

Hongos ectomicorrízicos asociados a plantas jóvenes de *Pinus patula* y *Quercus crassifolia* en plantaciones del sistema matarrasa de la Sierra Juárez de Oaxaca, México

Ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus patula* and *Quercus crassifolia* in plantations reforested from clear cut logging, in the Sierra Juarez of Oaxaca, Mexico

Aldo Alfonso Ramírez Miguel,¹ Arturo Félix Hernández Díaz,¹ César Valenzuela Encinas,¹ Roberto Garibay-Orijel,² Camille Truong²

¹ Instituto de Estudios Ambientales, Universidad de la Sierra Juárez, Avenida Universidad S/N, Ixtlán de Juárez, CP 68725, Oaxaca, México.

² Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F., México.

RESUMEN

Antecedentes: *Pinus patula* es la especie forestal maderable más importante en la región subtropical de México. En el estado de Oaxaca, se encuentra en bosques sometidos a manejo y en plantaciones del sistema de aprovechamiento matarrasa. La interacción entre raíces y hongos ectomicorrízicos (EcM) afecta la nutrición y la sobrevivencia de *Pinus* y *Quercus*, con consecuencias para la dinámica de los bosques.

Objetivo: Caracterizar a los hongos EcM más frecuentes en las raíces de plántulas de *P. patula* y *Q. crassifolia* (que crece por regeneración natural) en franjas del sistema silvícola matarrasa de la Sierra Juárez de Oaxaca.

Métodos: Los morfotipos de cada punta de raíz EcM se describieron morfológicamente y se identificaron usando la región ITS del DNA ribosomal nuclear por similitud genética en la base de datos de UNITE.

Resultados y conclusiones: Se encontraron un total de 14 "Species Hypothesis", de las cuales los linajes /tomentella-thelephora y /laccaria tuvieron el mayor número de especies. *Lactarius* sp., *Cenococcum geophilum* y *Tomentella radiosa* fueron las especies con mayor frecuencia, en asociación con ambos hospederos. Este trabajo destaca la diversidad de los hongos EcM en plantaciones del sistema matarrasa. Tal conocimiento podría utilizarse para posteriores investigaciones de aprovechamiento forestal sustentable.

Palabras clave: código de barras de DNA, manejo forestal, micorriza

ABSTRACT

Background: *Pinus patula* is the most important timber species in the subtropical region of Mexico, particularly in the state of Oaxaca. It is found in native forests and in plantations reforested from clear cut logging (matarrasa). The interaction of *Pinus* and *Quercus* roots with ectomycorrhizal fungi (EcM) plays important functions for the nutrition and survival of these plants, with consequences for forest dynamics.

Objective: We characterized the most frequent EcM fungi in seedling roots of *P. patula* and *Q. crassifolia* (which grows by natural regeneration in the stands) from clear cut plantations in the Sierra Juarez of Oaxaca, Mexico.

Methods: Morphotypes of each EcM root tip were described morphologically and identified using the ITS nuclear ribosomal DNA region by genetic similarity in the UNITE database.

Results and conclusions: We found a total of 14 "Species Hypothesis" for which the morphological description of the root tip is presented. The /tomentella-thelephora and /laccaria lineages were the most diverse. *Lactarius* sp., *Cenococcum geophilum* and *Tomentella radiosa* were the most frequent species associated to both hosts. This work highlights the diversity of EcM fungi in clear cut plantations. Such knowledge is useful for further research on sustainable forest management.

Keywords: DNA barcode, forest management, mycorrhiza

ARTICLE HISTORY

Received 29 June 2020 / Accepted 17 November 2020

Published on line: 28 January 2021

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Camille Truong, camille.truong@ib.unam.mx

ORCID: 0000-0002-8510-1761

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento forestal maderable de la Sierra Norte del estado de Oaxaca (Sierra Juárez) ha sustentado por más de 30 años el desarrollo comunitario, generando empleos e ingresos a las familias, además de permitir el desarrollo de la región, ya que con estos ingresos se financian servicios y obras sociales. La comunidad de Ixtlán de Juárez realiza el aprovechamiento de sus recursos forestales mediante la implementación de dos sistemas silvícolas, el Método Mexicano de Ordenación de Bosque Irregular (MMOBI) y "matarrasa" (CONAFOR, 2015). En las áreas de manejo forestal de matarrasa, se establecen franjas para el aprovechamiento de especies de mayor interés, en particular *Pinus patula*. Esa modalidad implica la corta total del área que abarca cada franja (Ordóñez Díaz, 2008). En una sola intervención toda la vegetación es removida y el espacio es liberado de manera que quede a disposición de una futura regeneración natural o una plantación (reforestación). Cada franja tiene un tamaño aproximado de 300-400 × 50 m, dependiendo de la naturaleza del terreno, de manera que la proximidad del bosque permite el crecimiento espontáneo de especies nativas como *Quercus crassifolia*.

Pinus patula Schl. & Cham. es una de las 54 especies nativas del género *Pinus* que se encuentran en los bosques de coníferas en México (Perry, 1991; Sáenz-Romero et al., 2011). Es una especie forestal de crecimiento rápido, con una tasa promedio de 20 m³/ha/año que se detiene sensiblemente entre los 30 y 35 años, por lo cual se usa en general a esa edad para la explotación forestal (CONAFOR, 2019). En Ixtlán de Juárez, *P. patula* es una especie nativa en los bosques y se usa en plantaciones mediante reforestación en franjas del sistema matarrasa. Debido a la cercanía del bosque, otras especies forestales como *Quercus crassifolia* Humb. & Bonpl. se establecen de manera espontánea en las franjas. *Quercus crassifolia* es una especie nativa de los bosques de encino o pino-encino entre 2600-2800 m de altitud en México (Rzedowski et al., 2005). En la comunidad de Ixtlán de Juárez, de acuerdo con el programa de manejo, esta especie es utilizada principalmente para producir carbón, leña y postes (CONAFOR, 2015).

Las raíces de más del 90 % de las plantas están asociadas con hongos micorrízicos que les proporcionan nutrientes y resistencia a varios tipos de estrés a cambio

de una fuente de carbono (Martin et al., 2016). Dentro de los diferentes tipos de micorrizas, las ectomicorrizas (EcM) se definen por formar un "manto" de hifas rodeando las raíces terminales (o puntas de raíz), y por penetrar en el espacio intersticial entre las células de la corteza de la raíz formando la "red de Hartig" (Brun-drett y Tedersoo, 2018). Estos hongos son muy diversos, con una estimación de aproximadamente 20,000 especies dentro de los tres linajes principales de hongos: Basidiomycota, Ascomycota y Mucoromycota (Tedersoo y Smith, 2013). Se asocian principalmente con especies de plantas leñosas en las regiones templadas y boreales, tal como los géneros *Pinus* y *Quercus*, así como con algunos linajes de plantas tropicales (Tedersoo et al., 2014).

A pesar de su importancia, el conocimiento de los hongos EcM asociados a las raíces de *P. patula* es muy limitado. Recientemente, Rodríguez-Gutiérrez et al. (2020) reportaron que en los bosques maduros de *P. patula* de Ixtlán de Juárez, la comunidad de hongos EcM está dominada por *Lactarius* aff. *deceptivus*, *Cortinarius* aff. *ochrophyllus*, *Hydnum* aff. *cuspidatum*, *Russula* sp. y *Sebacina* aff. *dimitica*. Debido a la importancia del manejo forestal en Ixtlán de Juárez, consideramos que el conocimiento sobre los hongos EcM asociados a *P. patula* en las franjas del sistema matarrasa es valioso, dado el papel que juegan en el establecimiento y la supervivencia de la masa forestal de interés económico. En el presente estudio, se caracterizaron e identificaron a los hongos EcM más frecuentes asociados a las raíces de plantas jóvenes de *P. patula* y de *Q. crassifolia* en las franjas del sistema matarrasa de Ixtlán de Juárez, mediante la descripción morfológica de las puntas de raíz EcM y su identificación molecular usando la región ITS del DNA ribosomal nuclear.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio corresponde a la comunidad de Ixtlán de Juárez, localizada al Noroeste de la ciudad de Oaxaca en la región denominada "Sierra de Juárez" (17.45° N y 96.34° O); cuenta con una superficie total de 19,180 ha de las cuales 12,425 ha corresponden a bosques de pino-encino. El resto de la superficie está cubierta por bosque mesófilo y selva alta perennifolia (FSC, 2001).

Se seleccionaron dos franjas dentro de las áreas forestales sometidas a manejo forestal del sistema matarrasa. Las dos franjas presentan características similares de tamaño, exposición y altitud (Tabla 1) y cuentan con reforestación de *Pinus patula* de 3 años de acuerdo con el año de establecimiento de las franjas (2015) hasta la toma de muestras (2018). Además, ambos sitios cuentan con regeneración espontánea de *Quercus crassifolia* por dispersión natural desde el bosque nativo que rodea las franjas. Los suelos en las franjas presentan una capa de materia orgánica con acomodo de residuos en curvas de nivel, los cuales resultan de las intervenciones silvícolas.

Recolecta de muestras

Durante el mes de noviembre de 2018, establecimos dos transectos (uno por franja) de 45 m de largo, ubicados en el medio de cada franja seleccionada para evitar efectos de borde. Se tomaron cuatro puntos de muestreo con una separación de 15 m entre ellos a lo largo de cada transecto. En cada punto de muestreo recolectamos las raíces de un individuo de *P. patula* y un individuo de *Q. crassifolia*, obteniendo un total de 8 muestras por cada especie de planta (16 muestras en total). Cada muestra consistió en 3-5 raíces terminales de un individuo de *P. patula* o de *Q. crassifolia*. Para asegurarse que las raíces pertenecían a la planta de interés, se desenterraron las raíces a partir de la base del árbol para seguirles hasta las raíces terminales. Las muestras se almacenaron a 5 °C para ser transportadas al laboratorio del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM).

Descripción morfológica de las raíces EcM

Las puntas de raíz EcM fueron separadas según su morfología bajo el estereomicroscopio con magnificación 10-40×. Puntas de raíz de cada morfotipo (por muestra) se colocaron en tubos Eppendorf con etanol 96 % y se almacenaron a 4 °C para su descripción

morfológica de acuerdo con el sistema de información para la caracterización y la determinación de ectomicorrizas DEEMY (<http://www.deemy.de/>). Se tomaron en cuenta el tipo de ramificación, la forma de las puntas no ramificadas, la textura y el color de la superficie del manto, la coloración, así como la presencia y el tipo de rizomorfos e hifas emanantes.

Extracción, amplificación y secuenciación de DNA

Por cada morfotipo aislado (por muestra), se limpió una punta de raíz con agua destilada estéril y se colocó en un tubo PCR con 30 µL de buffer de extracción Extract-N-Amp (Sigma-Aldrich), en él se trituroó con una pinza previamente esterilizada. La extracción del DNA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y las muestras de DNA se almacenaron a -20 °C.

La amplificación de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) del DNA ribosomal nuclear (rDNA) se amplificó por PCR con los primers ITS1F (Gardes y Bruns, 1993) e ITS4 (White *et al.*, 1990) siguiendo el protocolo para Taq Platinum (Invitrogen). El ITS es una región no codificante susceptible de acumular mutaciones, por esa razón fue elegida código de barras universal de los hongos (Schoch *et al.*, 2012). Cada reacción contuvo 19.125 µL de H₂O destilada estéril, 2.5 µL de Buffer (Invitrogen), 1.25 µL de MgCl₂ (25 µM), 0.5 µL de dNTP (10 µM), 0.25 µL de primer ITS1F (50 µM), 0.25 µL de primer ITS4 (50 µM), 0.125 µL de Taq Platinum (Invitrogen) y 1 µL de DNA genómico, para un volumen total de 25 µL. Los tubos fueron incubados en un termociclador con una temperatura inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 51 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, y finalmente 72 °C por 10 min para la elongación final.

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis con un gel de agarosa 1 % teñido con GelRed (Biotium). La limpieza de los productos PCR se realizó con ExoSAP-IT (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se secuenciaron

Tabla 1. Ubicación y datos técnicos de las dos franjas donde se realizó el muestreo (datos proporcionados por Servicios Técnicos de Ixtlán de Juárez).

Franja	Rodal/Subrodal	Exposición	Tamaño (m)	Área (m ²)	Coordenadas	Altitud (msnm)
F1	P/1107	45 NO	330 × 50	16500	17.3936°N; 96.45485°O	2823
F2	P/1105	60 NO	410 × 50	20500	17.3925°N; 96.45278°O	2810

ron con los mismos primers ITS1F e ITS4 en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del IB-UNAM. El control de calidad y la edición de las secuencias se realizó con el programa Geneious Prime R10.

Identificación molecular de las puntas de raíz EcM

Para la identificación taxonómica de las secuencias, se realizaron búsquedas BLAST en la base de datos de UNITE (Kõljalg et al., 2005). En comparación con GenBank (NCBI), UNITE es una base de datos de secuencias de rDNA de hongos (esporomas, puntas de raíz, muestras ambientales) curada y diseñada para proporcionar una identificación confiable y reproducible de especies de hongos: Proporciona una manera unificada para delimitar e identificar hongos usando "Species Hypothesis" (SH) basándose en un porcentaje de identidad de la región ITS aplicando un conjunto de valores de distancia dinámica de 97 % a 99.5 % (Kõljalg et al., 2013). En nuestro caso, identificamos cada secuencia de ITS asignándola a una SH con un porcentaje de similitud ≥ 97 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Delimitación e identificación molecular de los hongos EcM

A partir de las 16 muestras de raíces (8 de *P. patula* y 8 de *Q. crassifolia*), se extrajo el DNA de 44 morfotipos de ectomicorrizas, de las cuales se lograron obtener 29 secuencias de ITS con calidad suficiente. De las 29 búsquedas BLAST, 26 correspondieron a hongos EcM y tres a hongos no-EcM (*Archaeorhizomyces* y Helotiales). Las 26 secuencias de hongos EcM se agruparon en un total de 14 SH en la base de datos de UNITE (Figura 1 y Tabla 2). Estas secuencias fueron depositadas en GenBank con los números de referencia MT668596-MT668621.

Descripción morfológica y taxonómica de las 14 SH de hongos EcM

Morfotipo M1: *Thelephora terrestris* Ehrh., Pl. Crypt. Linn. Exsicc.: no. 178 (1793)

SH1502189.08FU con *P. patula* (Figura 1A)
Morfotipo con ramificación dicotómica-irregular de color marrón en etapa adulta y grisáceo en la parte apical; terminación del extremo distal reducido. El manto es visible, no transparente. El morfotipo es de color ocre en raíces jóvenes, con coloración más

clara en la parte apical. Se nota la presencia de hifas muy cortas en la superficie del manto, de distribución no específica. Las secuencias coincidieron en un 99 % de similitud con secuencias asociadas a bosques de coníferas (*Pinus*, *Picea*) del este de Europa (Genbank #MG590062, #MF162213). Esta especie es abundante en sitios perturbados o bajo manejo forestal con varias intensidades (Vašutová et al., 2018). De acuerdo con el número de secuencias de esta SH en UNITE (310 registros), es una especie abundante y de distribución global, que se ha encontrado asociada a una gran variedad de hospederos de coníferas y angiospermas en diferentes países en América, Asia, Europa, África y Oceanía. Sin embargo, estudios previos demostraron que esa especie es exótica en México, por lo cual su presencia en las raíces de *P. patula* puede representar una introducción desde los viveros donde están producidas las plántulas (Ángeles-Argáiz et al., 2016).

Morfotipo M2: *Tomentella radiosa* (P. Karst.) Rick, Brotéria Série Trimestral, Ciências Naturais 3: 79 (1934)

SH1502402.08FU con *P. patula* (Figura 1B) y *Q. crassifolia* (Figura 1C)

Morfotipo sin ramificación, ocurriendo en cada raíz individual, sin rizomorfos. El diámetro del extremo distal es reducido con terminación gradual. Su coloración es amarillo claro con un manto visible poco transparente. Las secuencias coincidieron en > 99 % de similitud con un esporoma muestreado en un bosque de *Quercus* en Colombia (UNITE #UDB022953). De acuerdo con el número de secuencias de esta SH en UNITE, es una especie Neotropical (Colombia y Costa Rica) que también ha sido aislada de puntas de raíz EcM de *Quercus*. Por lo tanto, se detectó aquí por primera vez en México asociada a coníferas y encinos.

Morfotipo M3: Thelephoraceae

SH1502494.08FU con *P. patula* (Figura 1D)

Morfotipo con ramificación dicotómica de color marrón oscuro en la parte más vieja, mientras es verdoso en la parte más joven. La terminación del extremo distal es cilíndrico y ligeramente reducido. El manto es visible, no transparente. Las puntas de raíz están rodeadas por hifas emanantes delgadas, de distribución no específica. Las secuencias coincidieron en > 99 % de similitud con secuencias identificadas como hongos ECM de la familia Thelephoraceae (i.e. Genbank #KX816311)

asociados positivamente con el contenido de materia orgánica del suelo y perturbaciones tal como quemas prescritas y fertilización por nitrógeno, en bosques de robles y pinos del noreste de Estados Unidos (Rasmussen *et al.*, 2018; Parrent y Vilgalys, 2007).

Morfotipo M4: Thelephoraceae

SH1503453.08FU con *Q. crassifolia* (Figura 1E)
Morfotipo con ramificación ausente, de coloración ocre, con extremo distal cilíndrico. La superficie del manto es visible, semitransparente, y no presenta hifas ni rizomorfos. Las secuencias coincidieron en > 97 % de similitud con una secuencia aislada de raíces de plántulas de *Tsuga canadense* en Estados Unidos (GenBank #FJ901332). Aquí se detectó en México por primera vez asociada a angiospermas.

Morfotipo M5: *Lactarius* Pers., *Tentamen dispositionis Methodicae* Fungorum: 63 (1797)

SH1519194.08FU con *P. patula* (Figura 2F) y *Q. crassifolia* (Figura 1G)
El morfotipo asociado a raíces de *P. patula* tiene ramificación dicotómico-irregular de color marrón, con ramas largas con el extremo distal reducido y un crecimiento a diferentes longitudes. El manto es liso-visible, no transparente, con ausencia de rizomorfos. El morfotipo asociado a raíces de *Q. crassifolia* presenta ramificación monopodial-piramidal de color marrón claro en puntas jóvenes (marrón oscuro en adultos), con ramas laterales orientadas en varias direcciones, con el extremo distal reducido gradualmente. El manto es visible, no transparente, con ausencia de rizomorfos. Las secuencias coincidieron en > 99 % de similitud con secuencias aisladas de puntas de raíz de *P. clausa* en Florida, Estados Unidos (Genbank #KX899822, #KX899848). En dicho estudio se utilizó el análisis de correlación para relacionar las matrices de las comunidades de hongos EcM con las características del huésped y del entorno (Rúa, 2017). Los resultados sugieren que las perturbaciones periódicas que dan forma a las poblaciones hospederas son importantes para estructurar la comunidad de hongos EcM independientemente de los efectos ambientales. Por otro lado, las secuencias también coincidieron en > 98 % con secuencias de raíces EcM de *P. taeda* en Carolina del Norte, Estados Unidos (Genbank #AJ633589), donde los hongos EcM más abundantes incluían Russulaceae, Thelephorales y Tricholomata-

ceae (Burke *et al.*, 2005). Por primera vez se encontró aquí asociada a coníferas y angiospermas en México.

Morfotipo M6: *Piloderma sphaerosporum* Jülich, *Willdenowia Beiheft* 7: 235 (1972)

SH1544806.08FU con *P. patula* (Figura 1H)
Morfotipo de ramificación dicotómico-irregular, de coloración marrón oscuro. La morfología del extremo distal es cilíndrica. El manto es visible no transparente, con una superficie ligeramente brillante, sin presencia de rizomorfos. Las secuencias coincidieron en > 99 % de similitud con el hongo EcM *Piloderma sphaerosporum* aislado de puntas de raíz de *P. sylvestris* en Lituania (GenBank #MG590050) y de *P. contorta* expuestos a tres tratamientos de fertilizante para la producción de volúmenes sustanciales de madera en Columbia Británica, Canadá (GenBank #JQ711930, Jones *et al.*, 2012). De acuerdo con el número de secuencias de esta SH en UNITE (332 registros), es una especie abundante y de amplia distribución en el hemisferio del Norte, en asociación principalmente con coníferas.

Morfotipo M7: *Laccaria* sect. *laccata* (Scop.) Cooke, *Grevillea* 12: 70 (1884)

SH1553002.08FU con *P. patula* (Figura 1I)
Morfotipo semicoraloide formado por ramificación dicotómica. Crece en pequeñas cantidades en cada raíz individual, con la terminación del extremo distal cilíndrica. Su coloración es ocre, cubierta con hifas emanantes de distribución no específica que dan a la superficie del manto una apariencia lanosa. Las hifas forman filamentos delgados (similar a rizomorfos) con origen no específico. Su secuencia coincidió en > 99 % de similitud con secuencias del linaje EcM /*laccaria* aisladas de puntas de raíz de *Q. ilex* en un área contaminada por elementos traza en España (GenBank #MG274060; López-García *et al.*, 2018). También coincidió en 100 % de similitud con esporomas identificados como *Laccaria laccata* recolectados en los mismos bosques de Ixtlán de Juárez por Rodríguez-Gutiérrez *et al.* (2020). De acuerdo con el número de secuencias de esta SH en UNITE (993 registros), es una especie abundante y de distribución global, en asociación con una gran variedad de hospederos, incluso varias especies de *Pinus* y *Quercus*. Sin embargo, las especies de *Laccaria* son difíciles de delimitar usando ITS (Badotti *et al.*, 2017) y varias especies tienen un porcentaje de similitud superior a 97% (valor usado para definir

nuestras "Species Hypothesis"), por lo que estos datos deben tomarse con cautela.

Morfotipo M8: *Laccaria sect. amethystina* Cook, *Grevillea* 12:70 (1884)

SH1553041.08FU con *Q. crassifolia* (Figura 1J)

Morfotipo con ramificación monopodial-piramidal, de coloración grisácea, con extremo distal reducido. La superficie del manto es visible, semitransparente y cubierta de hifas que emanan a lo largo de la punta micorrízica, presentando agregados de partículas de suelo. Esta secuencia coincidió en > 98 % de similitud con una secuencia de punta de raíz EcM de *Fagus grandifolia* en Veracruz, México, correspondiendo al linaje EcM de *Laccaria* (GenBank #KJ026729; Garay-Serrano et al., 2012). También coincidió en 99 % de similitud con esporomas identificados como *Laccaria vinaceo-brunnea* recolectados en los mismos bosques de Ixtlán de Juárez por Rodríguez-Gutiérrez et al. (2020). Este taxón se reportó en asociación con *Quercus* en Costa Rica, en un estudio sobre patrones biogeográficos y de diversificación del género *Laccaria* (Wilson et al., 2017).

Morfotipo M9: *Laccaria* Berk. & Broome, *Annals and Magazine of Natural History* 12: 370 (1883)

SH1553082.08FU con *P. patula* (Figura 1K)

Morfotipo con ramificación dicotómica, de coloración ocre opaco, con extremo distal cilíndrico. La superficie del manto es visible, semitransparente, cubierta de hifas emanantes a lo largo de la punta micorrízica, con ausencia de rizomorfos. Esta secuencia coincidió en > 99 % de similitud con una secuencia de punta de raíz EcM de *Oreomunnea mexicana* reportada en Oaxaca, México (GenBank #KR135339). Hasta ahora este taxón se ha reportado solo para México. Por lo tanto, se detectó aquí por primera vez asociado a coníferas.

Morfotipo M10: *Tuber cf. separans* Gilkey, *University of California Publications in Botany* 6: 315 (1916)

SH1561434.08FU con *P. patula* (Figura 1L)

Morfotipo coraloide, formado por ramificación dicotómica, de coloración ocre a marrón amarillento, ocurriendo en pequeñas cantidades en cada raíz terminal, con ausencia de rizomorfos. El extremo distal es cilíndrico, con ápice elipsoide. El manto no es transparente, por lo tanto, las células corticales no son visibles y presentan cistidios densamente cortos y espinosos en toda la superficie del manto. Estas secuencias coinci-

dieron en > 98 % de similitud con secuencias de esporomas de *Tuber cf. separans* (GenBank # KC152263) y de puntas de raíz EcM asociados a *Pinus montezumae* en la Faja Volcánica Transmexicana de México (GenBank #JN704827; Garibay-Orijel et al., 2013). De acuerdo con el número de secuencias de esta SH en UNITE (16 registros), este taxón ha sido reportado en México y en Estados Unidos, en asociación con varias especies de *Pinus*.

Morfotipo M11: *Rhizopogon succosus* A.H. Sm., *Memoirs of the New York Botanical Garden* 14: 89 (1966)

SH1562186.08FU con *P. patula* (Figura 1M)

Morfotipo de tipo coraloide, formado por ramificación dicotómica, de coloración blanca, con presencia de rizomorfos de reducción gradual en los puntos de ramificación. La morfología del extremo distal es gradualmente agrandada. El manto es poco visible, cubierto por una red de hifas de distribución no específica. Esta secuencia coincidió en > 99 % de similitud con un esporoma identificado como *Rhizopogon superiorenensis* var. *mexicana* y recolectado en Michoacán, México (GenBank #KJ595011). *Rhizopogon superiorenensis* var. *mexicana* fue descrita de Chiapas, México por Horsford y Trappe (1980), posteriormente Miller (1986) la sinonimizó con *R. succosus*. Esta especie fue citada del noreste de México asociada a bosques de pino y pino-encino por Cázeres et al. (1992). Por lo tanto, *R. succosus* se conoce en México de Chiapas, Oaxaca, Michoacán, Nuevo León y Coahuila, así como del sur de Estados Unidos.

Morfotipo M12: *Inocybe* (Fr.) Fr., *Monographia Hymenomycetum Sueciae* 2: 346 (1863)

SH1577658.08FU con *P. patula* (Figura 1N)

Morfotipo con ramificación dicotómico-irregular, formando horquillas poco regulares de terminación redondeada (ápice aproximadamente semicircular). Su coloración es marrón en la parte más madura, mientras que en la parte más joven se torna de color ocre. El manto es visible, ligeramente brillante, no transparente, sin presencia de hifas. Esta secuencia coincidió en > 96 % de similitud con una sola secuencia de punta de raíz de *Castanea dentata* en Syracuse, NY, Estados Unidos (GenBank #JX030269). Debido a que el porcentaje de similitud no alcanzó a los 97 %, es probable que estamos en presencia de otra especie, pero es necesario realizar más estudios para definirlo.



Figura 1. Morfotipos de las raíces ectomicorrízicas de *Pinus patula* y *Quercus crassifolia* correspondiendo a 14 "Species Hypothesis" (SH) en UNITE (Tabla 2). A: M1, *Thelephora terrestris* con *P. patula*. B: M2, *Tomentella radiosa* con *P. patula* y C: con *Q. crassifolia*. D: M3, Thelephoraceae con *P. patula*. E: M4, Thelephoraceae con *Q. crassifolia*. F: M5, *Lactarius* con *P. patula* y G: con *Q. crassifolia*. H: M6, *Piloderma sphaerosporum* con *P. patula*. I: M7, *Laccaria* sect. *laccata* con *P. patula*. J: M8, *Laccaria* sect. *amethystina* con *Q. crassifolia*. K: M9, *Laccaria* con *P. patula*. L: M10, *Tuber* cf. *separans* con *P. patula*. M: M11, *Rhizopogon succosus* con *P. patula*. N: M12, *Inocybe* con *P. patula*. O: M13, *Cenococcum geophilum* con *Q. crassifolia*. P: M14, *Tylospora* con *P. patula*.

Morfotipo M13: *Cenococcum geophilum* Fr., Systema Mycologicum 3: 66 (1829)

SH2544908.08FU con *P. patula* y *Q. crassifolia* (Figura 1O)

Morfotipo sin ramificación, ocurriendo en pequeñas cantidades o solitario a lo largo de las raíces termina-

les, de coloración negro. El manto no es transparente, con hifas de color negro de distribución no específica (puede ser densamente lanudo), similares a hilos. Su morfología es variable respecto a la distribución, densidad y coloración de las hifas en puntas de raíz de *P. patula* y de *Q. crassifolia*. Estas secuencias

coincidieron en > 99 % de similitud con secuencias de puntas de raíces de un estudio realizado por Bowman & Arnold (2018) sobre la distribución de comunidades de hongos EcM asociados con *P. ponderosa* (Genbank #MG761352). Cabe resaltar que *Cenococcum geophilum* es un hongo EcM de amplia distribución y se ha reportado en todo el mundo asociado a varias especies de angiospermas y coníferas, de acuerdo con la base de datos de UNITE. Esta especie ha sido comúnmente introducida de manera artificial a los bosques desde las plántulas producidas en viveros (Southworth et al., 2009).

Morfotipo M14: *Tylospora* Donk, Taxon 9: 220 (1960)

SH1648324.08FU con *P. patula* (Figura 1P)

Morfotipo con ramificación dicotómica-irregular, de color ocre (en las partes más jóvenes el color es más claro), con el extremo distal aproximadamente semi-circular. El manto es visible, con una gran cantidad de hifas emanantes de distribución no específica que rodean las micorrizas. Esta secuencia coincidió en > 99 % de similitud con secuencias de puntas de raíz EcM, muestras ambientales y esporomas en bosque de *Pinus* spp. en Estados Unidos (Genbank #KY651100; #KP814347; Rosenthal et al., 2017) y de *Pinus monte-*

Tabla 2. Descripción de las 14 "Species Hypothesis" resultando de las búsquedas BLAST de las 26 secuencias de hongos ectomicorrízicos (EcM) en la base de datos de UNITE

Morfotipo	Hospedero	Franja/Árbol	SH (UNITE)	Taxón correspondiente	% ID (BLAST)	Accesión (GenBank)	Origen (UNITE)	Hospedero (UNITE)
M1	<i>Pinus</i>	F2/P2,P4	SH1502189.08FU	<i>Thelephora terrestris</i>	99.0	MG590062, MF162213	Lituania, Slovakia	<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Picea abies</i>
M2	<i>Pinus</i> , <i>Quercus</i>	F1/P1,Q4	SH1502402.08FU	<i>Tomentella radiosa</i>	99.5	UDB022953	Colombia	<i>Quercus</i>
M3	<i>Pinus</i>	F2/P1	SH1502494.08FU	Thelephoraceae	99.2	KX816311	USA	<i>Pinus</i> , <i>Quercus</i>
M4	<i>Quercus</i>	F2/Q3	SH1503453.08FU	Thelephoraceae	97.6	FJ901332	USA	<i>Tsuga canadensis</i>
M5	<i>Pinus</i> , <i>Quercus</i>	F1/P2,Q1,Q2	SH1519194.08FU	<i>Lactarius</i> sp.	99.0	KX899822, KX899848	USA	<i>Pinus clausa</i>
M6	<i>Pinus</i>	F1/P4; F2/P3	SH1544806.08FU	<i>Piloderma sphaerosporum</i>	99.4	MG590050, JQ711930	Lituania, Canadá	<i>Pinus</i> spp.
M7	<i>Pinus</i>	F1/P1	SH1553002.08FU	<i>Laccaria</i> sect. <i>laccata</i>	99.2	MG274060	España	<i>Quercus ilex</i>
M8	<i>Quercus</i>	F2/Q2	SH1553041.08FU	<i>Laccaria</i> sect. <i>amethystina</i>	98.9	KJ026729	México	<i>Fagus grandifolia</i>
M9	<i>Pinus</i>	F2/P4	SH1553082.08FU	<i>Laccaria</i> sp.	99.7	KR135339	México	<i>Oreomunnea mexicana</i>
M10	<i>Pinus</i>	F1/P1; F2/P3	SH1561434.08FU	<i>Tuber</i> cf. <i>separans</i>	98.3	JN704827, KC152263	México	<i>Pinus montezumae</i>
M11	<i>Pinus</i>	F2/P3	SH1562186.08FU	<i>Rhizopogon succosus</i>	99.3	KJ595011	México	no especificado
M12	<i>Pinus</i>	F1/P3	SH1577658.08FU	<i>Inocybe</i> sp.	96.3	JX030269	USA	<i>Castanea dentata</i>
M13	<i>Pinus</i> , <i>Quercus</i>	F1/P3,Q4; F2/P2,Q2	SH2544908.08FU	<i>Cenococcum geophilum</i>	99.0	MG761352	USA	<i>Pinus ponderosa</i>
M14	<i>Pinus</i>	F2/P1	SH1648324.08FU	<i>Tylospora</i> sp.	99.1	KY651100, KP814347, KU245965	USA, México	<i>Pinus</i> spp.

Franja/Árbol = número de la franja (F) y árbol (P = *Pinus patula*, Q = *Quercus crassifolia*) donde se muestreó la especie; SH = "Species Hypothesis" en UNITE a 97% de similitud; % ID = porcentaje de similitud en BLAST con la(s) secuencia(s) más similares a las nuestras; accesión = referencia en GenBank de la(s) secuencia(s) más similares a las nuestras; origen, hospedero = información en UNITE sobre las secuencias más similares a las nuestras.

zumae en México (#KU245965; Garay-Serrano *et al.*, 2018). De acuerdo con el número de secuencias de esta SH en UNITE (58 registros), es una especie abundante en Norteamérica, en asociación estricta con el género *Pinus*.

Diversidad de los hongos EcM por sitio y hospedero

Las SH con mayor frecuencia fueron *Lactarius* sp. (SH1519194.08FU, morfotipo M5) con cinco ocurrencias, *Cenococcum geophilum* (SH2544908.08FU, morfotipo M13) con cuatro y *Tomentella radiosa* (SH1502402.08FU, morfotipo M2) con tres, mientras las demás SH se detectaron en uno o en dos individuos (Tabla 2). Estos tres taxones son los únicos que se encontraron asociados a raíces de plantas jóvenes de ambos hospederos (*P. patula* y *Q. crassifolia*). *Lactarius* sp. ha sido previamente encontrada en asociación con otras especies de *Pinus* (Burke *et al.*, 2005) y suele ser una especie adaptada a perturbaciones con la capacidad de asociarse con una amplia gama de hospederos (aquí también con *Quercus*). Del mismo modo, *Cenococcum geophilum* se considera uno de los hongos EcM más ampliamente distribuido en el mundo (Obase *et al.*, 2017). Con respecto a *Tomentella radiosa*, se había detectado previamente en asociación únicamente con *Quercus*, por lo cual la presencia de ese hospedero en plantaciones de *P. patula* potencialmente favoreció su asociación con *Pinus*. Algunas especies del género *Tomentella* se encuentran entre los micobiontes más abundantes y diversos en las comunidades de hongos EcM, particularmente en regiones tropicales (Jakucs & Erös-Honti, 2008).

De las 14 SH de hongos EcM identificadas, cuatro se encontraron exclusivamente en la franja uno, siete exclusivamente en la franja dos, y tres en las dos franjas (Tabla 2). Dado que las dos franjas tienen características de vegetación, exposición y altitud similares, se esperaba tener una diversidad de hongos EcM parecida en ambos sitios. Sin embargo, se asume que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para llegar a conclusiones sobre la diversidad total de hongos EcM por sitio.

El total de SH asociadas a plantas jóvenes de *P. patula* en el sistema matarrasa fue de 12 (Tabla 2). Además de los tres taxones más frecuentes detectados en ambos hospederos (i.e. *Lactarius* sp., *Cenococcum geophilum* y *Tomentella radiosa*) se identificó a taxones de la familia Thelephoraceae (SH1502494.08FU), de los géne-

ros *Inocybe* (SH1577658.08FU), *Laccaria* (SH1553082.08FU, SH1553002.08FU), *Tuber* (SH1561434.08FU) y *Tylospora* (SH1648324.08FU), y de las especies *Piloderma sphaerosporum* (SH1544806.08FU) *Rhizopogon succosus* (SH1562186.08FU) y *Thelephora terrestris* (SH1502189.08FU). Varios de esos taxones son comunes en bosques de *Pinus* spp., i.e. *Rhizopogon*, *Tuber* o *Tylospora*, mientras otros son de amplia distribución en asociación con una gran variedad de hospederos, como *Piloderma sphaerosporum*. Especies de Thelephoraceae como *Thelephora terrestris* son conocidas por su adaptación a perturbaciones o a sitios bajo manejo forestal (Rasmussen *et al.*, 2018; Vašutová *et al.*, 2018) por lo cual no es sorprendente detectarlos en nuestro estudio. En el caso de *Inocybe* (SH1577658.08FU, previamente conocido en asociación con *Castanea*) y *Laccaria* (SH1553082.08FU, previamente conocido en asociación con *Oremunea*), su identificación en raíces EcM de plantas jóvenes de *Pinus patula* indica que esos taxones tienen la capacidad de asociarse con una gama de hospederos más amplia que lo previamente conocido. Varias especies de *Inocybe* y *Laccaria* son conocidas por asociarse con plántulas en sus primeras etapas de desarrollo, por lo que se consideran como especies pioneras en el proceso de sucesión de hongos EcM (Ishida *et al.*, 2008). Sin embargo, tales ejemplos ilustran la falta de conocimiento sobre los hongos EcM neotropicales y la necesidad de llevar a cabo más estudios sobre el tema (Corrales *et al.*, 2018).

Al comparar la comunidad de hongos EcM detectada en las raíces de plantas de *P. patula* de tres años contra los resultados reportados en adultos (25-30 años) en los mismos bosques (Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2020), encontramos que no se comparte ninguna especie de hongos EcM. Las únicas dos especies encontradas en ambos estudios fueron esporomas identificados como *Laccaria laccata* (100 % de similitud con el morfotipo M7) y *Laccaria vinaceobrunnea* (99 % de similitud con el morfotipo M8) por Rodríguez-Gutiérrez *et al.* (2020). Esos resultados confirman la necesidad de enfocar estudios sobre hongos EcM en plantas jóvenes dado que existe una sucesión de hongos en las raíces de los hospederos EcM. En consecuencia, los hongos presentes en plantas adultas de *P. patula* no corresponden con los hongos de las etapas tempranas de su desarrollo y no se pueden proponer como candidatos para proyectos de micorrización y de reforestación.

El total de SH asociadas a plantas jóvenes de *Q. crassifolia* en el sistema matarrasa fue de 5 (Tabla 2). Además de los tres taxones más frecuentes detectados con ambos hospederos (i.e. *Lactarius* sp., *Cenococcum geophilum* y *Tomentella radiosa*), se identificó a *Laccaria* sect. *amethystina* (SH1553041.08FU) previamente conocida en asociación con especies de *Quercus* y *Fagus* en México y Centroamérica (Wilson et al., 2017). También se identificó un taxón de Thelephoraceae (SH1503453.08FU) previamente conocido en asociación con plántulas de coníferas (*Tsuga canadiense*), por lo cual su presencia en plantaciones de *P. patula* potencialmente favoreció su asociación con *Quercus*. En resumen, este estudio nos indica que, después de 3 años de la extracción total de la vegetación en la zona de matarrasa, la diversidad de hongos ECM asociados a *P. patula* (12 SH) es mayor que la de *Q. crassifolia* (5 SH, Tabla 2). Este resultado no es sorprendente dado que las plántulas de *Q. crassifolia* crecen de manera espontánea en las franjas con una densidad mucho menor a la de *P. patula*. Además, las plántulas de *P. patula* pueden traer cierta diversidad de especies de hongos EcM exóticas desde el vivero donde fueron producidas, como el caso de *Thelephora terrestris* y *Cenococcum geophilum* (Ángeles-Argáiz et al., 2016; Southworth et al., 2009).

En general, la composición de hongos EcM encontrados en este trabajo es similar a las especies que se reportan en otros estudios relacionados con las comunidades EcM en rodales de *P. ponderosa* y *P. contorta* maduros (con edades mayores a 100 años) como son: *Cenococcum geophilum*, *Inocybe*, *Rhizopogon*, *Tomentella*, *Lactarius*, o *Thelephora* (García et al., 2016). En otro estudio sobre los cambios espaciotemporales en las comunidades de hongos EcM asociados a *P. montezumae*, se encontraron los géneros *Cenococcum*, *Laccaria*, *Tomentella*, *Inocybe* y *Lactarius*, entre otros taxones similares a este estudio (Reverchon et al., 2010).

Aplicaciones del conocimiento sobre los hongos EcM al manejo forestal

Varios estudios han demostrado los efectos de la inoculación de hongos ECM con especies forestales de interés económico. Por ejemplo, se evaluó la eficacia de los hongos EcM *Laccaria laccata* y *Thelephora terrestris* en el crecimiento y desarrollo micorrízico de plántulas de *P. patula* y se encontraron valores signifi-

ficativos en la altura y el peso de las plántulas (Reddy y Natarajan, 1997). Por su parte, Selosse et al. (2000) evaluaron el efecto de la inoculación del hongo EcM *Laccaria bicolor* con *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) y encontraron que las plántulas inoculadas aumentaron en un 60 % el volumen total de madera producida en 8 años después de la siembra, en comparación con los árboles no inoculados. En otro estudio, plantas de *P. patula* y *P. greggii* inoculadas con *Laccaria laccata*, *Suillus pseudobrevipes* y *Boletus clavipes* presentaron valores medios más altos en altura, peso seco y diámetro del tallo, en comparación con el testigo (Carra-Nieva y López-Ríos, 2004). Con respecto a lo anterior, los hongos EcM encontrados en este estudio, en particular especies nativas de los géneros *Laccaria* e *Inocybe* y de la familia Thelephoraceae, podrían evaluarse para conocer los efectos de su inoculación sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de *P. patula* en vivero. Es necesario evaluar primero la eficiencia de las inoculaciones sobre el crecimiento de plántulas de *P. patula* y la obtención de inóculo en cantidad adecuada (usando esporomas o cultivos de cepas). Por lo tanto, los hongos EcM identificados en ese estudio podrían ser utilizados para la producción masiva de plántulas en viveros a nivel local y regional, ya que *P. patula* es una especie forestal de gran importancia ecológica y económica en toda la Sierra Juárez de Oaxaca.

Las asociaciones EcM son integrales para la salud de los bosques, su productividad y la recuperación por perturbaciones (Rudgers et al., 2004). Por lo tanto, los hongos EcM son clave para la efectividad en el establecimiento de las plántulas de *P. patula* en las franjas de matarrasa. Teniendo en cuenta que los sitios de muestreo seleccionados contaban con características similares (reforestación con *P. patula* y rebrotes de *Quercus* nativos), podemos afirmar que la proximidad del bosque, con una vegetación nativa y sana de pino-encino contigua a las franjas, favorece a la diversidad de hongos EcM en las plantaciones de *P. patula*. La diversidad de hongos EcM es un componente esencial en la resiliencia del ecosistema al cambio (Klein et al., 2016). Gracias al banco de hongos EcM en los suelos forestales en la cercanía de las plantaciones, la adaptabilidad ecológica de *P. patula* en los rodales frente a estreses ambientales, tales como sequías o cambio climático global, se ve favorecida. Es necesario estudiar las interacciones planta-suelo entre especies de plantas en condiciones naturales y en plantaciones. Sin

embargo, por la proximidad del bosque nativo, el sistema matarrasa permite el manejo sustentable de los bosques por mantener la diversidad de microorganismos en el suelo y permitir la regeneración del bosque nativo desde el banco de esporas de hongos EcM en el suelo (Policelli *et al.*, 2020).

Las redes de hongos EcM en el suelo son un componente importante del ecosistema y pueden ser beneficiosas para la supervivencia y el crecimiento de las plántulas (García *et al.*, 2016). A los pocos días de su germinación, las raíces finas de *P. patula* son colonizadas por hongos EcM que desempeñan un papel importante en la función y dinámica de comunidades de plantas por su interacción mutualista (Peay *et al.*, 2008). Lo anterior nos lleva a determinar que *P. patula* puede establecerse de manera exitosa mediante reforestaciones en las franjas de matarrasa porque sus raíces logran ser colonizadas por hongos EcM, algunos de los cuales comparte con *Q. crassifolia*. Para reforzar los resultados de esta investigación, es necesario realizar estudios en una mayor cantidad de sitios de muestreo, en las diferentes épocas del año y con árboles de distintas edades, de manera que se pueda conocer con mayor claridad la diversidad global de los hongos EcM en toda el área que abarca el sistema matarrasa. Sin embargo, este trabajo permitió fortalecer el conocimiento sobre la interacción simbiótica de los hongos EcM con la especie forestal maderable *P. patula* y otras especies de importancia económica en el bosque de Ixtlán de Juárez.

CONCLUSIONES

Los hongos EcM juegan un papel esencial en el establecimiento y el funcionamiento de las poblaciones de *P. patula* y de *Q. crassifolia* en las franjas en el sistema matarrasa, y son un factor crucial en la salud de las especies forestales de potencial económico. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron caracterizar la diversidad de los hongos EcM más frecuentes en las raíces de individuos jóvenes de *P. patula* y de *Q. crassifolia*, mediante su descripción morfológica e identificación molecular. Ese trabajo servirá como punto de partida para estudios futuros sobre las interacciones que se dan entre los hongos EcM y las especies forestales en el sistema de aprovechamiento matarrasa en la Sierra de Juárez, ya que tienen implicaciones importantes sobre las especies utilizadas en el aprovechamiento

forestal maderable. Se sugiere indagar más sobre los resultados de las SH encontradas en este estudio, por ejemplo para utilizarlas como inóculo en la producción de plantas de *P. patula* en vivero e incluir a los hongos EcM en los planes de manejo forestal sustentable en la comunidad de Ixtlán de Juárez.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Comisariado de Bienes Comunales y Servicios Técnicos de la Unión Forestal Santo Tomás Ixtlán, por permitir el acceso al área de manejo forestal en la comunidad de Ixtlán de Juárez. Laura Márquez y Nelly López realizaron la secuenciación de las muestras en el laboratorio de Biología Molecular y de la Salud del IB- UNAM. Esta investigación forma parte de los productos generados del proyecto de investigación "Comunidades bacterianas asociadas a ectomicorrizas en *Pinus patula* y su aplicación Biotecnológica" financiado por el programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP), a través del apoyo Fortalecimiento de Cuerpos Académicos con Clave PRODEP UNSIJ-CA-7.

LITERATURA CITADA

- Ángeles-Argáiz, R.E., A. Flores-García, M. Ulloa, R. Garibay-Orijel, 2016. Commercial *Sphagnum* peat moss is a vector for exotic ectomycorrhizal mushrooms. *Biological Invasions* 18: 89-101. Doi: 10.1007/s10530-015-0992-2
- Badotti, F., F. Silva de Oliveira, C. Fernando Garcia, A.B. Martins Vaz, P.L. Camargos Fonseca, L. Alves Nahum, G. Oliveira, A. Góes-Neto, 2017. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology* 17: 42. Doi: 10.1186/s12866-017-0958-x
- Bowman, E.A., A.E. Arnold, 2018. Distributions of ectomycorrhizal and foliar endophytic fungal communities associated with *Pinus ponderosa* along a spatially constrained elevation gradient. *American Journal of Botany* 105: 687-699. Doi: 10.1002/ajb2.1072
- Brundrett, M.C., L. Tedersoo, 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220: 1108-1115. Doi: 10.1111/nph.14976
- Burke, D.J., K.J. Martin, P.T. Rygielwicz, M.A. Topa, 2005. Ectomycorrhizal fungi identification in single and pooled root samples: terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and morphotyping compared. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1683-1694. Doi: 10.1016/j.soilbio.2005.01.028
- Carrera-Nieva, A., G.F. López-Ríos, 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10: 93-98.
- Cázares, E., J. García, J. Castillo, J.M. Trappe, 1992. Hypogeous fungi from northern Mexico. *Mycologia* 84: 341-359. Doi: 10.2307/3760186

- CONAFOR, 2015. Estudio de cuenca de abasto para el desarrollo industrial forestal maderable de la región Sierra Juárez, Oaxaca. Ciclo Forestal Región Sierra Juárez. Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/22/6398Sierra%20Norte%20de%20Oaxaca.pdf>
- CONAFOR, 2019. *Pinus patula* Schl. et Cham. Sistema de Información de Reforestación (SIRE) - Paquetes tecnológicos. Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/975Pinus%20patula.pdf>
- Corrales, A., T.W. Henkel, M.E. Smith, 2018. Ectomycorrhizal associations in the tropics - biogeography, diversity patterns and ecosystem roles. *New Phytologist* 220: 1076-1091. Doi: 10.1111/nph.15151
- FSC, 2001. Resumen público de certificación, Comunidad Ixtlán de Juárez. Certificado SW-FM/COC-147. Forest Stewardship Council & SmartWood. Disponible en: <https://www.rainforest-alliance.org/business/forestry/documents/comunidad-ixtlan.pdf>
- Garay-Serrano, E., V.M. Bandala, L. Montoya, 2012. Morphological and molecular identification of the ectomycorrhizal association of *Lactarius fimosibrunneus* and *Fagus grandifolia* var. *mexicana* trees in eastern Mexico. *Mycorrhiza* 22: 583-588. Doi: 10.1007/s00572-012-0435-1
- Garay-Serrano, E., M. del Pilar Ortega-Larrocea, F. Reverchon, I. Suárez-Quijada, 2018. Persistence of ecto- and ectendomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* in experimental microcosms. *Symbiosis* 74: 67-78. Doi: 10.1007/s13199-017-0496-1
- García, M.O., J.E. Smith, D.L. Luoma, M.D. Jones, 2016. Ectomycorrhizal communities of ponderosa pine and lodgepole pine in the south-central Oregon pumice zone. *Mycorrhiza* 26: 275-286. Doi: 10.1007/s00572-015-0668-x
- Gardes, M., T.D. Bruns, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118. Doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
- Garibay-Orjuel, R., E. Morales-Marañón, M. Domínguez-Gutiérrez, A. Flores-García, 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. Doi: 10.7550/rmb.29839
- Horsford, D.R., J.M. Trappe, 1980. Taxonomic studies on the genus *Rhizopogon*, II. Notes and new records of species from Mexico and Caribbean countries. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 14: 3-15.
- Ishida, T.A., K. Nara, M. Tanaka, A. Kinoshita, T. Hogetsu, 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180: 491-500. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02572.x
- Jakucs, E., Z. Erős-Honti, 2008. Morphological-anatomical characterization and identification of *Tomentella* ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* 18: 277-285. Doi: 10.1007/s00572-008-0183-4
- Jones, M.D., L.A. Phillips, R. Treu, V. Ward, S.M. Berch, 2012. Functional responses of ectomycorrhizal fungal communities to long-term fertilization of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud. var. *latifolia* Engelm.) stands in central British Columbia. *Applied Soil Ecology* 60: 29-40. Doi: 10.1016/j.apsoil.2012.01.010
- Klein, T., R.T.W. Siegwolf, C. Körner, 2016. Belowground carbon trade among tall trees in a temperate forest. *Science* 352: 342-344. Doi: 10.1126/science.aad6188
- Kõljalg, U., K. Larsson, K. Abarenkov, R.H. Nilsson, I.J. Alexander, U. Eberhardt, S. Erland, K. Hoiland, R. Kjøller, E. Larsson, T. Pennanen, R. Sen, A.F.S. Taylor, L. Tedersoo, T. Vralstad, B.M. Ursing, 2005. UNITE : a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166: 1063-1068. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01376.x
- Kõljalg, U., R.H. Nilsson, K. Abarenkov, L. Tedersoo, A.F.S. Taylor, M. Bahram, B. Douglas, 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22: 5271-5277. Doi: 10.1111/mec.12481
- López-García, Á., M. Gil-Martínez, C.M. Navarro-Fernández, R. Kjoller, C. Azcón-Aguilar, M.T. Domínguez, T. Marañón, 2018. Functional diversity of ectomycorrhizal fungal communities is reduced by trace element contamination. *Soil Biology and Biochemistry* 121: 202-211. Doi: 10.1016/j.soilbio.2018.03.021
- Martin, F., A. Kohler, C. Murat, C. Veneault-Fourrey, D.S. Hibbett, 2016. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 14: 760-773. Doi: 10.1038/nrmicro.2016.149
- Miller, S.L, 1986. Hypogeous fungi from the southeastern United States I. The genus *Rhizopogon*. *Mycotaxon* 27: 193-218.
- Obase, K., G.W. Douhan, Y. Matsuda, M.E. Smith, 2017. Progress and challenges in understanding the biology, diversity and biogeography of *Cenococcum geophilum*. *Ecological Studies* 230: 299-317. Doi: 10.1007/978-3-319-56363-3_14
- Ordóñez Díaz, J.A.B, 2008. Cómo entender el manejo forestal, la captura de carbono y el pago de servicios ambientales. *Ciencias* 90: 37-42.
- Parrent, J.L., R. Vilgalys, 2007. Biomass and compositional responses of ectomycorrhizal fungal hyphae to elevated CO₂ and nitrogen fertilization. *New Phytologist* 176: 164-174. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02155.x
- Peay, K.G., P.G. Kennedy, T.D. Bruns, 2008. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience* 58: 799-810. Doi: 10.1641/B580907
- Perry Jr., J.P., 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland.
- Policelli, N., T.R. Horton, A.T. Hudon, T.R. Patterson, J.M. Bhatnagar, 2020. Back to roots: The role of ectomycorrhizal fungi in boreal and temperate forest restoration. *Frontiers in Forest and Global Change* 3: 97. Doi: 10.3389/ffgc.2020.00097
- Rasmussen, A.L., J.S. Brewer, C.R. Jackson, J.D. Hoeksema, 2018. Tree thinning and fire affect ectomycorrhizal fungal communities and enzyme activities. *Ecosphere* 9: 1-15. Doi: 10.1002/ecs2.2471
- Reddy, M.S., K. Natarajan, 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7: 133-138. Doi: 10.1007/s005720050173
- Reverchon, F., M.D.P. Ortega-Larrocea, J. Perez-Moreno, V.M. Pena-Ramirez, C. Siebe, 2010. Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* across

- a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, Mexico. *Canadian Journal of Forest Research* 40: 1165-1174. Doi: 10.1139/X10-062
- Rodríguez-Gutiérrez, I., R. Garibay-Orijel, B. Santiago Morales, R. Lindig Cisneros, 2020. Comparación entre la abundancia de esporomas y ectomicorrizas del género *Laccaria* en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 91: e913340. Doi: 10.22201/ib.20078706e.2020.91.3340
- Rosenthal, L.M., K.H. Larsson, S. Branco, J.A. Chung, S.I. Glassman, H.L. Liao, E.C. Vellinga, 2017. Survey of corticioid fungi in North American pinaceous forests reveals hyperdiversity, underpopulated sequence databases, and species that are potentially ectomycorrhizal. *Mycologia* 109: 115-127. Doi: 10.1080/00275514.2017.1281677
- Rúa, M.A., 2017. Disturbance history and environmental characteristics shape the ectomycorrhizal fungal community of two varieties of *Pinus clausa*. Disponible en: <https://corescholar.libraries.wright.edu/biology/650/>
- Rudgers, J.A., J.M. Koslow, K. Clay, 2004. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters* 7: 42-51. Doi: 10.1046/j.1461-0248.2003.00543.x
- Rzedowski, J., G. Calderón de Rzedowski, 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro.
- Sáenz-Romero, C., J. Beaulieu, G.E. Rehfeldt, 2011. Variación genética altitudinal entre poblaciones de *Pinus patula*. *Agrociencia* 45: 399-411.
- Schoch, C.L., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, Fungal Barcoding Consortium, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6241-6246. Doi: 10.1073/pnas.1117018109
- Selosse, M.A., D. Bouchard, F. Martin, F.L. Tacon, 2000. Effect of *Laccaria bicolor* strains inoculated on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) several years after nursery inoculation. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 360-371. Doi: 10.1139/cjfr-30-3-360
- Southworth, D., E.M. Carrington, J.L. Frank, P. Gould, C.A. Harrington, W.D. Devin, 2009. Mycorrhizas on nursery and field seedlings of *Quercus garryana*. *Mycorrhiza* 19: 149-158. Doi: 10.1007/s00572-008-0222-1
- Tedersoo, L., M.E. Smith, 2013. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews* 27: 83-99. Doi: 10.1016/j.fbr.2013.09.001
- Tedersoo, L., M. Bahram, S. Pölme, U. Kõljalg, S.N. Yarrow et al., 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346: 1256688. Doi: 10.1126/science.1256688
- Vašutová, M., M. Edwards-Jonášová, P. Veselá, L. Effenberková, P. Fleischer, P. Cudlín, 2018. Management regime is the most important factor influencing ectomycorrhizal species community in Norway spruce forests after windthrow. *Mycorrhiza* 28: 221-233. Doi: 10.1007/s00572-018-0820-5
- White, T.J., T.D. Bruns, S. Lee, J. Taylor, M.A. Innis et al., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Cambridge. Pp. 315-322. Doi: 10.1016/0307-4412(91)90165-5
- Wilson, A.W., K. Hosaka, G.M. Mueller, 2017. Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist* 213: 1862-1873. Doi: 10.1111/nph.14270