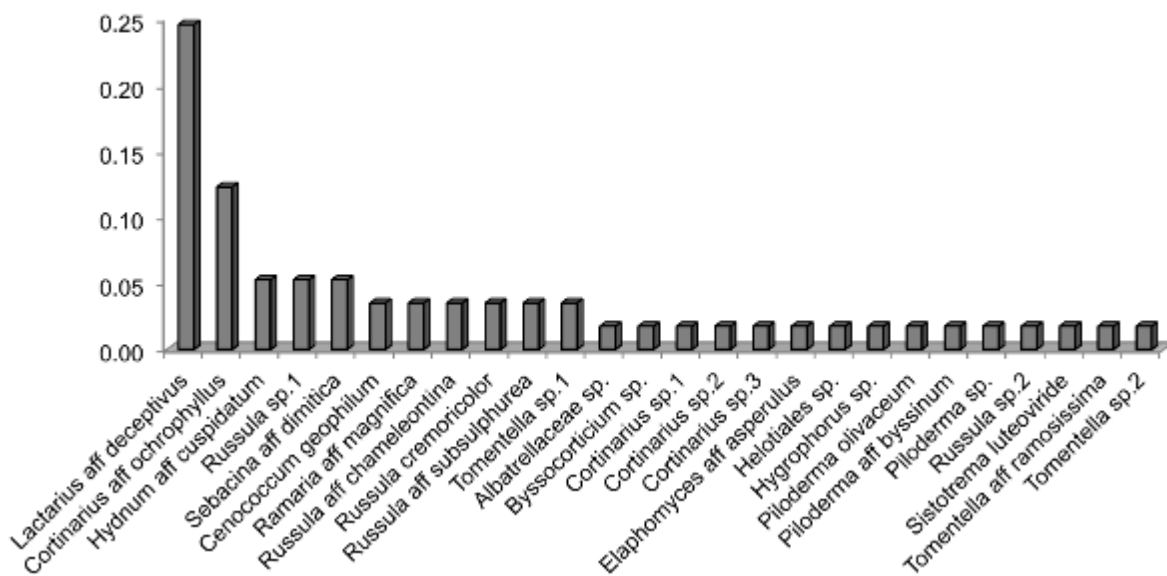


Figura 2 Abundancia relativa de ectomicorrizas en los bosques de Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Discusión

A nivel de género, *Laccaria* es el más productivo en esporomas en los bosques de Ixtlán de Juárez, en sitios con manejo y sin manejo forestal a través del tiempo (Garibay-Orijel et al., 2009; Gómez-Hernández et al. 2019). Garibay et al. (2009) registraron un total de 81 especies de hongos comestibles monitoreados durante dos años en ocho sitios muestreados, en el presente estudio la diversidad estuvo representada por tan solo el 21% de lo reportado en 2009, esto en una temporada de lluvias en tres sitios muestreados. La producción total de esporomas en 2001 fue de 5 851 en 2002 fue de 4 611 (tomando en cuenta solo tres sitios muestreados), mientras que en 2013 se obtuvo el 41% y el 51% en relación al 2001 y 2002 respectivamente. La baja producción de esporomas en 2013 se puede deber a diversos factores ambientales, edáficos, entre otros; recordando que los hongos presentan la característica de formar esporomas de forma no periódica y/o regular. No obstante la especie con mayor abundancia en 2009 (AR=0.44) y 2013 (AR=0.43) fue *Laccaria laccata*, cabe mencionar que los sitios muestreados por Garibay-Orijel et al. y los del presente estudio, aunque son diferentes son homogéneos teniendo a *Pinus patula* como la especie dominante a nivel arbóreo.

El tamaño del área muestreada en términos de abundancia en los bosques de Ixtlán de Juárez parece no ser un factor que afecte el resultado en cuanto a la especie dominante de hongos micorrízicos y esto podría ser por la homogeneidad de la vegetación; en términos de biomasa *L. laccata* presentó la mayor producción en 2001 con 6.62 kg/3 SM y en 2002 con 6.61 kg/3 SM, de igual forma para 2013 fue la especie más productiva, sin embargo, comparando con lo reportado por Garibay-Orijel et al. (2009) fue 68% más bajo.

Gómez- Hernández et al. (2019) registraron al género *Laccaria* como uno de los más diversos en términos de especies (nueve), teniendo que *Laccaria* sp.1 es la tercera especie más abundante, creciendo en un bosque bajo manejo

forestal. Garibay-Orijel et al. (2009) y el presente estudio coincidieron en la dominancia de *L. laccata* en un bosque sin manejo forestal.

El muestreo de micorrizas nos permitió reconocer las especies abundantes a nivel de raíz teniendo que *Lactarius* aff *deceptivus* (**Figura 3**) y *Cortinarius* aff *ochrophyllus* fueron las especies más representativas en los sitios de muestreo dentro de un bosque de edad madura, no encontrando a *Laccaria* dentro de los géneros identificados. Ramírez-Miguel (2019) en la misma localidad (Ixtlán de Juárez) estudió la frecuencia de micorrizas en un bosque en regeneración con tres años de edad después del aprovechamiento forestal de *Pinus patula*. Él reporta a *Russula* (19%) como el género más abundante, seguida de *Cenococcum* y *Tomentella* (11% respectivamente), y finalmente *Laccaria* (4%). Si bien la dominancia a nivel de esporoma en los bosques de *Pinus* en Ixtlán de Juárez presenta *Laccaria* a nivel de micorrizas no es así, obteniendo una falta de correspondencia entre ambas fases en bosques maduros, aunque en bosques jóvenes si se encuentran sus micorrizas.

Se sabe que las especies de *Laccaria* son de las primeras en colonizar los sistemas radiculares en plantas jóvenes, siendo utilizadas para la inoculación desde invernadero, por su capacidad de micorrizar y con ello garantizar el éxito en el establecimiento en campo (Pera y Parladé, 2005; Quoreshi et al., 2009). Un fenómeno observado en los estudios a nivel de esporomas en México es la dominancia del género *Laccaria*, permitiendo de esta forma ser especies modelo en procesos de inoculación en invernadero (Villarreal, 1996; Gómez-Reyes, 2005; Quiñonez-Martínez et al., 2005; Montoya et al., 2005; Garibay-Orijel et al., 2009; Gómez-Hernández et al., 2019; Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019).

Reverchon et al. (2012) en un bosque joven de *Pinus montezumae* encontró que *Inocybe* y *Laccaria* eran los géneros con mayor dominancia a nivel de esporomas; mientras que a nivel de micorrizas fueron *Cenococcum geophilum*, *Clavulina* sp. 2 y la Familia Atheliaceae. Para los bosques de *Pinus* en Ixtlán de

Juárez existe una similitud en cuanto a patrones, teniendo una falta de correspondencia entre lo encontrado entre las fases sexuales (esporomas) y vegetativas (micorrizas). Nuestro estudio coincide con Reverchon et al. (2012) encontrando a *Laccaria* dominante a nivel de esporoma, pero no a nivel de micorrizas. Mientras que en un bosque viejo Reverchon et al. (2012) registraron como abundante a *Amanita flavoconia*, *Cantharellus cibarius* y *Tricholoma imbricatum* y en micorrizas fue de la Familia Thelephoraceae.

Existe una clara diferencia entre un bosque joven y uno maduro en cuanto a dominancia de hongos ectomicorrízicos y esto potencialmente puede ser por los requerimientos nutrimentales de la planta en los diferentes estados de desarrollo, así como las condiciones edáficas, la comunidad microbiana, entre otros factores. Pérez-Pazos (2018) estudió la composición de la comunidad fúngica en ambas fases en un bosque monodominante de *Abies religiosa* en el Estado de México, encontrando una dominancia en esporomas y micorrizas por *Clavulina*, esto es un fenómeno poco frecuente, no obstante él propone que los esporomas de *Clavulina* se pueden comportar como saprobios facultativos.

La falta de correspondencia entre los estudios a nivel de esporomas *versus* micorrizas es una constante en ecología de hongos ectomicorrízicos, no obstante el tipo de muestreo potencialmente puede ser un factor determinante. Como menciona Rosinger et al. (2018) las estrategias para la adquisición de nutrientes presentan características que permiten a los hongos ectomicorrízicos ser más eficientes, es decir, si se sabe que el género *Laccaria* la profundidad en la que se puede encontrar es mucho más profunda y cercano a las raíces. Por lo tanto, el muestreo tendría que ajustarse a el tipo de exploración de las micorrizas estudiadas, que para *Laccaria* es de mediana distancia; en consecuencia el muestreo tendría que ser potencialmente muy cerca del hospedero.

Potencialmente los géneros abundantes a nivel de esporomas y micorrizas como son *Laccaria*, *Cantharellus*, *Lactarius* y *Cortinarius* (**Figura 3**) tendrían que

ser centro de atención en programas de micorrización y poder ser evaluados en invernadero, con eso comenzar a pensar en consorcios de hongos ectomicorrízicos más importantes. Conocer y reconocer los actores involucrados en el sistema ectomicorrízico en los diferentes niveles de estudio (esporomas, esporas, micelio y micorriza), permitirá un mejor entendimiento de la compleja



simbiosis, generando nuevas estrategias en los procesos de micorrización con un enfoque holístico, garantizando de esta forma el éxito en invernadero y campo, en proyectos de reforestación, aforestación y migración asistida.

Figura 3 Hongos comestibles y ectomicorrízicos más abundantes a nivel de esporomas y ectomicorrizas en los bosques de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. a) *Laccaria c.f. laccata*; b) *Cantharellus tubaeformis*; c) *Otidea onotica*; d) *Laccaria c.f. vinaceobrunnea*; e) *Lactarius deceptivus*.

Conclusiones

Las características de los bosques de *Pinus* de Ixtlán de Juárez presentan un patrón muy similar de condiciones, que a nivel de producción de esporomas se ve reflejado en el patrón de dominancia por el género *Laccaria*, patrón que ha sido constante durante los últimos 20 años.

La hipótesis planteada en el presente estudio se rechaza, ya que la dominancia a nivel de esporoma del género *Laccaria* no corresponde a nivel de micorrizas, donde el género *Lactarius* (*L. aff. deceptivus*) es el más abundante.

Finalmente, la falta de correspondencia entre ambas fases pudiera ser por diversos motivos, el más probable es que a nivel de micorrizas *Laccaria* es un simbionte especializado en pinos jóvenes pionero en la micorrización de plántulas, por lo tanto en los bosques maduros estudiados ya ha sido reemplazado por géneros de etapas más avanzadas como *Lactarius*, *Cortinarius* y *Russula*.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo a las autoridades de Ixtlán de Juárez, Oaxaca por el permiso para entrar a la comunidad, a las oficinas de Servicios Técnicos Forestales por el apoyo en el traslado y en la toma de datos en los sitios de muestreo y en especial al Ing. Forestal Julio Aureliano Ruiz Aquino y a la Ing. Forestal Elizabeth Nashielly Ramírez Santiago. Al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante los estudios de doctorado. Este proyecto fue parcialmente financiado por UNAM PAPIIT IN210217 a RGO.

- Argüelles-Moyao, A. y Garibay-Orijel, R. (2018). Ectomycorrhizal fungal communities in high mountain conifer forest in central Mexico and their potential use in the assisted migration of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza*, 28, 1-13.
- Argüelles-Moyao, A., Garibay-Orijel, R., Márquez-Valdelamar, L.M. y Arellano-Torrez, E. (2016). *Clavulina-Membranomyces* is the most important lineage within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza*, 27, 53-65.
- Baeza, Y.B., Medel-Ortiz, R. y Garibay-Orijel, R. (2017). Caracterización morfológica y genética de los hongos ectomicorrízicos asociados a bosques de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional Cofre de Perote, Veracruz. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88, 41-48.
- Bais, H.P., Park S-W., Weir, T.T., Callaway, R.M. y Vivanco, J.M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trend in plant science*, 9, 26-32.
- Bowman, E.A. y Arnold, A.E. (2018). Distributions of ectomycorrhizal and foliar endophytic fungal communities associated with *Pinus ponderosa* along a spatially constrained elevation gradient. *American Journal of Botany*, 104, 687-699.
- Brundrett, M.C. y Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*. doi:10.1111/nph.14976.
- Castellanos-Bolaños, J.F., Treviño-Garza, E.J., Aguirre-Calderón, O.A., Jiménez-Pérez, J. y Velázquez-Martín, A. (2010). Diversidad arbórea y estructura espacial de bosques de pino-encino en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 1, 39-52.
- Dickie, I.A. y Reich, P.B. (2005). Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges. *Journal of Ecology*, 93, 244-255.
- Dickie, I.A., Martínez-García, L.B., Koele, K., Grelet, G.A., Tyljanakis, J.M., Peltzer, D.A. y Richardson, S.J. (2013). Mycorrhizas and mycorrhizal fungal communities throughout ecosystem development. *Plant Soil*, 367, 11-39.

- García, G.O.M., Garibay-Orijel, R., Hernández, E., Arellano-Torres, E. y Oyama, K. (2017). Word-wide meta-analysis of *Quercus* forests ectomycorrhizal fungal diversity reveals southwestern Mexico as a hotspot. *Mycorrhiza*, 27, 811-822.
- Gardes, M. y Bruns, T.D. (1996). Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany*, 74, 1572-1583.
- Garibay-Orijel, R., Martínez-Ramos, M. y Cifuentes, J. (2009). Disponibilidad de esporomas de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80, 521-534.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M. y Flores-García, A. (2013). Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 153-169.
- Gil-Martínez, M., López-García, A., Domínguez, A., Navarro-Fernández, C.M., Kjølner, R., Tibbett, M. y Marañón, T. (2018). Ectomycorrhizal fungal communities and their functional traits mediate plant-soil interactions in trace element contaminated soils. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1-15.
- Gómez-Hernández, M., Ramírez-Antonio, K.G. y Gándara, E. (2019). Ectomycorrhizal and Wood-decay macromycete communities along development stage of managed *Pinus patula* in Southwest Mexico. *Fungal Ecology*, 39, 109-116.
- Gómez-Reyes, V.M. (2005). *Diversidad de hongos ectomicorrízicos y su relación con diferentes unidades ambientales en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan*. Tesis de maestría, Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Izzo, A., Josephine, A. y Bruns, T.D. (2005). Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytologist*, 166, 619-630.
- Kennedy, P.G., Garibay-Orijel, R., Higgins, L.M. y Ángeles-Argáiz, R. (2011).

- Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests supports the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Micorrhizal*, 6, 559-568.
- Kranabetter, J.M., Durall, D.M. y MacKenzie, W.M. (2009). Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. *Mycorrhiza*, 19, 99-111.
- Nantel, P. y Peter, N. (1992). Ecology of ectomycorrhizal Basidiomycetes communities on a local vegetation gradient. *Ecology*, 73, 99-117.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E.G.J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H.J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buée, M., Brokstein, P., Canbäck, B., Cohen, D., Courty, P.E., Coutinho, P.M., Delaruelle, C., Detter, J.C., Deveau, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucic, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P.J., Jain, P., Kilaru, S., Labbé, J., Lin, Y.C., Legué, V., LeTacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Oudot-LeSecq, M.P., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kües, U., Lucas, S., Van de Peer, Y., Podila, G.K., Polle, A., Pukkila, P.J., Richardson, P.M., Rouzé, P., Sanders, I.R., Stajich, J.E., Tunlid, A., Tuskan, G. y Grigoriev, I.V. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452, 88-93.
- Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A., Cifuentes, J. y Caballero, J. (2005). Useful wild fungi. La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity*, 17, 115-143.
- Montoya, A. (2005). *Aprovechamiento de los hongos silvestres comestibles en el volcán La Malinche, Tlaxcala*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Morris, M.H., Pérez-Pérez, Smith, M.A. y Bledsoe, M.E. (2008a). Influence of host

- species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a tropical cloud forest. *FEMS Microbiology Ecology*, *69*, 274-287.
- Morris, M.H., Pérez-Pérez, Smith, M.A., Bledsoe, M.E. (2008b). Multiple species of ectomycorrhizal fungi are frequently detected on individual oak root tips in a tropical cloud forest. *Mycorrhiza*, *18*, 375-383.
- O'Hanlon, R. (2012). Below-ground ectomycorrhizal communities: the effect of small scale spatial and short term temporal variation. *Symbiosis*, *57*, 57-71.
- Pacheco-Aquino, G., Durán-Medina, E. y Ordóñez-Díaz, J.A. (2015). Estimación de carbono arbóreo en el área de manejo forestal de Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, *29*, 126-145.
- Pera, J. y Parladé, J. (2005). Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales*, *14*, 419-433.
- Pérez-Pazos, F.E. (2018). Diversidad, ecología y huella isotópica de *Clavulina* en bosques de *Abies* del suroeste de la cuenca de México. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Quiñonez-Martínez, M., Garza, F. y Vargas, M. (2005). Aspectos ecológicos y diversidad de hongos ectomicorrízicos en bosque de pino encino de cinco localidades del municipio de Bocoyna, Chihuahua. *Ciencia en la Frontera*, *3*, 29-38.
- Quoreshi, A.M., Kernaghan, G. y Hunt, G.A. (2009). Micorrhizal fungi in Canadian forest nurseries and field performance of inoculated seedlings. En. Khasa D., Piché Y. y Coughlan A. (Eds.). *Advances in Mycorrhizal Science and Technology* (pp. 115-128). Press Ottawa: NRC.
- Ramírez-Miguel, A.D. (2019). Hongos ectomicorrízicos asociados a plantas jóvenes de *Pinus patula* Schl. Et Cham., establecidos en el sistema silvícola matarrasa en la comunidad de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Tesis de licenciatura. Universidad de la Sierra Norte de Juárez, Oaxaca.

- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Bonilla-Rosso, G. y Pérez-Moreno, J. (2012). Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedling and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 80, 479-487.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., Ortega-Larrocea, M.P. y Arellano-Torrez, E. (2019). Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizas in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90, e902868.
- Rosinger, C., Sandén, H., Matthews, B., Mayer, M. y Godbold, D. (2018). Patterns in Ectomycorrhizal Diversity, Community Composition, and Exploration Types in European Beech, Pine, and Spruce Forests. *Forest*, 9, 445.
- Ruiz-Aquino, F., Valdez-Hernández, J.I., Romero-Manzanares, A., Manzano-Méndez, F., Fuentes-López, M.E. (2015). Spatial distribution of two oak species and ecological attributes of pine-oak woodlands from Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Chapingo serie ciencia forestal y del ambiente*, 21, 67-80.
- Salo, K. (1993). The composition and structure of macrofungus communities in boreal upland type forest and peatlands in North Karelia, Finland. *Karstenia*, 33, 61-91.
- Sanon, A., Andrianjaka, Z.N., Prin, Y., Bally, R., Thioulouse, J., Comte, G. y Duponnois, R. (2009). Rhizosphere microbiota interferes with plant-plant interactions. *Plant and Soil*, 321, 259-278.
- Schmitt, J.P., Murphy, J.F. y Mueller, G. (1999). Macrofungal diversity of a temperate oak forest: a test of species richness estimators. *Canadian Journal of Botany*, 77, 1014-1027.
- Smith, S.E. y Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic, London.
- Tedersoo, L., Kõljalg, U., Hallenberg, N. y Larsson, K.H. (2003). Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist*, 159, 153-165.
- Tedersoo, L., May, T.W. y Smith, M.E. (2009). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi:

- global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, *20*, 217-263.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Toots, M., Diédhiou, G., Henkel, W.T., Kjeller, R., Morris, M.H., Nara, K., Nouhra, E., Peay, K.G., Pölme, S., Ryberg, M., Smith, M.E. y Kõljalg. (2012). Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, *21*, 4160-4170.
- Torres-Gómez, M., Garibay-Orijel, R., Casas, A. y Pérez-Salicrup, D.R. (2018). Ectomycorrhizal trees intermingled within *Cupressus lusitanica* plantations sustain the diversity and availability of edible mushrooms. *Agroforestry systems*, *92*, 557-588.
- Villarreal, L. (1996). Los hongos silvestres: componentes de la biodiversidad y alternativas para la sustentabilidad de los bosques templados de México. Colegio de Posgraduados. Edo. de Méx.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. y Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, En. Innis, M., Gelfand, D. Sninsky, J. y White, T. (Eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315-322). Academic Press, CA., USA.

CAPÍTULO IV.

Revista Mexicana de Biodiversidad 90(2019):e902868

SYMPATRIC SPECIES DEVELOP MORE EFFICIENT ECTOMYCORRHIZAE IN THE *Pinus-Laccaria* SYMBIOSIS

Resumen

La simbiosis micorrízica es óptima cuando la planta y los hongos son simpátricos. Sin embargo, en las plantaciones forestales típicamente se usa inóculo exótico. En este trabajo, la eficacia de la micorrización se determinó mediante la evaluación del efecto de 2 especies de hongos simpátricos (*Laccaria trichodermophora* y *L. bicolor* s. l.) y 2 alopátricas (*L. laccata* var. *laccata* y *L. vinaceobrunnea*) en el crecimiento y contenido de nutrientes de *Pinus montezumae*. También evaluamos el efecto de *Pseudomonas fluorescens* (Pf_Ag001). Después de 1 año de crecimiento, evaluamos el porcentaje de micorrización, la altura de la planta, el diámetro en el collar de la raíz, el peso seco y el contenido de nutrientes (N, P, K). El porcentaje de micorrización varió de 93.5% a 98.5%. Los tratamientos que mostraron una mayor eficiencia fueron los inoculados con especies simpátricas. Todos los tratamientos con *Laccaria*, en presencia o ausencia de bacterias, mostraron una mejor respuesta en comparación con los controles no inoculados. Este trabajo demuestra la importancia de usar inóculo de especies simpátricas ya que están genéticamente predispuestas a asociarse con sus hospederos y están naturalmente adaptadas a las condiciones ambientales y edáficas locales.

Resource use and management

Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis

Las especies simpátricas desarrollan ectomicorrizas más eficientes en la simbiosis Pinus-Laccaria

Ibeth Rodríguez-Gutiérrez ^a, Daniel Ramírez-Martínez ^a, Roberto Garibay-Orijel ^{a, *},
Virginia Jacob-Cervantes ^b, Jesús Pérez-Moreno ^c, María del Pilar Ortega-Larrocea ^d, Elsa Arellano-Torres ^e

^a Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico.

^b Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales, Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícolas y Pecuarias, Av. Progreso 5, Coyoacán, 04110 Ciudad de México, Mexico.

^c Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, carretera México-Texcoco Km. 36.5, 56230 Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mexico.

^d Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico.

^e Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico.

*Corresponding author: rgaribay@ib.unam.mx (R. Garibay-Orijel)

Received: 13 November 2018; accepted: 12 September 2019

Abstract

The mycorrhizal symbiosis is optimal when the plant and the fungi are sympatric. However, in forest plantations the inoculum typically belongs to exotic or allopatric fungi. In this paper, the efficiency of mycorrhization was determined by evaluating the effect of 2 sympatric fungi species (*Laccaria trichodermophora* and *L. bicolor* s.l.) and 2 allopatric (*L. laccata* var. *laccata* and *L. vinaceobrunnea*) on the growth and nutrient contents of *Pinus montezumae*. We also tested the effect of the mycorrhizal helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* (Pf_Ag001). After 1 year of growth, we evaluated the mycorrhization percentage, plant height, diameter at root collar, dry weight and nutrient contents (N, P, K) of aerial part and roots. The mycorrhization percentage varied from 93.5% to 98.5%. The treatments that showed higher efficiency (biomass accumulation and K contents) were those inoculated with sympatric species. All *Laccaria* treatments, either in the presence or absence of the bacteria, showed a better response compared to not inoculated controls. This work demonstrates the significance of using inocula of sympatric species as these are genetically predisposed to associate with their hosts, naturally adapted to the local environmental and edaphic conditions compared with those of allopatric origin.

Keywords: Ectomycorrhizal inoculum; Exotic; *Laccaria laccata*; *Laccaria trichodermophora*; *Laccaria vinaceobrunnea*; *Laccaria bicolor*; *Pseudomonas fluorescens*; *Pinus montezumae*

Resumen

La simbiosis micorrízica es óptima cuando la planta y los hongos son simpátricos. Sin embargo, en las plantaciones forestales típicamente se usa inóculo de hongos exóticos. En este trabajo, la eficacia de la micorrización se determinó mediante la evaluación del efecto de 2 especies de hongos simpátricos (*Laccaria trichodermophora* y *L. bicolor* s.l.) y 2 alopátricos (*L. laccata* var. *laccata* y *L. vinaceobrunnea*) en el crecimiento y contenido de nutrientes de *Pinus montezumae*. También evaluamos el efecto de la bacteria ayudadora de micorrizas *Pseudomonas fluorescens* (Pf_Ag001). Después de 1 año de crecimiento, evaluamos el porcentaje de micorrización, la altura de la planta, el diámetro en el collar de la raíz, el peso seco y el contenido de nutrientes (N, P, K). El porcentaje de micorrización varió de 93.5% a 98.5%. Los tratamientos que mostraron una mayor eficiencia fueron los inoculados con especies simpátricas. Todos los tratamientos con *Laccaria*, en presencia o ausencia de bacterias, mostraron una mejor respuesta en comparación con los controles no inoculados. Este trabajo demuestra la importancia de usar inóculos de especies simpátricas ya que están genéticamente predisuestas a asociarse con sus hospedadores y están naturalmente adaptadas a las condiciones ambientales y edáficas locales.

Palabras clave: Inóculo ectomicorrízico; Exótico; *Laccaria laccata*; *Laccaria trichodermophora*; *Laccaria vinaceobrunnea*; *Laccaria bicolor*; *Pseudomonas fluorescens*; *Pinus montezumae*

Introduction

The ectomycorrhizal symbiosis between fungi and trees or shrubs, both Gymnosperms and Angiosperms, mainly occurs in temperate and boreal zones. This symbiosis is ecologically relevant due to the impact on the structure, composition, and functioning of plant communities (Pérez-Moreno & Read, 2004; Smith & Read, 2008; Umbanhowar & McCann, 2005). Mycorrhized seedlings have advantages over non mycorrhized ones since fungi improve their nutritional status, water absorption, drought and disease resistance enhancing plant growth and fitness (Barroetaveña & Rajchenberg, 2003; Bonfante & Genre, 2010; Pérez-Moreno & Read, 2000).

However, the outcome of the mycorrhizal symbiosis varies from positive to neutral (even negative) depending on the plant species, the species of fungus and their origin, as well as the soil fertility (Barroetaveña et al., 2016; Umbanhowar & McCann, 2005). The origin of the participants, i.e., whether they are sympatric or allopatric, is particularly important because it determines its natural predisposition to establish the symbiosis. In previous studies with arbuscular mycorrhizal fungi, the results indicate significant effects in the local adaptation when the tests have included sympatric plants and fungi, instead of allopatric combinations (Hoeksema et al., 2010; Klironomos, 2003; Rúa et al., 2016). The ectomycorrhizal symbiosis with native species has also shown better local adaptations, mostly reflected in terms of plant growth and colonization (Carrasco-Hernández et al., 2010, 2011; Carrera-Nieve & López-Ríos, 2004; Cuevas-Rangel, 1979; Martínez-Reyes et al., 2012; Méndez-Neri et al., 2011; Perea-Estrada, 2009; Quoreshi et al., 2009; Valdés et al., 1983, 2009).

Species of the genus *Laccaria* (Berk & Bromme) are among the main ectomycorrhizal fungi used around

the world (Kropp & Mueller, 1999). *Laccaria* species are habitat pioneers and they have been used as model species in the study of ectomycorrhizal symbiosis (Khasa et al., 2009; Pera & Parladé, 2005; Quoreshi et al., 2008; Trappe, 1977; Wadud et al., 2008, 2014). Additionally, the publication of the genome sequence of the ectomycorrhizal fungus, *L. bicolor* (Martin & Selsosse, 2008), was the foundation of subsequent studies of the ectomycorrhizal interaction at genomic level (Larsen et al., 2011). Species of this genus have been used to perform mycorrhization on different tree genera such as *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Betula*, *Quercus*, among others (Dixon & Johnson, 1992; Gibson & Deacon, 1988; Mortier et al., 1988; Onwuchekwa et al., 2014; Parladé & Álvarez, 1993; Sudhakara & Natarajan, 1997; Zadworny et al., 2004). Even though all species of the genus are considered good mycorrhizal candidates, the former statement is not always accurate at the species level because the symbiosis is highly specific (Kropp & Mueller, 1999; Molina et al., 1992; Perea-Estrada et al., 2009; Wilson et al., 2017). Therefore, the adaptation to local conditions reflects evolutionary processes in the plant-fungal symbiosis process under specific environmental conditions within the geographic distribution of both symbionts (Hoeksema et al., 2010).

Species of *Laccaria* that have been used in mycorrhization processes are *L. laccata* s.l., *L. bicolor*, *L. amethystina*, *L. proxima*, and *L. trichodermophora* in association with *Pinus* as *P. ayacahuite*, *P. banksiana*, *P. contorta*, *P. densiflora*, *P. douglasiana*, *P. greggii*, *P. michoacana*, *P. montezumae*, *P. oaxacana*, *P. patula*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. pseudostrobus*, *P. radiata*, *P. rudis*, and *P. sylvestris* (Carrasco-Hernández et al., 2010, 2011; Carrera-Nieve & López-Ríos, 2004; Chapela et al., 2001; Galindo-Flores et al., 2015; Hynson et al., 2013; Martínez-Reyes et al., 2012; Méndez-Neri et al., 2011; Onwuchekwa et al., 2014; Parladé & Álvarez, 1993; Pera

& Parladé, 2005; Perea-Istrada et al., 2009; Perrin et al., 1997; Qureshi et al., 2009; Sudhakara & Nataranja, 1997; Teramoto et al., 2012; Valdés et al., 2006; Zadworny et al., 2004). However, in previous works, the efficiency of sympatric versus allopatric species with *Pinus* hosts has not been experimentally tested.

The ectomycorrhizal symbiosis is a tripartite partnership, where mycorrhizal helper bacteria (MHB) promote host colonization and enhance the symbiosis function (Aspray et al., 2013; Garbaye, 1994; Frey-Klett et al., 1999; Vik et al., 2013). There are MHB included in the genera *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhodococcus* and *Streptomyces* (Kumari et al., 2013). The MHB can promote mycorrhization in the bacteria-fungus-plant interaction. However, in general the MHB favor the phase of pre-infection as they favour spore germination, mycelia growth through the soil, as well as an increase in the root susceptibility to mycorrhizal colonization. These effects have been demonstrated for *Pseudomonas fluorescens* in *L. laccata* and *L. bicolor* (Deveau et al., 2007, 2010; Duponnois & Garbaye, 1991; Frey-Klett et al., 1999).

With the aim of producing native ectomycorrhizal inocula suitable for forest plants adapted to local conditions we selected the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB) as a study model. The TMVB is around 1,000 km length with irregular amplitudes ranging between 80 and 230 km. This mountain range is recognized as a center of diversification, endemism and biogeographic transition for a variety of taxa, making it one of the most heterogeneous and complex biogeographic provinces (Flores-Villela & Canseco-Márquez, 2007; Morrone, 2010; Morrone & Escalante, 2002). *Pinus* is the most diverse ectomycorrhizal host worldwide. Mexico is an important diversification center for *Pinus* Lamb. with 47 species, from which 50% are distributed in the TMVB (Farjon, 1996; Farjon & Styles, 1997).

To test the hypothesis that the ectomycorrhiza becomes more efficient (in terms of plant growth and nutrient content) when a sympatric relationship between fungi and plants exists, we evaluated the mycorrhization effect on *P. montezumae* with 2 sympatric fungi (*L. trichodermophora* and *L. bicolor s.l.*) and 2 allopatric ones (*L. laccata* var. *laccata* and *L. vinaceobrunnea*). We also tested the effect of *P. fluorescens* on the mycorrhization by the 4 fungal species.

Materials and methods

One of the most important forest trees in the TMVB is *Pinus montezumae* Lamb. This species is naturally distributed between 2,000 and 3,200 m asl forming large woodland areas in the National Parks. Four *Laccaria*

species that produce sporomes in great abundance were selected (Garibay-Orijel et al., 2009; Montoya et al., 2005): *Laccaria trichodermophora* and *L. bicolor s.l.* that are sympatric with *P. montezumae*, and *L. laccata* var. *laccata* and *L. vinaceobrunnea* that do not share the same habitat with this host.

Fruitbodies of *L. trichodermophora* and *L. bicolor s.l.* were collected from the Malinche National Park in the State of Tlaxcala. There, the average altitude is 3,200 m, climate is temperate sub humid with annual average temperature of 15.3 °C and an average rainfall range between 600 to 800 mm. The main vegetation are conifer forests dominated by *P. montezumae*, *P. teocote*, *P. hartwegii*, and *Abies religiosa* (Castillo-Guevara et al., 2012; Montoya et al., 2012). Fruitbodies of *L. laccata* var. *laccata* and *L. vinaceobrunnea*, were obtained from Ixtlán de Juárez, at the Sierra Norte in the State of Oaxaca. In this area, the average elevation is 2,470 m, the predominant climate is temperate humid with annual average temperature of 15 °C and average rainfall ranging between 1,000 and 1,300 mm. The main vegetation is constituted by mixed temperate *Pinus-Quercus* forests dominated by *P. patula*, *P. oaxacana*, and *P. douglasiana* (UNFOTI, 2012, Valdés et al., 2006).

Pileus from fruitbodies were dried at 35 °C and manually grinded to obtain the inoculum. To know the concentration of spores in the inoculum of each species, we performed triplicate counts in a Neubauer chamber. We also conducted spore viability tests following the protocol of Moreno-Martínez (1984) and Santiago-Martínez et al. (2003) using 1.0% of tetrazolium buffer. We prepared 1 L of 1.0% 2, 3, 5 trifeniltetrazolium chloride in a buffer solution. We mixed 400 mL of KH_2PO_4 and 600 mL of $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ solution; we added 10 g of tetrazolium salt, adjusted to pH 6 with KOH. In 1.5 mL Eppendorf tubes we placed a sample of each inoculum, we re-suspended them for 1 min with a vortex and incubated them for 30 min at room temperature. We then counted the total number of metabolically active spores in a Neubauer Chamber.

We acquired the MHB (strain *P. fluorescens* Pf_Ag001) from BIOQualitum that sells it under the tradename BactoCROP guaranteeing minimum concentration as 100 millions of bacteria per gram.

Seeds of *P. montezumae* were collected from the surroundings of the Iztaccíhuatl Volcano in the State of Mexico located in the TMVB. They were surface-sterilized with hydrogen peroxide (H_2O_2) 30% and 20 mL of Tween-20 in 500 mL distilled water, and subsequently washed with running water and placed 24 h in water for pre-germination. We used a substrate composed of a 1:1 mixture of peat and agrolite and 134 mL containers. Peat was sterilized with 50 kiloGrays of Gamma radiation at the Institute of Nuclear Sciences, UNAM,

as it has been shown it contains ectomycorrhizal fungi spores resistant to pasteurization (Ángeles-Argáiz et al., 2016). At the beginning of the experiment, each plant was inoculated with 10^7 spores placed in water solution added to the substrate. Bacteria treatments included 0.1 g of BactoCROP per container, diluted with the fungal inoculum. All plants remained 365 days in the greenhouse without any fertilization and watered with tap water every third day up to the saturation point; all treatments were randomly rotated every week.

The experimental design included 2 factors: (1) the ectomycorrhizal fungal species, including 4 levels (*L. trichoderophora*, *L. bicolor* s.l., *L. laccata* var. *laccata* and *L. vinaceobrunnea*); (2) the bacterial inoculum, including 2 levels (presence or absence of *P. fluorescens*). We also included a treatment only with bacterial inoculum and a negative control without inoculum. In total, the experiment had 10 treatments, with 13 seedlings each, comprising a total of 130 experimental units, each one constituted by one plant.

After a year of growth, we measured each plant height from the root collar and the root collar diameter (RCD); subsequently plants were dehydrated at 80 °C in an oven during 48 h to evaluate the dried shoots and roots weight. We determined total P, N and K content of the aerial and root parts for 5 randomly selected pines by treatment. Phosphorus was determined by colorimetry, N by wet digestion (Bremner, 1975), and K by flame photometry ammonium acetate extraction (Chapman & Parker, 1986).

The mycorrhization percentage in the root system for each seedling was randomly calculated. We divided the

root system in 3 equal fractions (upper, middle and lower) and randomly selected 4 secondary roots per fraction, thus twelve secondary roots per plant were analyzed (Carrasco-Hernández et al., 2011), counting the number mycorrhizal and non-mycorrhizal root tips in each under a stereoscopic microscope.

Evaluation of the mycorrhization effect and promotion by MHB on each response variable was conducted using two-factor variance analysis. When significant differences were obtained, we looked for the homogeneous groups by Tukey tests with the software Statistica 8 (StatSoft ver.2008).

To describe the ectomycorrhizae morphology, we conducted the characterization of structures as proposed by Agerer (1987-2002). Colors were recorded according to Kornerup and Wanscher (1978). Photographs were taken with the aid of a multifocal automatic microscope (Leica Z16 APOA) with an 8 mega-pixel camera (Leica DFC490); 3D images were assembled in Leica application systems V4.3.0. Scanning electron photographs were taken with a scanning electron microscope (JEOL JSM-5310LV); anatomic characteristics were photographed with an Olympus BX51 microscope.

Results

The percentage of mycorrhization varied from 93.5% to 98.5%, we did not find significant differences between sympatric and allopatric species. However, we found significant differences ($F = 55.95$, $p < 0.0001$) between all

Table 1

Growth, biomass accumulation and mycorrhization of *Pinus montezumae* inoculated with different *Laccaria* species and *P. fluorescens*.

Origin	Treatment	Height (cm)	Root collar diam (cm)	Root dry weight (mg)	Shoot dry weight (mg)	Total dry weight (mg)	M%
Sympatric	L.b	16.5abc	2.9a	8.7a	20.0a	28.7a	93.5a
	L.b/P.f	16.3c	2.8a	8.0a	20.0a	28.0a	98.4a
	L.t	15.5c	2.5ab	5.8bc	13.5b	19.3b	98.5a
	L.t/P.f	16.7abc	2.7ab	6.2b	12.0b	18.2b	98.5a
Allopatric	L.v/P.f	16.8abc	2.7ab	4.0de	8.0c	12.0c	94.5a
	L.l	16.7abc	2.5ab	4.5cd	7.3c	11.8c	97.6a
	L.v	17.1ab	2.4ab	3.7de	7.0c	10.7c	95.7a
	L.l/P.f	17.9a	2.2ab	4.1de	6.5c	10.6c	97.1a
Controls	C-	16.4abc	2.0ab	4.2de	7.3c	11.5c	0b
	P.f	16.6abc	1.7b	2.6e	3.9d	6.5d	0b

L.t/P.f: *Laccaria trichoderophora* + *Pseudomonas fluorescens*, L.t: *L. trichoderophora*, L.v/P.f: *L. vinaceobrunnea* + *P. fluorescens*, L.v: *L. vinaceobrunnea*, L.l/P.f: *L. laccata* var. *laccata* + *P. fluorescens*, L.l: *L. laccata* var. *laccata*, L.b/P.f: *L. bicolor* + *P. fluorescens*, L.b: *L. bicolor*. C-: no-inoculated negative control, P.f: *P. fluorescens*. root collar diam: root collar diameter, M%: mycorrhization percentage. Different letters show statistically significant differences on post hoc Tukey test ($p < 0.05$). n = 13.

the mycorrhizal treatments and the 2 control treatments (C and C/Pf), which did not develop any mycorrhizae (Table 1).

The height of plants was similar among treatments. There were significant differences ($F = 3.17, p < 0.002$) only between the treatments of *Laccaria laccata* var. *laccata* with *P. fluorescens* ($\bar{x} = 17.9$ cm) compared to those of *L. trichodermophora* and *L. bicolor* s.l. with *P. fluorescens* ($\bar{x} = 15.5$ and 16.3 , respectively). The remaining treatments produced heights ranging from 16.3 to 16.8 cm. The root collar diameter (RCD) showed significant differences ($F = 2.49, p < 0.012$) between *L. bicolor* s.l. ($\bar{x} = 2.9$ cm), and *L. bicolor* s.l. with *P. fluorescens* ($\bar{x} = 2.8$ cm) treatments compared to the control with only *P. fluorescens* ($\bar{x} = 1.7$ cm). Although the negative control plants were thinner ($\bar{x} = 2.0$ cm) than treatments inoculated with fungi, differences were not significant (Table 1).

The 3 variables used to evaluate biomass (i.e., root dry weight, shoot dry weight and total dry weight) showed the same trend (Table 1). The best treatments were those inoculated with *L. bicolor* with or without *P. fluorescens* (28.7 and 28.0 mg, respectively), having a significantly greater biomass ($F = 127.33, p = 0.0001$) than the rest of the treatments. *Laccaria trichodermophora* treatments (with or without bacteria) had the second best total dry weight ($19.3, 18.2$ mg respectively) being significantly higher than the allopatric species that did not presented significant differences than the no-inoculated control. The control inoculated only with *P. fluorescens* showed the lowest total dry biomass ($\bar{x} = 6.5$ mg) (Table 1).

The P roots contents did not show significant differences among the treatments ($F = 1.27, p > 0.284$). However, both the P content in the shoots ($F = 1.99, p < 0.067$) and in the whole plant ($F = 2.18, p < 0.044$) showed significant differences and followed a similar trend, with *L. trichodermophora* with *P. fluorescens* always with higher values. Significant differences were observed in the total P content between plants mycorrhized with *L. trichodermophora* with *P. fluorescens* ($\bar{x} = 180.3$ mg) compared to both *P. fluorescens* control ($\bar{x} = 108.4$ mg), and the no-inoculated control ($\bar{x} = 106.5$ mg) treatments. The N content in shoots ($F = 2.48, p > 0.024$), roots ($F = 0.67, p > 0.728$) and total ($F = 0.93, p > 0.513$) parts of the plant did not show any significant differences between treatments and compared to the negative control. This was also true for the K content in the roots ($F = 0.93, p > 0.509$). Mycorrhizal plants inoculated with *L. bicolor* showed the highest concentration of K in the shoots ($\bar{x} = 34.0$ mg), followed by *L. bicolor* with *P. fluorescens* ($\bar{x} = 26.6$ mg) and *L. trichodermophora* ($\bar{x} = 26.1$ mg) treatments, showing significant differences ($F = 7.00, p = 0.0001$) relative to no-inoculated control ($\bar{x} = 14.4$ mg). Total K of mycorrhizal plants with *L. bicolor* ($\bar{x} = 60.7$ mg), *L. bicolor* and *P. fluorescens* ($\bar{x} = 51.4$ mg), *L. trichodermophora* ($\bar{x} = 50.4$ mg), *L. trichodermophora* with *P. fluorescens* ($\bar{x} = 44.7$ mg), and *L. laccata* with *P. fluorescens* ($\bar{x} = 43.0$ mg) showed higher significant concentrations ($F = 4.76, p = 0.0001$) than the negative control ($\bar{x} = 32.1$ mg) (Table 2).

Table 2

Nutrient contents (mg) in *Pinus montezumae* inoculated with different *Laccaria* species and *P. fluorescens*.

Treatment	Ps	Pr	Pt	Ns	Nr	Nt	Ks	Kr	Kt
L.v/P.f	132.9a	47.4a	180.3a	0.9a	1.0a	1.9a	21.4bc	23.3a	44.7ab
L.t	80.7ab	39.1a	119.8ab	1.2a	0.8a	2.0a	26.1ab	24.3a	50.4ab
L.v/P.f	92.9ab	49.8a	142.7ab	1.1a	1.0a	2.1a	16.6bc	22.0a	38.6bc
L.v	95.5ab	40.0a	135.5ab	1.2a	0.9a	2.1a	18.0bc	22.6a	40.6bc
L.b/P.f	96.3ab	35.4a	131.7ab	1.1a	1.0a	2.1a	26.6ab	24.8a	51.4ab
L.b	95.4ab	44.6a	140.0ab	1.1a	0.8a	1.9a	34.0a	26.7a	60.7a
L.l/P.f	81.3ab	37.3a	118.6ab	0.8a	0.8a	1.6a	17.3bc	25.7a	43.0ab
L.l	106.7ab	33.4a	140.1ab	1.1a	0.8a	1.9a	19.2bc	20.5a	39.7bc
P.f	62.4b	46.0a	108.4b	1.1a	0.9a	2.0a	19.5bc	24.3a	43.8ab
C-	70.0ab	36.5a	106.5b	0.9a	0.7a	1.6a	14.4c	17.7a	32.1c

L.v/P.f: *Laccaria trichodermophora* + *Pseudomonas fluorescens*, L.t: *L. trichodermophora*, L.v/P.f: *L. vinaceobrunnea* + *P. fluorescens*, L.v: *L. vinaceobrunnea*, L.l/P.f: *L. laccata* var. *laccata* + *P. fluorescens*, L.l: *L. laccata* var. *laccata*, L.b/P.f: *L. bicolor* + *P. fluorescens*, L.b: *L. bicolor*, C-: negative control, P.f: *P. fluorescens*, Ps: phosphorous in shoot, Pr: phosphorous in roots, Pt: total phosphorous, Ns: nitrogen in shoot, Nr: nitrogen in roots, Nt: total nitrogen, Ks: potassium in shoot, Kr: potassium in roots, Kt: total potassium. Different letters show statistically significant differences on post hoc Tukey test ($p < 0.05$). n = 5.

Mycorrhizae morphological description. *L. trichodermophora* + *P. fluorescens* + *P. montezumae* (Fig. 1A): dichotomous mycorrhizae with lateral branches of the same length, with straight edges and branches. The mantle presented reflective white patches over an orange base, it also showed emerging hyphae varying in quantity at the base and the apex. The base was yellowish brown

(5D8 (Kornerup & Wanscher (1978)), the tips and apices were bright orange (5A6). Mantle plectenchymatous with palmate Hartig net widely distributed and with individual hyphae. *L. trichodermophora* + *P. montezumae* (Fig. 1B, C): same as before with 2 main differences: the superficial mantle showed a cottony texture and the mycorrhiza showed a strong orange color (5A8).

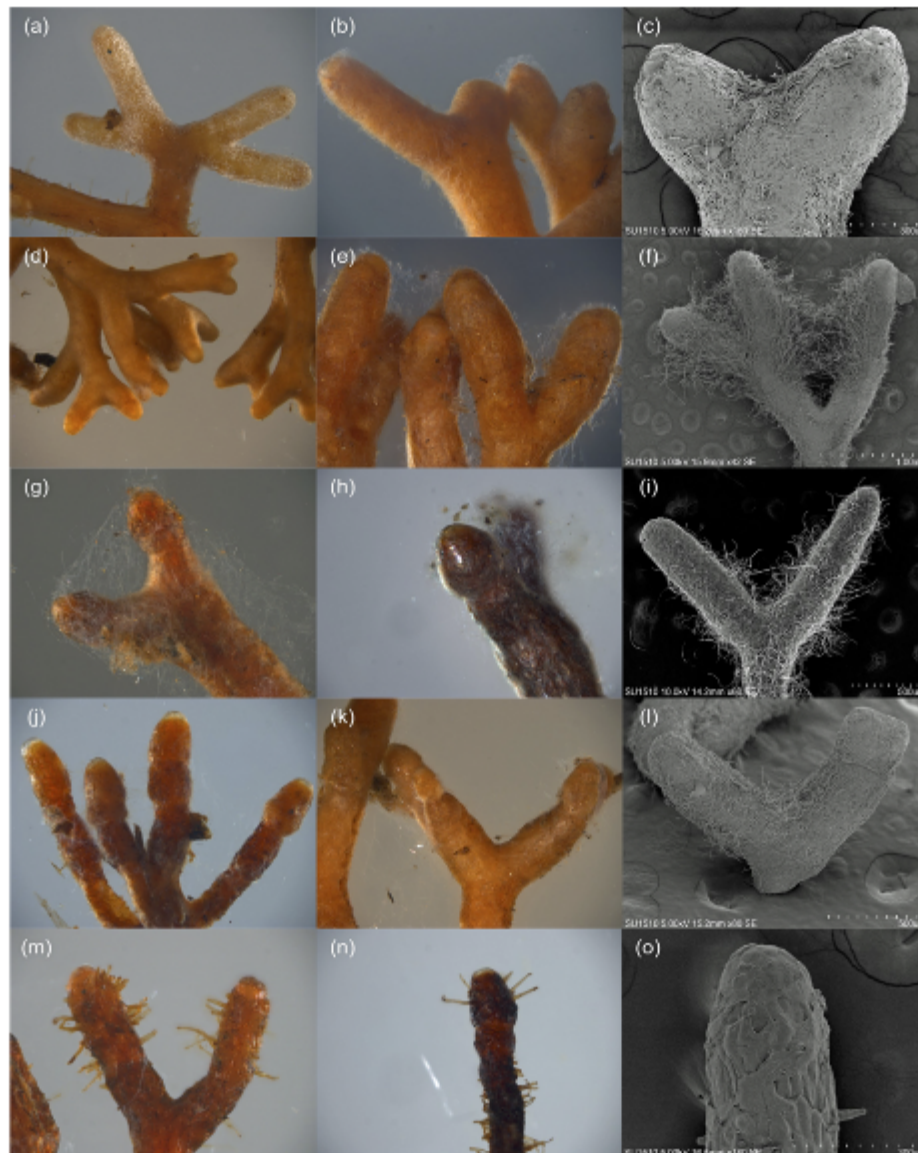


Figure 1. Morphology of mycorrhizae formed between: *Pinus montezumae*, *Laccaria* spp. and *Pseudomonas fluorescens*. A: *L. trichodermophora* + *P. fluorescens* + *P. montezumae*; B-C: *L. trichodermophora* + *P. montezumae*; D: *L. laccata* var. *laccata* + *P. fluorescens* + *P. montezumae*; E-F: *L. laccata* var. *laccata* + *P. montezumae*; G: *L. vinaceobrunnea* + *P. fluorescens* + *P. montezumae*; H-I: *L. vinaceobrunnea* + *P. montezumae*; J: *L. bicolor* s.l. + *P. fluorescens* + *P. montezumae*; K-L: *L. bicolor* s.l. + *P. montezumae*; M: *P. montezumae* + *P. fluorescens*; N-O: *P. montezumae* non mycorrhizal roots.

L. laccata var. *laccata* + *P. fluorescens* + *P. montezumae* (Fig. 1D): dichotomous mycorrhizae with lateral branches of the same length golden yellow (5B7), with straight edges and branches. Cotton-like superficial mantle, with emerging hyphae in some parts, surrounding the apices. Mantle plectenchymatous with anastomosed hyphae in the middle parts. *L. laccata* var. *laccata* + *P. montezumae* (Fig. 1E, F): same as before with 2 main differences: it showed abundant emerging hyphae from all the mycorrhiza, with a fan-like shape and orange (5B8) mantle.

L. vinaceobrunnea + *P. fluorescens* + *P. montezumae* (Fig. 1G): dichotomous mycorrhizae with lateral branches of the same length, with straight edges and branches. Apex orange (5A6), the rest of the mycorrhiza was brownish yellow (5E8). Cottony superficial mantle with emerging hyphae in certain parts; apex is mantle-free. Mantle pseudoparenchymatous, with palmate Hartig net widely distributed and showing individual hyphae. *L. vinaceobrunnea* + *P. montezumae* (Fig. 1H, I): same as before with 2 main differences: it presented constrictions at the base of the branch, in the middle and before reaching the apices and the whole mycorrhiza was orange brown (6C8).

L. bicolor s.l. + *P. fluorescens* + *P. montezumae* (Fig. 1J): dichotomous mycorrhizae with side branches of the same length; straight edges and branches, reddish brown (7E8). Cotton-like superficial mantle with rarely emanating hyphae. Mantle pseudoparenchymatous with palmate Hartig net widely distributed. *L. bicolor* s.l. + *P. montezumae* (Fig. 1K-L): same as before with one main difference: the mycorrhiza was orange (5B8).

Roots of *P. montezumae* + *P. fluorescens* (Fig. 1M) and roots of *P. montezumae* (Fig. 1N-O): roots lack mantle and showed root hairs without superficial or intraradical hyphae.

Discussion

All the inoculated plants developed mycorrhizas and mycorrhization percentages in all treatments were high, greater than 93.5%. This is explained by the fact that the 4 *Laccaria* species used are ectomycorrhizal pine symbionts and all are native from Mexican forests as also is *P. montezumae*. As we will discuss later, the main differences found between sympatric and allopatric species are not evident in their ability to colonize the roots, but in their effect to improve the symbiosis efficiency.

The mycorrhiza helper bacteria *P. fluorescens* did not improve the mycorrhization percentage of any of the *Laccaria* species. This contrasts with previous reported positive effects of *P. fluorescens* in mycorrhization percentage (Frey-Klett et al., 1999) and increase in root biomass of *L. laccata* (Duponnois & Garbaye, 1991).

Pseudomonas fluorescens comprises a complex of genetic species with around 50% of genomic divergence between strains. In consequence, it might be expected that different strains exhibit a diverse spectrum of genetic traits involved in multi-trophic interactions with plants and other microbes (Loper et al., 2012). As it has been recently shown by Barragán-Soriano et al. (2018), MHB do increase the growth and physiological quality of *P. montezumae*, so further research is needed to find compatible strains of MHB-sympatric *Laccaria*- and *P. montezumae*.

On the other hand, we demonstrate the efficiency of peat sterilization with Gamma rays, since both the negative control and the treatment with only *P. fluorescens* showed no mycorrhizae. The former means that we managed to eliminate the viability of resistant ectomycorrhizal fungi spores present in the peat (Ángeles-Argáiz et al., 2016).

Overall, we did not find significant differences in growth parameters, although pines mycorrhized with allopatric species were little higher and smaller root collar diameter than those plants mycorrhized with sympatric species. The most important differences occurred in total biomass accumulation, as both sympatric species (*L. bicolor* followed by *L. trichodermophora*) promoted the enhancement of plant biomass (Table 1). Also, the increase in biomass accumulation in these treatments was independent of the presence of *P. fluorescens*. By comparison, allopatric species did not show any increase in biomass accumulation compared to the negative control.

Regarding nutrient contents, we did not find a significant relationship between the plants N content, in any part of the plant, and the mycorrhization treatments. We also did not find differences in P and K content in the roots between treatments. However, plants mycorrhized with the sympatric species *L. trichodermophora* with *P. fluorescens* were the unique treatment with significant higher P concentration in the total plant than the non-inoculated controls. Similarly, treatments with sympatric species, especially *L. bicolor*, showed a higher K concentration of shoot and total plant.

Our experimental data confirm the hypothesis that the sympatric mycorrhizal species are more efficient to accumulate biomass and nutrients (K) in the host plant. This was shown in an artificial substrate where nutrients came from organic matter (peat). However, an enhanced effect of the ability of sympatric fungi should be expected if this symbiosis was grown in the natural soils where it develops. The capacity of mycorrhizas to exploit and transfer soil nutrients to plants is related with ecological adaptations as particular soil ecotypes (Hoeksema et al., 2010; Klironomos, 2003; Rúa et al., 2016).

The mycorrhizal morphology in the presence of *P. fluorescens* showed differences, the mantle shape and general coloring, in contrast with the mycorrhizae synthesized without bacteria. In the case of *L. trichodermophora*, the mantle shape was cottony with strong orange color; whereas, in the presence of *P. fluorescens*, the mycorrhiza had few hyphae with pale orange color. *L. vinaceobrunnea* presented a reduced mantle of yellow-orange coloring; whereas in the presence of bacteria the mycorrhiza had a cottony mantle pale orange in color at the base. While branching type of this symbiotic partners is similar to previous descriptions of *L. bicolor* s.l. with *P. pseudostrobus* in the absence of *P. fluorescens*; they are differences in the color from the brown color previously reported (Carrasco-Hernández et al., 2010; Santiago-Martínez et al., 2003). The mycorrhiza of *L. trichodermophora* matches the type of branching but not in the coloring (strong orange), which is different from the pale yellow mycorrhizas reported previously (Galindo-Flores et al., 2015). Consistency in the branching pattern is a main feature that characterizes the *Pinus-Laccaria* association (Agerer, 1987, 2002), while differences in color may be due to particular metabolic pathways related with the specific species association and also the maturing of the symbiosis.

The widespread use of *Laccaria* species in mycorrhization is explained because they are pioneers with the ability to colonize a variety of important forest trees (Bois & Coughlan, 2009; Fortin & Lamhamedi, 2009; Parent & Moutoglou, 2009; Quoreishi et al., 2009; Sudhakara & Natarajan, 1997). However, in this study, we have shown that the plant compatibility with its ectomycorrhizal fungus is differential, even though with phylogenetically related (within the same genus) fungal species. The fungus ability to colonize and remain in the host roots is evidenced through physiological and morphological responses of the plant (Karst et al., 2014; Onwuchekwa et al., 2014; Perrin et al., 1997; Quoreishi et al., 2008). However, the ectomycorrhizal efficiency depends on the origin of the participants in the symbiosis. The local adaptation potential of sympatric species plays a fundamental role in the successful development in the field (Rúa et al., 2016). Therefore, when selecting ectomycorrhizal fungi inoculum to grow forest plants, we should prioritize sympatric species to increase survival and growth success of plants and to ensure minimal disruption and disturbance of the natural communities.

Acknowledgements

Authors appreciate the thoughtful comments and reviews by Joaquín Cifuentes-Blanco and Roberto Lindig-Cisneros. We thank the support provided by Iris Suárez-

Quijada. We thank the Laboratory of Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad, in particular to the areas of Electron Microscopy to Berenit Mendoza Garfias, and Multifocal Photography to Susana Guzman, both at the Instituto de Biología, UNAM. Finally, we thank Mephi Boseth Álvarez-Sánchez for graphic design and photographic assistance. IR-G thanks to the Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for financial support during the development of this work, as well as the National Council of Science and Technology (Conacyt) for the scholarship granted during her doctoral studies. This project was partially funded by UNAM PAPIIT IN210217 to RGO.

References

- Agerer, R. (Ur. 1987-2002). *Color Atlas of Ectomycorrhiza*. Germany Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Ángeles-Argáiz, R. E., Flores-García, A., Ulloa, M., & Garibay-Orjuel, R. (2016). Commercial *Sphagnum* peat moss is a vector for exotic ectomycorrhizal mushrooms. *Biological Invasions*, 18, 89–101. <https://doi.org/10.1007/S10530-015-0992-2>
- Aspray, T. J., Jones, E. E., Davies, M. W., Shipman, M., & Bending, G. D. (2013). Increased hyphal branching and growth of ectomycorrhizal fungus *Lactarius rufus* bay the helper bacterium *Paenibacillus* sp. *Mycorrhiza*, 23, 403–410. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0483-1>
- Barragán-Soriano, J. L., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J., Carcaño-Montiel, M. G., & Medrano-Ortiz, K. I. (2018). Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 24, 3–16. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.01.010>
- Barroetaveña, C., & Rajchenberg, M. (2003). Las micorrizas y la producción de plántulas de *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws. en la Patagonia, Argentina. *Bosque (Valdivia)*, 24, 17–33. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002003000100002>
- Barroetaveña, C., Bassani, V. N., Monges, J. L., & Rajchenberg, M. (2016). Field performance of *Pinus ponderosa* seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi planted in steppe-grasslands of Andean Patagonia, Argentina. *Bosque (Valdivia)*, 37, 307–316. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002016000200009>
- Bois, G., & Coughlan, A. P. (2009). Ectomycorrhizal inoculation for boreal forest ecosystem restoration following oil sand extraction: the need for an initial three-step screening process. In D. Khasa, Y. Piché, & A. P. Coughlan (Eds.), *Advances in mycorrhizal science and technology* (pp. 129–137). Ottawa: NRC Research Press.
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>

- Bremner, J. M. (1975). Total nitrogen. In C. A. Black (Ed.), *Methods of soil analysis* (pp. 1149–1178). Madison: American Society of Agronomy Madison.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J. J., Quintero-Lizoala, R., & Torres-Aquino, M. (2010). Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4, 657–577.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J., Quintero-Lizoala, R., & Torres-Aquino, M. (2011). Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrizicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural*, 83, 83–96.
- Carrera-Nieve, A., & López-Ríos, G. F. (2004). Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 10, 93–98.
- Castillo-Guevara, C., Lara, C., & Pérez, G. (2012). Mycophagy by rodents in a temperate forest of Central Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, 772–777. <https://doi.org/rmb.27445>
- Chapela, I. H., Osher, L. J., Horton, T. R., & Henn, M. R. (2001). Ectomycorrhizal fungi introduced with exotic pine plantations induce soil carbon depletion. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 1733–1740. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00098-0)
- Chapman, H. D., & Parker, F. P. (1986). *Métodos de análisis para suelos, plantas y agua*. México D.F.: Trillas.
- Cuevas-Rangel, R. A. (1979). Prueba de inoculación con el hongo micorrizico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch en plantas de *Pinus montezumae* Lamb. en suelos de vivero. *Ciencia Forestal*, 4, 46–62.
- Deveau, A., Brulé, C., Palin, B., Champmartin, D., Rubini, O., Garbaye, J. et al. (2010). Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6r8. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 560–568. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00145.x>
- Deveau, A., Palin, B., Delaruelle, C., Peter, M., Kohler, A., Pierrat, J. C. et al. (2007). The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6r8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist*, 175, 743–755. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02148.x>
- Dixon, R. K., & Johnson, P. S. (1992). Synthesis of ectomycorrhizae on Northern red oak seedlings in a Michigan nursery. *Journal of Arboriculture*, 18, 266–272.
- Duponnois, R., & Garbaye, J. (1991). Effect of dual inoculation of Douglas fir with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laevis* and mycorrhization helper bacteria (MHB) in two bare-root forest nurseries. *Plant and Soil*, 138, 169–176.
- Farjon, A. (1996). Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and paleoendemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121, 365–384.
- Farjon, A., & Styles, B. T. (1997). *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropical Monograph V75. New York: The New York Botanical Garden.
- Flores-Villela, O., & Canseco-Márquez, L. (2007). Riqueza de la herpetofauna. In I. Luna-Vega, J. J. Morrone, & D. Espinosa (Eds.), *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana* (pp. 407–420). Ciudad de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/ Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fortin, J. A., & Lamhamedi, M. S. (2009). Ecophysiology of sporocarp development of ectomycorrhizal basidiomycetes associated with boreal forest gymnosperms. In D. Khasa, Y. Piché, & A. P. Coughlan (Eds.), *Advances in mycorrhizal science and technology* (pp. 161–173). Ottawa: NRC Research Press.
- Frey-Klett, P., Churin, J. L., Pierrat, J. C., & Garbaye, J. (1999). Dose effect in the dual inoculation of an ectomycorrhizal fungus and a mycorrhiza helper bacterium in two forest nurseries. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1555–1562. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00079-6)
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A., & Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichoderma* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*, 93, 1–9. <https://doi.org/10.17129/botsci.200>
- Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 128, 197–210. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x>
- Garibay-Orijel, R., Martínez-Ramos, M., & Cifuentes, J. (2009). Disponibilidad de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80, 521–534. <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2009.002.615>
- Gibson, F., & Deacon, J. W. (1988). Experimental study of the establishment of ectomycorrhizas in different regions of birch root systems. *Transactions of the British Mycological Society*, 91, 239–251. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(88\)80211-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(88)80211-0)
- Hoeksema, J. D., Chaudhary, V. B., Gehring, C. A., Johnson, N. C., Kars, J., Koide, R. T. et al. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 13, 394–407. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01430.x>
- Hynson, N. A., Merckx, V. S. F. T., Perry, B. A., & Treseder, K. K. (2013). Identities and distributions of the co-invading ectomycorrhizal fungal symbionts of exotic pines in the Hawaiian Islands. *Biological Invasions*, 15, 2373–2385. <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0458-3>
- Karst, J., Randall, M. J., & Gehring, C. A. (2014). Consequences for ectomycorrhizal fungi of the selective loss or gain of pine across landscapes. *Botany*, 92, 855–865. <https://doi.org/10.1139/cjb-2014-0063>
- Khasa, D., Piché, Y., & Coughlan, A. P. (2009). *Advances in mycorrhizal science and technology*. Ottawa: NRC-Research Press.
- Klironomos, J. N. (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84, 2292–2301. <https://doi.org/10.1890/02-0413>

- Kornerup, A., & Wanscher, J. H. (1978). *Methuen handbook of colour*. London: E. Methuen.
- Kumari, D., Sudhakara, R., & Ramseh, C. U. (2013). Diversity of cultivable bacteria associated with fruiting bodies of wild Himalayan *Cantharellus* spp. *Annals of Microbiology*, 63, 845–853. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0535-3>
- Kropp, B. R., & Mueller, G. M. (1999). *Laccaria*. In J. W. G. Cairney, S. M. Chambers (Eds.), *Ectomycorrhizal Fungi: key genera in profile* (pp. 65–88). Berlin: Springer-Verlag.
- Larsen, P. E., Sreedasyam, A., Trivedi, G., Podila, G. K., Cacke, L. J., & Collart, F. R. (2011). Using next generation transcriptome sequencing to predict an ectomycorrhizal metabolome. *BMC Systems Biology*, 5, 70. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-70>
- Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis, I. I. E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T., et al. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *Plos Genetics*, 8, e1002784. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002784>
- Martin, F., & Selosse, M. A. (2008). The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytologist*, 180, 296–310. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02613.x>
- Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J. J. et al. (2012). Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Forestales y del Ambiente*, 18, 183–192. <https://doi.org/10.5154/r.rchsefa.2010.11.112>
- Méndez-Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero-Lizaola, R., Hernández-Acosta, E., & Lara-Herrera, A. (2011). Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana*, 29, 73–81.
- Molina, R., Massicotte, H., & Trappe, J. M. (1992). Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In M. R. Allen (Ed.), *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process* (pp. 357–423). New York: Chapman & Hall.
- Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A., Cifuentes, J., & Caballero, J. (2005). Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity*, 17, 115–14.
- Montoya, A., Torres-García, E., Kong, A., Estrada-Torres, A., & Caballero, J. (2012). Gender differences and regionalization of the cultural significance of wild mushrooms around La Malinche volcano, Tlaxcala, Mexico. *Mycologia*, 104, 826–834. <https://doi.org/10.3852/11-347>
- Moreno-Martínez, E. (1984). *Análisis físico y biológico de semillas agrícolas*. Mexico D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morrone, J. J. (2010). Fundamental biogeographic patterns across the Mexican Transition Zone: an evolutionary approach. *Ecography*, 33, 355–361. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2010.06266.x>
- Morrone, J. J., & Escalante, T. (2002). Parsimony Analysis of Endemism (PAE) of Mexican terrestrial mammals at different area units: when size matters. *Journal of Biogeography*, 29, 1095–1104. <https://doi.org/10.1046/j365-2699.2002.00753.x>
- Mortier, F., Le Tacon, F., & Garbaye, J. (1988). Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis, and growth of Douglas fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. *Annals of Forest Science*, 45, 301–310. <https://doi.org/10.1051/forest:19880401>
- Onwuchekwa, N. E., Zwiiazek, J. J., Qureshi, A., & Khasa, D. P. (2014). Growth of mycorrhizal Jack pine (*Pinus banksiana*) and White spruce (*Picea glauca*) seedling planted in oil sands. *Mycorrhiza*, 24, 431–441. <https://doi.org/10.1007/s00572>
- Parent, S., & Moutoglis, P. (2009). Industrial perspective of applied mycorrhizal research in Canada. In D. Khasa, Y. Piché & A. P. Coughlan (Eds.), *Advances in mycorrhizal science and technology* (pp. 105–113). Ottawa: NRC Research Press.
- Parladé, J., & Álvarez, I. F. (1993). Coinoculation of aseptically grown Douglas fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 3, 93–96.
- Pera, J., & Parladé, J. (2005). Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales*, 14, 419–433.
- Perea-Estrada, V. M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Trinidad-Santos, A., De la I de Bauer, M. L., Cetina-Alcalá, V. M. et al. (2009). Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32, 93–102.
- Pérez-Moreno, J., & Read, D. J. (2000). Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist*, 145, 301–309. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00569.x>
- Pérez-Moreno, J., & Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29, 239–247.
- Perrin, E., Parladé, X., & Pera, J. (1997). Receptiveness of forest soils to ectomycorrhizal association: concept and method as applied to the symbiosis between *Laccaria bicolor* (Maire) Orton and *Pinus pinaster* Art or *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Mycorrhiza*, 6, 469–476.
- Qureshi, A. M., Kernaghan, G., & Hynt, G. A. (2009). Mycorrhizal fungi in Canadian forest nurseries and field performance of inoculated seedlings. In D. Khasa, Y. Piché & A. P. Coughlan (Eds.), *Advances in mycorrhizal science and technology* (pp. 115–127). Ottawa: NRC Research Press.
- Qureshi, A. M., Piché, Y., & Khasa, D. (2008). Field performance of conifer and hardwood species 5 years after nursery inoculation in the Canadian Prairie provinces. *New Forests*, 35, 235–253. <https://doi.org/10.1007/s11056-007-9074-3>
- Rúa, M. G., Antoninka, A., Antunes, P. M., Chaudhary, V. B., Gehring, C., Lamit, L. J. et al. (2016). Home-field advantage? Evidence of local adaptation among plants, soil, and arbuscular mycorrhizal fungi through meta-analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 16, 122. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0698-9>

- Santiago-Martínez, G., Estrada-Torres, A., Varela, L., & Herrera, T. (2003). Crecimiento de siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencias*, 37, 575–584.
- Sudhakara, R. M., & Natarajan, K. (1997). Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza*, 7, 133–138.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. New York: Academic Press
- Teramoto, M., Wu, B., & Hogetsu, T. (2012). Transfer of ¹⁴C-photosynthate to the sporocarp of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria amethystina*. *Mycorrhiza*, 22, 219–225. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0395-x>
- Trappe, J. M. (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathology*, 15, 203–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.15.090177.001223>
- Umbanhowar, J., & McCann, K. (2005). Simple rules for the coexistence and competitive dominance of plants mediated by mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 8, 247–252. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00714.x>
- UNFOSTI (2012). *Programa de manejo forestal para el aprovechamiento persistente de los recursos forestales maderables*. Comunidad de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Oaxaca: México.
- Valdés, M., Asbjornsen, H., Gómez-Cárdenas, M., Juárez, M., & Vogt, K. A. (2006). Drought effects on fine-root and ectomycorrhizal-root biomass in managed *Pinus oaxacana* Mirov stand in Oaxaca, Mexico. *Mycorrhiza*, 2, 117–124. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0022-9>
- Valdés, M., Pereda, V., Ramírez, P., Valenzuela, R., & Pineda, R. M. (2009). The ectomycorrhizal community in a *Pinus oaxacana* forest under different silvicultural treatments. *Journal of Tropical Forest Science*, 21, 88–97.
- Valdés, M., Piña, F., & Grada, R. (1983). Inoculación micorrízica y crecimiento de plántulas de pino en suelo erosionado. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 18, 56–70.
- Vik, U., Logares, R., Błażid, R., Halvorsen, R., Carlsen, T., Bekke, I. et al. (2013). Different bacterial communities in ectomycorrhizal and surrounding soil. *Scientific Reports*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep03471>
- Wadud, M. A., Lian, C. L., Nara, K., Reza, M. S., & Hogetsu, T. (2008). Below ground genet differences of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* infecting *Salix* stands in primary successional stage. *Journal of Agroforestry and Environment*, 2, 1–6.
- Wadud, M. A., Nara, K., Lian, C. L., Ishida, A. T., & Hogetsu, T. (2014). Genet dynamics and ecological functions of the pioneer ectomycorrhizal fungi *Laccaria amethystina* and *Laccaria laccata* in volcanic desert on Mount Fuji. *Mycorrhiza*, 24, 551–563. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0571-x>
- Wilson, A. W., Hosaka, K., & Mueller, G. M. (2017). Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist*, 213, 1862–1873. <https://doi.org/10.1111/nph.14270>
- Zadworny, M., Werner, A., & Idzikowska, K. (2004). Behavior of the hyphae of *Laccaria laccata* in the presence of *Trichoderma harzianum* *in vitro*. *Mycorrhiza*, 14, 401–409. <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0323-4>

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL

La delimitación taxonómica de especies de hongos, actualmente se centra en conocer su historia filogenética y con ello establecer las relaciones entre éstas, a través de una cantidad de marcadores moleculares cada vez mayor, que en ocasiones es hasta el genoma entero. La región de ITS permite separar especies y con ello potencialmente conocer la diversidad; el presente estudio separa cinco clados de *Laccaria* que corresponden con las especies más abundantes a nivel de esporomas de los bosques templados de México: *L. cf. laccata*, *L. cf. vinaceobrunnea*, *L. nobilis*, *L. squarrosa* y *L. trichodermophora*.

La filogenia más completa de *Laccaria* es la presentada por Wilson y cols. (2017) mediante cuatro genes (ITS, 28S, RBP2 y EF1 α) mostrando la existencia de cuatro clados bajo el mismo nombre de *L. laccata*. Es por ello que es inexacto definir en sentido estricto a la especie *L. laccata*. Los ejemplares mexicanos analizados y determinados morfológicamente como *L. laccata* (Mueller, 1992) no muestran filogenéticamente una cercanía con el clado *L. laccata sensu* Wilson et al. por lo que no hay claridad con respecto a los ejemplares mexicanos.

Un caso similar ocurre con el complejo de *L. amethystina sensu* Wilson et al. (2017) teniendo en este clado a las especies *L. amethystina*, *L. amethysteo-occidentalis*, *L. ocropurpurea* y *L. vinaceobrunnea*. Esta última especie carece de secuencias ITS en el análisis de Wilson. En el presente estudio este es el gen utilizado, por lo que la suposición filogenética esperada es que constituye clado hermano de *L. trulisata* lo que indica que potencialmente se considere una especie diferente. Morfológicamente, Mueller (1992) distinguió a *L. vinaceobrunnea* de *L. amethystina* y *L. amethysteo-occidentalis* por las basidiosporas ampliamente elipsoides y la abundancia de queilocistidios largos.

Las especies determinadas como *L. trichodermophora*, *L. nobilis* y *L. squarrosa* en el presente estudio, morfológicamente cumplen con las descripciones de Odsmunson (2005), Mueller (1992) y Ramos y cols. (2017); molecularmente se agrupan con las especies determinadas bajo dichos nombres con buenos soportes en su mayoría (98.0%). Para el caso de *L. squarrosa* los autores de la especie (Ramos et al., 2017) reportan endemismo para el estado de Veracruz y especificidad con del hospedero *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. No obstante, en el presente estudio se amplió la distribución al estado de Michoacán y como hospedero a *Quercus* sp.

En los bosques de Ixtlán de Juárez, Oaxaca bajo manejo forestal o sin manejo a lo largo del tiempo no ha cambiado la estructura de la comunidad a nivel de esporomas en cuanto a su abundancia y disponibilidad (Garibay-Orijel et al., 2009; Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019; Gómez et al., 2019); *Laccaria* continúa siendo el género dominante. A nivel de micorrizas en México Reverchon y cols. (2012) reportaron una falta de correspondencia entre ambas fases (esporoma y micorrizas) en un bosque de *Pinus montezumae*, teniendo a nivel de esporoma a *Laccaria* e *Inocybe* como los géneros más abundantes en un bosque joven mientras que a nivel de micorrizas fueron *Cenococcum geophilum*, *Clavulina* sp. 2 y la Familia Athilaceae. En la presente investigación, se encuentra la misma falta de correspondencia con el hospedero *Pinus patula* donde *Laccaria* fue el dominante en esporomas mientras que en micorrizas fueron *Lactarius* aff. *deceptivus* y *Cortinarius* aff. *ochrophyllus*. La estructura de la comunidad en ambas fases (esporomas y micorrizas), se debe de tomar como referencia en la información sobre la disponibilidad y frecuencia de especies para inoculantes en la toma de desiciones. El éxito de la planta depende de las primeras etapas de desarrollo hasta su establecimiento en campo.

El aprovechamiento de *Laccaria* a nivel de invernadero es amplio, tanto en México como en el resto del mundo; los trabajos descriptivos de morfotipos son pocos, en el caso particular en la simbiosis entre *Pinus montezumae* y *L.*

trichodermophora se tiene como referencia el de Galindo-Flores y cols. (2015) en donde la especie coincide en el tipo de ramificación, no obstante la coloración (naranja fuerte) es diferente a la reportada (amarillo pálido) lo cual pudiera ser entre otras cosas debido al tiempo de toma de muestras para la descripción. Galindo-Flores y cols. (2015) describieron el patrón de coloración blanca (5Y8/2) ligeramente brillantes en etapas jóvenes y amarilla pálida (5Y7/3) ligeramente brillante en etapas maduras de la micorriza. Mientras que en el presente trabajo se describieron las coloraciones naranja oscuro (5A8) solo en etapa madura.

En cuanto al aprovechamiento forestal de las ectomicorrizas, el amplio uso de las especies del género *Laccaria* en micorrización se debe a que son especies pioneras, con la habilidad para formar micorrizas con diversas especies de árboles de importancia forestal (Sudhakara y Natarajan, 1997, Parent y Moutoglis 2009, Quoreshi et al. 2009, Bois y Coughlan 2009, Fotin y Lamhamedi, 2009). Sin embargo, aquí hemos demostrado que la compatibilidad de la planta con el hongo ectomicorrízico es diferencial; aún cuando se trate de especies de hongos filogenéticamente cercanos. La habilidad de un hongo ectomicorrízico para colonizar y persistir en las raíces se refleja en respuestas fisiológicas y morfológicas en la planta (Perrin et al., 1996, Quoreshi et al., 2008, Onwuchekwa et al., 2014, Karst et al., 2014). No obstante, esta habilidad dependerá del origen de los participantes en la simbiosis. El potencial de adaptación local en especies simpátricas juega un papel fundamental en el éxito en campo (Rúa et al., 2016). Por lo tanto, a la hora de seleccionar hongos ectomicorrízicos para inocular plantas forestales deben priorizarse especies simpátricas para incrementar el éxito en la supervivencia y crecimiento de las plantas, así como para alterar en la menor medida la composición natural de las comunidades.

Otro de los componentes clave de la simbiosis ectomicorrizógena que debe ser visto desde el punto de vista de origen son las Bacterias Promotoras de Micorrización; Bending y cols. (2002) reportan una baja colonización micorrizica en *Pseudotsuga menziesii* y *Pseudomonas fluorescen* BBc6, de igual forma Bowen y Tbeodorou (1979) reportaron efectos positivo o negativo del crecimiento de *Pinus radiata* con *Rhizopogon luteoliis* dependiendo del aislamientos bacteriano.

Garbaye y Duponnois (1992) aislaron cepas de MHB de esporomas de *Laccaria laccata* asociada con *Pseudotsuga menziesii* encontrando un incremento hasta del 50% de micorrización que en los tratamientos controles sin bacterias (67% versus 97%), además mostraron una especificidad por especies de *Laccaria* cercanas (*L. bicolor* y *L. laccata*) mientras que para *L. proxima* no hubo un efecto e inhibio la micorrización en otros géneros de hongos utilizados. No obstante Garbaye y cols. (1992) demostraron que el efecto de las MHB no son específicos de plantas ya que el mismo hongo *L. laccata* puede micorrizar a *Picea abies*, *Pinus nigra*, *P. sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii* y *Quercus robur*. Garbaye (1994) menciona la selectividad de las cepas de MHB de *Laccaria laccata* .

CAPÍTULO VI.

CONCLUSIONES GENERALES

Las especies de importancia forestal de *Laccaria* reportadas en los bosques del Neotrópico Mexicano, son *L. cf. laccata*, *L. cf. vinaceobrunnea*, *L. nobilis*, *L. squarrosa* y *L. trichodermophora*. El uso de caracteres morfológicos así como secuencias moleculares, permiten una delimitación más clara de las especies; ITS funciona para dar un panorama de la diversidad genética, aunque éste no produce clados con buenos valores de soporte en todas las especies, es por ello que se propone utilizar otros genes como son RBP2, 28S y EF1 α (Ramos et al., 2017; Wilson et al., 2017a, b).

Si bien el género *Laccaria* a nivel de esporoma es de los más abundantes en los bosques templados de México, particularmente en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, esta dominancia se ve a lo largo de dos décadas, lo cual indica que existe un buen manejo del recurso forestal maderable el cual no perturba las condiciones para la formación de esporomas de las especies comestibles y ectomicorrízicas. Sin embargo, no existe una correspondencia a nivel de micorrizas, donde *Lactarius* (*L. aff. deceptivus*) es la especie más abundante, esto puede ser por varios factores, entre ellos la composición arbórea la cual es mayormente representada por *Pinus patula* (especie aprovechada forestalmente) y *Quercus* spp. en diferentes cantidades o porcentajes de cobertura vegetal y la edad del bosque, los cuales en su mayoría son bosques maduros, sabiendo que la simbiosis micorrizica entre *Pinus-Laccaria* se lleva en la primera etapa de crecimiento de la planta. Es por ello que se propone trabajar en proyectos de micorrización con el empleo de un consorcio de especies en el que en ambas fases sean abundantes; en el caso de *Pinus patula* con *Laccaria complex laccata*, *Cantharellus tubaeformis*, *Lactarius chrysorreus* y *L. complex vinaceobrunnea* todas estas especies muy abundantes a nivel de esporoma, mientras que a nivel de micorriza con *Lactarius deceptivus*, *Cortinarius ochrophyllus*, *Hydnum cuspidatus* y *Russula* sp.

Debido a la abundancia de esporomas de *Laccaria* es que se ha utilizado como fuente de inóculo para procesos de micorrización en invernadero evaluando el porcentaje de micorrización, concentración de nutrientes, así como la caracterización de la morfología de la planta. Teniendo en todos los casos una significancia positiva de las plantas inoculadas *versus* las no inoculadas; la habilidad para colonizar la planta dependerá del origen de los participantes. Por lo tanto, a la hora de seleccionar hongos ectomicorrízicos para inocular plantas forestales deben priorizarse especies simpátricas para incrementar el éxito en la supervivencia y crecimiento de las plantas, así como para alterar en la menor medida la composición natural de las comunidades.

Es importante en el procesos de tecnificación de planta micorrizada en invernadero el uso de bacterias promotoras de micorrización, las cuales deben obtenerse preferentemente de las especies de hongos ectomicorrizógenos utilizados, lo cual va garantizar el beneficio en porcentaje de micorrización y crecimiento de la planta.

Delimitar las especies de *Laccaria* mexicanas permitirá, entre otras cosas, conocer la diversidad presente en los bosques, reconocer aquellas que debido a su abundancia son aprovechadas para la tecnificación en procesos de micorrización y con ello incrementar la supervivencia de la planta en invernadero y campo. La función de los hongos micorrízicos es la absorción de nutrientes y agua que la planta por si sola no puede satisfacer sus necesidades; tener el panorama de la estructura de la comunidad a nivel de esporoma (inóculo) y de micorrizas, permitirá proponer consorcios de especies de ambas fases de la simbiosis, garantizando el éxito de la planta.

CAPÍTULO VII.

PERSPECTIVAS

En el tópico de Taxonomía del género *Laccaria* las perspectivas son las siguientes:

- Incrementar el número de ejemplares analizados, no solo aquellos que son muy abundantes sino la mayor diversidad posible del género *Laccaria* en México.
- Utilizar los genes RBP2, 28S y EF1 α para poder delimitar con mayor claridad los ejemplares mexicanos y con ello generar hipótesis robustas de origen.

En el tópico de ecología del género *Laccaria* las perspectivas son las siguientes:

- Llevar a cabo el mismo tipo de estudio en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, de ecología de esporomas *versus* micorrizas en parcelas donde se encuentran plantas de edad joven y con ello conocer la estructura de la comunidad en diferentes etapas teniendo de esa forma un panorama holístico, pudiendo proponer a corto plazo paquetes tecnológicos de inoculación y micorrización en invernadero.
- Este mismo tipo de estudio pero en otros bosques son necesarios para poder comprender si existe una diferencia o similitud entre las comunidades ectomicorrizógenas con hospederos iguales o cercanamente emparentados y con ello proponer inóculos únicos o generales.

En el tópico de Procesos de micorrización del género *Laccaria* la perspectiva es la siguiente:

- Trabajar con consorcios de especies de hongos ectomicorrizógenos abundantes tanto a nivel de esporoma como de raíz, en diferentes etapas de desarrollo de la planta, de esta forma se podrá evaluar si la planta presenta mayor beneficio en comparación a quecsolo estuviera formando micorrizas con un solo hongo como es *Laccaria*.

- Obtención de cepas de bacterias que se encuentran en la rizosfera y/o base micelial de los esporomas, las cuales deberían de ser experimentadas con diferentes hospederos y especies de hongos ectomicorrizógenos, con la finalidad de probar su especificidad o no a la simbiosis.

REFERENCIAS

- Fortin, J.A. y Lamhamedi, M.S. (2009). Ecophysiology of sporocarp development of ectomycorrhizal basidiomycetes associated with boreal forest gymnosperms. En *Advances in Mycorrhizal Science and Technology*. Khasa, D., Piché, Y. y Coughlan, AP(Eds.). NRC Research Press. Ottawa. pp 161-173.
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A. y Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*, 93, 1-9.
- Garibay-Orijel, R., Martínez-Ramos, M. y Cifuentes, J. (2009). Disponibilidad de esporomas de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80, 521-534.
- Gómez-Hernández, M., Ramírez-Antonio, K.G. y Gándara, E. (2019). Ectomycorrhizal and Wood-decay macromycete communities along development stage of managed *Pinus patula* in Southwest Mexico. *Fungal Ecology*, 39, 109-116.
- Karst, J., Randall, M.J. y Gehring, C.A. (2014). Consequences for ectomycorrhizal fungi of the selective loss of pine across landscapes. *Botany*, 92, 855-865.
- Mueller, G.M. (1992). Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana Botany*, 30: 1-58.
- Onwuchekwa, N.E., Zwiazek, J.J., Quoreshi, A. y Khasa, D.P. (2014). Growth of mycorrhizal Jack pine (*Pinus banksiana*) and White spruce (*Picea glauca*) seedling planted in oil sands. *Mycorrhiza*, 24, 431-441.
- Parent, S. y Moutoglis, P. (2009). Industrial perspective of applied mycorrhizal

- research in Canada. En *Advances in Mycorrhizal Science and Technology*. Khasa, D., Piché, Y. y Coughlan, A.P. (Eds.). NRC Research Press. Ottawa. pp. 213.
- Perrin, E., Parladé, X. y Pera, J. (1996). Receptiveness of forest soils to ectomycorrhizal association: concept and method as applied to the symbiosis between *Laccaria bicolor* (Maire) Orton and *Pinus pinaster* Art or *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Mycorrhiza*, 6, 469-476.
- Quoreshi, A.M., Piché, Y. y Khasa, D. (2008). Field performance of conifer and hardwood species 5 years after nursery inoculation in the Canadian Prairie provinces. *New Forest*, 35, 235-253.
- Quoreshi, A.M., Kernaghan, G. y Hunt, G.A. (2009). Micorrhizal fungi in Canadian forest nurseries and field performance of inoculated seedlings. En. Khasa D., Piché Y. y Coughlan A. (Eds.). *Advances in Mycorrhizal Science and Technology* (pp. 115-128). Press Ottawa: NRC.
- Ramos, A., Bandala V.M. y Montoya, L. (2017). A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relic forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycKeys*, 27, 77-94.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Bonilla-Rosso, G. y Pérez-Moreno, J. (2012). Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedling and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 80, 479-487.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., Ortega-Larrocea, M.P. y Arellano-Torrez, E. (2019). Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizas in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90, e902868.
- Rúa, M.G., Antoninka, A., Antunes, P.M., Chaudhary, V.B., Gehring, C., Lamit, L.J., Piculell, B.J., Bever, J.D., Zabinski, C., Meadow, J.F., Lajeunesse, M.J., Milligan, B.G., Karst, J. y Hoeksema, J.D. (2016). Home-field advantage? Evidence of local adaptation among plants, soil, and arbuscular mycorrhizal fungi through meta-analysis. *Evolutionary Biology* 16, 122.
- Sudhakara, R.M. y Natarajan, K. (1997). Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal

fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza*, 7, 133-138.

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

Capítulo de libro publicado (2019)

ANEXO

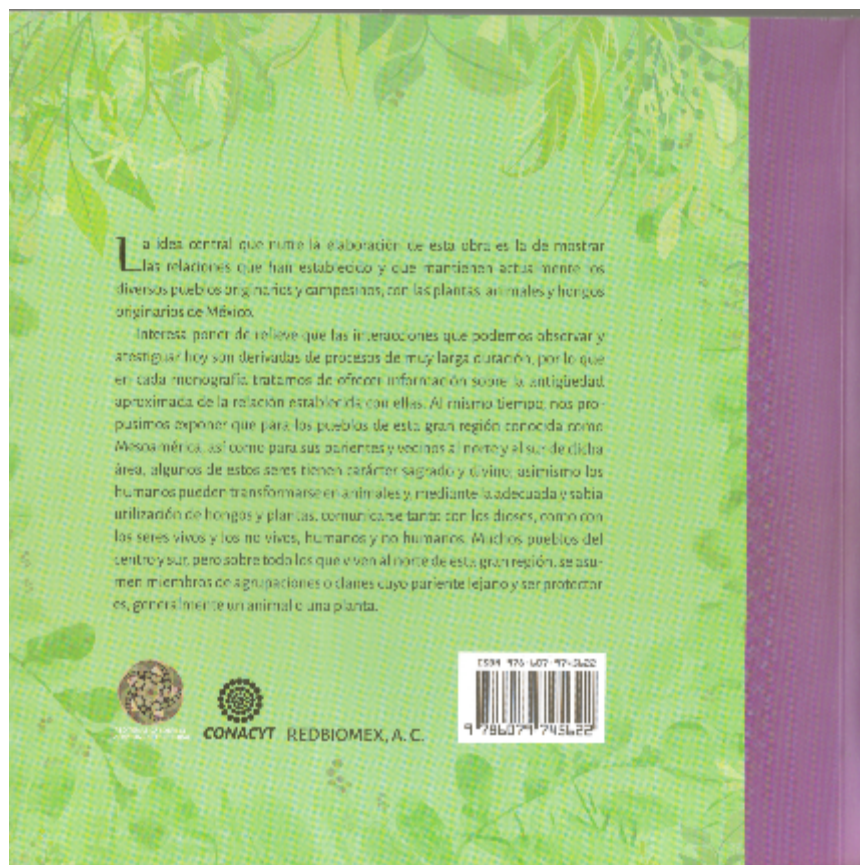
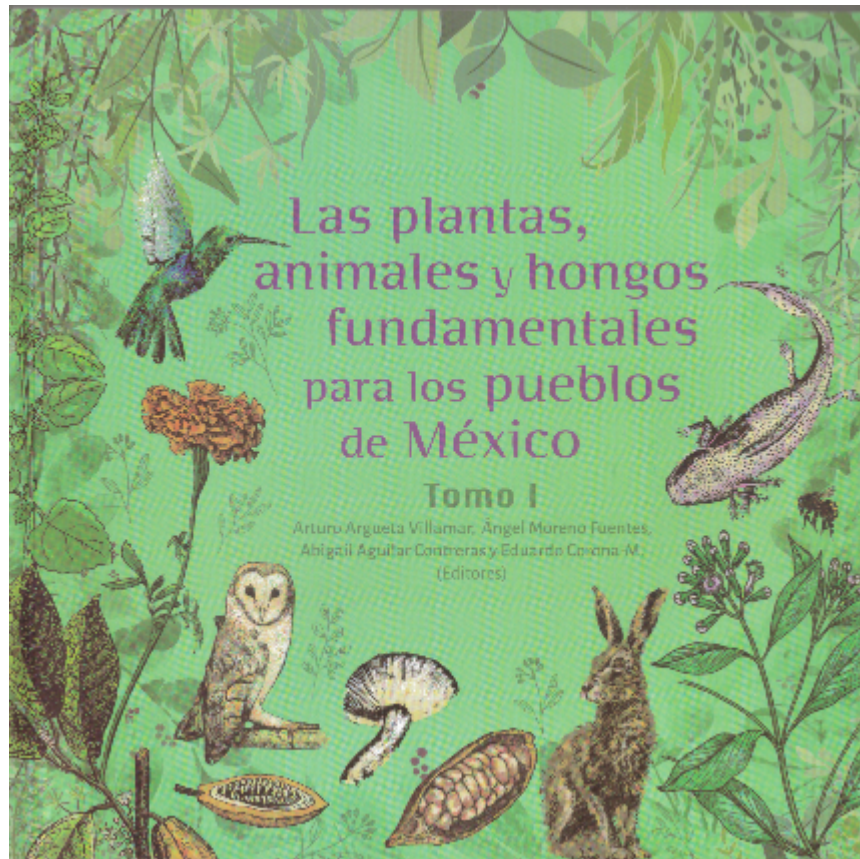
XOCOYOL

Resumen

El capítulo que lleva por nombre Xocoyol, forma parte de los hongos que son apreciados por su comestibilidad en muchas comunidades de México. Xocoyol o Chochoyotl es uno de los nombres con los cuales se conocen las especies del género *Laccaria*, las cuales son apreciadas por su disponibilidad (gran cantidad de esporomas en los bosques templados del país).

Dentro de las especies aprovechadas por comunidades de los estados de Chiapas, Chihuahua, Ciudad de México, Estado de México, Morelos, Oaxaca, Querétaro, Snora y Tlaxcala. Las especies son *Laccaria laccata*, *L. bicolor*, *L. proxima*, *L. proximella* conocidas con nombres de procedencia náhuatl como Xocoyotl, Xocoyolli; *L. trichodermophora* como Xocoyulado. *L. laccata*, *L. vinaceobrunnea*, *L. bicolor* y *L. amethystina* con nombre zapoteco en la Sierra Norte de Juárez, Oaxaca, como Beshia ladhi Biinii = hongo de pata de pajarito.

Esta información se encuentra en el libro titulado “Las plantas, animales y hongos fundamentales para los pueblos de México”.



Xocoyol

1. *Laccaria vinaceobrunnea* G.M. Muell. 3. *L. trichodermophora* G.M. Muell.
 2. *L. laccata* (Scop.) Cooke 4. *L. bicolor* (Scop.) Cooke

Roberto Caribay-Orijel e Ibeth Rodríguez-Gutiérrez



Clasificación taxonómica

Kirk et. al., 2008

Reino	Fungi
Phyllum	Basidiomycota
Orden	Agaricales
Familia	Tricholomataceae
Género	<i>Laccaria</i>

Fotos: Roberto Garibay Orijel

Las especies del género *Laccaria* son reconocidas como un solo taxón tradicional; se recolectan y usan indistintamente. Típicamente se venden por montones muy abundantes en los mercados del centro de México donde es posible encontrar hasta 5 especies diferentes revueltas. Todas se usan con fines alimenticios.

CATEGORÍA DE RIESGO



Las especies del género *Laccaria* no se encuentran citadas bajo algún estatus de protección nacional o internacional.

Distribución, vegetación y temporalidad



Chochoyotl

Náhuatl: Oriente del Estado de México

xocoyotl, xocoyolli (L. laccata, L. bicolor, L. proxima, o L. proximella).

Tlaxcala: *Xocoyulado (L. trichodermophora)*, proviene del náhuatl

xogoyolli = hijo más pequeño, se refiere a que son uno de los hongos comestibles silvestres más pequeños

Zapoteco de la Sierra Norte de Juárez, Oaxaca: *beshia ladhi biinii* = hongo de pata de pajarito (*L. laccata* var. *pallidifolia*, *L. vinaceobrunnea*, *L. bicolor* y *L. amethystina*)

Chiapas Municipio Ocozocoautla de Espinosa, Parque Educativo Laguna Bélgica. **Chihuahua** Municipio Bocoyna, Arareco, Creel; Mpio. Guachochi; Mpio. Maguarichi, Choguita; Mpio. Chihuahua, San Juan. **CDMX** Delegación Magdalena Contreras, Los Dinamos. **Estado de México** Municipio Luvianos, km. 11 y 16 del camino de terracería hacia Nanchititlán, 1 km al oeste del pueblo de Nanchititlán; Mpio Tepetlaoxtoc. **Morelos** Sierra del Chichinautzin. **Oaxaca** Municipio de Ixtepeji; Mpio. Nuevo Zoquiapan; Mpio. San Miguel Aloápam; Mpio. Ixtlán. **Queretaro** Lareda sureste del cerro el Zamarano. **Sonora** Municipio Yécora, km 251 de la carretera Hermosillo a Yécora, km 258 de la carretera Hermosillo a Yécora; Mpio. Fronteras, 7 km de la carretera Esqueda a Nazozari. **Tlaxcala** Parque Nacional La Malinche, 4 a 7 km al oeste de Francisco Javier Mina, lareda oeste de el Volcán La Malinche, Ixtenco, Javier Mina, Los Pilares.



Laccaria laccata
Champignonsraf dessins.free.fr

Descripción micológica

Píleo (sombbrero) de forma convexo a plano, algunas veces con el centro deprimido a **umbilicado**; margen recto y borde entero. Superficie cuando fresca de color café-naranja, rosa o carne, violáceo obscuro, vináceo, café-rojizo (óxido). Translúcida-estriada. Presenta ornamentación de tipo velutinoso (cubierta de pelos diminutos, densos, blancos y finos) o liso. Láminas delgadas a gruesas, distantes a subdistantes, sinuadas a subdecurrentes. Color rosa o carne, lila, vinácea, violácea, gris ceniza. Esporada blanca a ligeramente lilácea. Estípite (pie) central, cilíndrico, con ornamentación de tipo velutinoso a hispido (cubierto de pelos tiesos, irregulares, entrelazados, largos que casi no tienden a recostarse), fibriloso o estrías longitudinales. Base micelial (masa de hifas originadas en el sustrato y que suben superficialmente a la base del pie) de color blanco o violeta. (1) Basidiosporas de formas globosas a subglobosas, anchamente elípticas, con ornamentación de tipo **equinulada**, raramente lisas. (2) Basidios bispóricos o tetraspórico. **Pileipélis** hifas entretrejidas o hifas en fascículos o tricodermo. Fíbulas presentes. (3) **Pleurocistidios** raros; **queilocistidios** ausentes o abundantes.

En México se ha registrado el consumo de 8 especies del género: *L. amethystina* (Huds.) Cooke, *L. laccata* (Scop.) Cooke, *L. ochropurpurea* (Berk.) Peck, *L. proxima* (Boud.) Pat., *L. proximella* Singer, *L. trichodermophora* G. M. Muell., *L. vinaceobrunnea* G. M. Muell. y *L. bicolor* (Scop.) Cooke.

Las especies del género no son de las más apreciadas por su sabor ni tienen una gran significancia cultural y son de las más baratas en los mercados, sin embargo por su abundancia en los bosques se venden en grandes cantidades. Se consumen normalmente en caldo de hongos o en quesadillas aunque se pueden también consumir crudas.



Mushroom report,
Laccaria laccata





Laccaria ochropurpurea, www.silysavg.com



<http://www.forocoques.com/foro/showthread.php?t=1503791&page=2>



Foto: Rogelio Rico. <http://www.cambiodemichoacan.com.mx/nota-17766>

Comentario de los autores

Si bien se usan ocho especies del género como alimento en México, las dos especies que se han citado más son *L. laccata* y *L. bicolor*. La primera se consume principalmente en el Estado de México, así como en la Ciudad de México, Michoacán, Oaxaca, Puebla y Veracruz. La segunda se ha reportado principalmente en Tlaxcala y el Estado de México, así como en Oaxaca. Además de su importancia como alimento tradicional, el género es muy importante ecológicamente pues forma micorrizas con las raíces de muchos árboles de interés forestal. Se ha demostrado que las especies de *Laccaria* son pioneras y que éstas favorecen el establecimiento y supervivencia de plántulas, incrementando la captación de nutrimentos y agua necesaria para su crecimiento. Principalmente los bosques con las que se asocian son de *Pinus* spp, *Quercus* spp. o mixtos *Pinus* spp-*Quercus* spp.

En diversos estudios de hongos comestibles, en los estados de Veracruz, Tlaxcala, Chihuahua, Michoacán, Oaxaca y Morelos, las especies de *Laccaria* son las más productivas en términos de número de esporomas, lo cual las hace disponibles para el autoconsumo, venta y producción de inóculo para tecnologías de micorrización de plántulas en vivero.



- www.micoweb.com.mx
- Aguirre-Acosta E. y E. Pérez-Silva. 1978. "Descripción de algunas especies del género *Laccaria* (Agaricales) de México". *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 12: 33-58