



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

Diversidad de la familia Russulaceae (Fungi,
Agaricomycetes)

asociada con *Monotropia uniflora* (Ericaceae) en el
Parque Nacional La Malinche

T E S I S

QUÉ PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Jesús Pérez Santiago

Directora: Dra. Adriana Montoya Esquivel



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

Diversidad de la familia Russulaceae (Fungi,
Agaricomycetes)

asociada con *Monotropia uniflora* (Ericaceae) en el
Parque Nacional La Malinche

T E S I S

QUÉ PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Jesús Pérez Santiago

Comité tutorial

Directora: Dra. Adriana Montoya Esquivel

Comité tutorial: Dr. Roberto Garibay Orijel

Dra. Ma. Guadalupe Santiago Martínez

M. en C. Gema Galindo Flores

M. en C. Alejandro Kong Luz

Hoja de financiamiento

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB), en el Laboratorio de Biodiversidad de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, y en el Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).

Agradecimientos

- Primero al Posgrado del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC), que pertenece a la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT).
- A la beca otorgada por el CONACYT, con número de CVU 399837, del periodo 2011-2013.
- Y a los miembros del comité: al M. en C. Alejandro Kong luz, a la Dra. Adriana Montoya Esquivel, a la Dra. Ma. Guadalupe Santiago martinez, al Dr. Roberto Garibay Orijel, a la M.enC. Gema Galindo Flores y a la Dra. Citlalli Castillo Guevara.

Agradecimientos a título personal

Le doy gracias a mis padres, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una buena educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanos Adriana y Amaury por ser parte de mi vida y representar la unidad familiar, así como llenar mi vida de alegrías cuando más lo he necesitado.

A ti, por ser una parte muy importante de mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, pero sobre todo por tu amor incondicional.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mis profesores: Gema Galindo, Lupita Santiago, Citlalli Castillo, por haber compartido conmigo sus conocimientos.

Gracias al Maestro Alejandro Kong, por haber creído en mí y ser una guía en todo este proceso, por su paciencia, perseverancia, conocimientos y sabios consejos que recibí de su parte, pero sobre todo por su amistad que formamos a lo largo de esta etapa.

A la doctora Adriana Montoya, por guiarme, entenderme y tener mucha paciencia conmigo a lo largo de este proceso, por sus sabios consejos y sus conocimientos.

A mis compañeros y amigos, Andrés, Aldo, Altayra, Yeny, Vanesa, Mary, Fer, Chava, Armando, Fernando Z, por confiar y creer en mí, pero más que nada haber hecho de mi etapa de Maestría un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

Y a todos los que olvidé mencionar pero formaron parte directa o indirectamente de esta etapa de mi vida, solo me resta decirles: Gracias.

Dedicatoria

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Por sus consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles. Me han dado todo lo que soy como persona, valores, principios, carácter, empeño, perseverancia y coraje para conseguir mis objetivos. Porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles, y porque el orgullo que sienten por mí, fue el motor que me hizo ir hasta el final.

Gracias.

Resumen

En la actualidad se desconocen qué especies de hongos se asocian a *Monotropa uniflora* en México, el conocimiento sobre su identidad y diversidad posibilitará un mejor entendimiento acerca de esta asociación y de los patrones de distribución y diversidad que presentan las especies de la familia Russulaceae asociadas a esta planta. Por lo tanto este trabajo tiene como objetivos conocer la diversidad de hongos de la familia Russulaceae asociados con *M. uniflora* en el Parque Nacional La Malinche, así como conocer qué especies son las que se asocian con *Monotropa uniflora*. El sitio de muestreo del presente trabajo fue la cañada grande dentro del PNLN, donde se procedió a seleccionar 12 plantas de *M. uniflora* al azar separadas por lo menos 100m una de otra, cada una se tomo como unidad de muestreo. Dentro de las 12 unidades de muestreo se registraron 14 especies de Russulaceae, 5 del género *Lactarius* y 9 de *Russula*. El mayor número de especies dentro una unidad de muestreo fue de 8 y el menor de 2. En total se recolectaron 671 basidiomas, 131 pertenecientes a *Lactarius* y 540 a *Russula*, que representan el 19.5% y 80.5% respectivamente. Con base en el inverso de Simpson (1-D) las unidades de muestreo con los valores más altos fueron las unidades de muestreo Mu1, Mu5 y Mu7, considerando a estas como las más diversas, por el contrario las unidades que presentaron las diversidades más bajas fueron la Mu8 y Mu10 con dos y cuatro especies respectivamente. La riqueza de hongos de la familia Russulaceae asociada a las raíces de *Monotropa uniflora* es más baja en comparación con la diversidad observada alrededor de las plantas, tres y 14 especies respectivamente. Se secuenciaron 13 de las 14 especies de basidiomas y para las micorrizas se obtuvieron seis secuencias de las unidades de muestroMu4, Mu6, Mu7, Mu9, Mu10 y Mu12, dichas secuencias fueron utilizadas en los análisis de máxima verosimilitud donde se observo que las micorrizas 4, 6, 9 y 10 se agrupan dentro de la sección urentinae, mientras que la Mu12 se agrupa dentro de la sección maculatinae y la micorriza 7 se agrupo dentro del subgénero *Compacta* sección Plorantinae. *Russula* fc. *olivobrunnea* se presentó en las raíces micorrizadas de cuatro de las seis plantas de *M. uniflora* estudiadas, fue la especie con mayor abundancia por número de basidiomas y la especie más abundante en seis de las diez unidades de muestreo en donde se presentó. *Russula*

aff. brevipes y *R. aff. globispora*, las otras dos especies presentes en las micorrizas de *M. uniflora*, no estuvieron representadas en forma de basidiomas dentro de las unidades de muestreo. La riqueza de hongos de la familia Russulaceae asociada a las raíces de *M. uniflora* es más baja en comparación con la diversidad observada alrededor de las plantas, tres y 14 especies respectivamente, La identificación de las especies asociadas a las raíces de *Monotropa uniflora* con base en caracteres moleculares se ve limitada por el número de secuencias que se pueden comparar. Sin embargo, su posición sistemática a nivel de subgéneros y secciones sí es posible.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Familia Russulaceae	2
2.2. <i>Monotropa uniflora</i> (Ericaceae)	6
2.3 <i>Abies religiosa</i>	12
2.4 Parque nacional la malinche (PNLM)	13
3. Justificación	14
4. Planteamiento del problema	15
5. Hipótesis	15
6. Objetivos.....	15
6.1 Objetivo general.....	16
6.2 Objetivos particulares.....	16
7. Metodología	16
7.1 Área de estudio	16
7.2 Sitios de muestreo.....	17
7.3 Muestreo de basidiomas.....	19
7.4 Diversidad.....	19
7.5 Técnicas moleculares.....	20
7.6 Exploración de la identidad y posición sistemática de los hongos asociados.....	22
8. Resultados.....	23
8.1 Diversidad de especies de la familia Russulaceae con base en los basidiomas recolectados alrededor de las plantas de <i>Monotropa uniflora</i>	23
8.2 Identidad y posición sistemática de los hongos asociados con las raíces de <i>Monotropa uniflora</i>	38

9. Discusión	53
10. Conclusión	59
11. Perspectivas	60
12. Referencias	60
13. Anexos.....	71

Índice de figuras

Figura 1. Especies de Russulaceae asociada a <i>M. uniflora</i> en América.....	9
Figura 2.- Sitio de muestreo (cañada grande).....	18
Figura 3.- Regiones ITS.....	22
Figura 4.- Abundancia de basidiomas por especie.....	29
Figura 5.- Abundancia de basidiomas por unidad de muestreo.....	45
Figura 6.- Árbol de máxima verosimilitud (Géneros).....	47
Figura 7.- Árbol de máxima verosimilitud (Subgéneros).....	49
Figura 8.- Árbol de máxima verosimilitud (Secciones de los subgéneros <i>Coccinula</i> , <i>Tenellula</i> e <i>Insidiosula</i>).....	51
Figura 9.- Árbol de máxima verosimilitud (Secciones del subgénero <i>compacta</i>	54

Índice de tablas

Tabla 1.- Abundancia de basidiomas por especie en cada unidad de muestreo.....	23
Tabla 2.- Frecuencia de especies en cada unidad de muestreo	25
Tabla 3.- Índice de diversidad para cada una de las unidades de muestreo.....	26

Tabla 4.- Comparación entre las secuencias obtenidas (basidiomas) con las bases de datos.....	31
Tabla 5.- Comparación entre las secuencias obtenidas (micorrizas) con las bases de datos.....	38
Tabla 6.- Especies representativas de los géneros Russulaceae, subgéneros y secciones.....	42
Tabla 7.- Identidad y posición sistemática de los hongos asociados a las raíces.....	52

INTRODUCCIÓN

Los hongos de la familia Russulaceae se encuentran ampliamente distribuidos en varios ecosistemas forestales (Singer 1986) y se han descrito aproximadamente 1250 especies a nivel mundial. Los principales géneros son *Russula* y *Lactarius*, que representan aproximadamente el 60 y 30% de la diversidad dentro de la familia respectivamente (Rinaldi y cols. 2008). El resto de las especies se encuentran distribuidas en otros 2 géneros (*Lactifluus* y *Multifurca*) que representan el otro 10 % de la diversidad de la familia (Buyck y cols. 2008). La mayoría de las especies forman ectomicorriza, una asociación entre el micelio del hongo y las raíces de las plantas, dicha asociación promueve la captación de nutrientes, proporcionando diversos beneficios fisiológicos y ecológicos a los simbioses (Molina y cols. 1992; Read y Pérez-Moreno 2003). La familia es frecuente y abundante en los bosques de coníferas de las regiones boreales y en los bosques templados, en donde se asocia principalmente con plantas de las familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae y Salicaceae (Malloch y cols. 1980; Dahlberg 2001).

La especificidad en la ectomicorriza es relativamente alta, debido a que existen pocas especies de Russulaceae que se asocien con diferentes géneros de plantas y por lo tanto, se encuentran estrechamente ligadas con la distribución de éstos (Molina y cols. 1992). Estudios recientes han mostrado que algunas especies de la familia Russulaceae (*R. brevipes*, *R. paludosa*, *R. cremicolor*, *R. postiana*, *R. integra*, *R. raoultii*, *R. nítida*, *R. nauseosa*, *L. theiogalus*) se encuentran asociadas de manera muy específica con *Monotropa uniflora* (Bidartondo y Bruns 2001, 2005; Taylor y cols. 2002), una planta de la familia Ericaceae, que por carecer de clorofila, se considera micoheterótrofa, es decir, que obtiene sus nutrientes y carbono orgánico de otras plantas que realizan fotosíntesis a través de un enlace fúngico, que conecta la ectomicorriza que forman las plantas autótrofas y los hongos, con la micorriza de *M. uniflora* (Young y cols. 2002; Berch y cols. 2005). Ésta se caracteriza por formar un tipo de micorriza que presenta manto y red de Hartig; sin embargo, la diferencia radica en qué ésta presenta una hifa de penetración, por lo cual se le ha llamado micorriza monotrofoide. Esta micorriza se presenta en plantas de la subfamilia Monotropoideae de la familia Ericaceae

(Smith y Read 1997). Además, se ha observado que la riqueza de especies de Russulaceae asociadas con *M. uniflora* es relativamente baja, reportándose para Norteamérica aproximadamente 20 especies, en comparación con las más de 500 especies de Russulaceae que se conocen para esta región (Yang y Pfister 2006).

Por otra parte, las condiciones de ubicación, topografía y clima que presenta México, junto con su historia geológica y biológica, han permitido la diversificación de varios linajes de plantas, como es el caso particular de *A. religiosa*, que forma parte importante de los bosques de México y en particular en zonas de alta montaña, formando bosques que pueden estar intercalados con especies de *Pinus* y *Quercus*, siendo así una especie clave en la dinámica de los bosques mexicanos.

El conocimiento que se tiene en México sobre la dinámica de los bosques en especial de *A. religiosa* y de esta familia de hongos (Russulaceae) es aun pobre, esto se debe a que existen grandes áreas que no han sido exploradas desde el punto de vista micológico y más aun a la carencia de estudios taxonómicos que ayuden a conocer la diversidad y dinámica de estos organismos en nuestro país. Específicamente para El Parque Nacional la Malinche no existe registro sobre la dinámica y distribución de la familia Russulaceae asociada con *M. uniflora*, a pesar de que dicha planta es muy abundante en la zona (cañada grande), un estudio sobre la diversidad de esta familia asociada a *M. uniflora* nos permitirá un mejor entendimiento sobre la dinámica de las especies fúngicas y su interacción con el bosque de *A. religiosa* en el Parque Nacional La Malinche.

ANTECEDENTES

Familia Russulaceae

La familia *Russulaceae* está formada por un grupo de hongos macroscópicos que se encuentran distribuidos ampliamente en varios ecosistemas forestales, tales como bosques

templados, regiones alpinas, regiones boreales, bosques mediterráneos y algunas áreas tropicales y subtropicales (Tedersoo y cols. 2010). Un estudio reciente sobre la filogenia molecular de la familia (Buyck y cols. 2008) demostró la existencia de cuatro grandes clados para las especies que actualmente se aceptan dentro de la familia *Russulaceae*. Ese mismo estudio sugiere interpretar estos clados en cuatro géneros filogenéticamente distintivos: 1) *Multifurca*.- que incluye a las especies anteriormente asignadas a *Russula* sección *Compactae* subsección *Ochricompectae* y también a *L. furcatus* 2) *Russula*.- el resto de las especies de *Russula* forman un clado monofilético y consistente, incluyendo a las formas secotioides y gasteroides de los géneros *Cystangium*, *Gymnomyces* y *Macowanites*, 3) *Lactarius*.- que incluye a las especies actualmente clasificadas dentro de *Lactarius* subgénero *Piperites* (Fr. ex J. Kickxf.) Kauffman, subgénero *Russularia* (Fr. ex Burl.) Kauffman, subgénero *Plinthogali* (Burl.), subgénero *Colorati* (Bataille) Bon, subgénero *Rhysocybella* Bon y además de las formas secotioides y gasteroides de los géneros *Arcangeliella* y *Gastrolactarius*, 4) *Lactifluus*.- que incluye a las especies actualmente clasificadas dentro de *Lactarius* subgénero *Lactifluus* (Pers.) Hesler y A.H. Sm., subgénero *Lactariopsis* (Henn.) R. Heim, subgénero *Russulopsis* Verbeken, *Lactarius* sección *Edulis* Verbeken, sección *Panuoidea* Singer y *Lactarius* serie *Gerardii* A.H. Sm. y Hesler (Buyck y cols. 2010).

Las especies de esta familia se caracterizan por producir cuerpos fructíferos cuyo estipite tiene una consistencia friable, parecida a la de la tiza, que se parten con un crujido similar al de la manzana. Observada al microscopio, la estructura no está completamente formada por finas hifas, sino que contiene abundantes células esféricas que aportan consistencia a la carne de la seta (Kirk y cols. 2008).

Casi todas las especies de *Russulaceae* conocidas forman ectomicorriza, una asociación entre el micelio del hongo y las raíces de plantas. En general esta asociación es mutualista y promueve la captación e intercambio de nutrientes, proporcionando diversos beneficios fisiológicos y ecológicos a los involucrados (Read y Pérez-Moreno 2003). Numerosos estudios han demostrado que miembros de la familia *Russulaceae* son de las especies de hongos ectomicorrizógenos más frecuentes y abundantes que se encuentran asociadas con las raíces de *Pinaceae* y *Fagaceae* en Europa, Asia y Norteamérica (Horton y

Bruns 2001; Richard y cols. 2004; Taniguchi y cols. 2009).

Particularmente para México los géneros más estudiados de la familia Russulaceae son *Russula* y *Lactarius*. La primera especie registrada para México de *Lactarius* fue *L. deliciosus* (Gándara 1929-1931); por su parte Sharp (1945) registró a *L. indigo* y tres años más tarde citó a *L. peckii*, Heim (1953) reportó a *L. salmonicolor* en los bosques de *A. religiosa* en el Estado de México. Singer (1957) registró a *L. fuliginosus* en Oaxaca y a *L. scrobiculatus* en el Estado de México.

Los primeros micólogos Mexicanos en estudiar especies del género *Lactarius* fueron Guzmán y Herrera (1961). Guzmán (1961) registró a *L. torminosus* y a *L. rufus*. Después de unos años (1966) citó a *L. mitissimus*. La primera especie mexicana de *Lactarius* propuesta como nueva fue *L. veraecrucis* descrita por Singer (1973) recolectada en los Tuxtlas, Veracruz.

Guzmán (1977) registró a *L. camphoratus*, *L. chrysorhenus*, *L. volemus*, *L. deceptivus*, *L. sanguifluus*, *L. subdulcis*, *L. tabidus* y *L. zonarius* sin indicar las localidades de sus registros. Por su parte Castillo (1979) registró a *L. insulsus* en el estado de Nuevo León; Guzmán (1983) a *L. neotropicus* en Quintana Roo, Martínez-Alfaro (1983) a *L. representaneus* en Puebla; Chacón y col. (1984) a *L. hygrophoroides* en el estado de Chiapas; Pérez-Silvia y Aguirre-Acosta (1985) a *L. quietus* y *L. uvidus* de Durango y a *L. pallidus* y *L. rugatus* de Chihuahua.

Hasta 1994, 68 taxa del género se habían registrado para México. Considerando que México presenta una mayor diversidad biológica que Estados Unidos y Canadá (Hesler y Smith 1979) el conocimiento en México parece aún pobre.

Por su parte Montoya (2000) realizó un estudio taxonómico y cronológico del género *Lactarius* en México y reconoció un total de 70 especies de *Lactarius* (32 de las cuales correspondieron a nuevos registros para el país).

Particularmente para el estado de Tlaxcala, el primer registro del género fue hecho por González (1987) quién citó a cinco especies: *L. deliciosus*, *L. indigo*, *L. salmonicolor*, *L. scrobiculatus* y *L. torminosus* reportando las primeras cuatro en el Volcán La Malintzi. Por su parte Santiago y cols. (1990), registraron a *L. deliciosus*, *L. indigo* y *L. salmonicolor* para el estado. Acosta y Kong (1991) citaron a *L. salmonicolor* en La Cañada Grande de la Malintzi; Estrada-Torres y cols. (1991) enlistaron las especies conocidas de Tlaxcala reportando a *L. chelidonium* var. *chelidonioides*, *L. deliciosus*, *L. indigo*, *L. salmonicolor* y *L. zonarius*; Por su parte Kong y Estrada-Torres (1994) describieron a *L. mexicanus*; Montoya (1994) registró a *L. deliciosus* var. *olivaceosordidus*, *L. indigo*, *L. salmonicolor*, *L. torminosus* var. *torminosus* y *L. uvidus* var. *uvidus* para el estado de Tlaxcala, citando a las cuatro primeras del Volcán La Malintzi, finalmente Kong (1995) en su tesis reporta catorce taxas del género *lactarius* en el volcán La Malintzi de los cuales cinco pertenecen al subgénero *Lactarius*, cinco al subgénero *Piperites* dos al subgénero *Tristes* y dos al sugénero *Russularia*.

Para el caso del género *Russula*, Burlingham (1911) fue la primera persona que estudió y describió una especie mexicana del género *Russula*. La llamó *R. mexicana* recolectada a los alrededores de Xalapa, Veracruz. Desde que fue descrita esta primera especie, se han reportado alrededor de 70 especies del género para nuestro país, Kong (2005). En la literatura mexicana existe una clave para 13 especies, elaborada por Guzmán (1977) con base en características macroscópicas. Además, existen descripciones de aproximadamente 30 especies (Guzmán 1961; Guzmán 1977; Valenzuela y cols. 1981; García y cols. 1998). Sin embargo, la mayoría de estas descripciones son breves y no cuentan con muchos de los datos más importantes para la identificación o carecen de buenas ilustraciones.

Específicamente para el estado de Tlaxcala se han reportado 25 especies del género *Russula*, de las cuales seis proceden del Parque Nacional La Malinche. Valenzuela y cols., (1981) registraron a *Russula olivacea* de la Sierra de Tlaxco. González-Fuentes (1987) citó a *R. alutecea*, *R. brevipes*, *R. emetica*, *R. nigricans*, *R. queletii* para el estado y a *R. brevipes* y *R. queletii* del Parque Nacional La Malinche. Santiago y cols. (1990) presentaron los resultados de un inventario preliminar sobre los hongos de Tlaxcala y registraron a *R. albonigra*, *R. brevipes*, *R. cyanoxantha*, *R. densifolia*, *R. drimeia*, *R. lutea* y *R. olivacea*.

Estrada-Torres y cols. (1991) realizaron un listado sobre los hongos que crecen en el estado donde incluyeron, además de las ya mencionadas a *R. emetica*, *R. fageticola*, *R. sanguínea*, y *R. xerampelina*. Por su parte Acosta y Kong (1991) citaron a *R. brevipes*, *R. drimeia*, *R. fageticola*, *R. olivacea*, *R. sanguinea* y *R. xerampelina* en una guía sobre los hongos que se desarrollan en las zonas de El Peñón del Rosario y La Malinche. Kong (1998) citó a *R. acrifolia*, *R. americana*, *R. basifurcata*, *R. cuprea* var. *juniperina*, *R. delica* var. *centroamericana*, *R. densifolia*, *R. gregaria*, *R. murrillii*, *R. ornaticeps*, *R. persicina* y *R. romagnesiana* de la entidad, sin precisar localidades.

***Monotropa uniflora* (Ericaceae)**

Plantas herbáceas originalmente integradas en una familia propia *Monotropaceae*, pero actualmente incluidas en Ericaceae. Crecen entre 10 y 35 cm, presentan diversos tallos de color blanco, habitualmente con manchas negras y una coloración rosa palido (*M. uniflora*) o entre amarillo y rojizo (*Hypopitys Monotropa*). De los tallos parten diversas hojas vestigiales, de color blanco con una longitud de entre 5 y 10 mm. Las flores presentan un tamaño de entre 9 a 15 mm de longitud las cuales crecen en el ápice del tallo. Presentan 4 o 5 sépalos y de 3 a 6 pétalos por flor.

El género *Monotropa* (familia Ericaceae) actualmente incluye 28 especies descritas y de estas solo tres aceptadas, *M. uniflora*, *M. latusquama* y *Hypopitys Monotropa* que se distribuyen en áreas disjuntas del Hemisferio Norte: Asia y Norteamérica, llegando hasta el norte de Sudamérica. Particularmente *M. uniflora* se caracteriza por ser una planta completamente micoheterótrofa, debido a que carecen por completo de clorofila y no realiza fotosíntesis. Esta total independencia de la luz la hace capaz de crecer en zonas oscuras, como en el sotobosque de bosques muy densos donde el follaje impide que llegue suficiente luz para que existan otras plantas de pequeño tamaño.

Sin embargo, *M. uniflora* ha logrado adaptarse evolutivamente a este tipo de ambientes

y obtiene sus nutrientes de una manera distinta a la mayoría de las plantas. Forma una asociación con hongos (ectomicorrizógenos) que a su vez se asocian con especies arbóreas con las cuales intercambian nutrientes, dicha asociación se comenzó a estudiar cuando Martin (1986) caracterizó ocho diferentes especies de hongos asociados a las raíces de *M. uniflora*, con base en las características morfológicas del manto. Cuatro fueron asignadas a la familia Russulaceae utilizando como evidencia la presencia de macrocistidios sobre el manto de la micorriza, estructuras típicas de la familia. Diez años después, Cullings y cols. (1996), revisaron los hongos asociados a *M. uniflora* en diferentes localidades y ecosistemas de Estados Unidos, y con base en caracteres moleculares, encontraron que todos eran especies de la familia Russulaceae, específicamente determinaron a *Lactarius piperatus*, *Russula rosacea* y *R. laurocerasi*. Concluyendo que los principales hongos asociados son miembros de la familia Russulaceae y que cada individuo de *M. uniflora* se encuentra asociado a una sola especie de Russulaceae (Young y cols. 2002).

Bidartondo y Bruns (2001) identificaron los linajes de las plantas pertenecientes a la subfamilia Monotropoideae y de sus hongos asociados utilizando un enfoque de filogenia molecular, concluyeron que cada uno de los linajes de plantas se asocia específicamente a un género o especie dentro de cinco familias de Basidiomycota ectomicorrizógenas. Para 10 poblaciones estadounidenses de *M. uniflora* encontraron que éstas se asocian con cinco especies de *Russula* (incluyendo *R. brevipes* y *R. paludosa*) y una de *Lactarius* (*L. theiogalus*). Para una población de Japón, encontraron sólo una especie de *Russula*. Además, confirmaron los hallazgos de Cullings (1994) de que el género *Monotropa* es polifilético y que *M. uniflora* y *Monotropastrum humile* forman un clado que se asocia exclusivamente a Russulaceae, mientras que *Hypopitis Monotropa*, *Allotropa virgata* y *Pityopus californicus* forman un clado aparte y asociado exclusivamente con especies del género *Tricholoma*.

Young y cols. (2002) realizaron un estudio sobre la micorriza de *M. uniflora* en Columbia Británica (Canadá) y con base en caracteres morfológicos y moleculares, observaron que cada individuo de *Monotropa* forma un agregado de raíces con cientos de puntas micorrizadas. Todas las micorrizas presentaron características morfológicas descritas para la ectomicorriza formada por especies de *Russula* (manto con macrocistidios) y

aparentemente cada individuo de *Monotropa* está micorrizado por una sola especie de Russulaceae. Los resultados moleculares sugirieron que las especies de Russulaceae asociadas a las quince plantas utilizadas en este estudio, pertenecen a tres especies, dos de ellas relacionadas con hongos russuloides hipogeos y gasteroides de los géneros *Gymnomyces* y *Martellia*, sin que hubiera una correlación con las especies de Russulaceae epigeas y agaricoides recolectadas alrededor de las plantas estudiadas.

Neyland y Hennigan (2004) realizaron un análisis cladístico de *M. uniflora* con base en caracteres moleculares y concluyeron que esta especie presenta una distribución disyunta. Una parte de su distribución incluye una zona extensa de Norteamérica (Estados Unidos y Canadá), mientras que una segunda parte se extiende en Centroamérica (entre México y Colombia), ambas partes separadas principalmente por los desiertos del norte de México y sur de Estados Unidos, y una tercera parte a través del este de Asia. Además, señalaron que cada una de estas poblaciones diverge molecularmente y por lo tanto, son filogenéticamente distintas.

Bidartondo (2005) presentó un resumen acerca de estudios realizados sobre *Monotropa* y su micorriza, partiendo de la pregunta inicial de Hooker (1821) sobre si *Monotropa* es o no un parásito de las raíces de otras plantas, señalando el trabajo de Kamiński (1881), en donde por primera vez se describe la manera en que *Monotropa* se encuentra unida a las raíces de árboles forestales a través de un hongo. Hace mención de varios estudios realizados a mediados del siglo XX en los que se describe la morfología de la micorriza y el transporte de nutrimentos en la asociación, y de estudios realizados desde finales de los ochentas hasta principios del siglo XXI, sobre la verdadera identidad de los hongos asociados con *M. uniflora*: especies de la familia Russulaceae.

Bidartondo (2005) realizó una revisión de los trabajos publicados en relación con la evolución y ecología de las plantas micoheterótrofas y señaló que aún existen muchas incógnitas, en particular. Los estudios sobre la micorriza de *M. uniflora* únicamente se han realizado en Japón, Taiwán, Canadá, Estados Unidos y Costa Rica. En Norteamérica, se ha observado una mayor diversidad de Russulaceae asociados a *M. uniflora* en el este de Norteamérica (diez especies) con respecto al oeste (cuatro especies) (Figura 1).

Yang y Pfister (2006) analizaron la diversidad genética de los hongos asociada a cincuenta y tres muestras de raíces de *M. uniflora* en el este de Estados Unidos y encontraron 20 especies asociadas, todas de la familia Russulaceae, 18 pertenecientes al género *Russula* y dos a *Lactarius*. El 60% de las plantas analizadas se asociaron con sólo tres especies (*R. brevipes*, *R. vesca* y *R. sp.*). Además, recolectaron los basidiomas de 25 especies de *Russulaceae* que crecían alrededor de las plantas muestreadas y observaron que sólo tres se encontraron asociadas con las raíces (reportados en Genbank como *Russula sp.* Provenientes de Estados Unidos). Igualmente, confirmaron los resultados observados sobre el patrón de diversidad entre el este y oeste de Norteamérica ya señalado por Bidartondo (2005) (Figura 1).

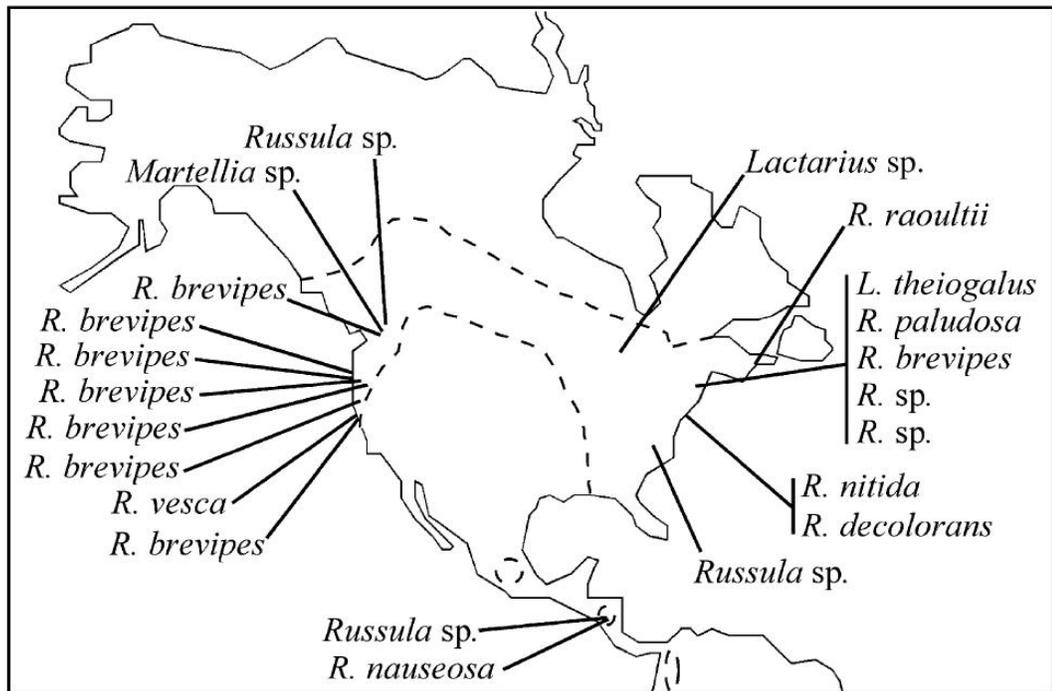


Figura 1. Especies de Russulaceae asociadas con *M. uniflora* en América (cada línea recta

corresponde con una localidad) a lo largo de su distribución geográfica (líneas no continuas). Todos los hongos detectados pertenecen a la familia Russulaceae, uno de los linajes de hongos ectomicorrizógenos más diversos (Bidartondo, 2005).

Algunos autores consideran a *Monotropa uniflora* como epiparásita ya que el flujo de carbohidratos es de la planta que realiza fotosíntesis a través del hongo hacia *Monotropa*, sin embargo, se llegó al acuerdo de que el término micoheterotrofia es más apropiado (Smith y Read 1997). La micoheterotrofia (del griego *mico*-hongo; *hetero*, diferente y *trofo*, que se alimenta) es una relación simbiótica que se establece entre ciertos tipos de plantas y algunos hongos, en la que las plantas obtienen, total o parcialmente, sus nutrientes del hongo. Un micoheterótrofo es una planta que normalmente no realiza fotosíntesis y por lo tanto, la micoheterotrofia está considerada como una relación de explotación. Los micoheterótrofos se encuentran en diferentes grupos de plantas. Todas las especies de la subfamilia Monotropeoideae de las ericáceas y las orquídeas no fotosintéticas son micoheterótrofas completas u obligadas, al igual que las hepáticas no fotosintéticas del género *Cryptothallus*. Una micoheterotrofia parcial es común en la familia *Gentianaceae*, en orquídeas fotosintéticas y en otros grupos de plantas como algunos helechos y licopodios que tienen gametofitos micoheterótrofos en algunas etapas de su ciclo de vida (Leake 1994; Taylor y cols. 2002; Trudell y cols. 2003). Los hongos que son explotados por las plantas micoheterótrofas presentan a menudo grandes reservas de energía, como lo son los hongos ectomicorrízicos, aunque también hay evidencias que pueden explotar a algunos hongos parásitos que forman redes miceliarias extensas, por ejemplo *Armillaria* (Leake 2005).

Existen alrededor de 400 especies de plantas micoheterótrofas obligadas, que se distribuyen en cerca de 90 géneros, y casi 20000 especies micoheterótrofas facultativas, o sea que dependen de un hongo para sobrevivir al menos en los estados iniciales de crecimiento (orquídeas). Las plantas micoheterótrofas se encuentran en diferentes grupos taxonómicos, como en algunas especies de la familia Ericaceae, Orchidaceae o en plantas que no realizan fotosíntesis (Taylor y cols. 2002; Leake 2005).

La micoheterotrofia total (u obligada) existe cuando una planta que no realiza fotosíntesis (una planta que carece de clorofila o lo que es lo mismo carente de una fotosíntesis

funcional) obtiene todos sus nutrientes de los hongos que parasita. La micoheterotrofia parcial (o facultativa) existe cuando una planta es capaz de realizar la fotosíntesis, pero parasita a un hongo como aporte suplementario de nutrientes. Las plantas verdes que tienen la capacidad dual de absorber nutrientes de un hongo por micoheterotrofia pero al mismo tiempo, retienen la capacidad autotrófica que les brinda la fotosíntesis, se denominan mixótrofas (Tedersoo y cols. 2007; Selosse y Roy 2009). También hay plantas, tales como algunas especies de orquídeas, que no fotosintetizan y son micoheterotróficas obligadas durante una parte de su ciclo de vida mientras que fotosintetizan y son micoheterotróficas facultativas o autotróficas para el resto de su ciclo vital (Leake 1994). Es importante tener en cuenta que otras plantas que no realizan la fotosíntesis y son también aclorófilas (es decir, no presentan clorofila), tales como las especies de los géneros *Cuscuta* u *Orobancha* no son micoheterotróficas ya que parasitan directamente el tejido vascular de otras plantas (Dawson y cols. 1994).

Hasta hace pocos años se creía, de un modo erróneo, que las plantas que no realizan la fotosíntesis conseguían sus nutrientes directamente de la materia orgánica de una manera saprofítica, similar a la que utilizan los hongos. Tales plantas, por lo tanto, fueron llamadas saprófitas. Ahora se sabe que estas plantas no son capaces de la absorción y digestión directa de la materia orgánica y que para conseguir el alimento deben recurrir al parasitismo micoheterotrófico o directo de otras plantas, algunos ejemplos de estas especies de plantas son: *M. uniflora*, *Sarcodes sanguinea*, *Rhisanthella gardneri* y *Allotropa vergata* (Bidartondo 2005; Leake 2005).

La interfaz entre la planta y sus socios fúngicos en esta asociación está entre las raíces de la planta y el micelio del hongo. La micoheterotrofia por lo tanto se asemeja mucho a las micorrizas y de hecho, actualmente se considera que puede haberse desarrollado a partir de micorrizas (Bidartondo 2005), excepto que en la micoheterotrofia, el flujo de nutrientes se verifica desde el hongo hacia la planta y no al revés (Trudell 2003; Bidartondo y cols. 2004).

Los micoheterótrofos, por tanto, se pueden considerar como epiparásitos, puesto que toman la energía de los hongos los cuales a su vez consiguen su energía de otras plantas vasculares (Bidartondo 2005; Leake 2005). De hecho, muchos micoheterótrofos se encuentran comúnmente en una red de micorrizas, en la que las plantas utilizan a las micorrizas del hongo para el intercambio de dióxido de carbono y nutrientes. En estos sistemas, los

micoheterótrofos juegan el papel de "explotadores de micorrizas", tomando los nutrientes de las micorrizas comunes, pero sin dar nada en contrapartida (Bidartondo 2005). Las plantas micoheterotróficas, entonces, obtienen la totalidad del carbono desde un hongo, el cual a su vez lo obtiene desde una planta verde, fotosintética, con la que vive asociado en una relación mutualista. Se ha demostrado recientemente que en muchas plantas mixotróficas de la familia de las ericáceas una considerable proporción del carbono proviene de los hongos con los que conviven (Tedersoo y cols. 2007).

Abies religiosa

A. religiosa es una especie perteneciente a la familia Pinaceae, sobresale de entre las comunidades vegetales dominadas por coníferas por sus particulares condiciones ecológicas en que se desarrolla y en algunas ocasiones son indicadores del ecosistema (Rzedowski 2006).

La ubicación geográfica del bosque de *Abies* en México es muy dispersa y localizada, puesto que se encuentra en forma de manchones aislados, y en ocasiones restringidos a laderas, cerros o cañadas. Las áreas de mayor extensión se presentan en el Valle de México y le siguen en tamaño otras montañas sobresalientes del Eje Volcánico Transversal (Pico de Orizaba, Cofre de Perote, La Malinche, Popocatèpetl, Nevado de Toluca y Nevado de Colima) (Rzedowski 2006).

Según cálculos hechos por Flores (1971) la extensión total que abarca esta comunidad vegetal es de 0.16% de la superficie del territorio nacional. Este tipo de vegetación está confinada a altitudes de entre 2400 y 3600 m snm por lo que está confinada a sitios de alta montaña; esta característica junto con los sitios en los que se encuentra establecida (laderas, cañadas y barrancas) ofrecen un microclima característico como es la humedad elevada y precipitación anual superior a 1000 mm, para que este tipo de vegetación se desarrolle favorablemente.

De acuerdo con Madrigal (1967) el tipo de suelo en que podemos encontrar al bosque de *Abies* son andesitas y basaltos, típicamente profundos, bien drenados pero húmedos durante

todo el año, compuesto por un perfil ABC, con texturas de migajón arenoso, francas y estructura en bloques, los valores del pH varían entre 5 y 7 y el horizonte A es abundante en materia orgánica (35.4%).

No se sabe con exactitud la importancia fisiológica y ecológica que ejercen las micorrizas sobre este tipo de bosques; sin embargo, se encuentran entre los más ricos por lo que a micoflora concierne. Según Guzmán (1973), algunos de los géneros de hongos que interactúan con estas comunidades son los siguientes: *Amanita*, *Boletus*, *Clavariadelphus*, *Cortinarius*, *Geastrum*, *Turbinellus*, *Hebeloma*, *Hohenbuehelia*, *Lactarius*, *Lentinellus*, *Lenzites*, *Macropodia*, *Melanoleuca*, *Otidea*, *Phaeocollybia*, *Phlogiotis*, *Pholiota*, *Russula*, *Sarcosphaera*, *Spongipellis*, *Tricholomopsis*, *Tremella* y *Xerulina*.

De las ocho especies de *Abies* que Martínez reconoce, seis están restringidas en su distribución al territorio del país, una se extiende a Guatemala (*A. guatemalensis*) y otra toca los límites de Canadá y el oeste de los Estados Unidos (*A. concolor*).

En el centro de México *A. religiosa* es una especie frecuente y los bosques que forman son relativamente extensos además muchas veces puros, aunque localmente pueden estar acompañados de *Pinus*, *Cupressus* o *Pseudotsuga*, *Quercus*, *Alnus*, y otros árboles. Las elevaciones del Eje Volcánico Transversal en Jalisco, Michoacán, México, Distrito Federal, Morelos, Puebla, Tlaxcala y Veracruz son las que ostentan a menudo esta comunidad en el piso altitudinal correspondiente.

Parque Nacional la Malinche (PNLM)

El Volcán Matlacuéyatl o La Malinche se considera como la zona núcleo del Parque Nacional La Malinche, cuenta con una superficie de 46,093 ha, de las cuales 33,161 ha corresponden al estado de Tlaxcala y 12,932 ha al estado de Puebla. Se localiza entre los 19° 06' 30'' - 19° 20' 19'' Latitud Norte y los 97° 55' 32'' - 98° 09' 55'' de Longitud Oeste; con un intervalo

altitudinal que va de 2,300 m snm, considerando la altura promedio del valle, hasta los 4,461 m snm que es la cima de la montaña. El clima predominante es templado subhúmedo, combinado con semifrío, con lluvias en verano que tienen su mayor intensidad entre los meses de junio a septiembre. Fue declarado como Parque Nacional mediante la publicación del Decreto en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de octubre de 1938 (López-Domínguez y Acosta 2005).

Los bosques del PNLN están dominados principalmente por árboles de la familia Pinaceae, a menudo formando masas puras o en algunas partes entremezclándose con otros elementos arbóreos de las familias Betulaceae, Fagaceae y Salicaceae. Estas plantas son los elementos típicos que forman las grandes extensiones del bosque boreal y templado en el hemisferio norte. Una característica importante, desde el punto de vista micológico, es que en este tipo de bosque se desarrollan las principales comunidades de hongos ectomicorrizógenos, que facilitan la absorción de nutrimentos y agua del suelo a los árboles con los que se asocia (Acosta y Kong 1991).

A pesar de la importancia que representa La Malinche, no existe un estudio integral de la totalidad del parque sobre su flora, vegetación y comunidad fúngica. Fernández (1987) realizó un estudio sobre la ecología del bosque de *A. religiosa* en el Parque Nacional La Malinche, en el que hace una breve reseña sobre la vegetación. Acosta y Kong (1991) elaboraron una guía de excursión Botánica y Micológica para La Cañada Grande situada al este del volcán. Con lo cual podemos entender la falta de conocimiento acerca de la dinámica del bosque de *A. religiosa* en La Malinche, así como sus interacciones ecológicas, particularmente este trabajo se enfoca en conocer la diversidad de la familia Russulaceae asociada con *M. uniflora* en dicho parque.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se desconoce qué especies de hongos se asocian con *M. uniflora* en México.

El conocimiento sobre su identidad y diversidad posibilitará un mejor entendimiento acerca de esta asociación, tanto en los patrones de distribución, diversidad, abundancia, identidad y dinámica que presentan las especies de la familia Russulaceae asociadas con *Monotropa Uniflora* en el Parque Nacional La Malinche.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la diversidad de hongos de la familia Russulaceae asociados con *M. uniflora* en el Parque Nacional La Malinche?

¿Qué especies son las que se asocian con *Monotropa uniflora* en el Parque Nacional La Malinche?

HIPÓTESIS

Debido a que *M. uniflora* es muy específica en su asociación con las especies de Russulaceae a lo largo de su distribución, se esperará que la diversidad asociada con las raíces de los individuos en el Parque Nacional La Malinche sea menor con relación a la diversidad observada para los basidiomas de Russulaceae que se desarrollen alrededor de las plantas.

OBJETIVOS

General

Conocer la diversidad de especies de la familia Russulaceae asociadas con *M. uniflora* en un bosque de *Abies religiosa* del Parque Nacional La Malinche.

Específicos

Valorar la diversidad de hongos de la familia Russulaceae (con base en riqueza (presencia) y abundancia de basidiomas recolectados) alrededor de plantas de *M. uniflora* y su relación con las especies asociadas a sus raíces.

Explorar la identidad y posición sistemática de los hongos asociados con *M. uniflora* con base en caracteres moleculares y su relación con los basidiomas recolectados alrededor de las plantas.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El área de estudio comprendió a la zona de La Cañada Grande, en el Parque Nacional la Malinche, que es una barranca formada por una fractura que colapsó lo que fue el antiguo cráter del volcán (Werner 1988). Se sitúa en la ladera este. Baja hacia el este en dirección al poblado de San Juan Ixtenco, Municipio de Huamantla. En su parte inferior es amplia y conforme asciende se hace estrecha. El relieve es casi plano y el desnivel entre el fondo de La

Cañada y sus paredes sobrepasa los 500 m. Su altitud varía entre 3000 m snm en su posición más baja y 3700 m snm en su posición más alta. Tiene aproximadamente 5 km de longitud (Acosta y Kong 1991).

En la parte baja de la barranca (3000-3200 m snm) se presenta un pastizal secundario de *Muhlenbergia macroura* con individuos de *Pinus montezumae*, relictos de vegetación original (bosque de pino). Por arriba de los 3200 m snm se desarrolla un bosque dominado por oyamel (*A. religiosa*), comunidad bien definida desde el punto de vista ecológico y florístico, aunque en algunas áreas cohabita con *P. hartwegii* (en las partes altas) y *P. montezumae* (en las partes bajas).

A. religiosa se desarrolla en pendientes pronunciadas de laderas y barrancas, formando un bosque denso, sombrío y húmedo con características micro climáticas muy particulares. En el sustrato arbustivo y arbóreo inferior encontramos a individuos jóvenes de *A. religiosa*, así como de *Salix mexicana*, *S. paradoxa*, *Buddleia parviflora*, *Ribes ciliatum* y *Prunus serotina*. En el sustrato inferior (partes más húmedas) encontramos una capa continua de musgos que cubren el suelo (Acosta y Kong 1991).

Sitio de muestreo

En la localidad de estudio se seleccionaron 12 plantas de *M. uniflora* dentro del bosque de *Abies religiosa* (Figura 2), cada una separada por al menos 100 m. Alrededor de cada planta se estableció una unidad de muestreo que consistió en un círculo de 5.65 m de radio, que representó un área de 100 m² por unidad de muestreo (Redecker y cols. 2001).



Figura 2.- Sitio de muestreo ladera este (Cañada Grande) y ubicación de las 12 plantas de *M. uniflora* seleccionadas (Mu1-Mu12) PNLM.

Muestreo de basidiomas

En cada unidad de muestreo se realizó la recolección de los basidiomas pertenecientes a la familia Russulaceae. El muestreo se llevó a cabo cada 8 días durante toda la época de lluvias, entre los meses de Julio a Octubre del 2009. En cada visita se contó el número de basidiomas por especie dentro de cada unidad de muestreo. En el laboratorio se tomaron datos en fresco de las diferentes estructuras que forman el basidioma (tamaño, forma, textura, ornamentación, color del píleo, láminas, trama, estípites, además del sabor de la trama y color de la esporada). Para la determinación taxonómica, se utilizaron claves de determinación especializadas para la familia Russulaceae (Hesler y Smith 1979; Kibby y Fatto 1990; Kong 1995, 2003), una vez identificado el material se depositó en el herbario TLXM.

Muestreo de micorrizas

Las 12 plantas de *M. uniflora* fueron extraídas por completo en el momento en que dejaron de aparecer basidiomas a sus alrededores (Octubre-Noviembre), posteriormente se trasladaron al laboratorio, se procedió a lavarlas y extraer las micorrizas, después se les tomaron fotografías y de cada planta se procedió a realizar dos procedimientos, uno fue deshidratarlas y conservarlas en alcohol en el herbario de TXLM y el segundo fue guardar algunas puntas micorrizadas (10) en Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) para los posteriores análisis moleculares.

Diversidad

En cada una de las unidades de muestreo se registró el número de basidiomas por especie. La

abundancia se estimó como el número total de basidiomas recolectados por especie durante todo el muestreo. La diversidad se estimó mediante el cálculo de los índices de Simpson, Shannon-Weiner y el índice de equidad de Pielou (Magurran 1988; Moreno 2001). Para medir la biodiversidad hay varios índices que se utilizan para poder compararla entre diferentes ecosistemas o zonas, en este caso se utilizaron los índices antes mencionados porque en el presente estudio se midió la diversidad alfa y tales índices miden dicha diversidad, puesto que se está midiendo la riqueza de especies de una comunidad particular que se considera homogénea, que corresponde con el bosque de *A. religiosa*.

Técnica molecular

Para la extracción y amplificación del ADN se utilizó el kit XNAP-Redextract (Sigma) utilizando el protocolo que se describe a continuación. En un tubo de 200 µl se colocó una punta de raíz micorrizada y se le agregó 10 µl del reactivo de extracción, esta se calentó en el termociclador por 10 min a 65°C y 10 min a 95°C. Posteriormente se agregaron 30 µl de reactivo de dilución y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Para muestras de esporomas se agregaron 20 µl del reactivo de extracción y 20 µl del reactivo de dilución. Para ambos casos se utilizó un control con las siguientes concentraciones 10 µl de extracción y 10 µl de dilución. Se mantuvo entre 2-8°C hasta antes de realizar la técnica de PCR. El resto de las puntas micorrizadas se almacenaron para su posterior uso en caso de no tener éxito en el proceso de extracción hasta la secuenciación del ADN.

Se amplificó la región de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y 5.8S del ARN ribosomal, se ocuparon los primers ITS1F e ITS4B (White y cols. 1990; Gardes y Bruns 1993), se utilizó la siguiente metodología: Para cada muestra del reactivo de PCR se agregó (agua bidestilada estéril) 5.6 µl, RedEx (reactivo del kit) 10 µl, primer ITS1 0.2 µl, primer ITS4 0.2 µl, ADN de la muestra (micorriza) 4.0 µl. Se incluyó un control negativo (muestras sin ADN) y control positivo (muestra que ya amplificó previamente) para que en caso de que

la PCR no fuera exitosa poder verificar las causas. Primero se mezcló (algunos segundos) el combinado de todos los reactivos sin ADN, después se adicionó el ADN y se mezcló nuevamente, posteriormente se procedió a meter la muestra al termociclador con el siguiente programa: Desnaturalización inicial 94 °C por 3 minutos, desnaturalización 94 °C por 1 minuto, alineación 51°C por 1 minuto, extensión 72°C por un minuto, extensión final 72°C por 8 minutos, finalización 4°C indefinido, los pasos del 2 al 4 se repitieron por 34 ciclos. Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la preparación del gel de agarosa se utilizó la siguiente metodología: 99 ml de TBE 0.5-1X y 1 g de agarosa por cada 40 muestras, se mezcló y se calentó en el micro ondas hasta diluir, se dejó enfriar hasta soportarlo en la mano. Se le agregó 1 µl de GelRed por cada 100 ml de gel, posteriormente se vació en la placa, se le colocaron los peines y se dejó solidificar. Una vez solidificado se procedió a depositar las muestras de PCR en los pozos, se corrió el gel a 100 volts durante 30 minutos, una vez que transcurría ese tiempo se procedía a sacar el gel de la cámara de electroforesis y se verificó en el transiluminador para observar si las muestras amplificaron exitosamente o si se tenía que repetir alguno de los pasos anteriores (extracción de ADN o PCR). En caso de que las muestras amplificaran correctamente se procedió a purificarlas para eliminar el exceso de nucleótidos o de primers con el siguiente protocolo: Se realizó la mezcla del exosap (kit de purificación) 1µl y agua 1µl, posteriormente para cada muestra se colocaron 2 µL más 3.5 µL del producto de PCR. Las muestras se colocaron en el termociclador a tres temperaturas diferentes, para esto se empleó el siguiente protocolo: 37 °C por 45 minutos, 80°C por 15 minutos y 4°C indefinidamente.

Los productos de PCR purificados fueron enviados al instituto de Biología de la UNAM para su secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias fueron ensambladas y editadas mediante el programa Geneious (Drummond y cols. 2011).

Exploración de la identidad y posición sistemática de los hongos asociados

Para relacionar la identidad de los hongos asociados con las raíces de *M. uniflora* primero se compararon sus secuencias con las depositadas en GenBank, mediante el programa BLAST (McGinnis y Madden 2004). Con las bases de datos de UNITE (Abarenkov y cols. 2010) y Bold Systems (Ratnasingham y Hebert 2007). Además, se realizaron varios análisis filogenéticos para ubicar la posición de los hongos asociados con las raíces de *M. uniflora* dentro de la filogenia de Russulaceae. Se alinearon las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las muestras que se obtuvieron, mediante el programa Muscle (Edgar 2004), junto con las secuencias de ITS de diferentes especies de Russulaceae depositadas en las bases de datos de Bold Systems, GenBank y Unite, y las secuencias de hongos obtenidas de las raíces de *M. uniflora* por Bidartondo y Bruns (2001, 2005), Young y cols. (2002) y Yang y Pfister (2006), todas ellas depositadas en GenBank. Se eliminaron las regiones ambiguas en los extremos 5' y 3' de las secuencias, dejándose las 15 bases finales del gen 18S: 5'...GCGGAAGGATCATTA...3' y las 15 bases iniciales del gen 28S: 5'...TTGACCTCAAATCGG...3' (Figura 3). Los análisis filogenéticos se realizaron mediante el método de máxima verosimilitud con el programa PhyML (Guindon y Gascuel 2003).



Figura 3. Ejemplo que ilustra la eliminación de las regiones ambiguas en los extremos 5' y 3' en la región de los ITS del ADN ribosomal durante el alineamiento.

RESULTADOS

Diversidad de especies de la familia Russulaceae con base en los basidiomas recolectados alrededor de las plantas de *Monotropa uniflora*

Dentro de las 12 unidades de muestreo se registraron 14 especies de Russulaceae, 5 del género *Lactarius* y 9 de *Russula*. El mayor número de especies dentro una unidad de muestreo fué de 8 y el menor de 2, cada una de ellas correspondió con la unidad de muestreo que presentó mayor y menor número de basidiomas respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Abundancia de basidiomas por especie en cada una de las unidades de muestreo durante el año (2009).

Especie	Abr ^a	Mu1 ^b	Mu2	M3	M4	M5	M6	Mu7	Mu8	Mu9	Mu10	Mu11	Mu12	Total
<i>Lactarius luculentus</i>	Lluc	0	0	0	0	1	30	2	0	38	0	0	0	71
<i>Lactarius mexicanus</i>	Lmex	3	0	0	0	0	3	5	0	0	0	2	3	16
<i>Lactarius oculatus</i>	Locu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Lactarius pseudomucidus</i>	Lpse	0	6	3	0	0	0	0	7	0	0	0	0	16
<i>Lactarius salmonicolor</i>	Lsal	9	0	11	0	5	1	0	0	1	0	0	0	27
<i>Russula</i> aff. <i>cascadensis</i>	Rcas	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Russula</i> cf. <i>olivobrunnea</i>	Rolo	47	7	65	53	6	8	0	0	14	74	9	58	341
<i>Russula</i> aff. <i>xerampelina</i>	Rxer	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Russula americana</i>	Rame	30	0	6	0	5	9	5	0	0	0	0	0	55
<i>Russula griseascens</i>	Rgri	9	0	2	20	9	13	0	2	15	0	0	0	70

Continuación

Especie	Abr ^a	Mu1 ^b	Mu2	M3	M4	M5	M6	Mu7	Mu8	Mu9	Mu10	Mu11	Mu12	Total
<i>Russula murrillii</i>	Rmur	10	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	5	18
<i>Russula nigrodisca</i>	Rnig	1	0	0	0	0	0	2	0	2	1	1	3	10
<i>Russula olivacea</i>	Rola	1	15	0	9	2	0	0	0	0	1	0	3	31
<i>Russula romagnesiana</i>	Rrom	0	4	0	1	0	0	0	0	5	0	0	0	10
Total		110	33	87	83	32	64	14	9	75	79	12	73	671

^a Abreviatura utilizada para las especies de Russulaceae, *L. luculentus*(Lluc), *L. mexicanus* (Lmex), *L. oculatus* (Locu), *L. pseudomucidus*(Lpse), *L. salmonicolor*(Lsal), *R. aff cascadiensis*(Rcas), *R. cf. olivobrunnea*(Rolo), *R. aff xerampelina*(Rxer), *R. americana*(Rame), *R. griseascens*(Rgri), *R. murrillii* (Rmur), *R. nigrodisca*(Rnig), *R. olivacea*(Rola), *R. romagnesiana*(Rrom).

^b Abreviatura utilizada para cada una de las unidades de muestreo (Mu = *Monotropa uniflora*).

En la Tabla 2 se muestra la frecuencia (presencia o ausencia de una especie alrededor de la planta) registrada en las unidades de muestreo para cada especie. En total se recolectaron 671 basidiomas, 131 pertenecientes a *Lactarius* y 540 a *Russula*, que representan el 19.5% y 80.5% respectivamente. Con base en el índice inverso de Simpson (1-D) las unidades de muestreo con los valores más altos fueron Mu1, Mu5 y Mu7, considerando a estas como las más diversas, por el contrario las unidades que presentaron los valores más bajos fueron la Mu8 y Mu10 con dos y cuatro especies respectivamente, este índice es relativamente proporcional al número de especies.

Tabla 2. Frecuencia de las especies en cada una de las unidades de muestreo durante el año (2009).

Especie ^a	Mu1 ^b	Mu2	Mu3	Mu4	Mu5	Mu6	Mu7	Mu8	Mu9	Mu10	Mu11	Mu12	Total ^c	% ^d
Lluc	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	4	33.3
Lmex	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	5	41.7
Locu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	8.3
Lpse	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	25
Lsal	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	5	41.7
Rcas	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	8.3
Rolo	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	10	83.3
Rxer	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8.3
Rame	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	5	41.7
Rgri	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	7	58.3
Rmur	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	25
Rnig	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	6	50
Rola	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	6	50
Rrom	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3	25
Total ^e	8	5	5	4	7	6	4	2	6	4	3	6		

^a Abreviatura utilizada para las especies de Russulaceae, *L. luculentus*(Lluc), *L. mexicanus* (Lmex), *L. oculatus* (Locu), *L. pseudomucidus*(Lpse), *L. salmonicolor*(Lsal), *R. aff. cascadiensis*(Rcas), *R. cf. olivobrunnea*(Rolo), *R. aff. xerampelina*(Rxer), *R. americana*(Rame), *R. griseascens*(Rgri), *R. murrillii* (Rmur), *R. nigrodisca*(Rnig), *R. olivacea*(Rola), *R. romagnesiana*(Rrom) (Ver Tabla 1).

^b Abreviatura utilizada para cada una de las unidades de muestreo (Mu = *Monotropa uniflora*).

^c Número de unidades de muestreo en donde se presentó cada una de las especies

^d Porcentaje de frecuencia para las 12 unidades de muestreo.

^e Número de especies por unidad de muestreo.

Los valores del índice de Shannon se relacionan con los del inverso de Simpson, siendo las unidades de muestreo Mu1 y Mu5 con mayor diversidad las que obtuvieron los valores más altos (1.529 y 1.792) en dicho índice, esto quiere decir que fueron las unidades de muestreo que presentaron mayor diversidad.

Para el índice de equidad de Pielou las unidades de muestreo con los valores más altos fueron Mu2, Mu5 y Mu7 con 0.844, 0.921 y 0.932 respectivamente (las unidades con las abundancias distribuidas de manera uniforme). Por otra parte, las unidades de muestreo con valores más bajos fueron las Mu10 y Mu12 con 0.213 y 0.457 respectivamente, esto quiere decir que fueron las unidades con menor uniformidad de distribución de especies (Tabla 3).

Tabla 3. Índices de diversidad para cada una de las unidades de muestreo durante el año 2009.

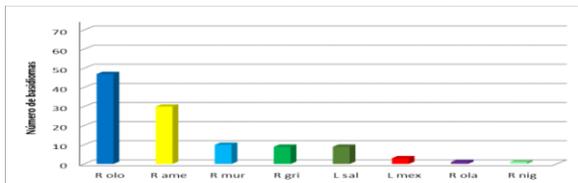
Unidad de muestreo	Número de especies <i>S</i>	Dominancia de Simpson <i>D</i>	Diversidad de Simpson <i>1-D</i>	Shannon-Wiener <i>H</i>	<i>H</i> máximo	Equidad de Pielou <i>J</i>
Mu 1	8	0.280	0.720	1.529	2.079	0.735
Mu 2	5	0.300	0.700	1.359	1.609	0.844
Mu 3	5	0.581	0.419	0.867	1.609	0.538

Continuación

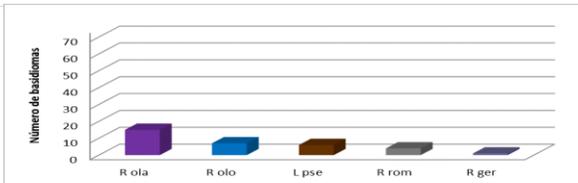
Unidad de muestreo	Número de especies S	Dominancia de Simpson D	Diversidad de Simpson $1-D$	Shannon-Wiener H	H máximo	Equidad de Pielou J
Mu 4	4	0.478	0.522	0.924	1.386	0.679
Mu 5	7	0.184	0.816	1.792	1.946	0.921
Mu 6	6	0.299	0.701	1.423	1.792	0.794
Mu 7	4	0.296	0.704	1.291	1.386	0.932
Mu 8	2	0.654	0.346	0.530	0.693	0.764
Mu 9	6	0.337	0.663	1.314	1.792	0.734
Mu 10	4	0.879	0.121	0.296	1.386	0.213
Mu 11	3	0.597	0.403	0.722	1.099	0.657

La unidad de muestreo Mu1, fue el sitio con mayor riqueza, encontrándose ocho especies, seis de ellas presentaron abundancias similares (*R. americana*, *R. murrillii*, *R. griseascens*, *L. salmonicolor*, *L. mexicanus*, *R. olivácea*, *R. nigrodisca*). En la unidad de muestreo Mu5 se presentaron siete especies, de las cuales *L. salmonicolor*, *R. aff. cascadensis*, *R. cf. olivobrunnea* y *R. americana* presentaron abundancias similares. En el caso de la unidad de muestreo Mu7 las cuatro especies (*R. americana*, *L. mexicanus*, *L. luculentus* y *R. nigrodisca*) presentes obtuvieron valores de abundancia muy parecidos (Figura 4).

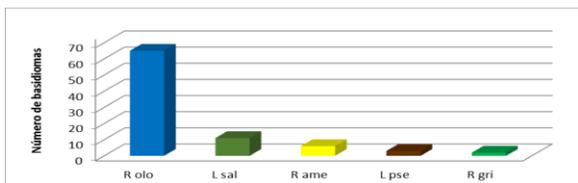
Monotropa uniflora 1



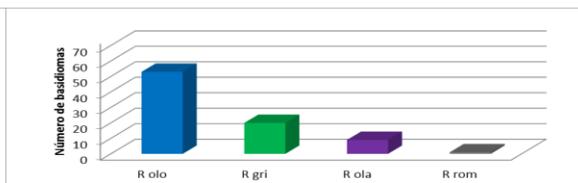
Monotropa uniflora 2



Monotropa uniflora 3

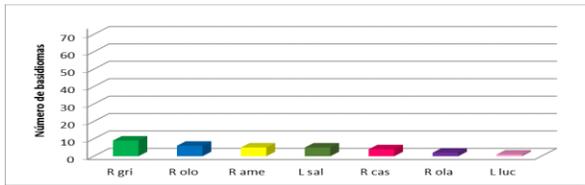


Monotropa uniflora 4

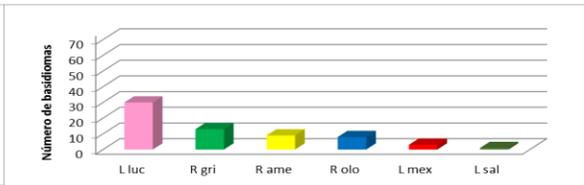


Continuación figura 4

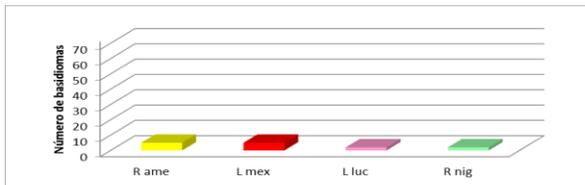
Monotropa uniflora 5



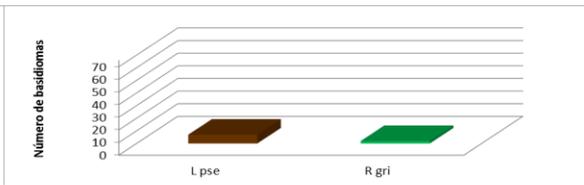
Monotropa uniflora 6



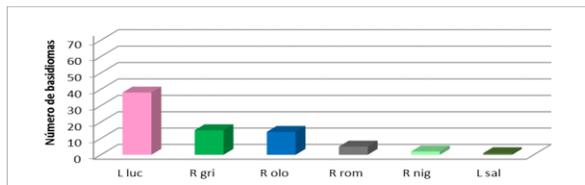
Monotropa uniflora 7



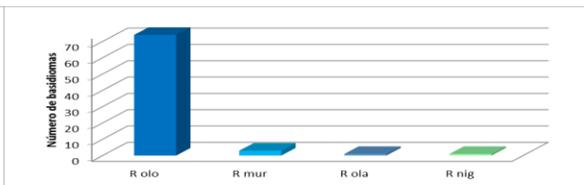
Monotropa uniflora 8



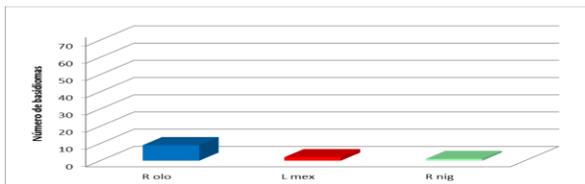
Monotropa uniflora 9



Monotropa uniflora 10



Monotropa uniflora 11



Monotropa uniflora 12

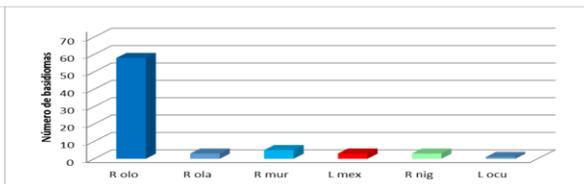


Figura 4. Abundancia de basidiomas de especies de Russulaceae por unidad de muestreo

(*Monotropia uniflora* 1-12).

Por el contrario, las unidades de muestreo con los valores más altos de dominancia (*D*) fueron las unidades Mu8 (0.654), Mu10 (0.879) y Mu12 (0.641). En las unidades de muestreo Mu10 y Mu12, *R. cf. olivobrunnea* fue la especie dominante. En la unidad de muestreo Mu8 *L. pseudomucidus* fue la especie dominante.

Dentro de las 12 unidades de muestreo se registraron 14 especies de Russulaceae con base a la identificación morfológica. Se secuenciaron 13 de las 14 especies. No se obtuvo la secuencia de *Russula* aff. *xerampelina*. Además, durante el muestreo se recolectó un ejemplar de *Russula* inmaduro que no se logró identificar en campo y que también se secuenció, haciendo un total de 14 secuencias para los hongos que crecieron dentro de las unidades de muestreo. Para el caso de las micorrizas se obtuvieron seis secuencias de las unidades de muestro 4, 6, 7, 9,10 y 12 en el año 2009.

Cabe mencionar que las puntas micorrizadas que estaban almacenadas en el herbario TXLM , en las cuales no se tuvo ADN en el 2009 (Mu1, Mu2, Mu3, Mu5, Mu8 y Mu11) se re-utilizaron (en el 2013) para las técnicas moleculares (extracción y amplificación), sin tener éxito con ninguna de las muestras. Esto se pudo deber a diversos factores, tales como la edad de las muestras, el proceso de secado, el almacenamiento o simple y sencillamente que en esas raíces no había ADN de hongos. Esta segunda etapa de re-utilización de las muestras se hizo con el fin de complementar la primera etapa del trabajo, sin embargo no se tuvo éxito en dicho proceso.

La identificación morfológica de las especies se realizó con base en los trabajos de Kong (1995, 2003). Además, las secuencias obtenidas de las especies se compararon con las bases de datos de Bold Systems, GenBank y Unite. En la Tabla 4 se muestran los resultados de estas comparaciones y se incluyen únicamente las especies que presentaron los valores más altos de similitud (mayor o igual a 97%), además de los nombres utilizados para las especies en el presente trabajo.

Tabla 4. Comparación entre las secuencias obtenidas de los basidiomas de Russulaceae provenientes del área de estudio con las bases de datos de Bold Systems, GenBank y Unite.

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de datos	Clave de acceso	Origen	Nombre y abreviatura utilizados en el presente trabajo
<i>Lactarius luculentus</i>	658	<i>Lactarius luculentus</i>	99	GenBank	FJ845419	Canadá	<i>Lactarius luculentus</i> Lluc
<i>Lactarius mexicanus</i>	672	<i>Lactarius scrobiculatus</i>	99	GenBank	EU597079	Canadá	<i>Lactarius mexicanus</i> Lmex
<i>Lactarius oculatus</i>	648	<i>Lactarius badiosanguineus</i>	99	GenBank	JF908284	Italia	<i>Lactarius oculatus</i> Locu
				GenBank	AY606943	Suecia	
				Unite	UDB015865	Estonia	
		<i>Lactarius hepaticus</i>	99	GenBank	FJ845420	Canadá	

Continuación

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de datos	Clave de acceso	Origen	Nombre y abreviatura utilizados en el presente trabajo
<i>Lactarius pseudomucidus</i>	652	<i>Lactarius kauffmanii</i>	99	GenBank	JF899562	Canadá	<i>Lactarius pseudomucidus</i> Lpse
				GenBank	FJ845422	Canadá	
<i>Lactarius salmonicolor</i>	646	<i>Lactarius sanguifluus</i>	96	GenBank	JQ685723	Montenegro	<i>Lactarius salmonicolor</i> Lsal
				Unite	UDB015807	Estonia	
				...			
<i>Lactarius semisanguifluus</i>			96	GenBank	DQ658872	Suecia	
				...			
				...			
<i>Lactariusaurantiosordidus</i>			96	GenBank	KC840610	Canadá	

Continuación

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de datos	Clave de acceso	Origen	Nombre y abreviatura utilizados en el presente trabajo
		<i>Lactarius vinosus</i>	96	GenBank	AY953420	España	
		<i>Lactarius salmonicolor</i>	95	GenBank	DQ679801	Italia	
				GenBank	AF249287	Francia	
				...			
				Unite	UDB000370	Italia	
				Unite	UDB000319	Alemania	
				...			
<i>Russula</i>	626	<i>Russula cascadenis</i>	92	GenBank	FJ845426	Canadá	<i>Russula</i> aff. <i>cascadenis</i> Reas

Continuación

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de datos	Clave de acceso	Origen	Nombre y abreviatura utilizados en el presente trabajo
		<i>Russula cascadenis</i>	92	GenBank	HM240541	Canadá	
<i>Russula</i>	600	<i>Russula olivobrunnea</i>	99	Unite	UDB016034	Finlandia	<i>Russula cf. olivobrunnea</i> Rolo
				Unite	UDB011113	Finlandia	
<i>Russula</i>	688	<i>Russula roseipes</i>	98	GenBank	AY061716	Europa	<i>Russula aff. roseipes</i> Rros
				Unite	UDB016003	Estonia	

Continuación

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de datos	Clave de acceso	Origen	Nombre y abreviatura utilizados en el presente trabajo
				Unite	UDB015981	Estonia	
<i>Russula americana</i>	630	<i>Russula americana</i>	99	GenBank	HQ604839	Canadá	<i>Russula americana</i> Rame
		<i>Russula cf. ammodica</i>	99	GenBank	HQ604840	Canadá	
<i>Russula griseascens</i>	623	<i>Russula bicolor</i>	99	GenBank	FJ845435	Canadá	<i>Russula griseascens</i> Rgri
		<i>Russula raoultii</i>	99	GenBank	JF834369	Estados Unidos	
				GenBank	HQ650738	Canadá	
		<i>Russula griseascens</i>	98	Unite	UDB011071	Noruega	
				Unite	UDB011217	Estonia	

Continuación

...

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de datos	Clave de acceso	Origen	Nombre y abreviatura utilizados en el presente trabajo
<i>Russula murrillii</i>	636	<i>Russula aff. firmula</i>	99	GenBank	JF834342	Estados Unidos	<i>Russula murrillii</i> Rmur
		<i>Russula firmula</i>	98	...			
<i>Russula nigrodisca</i>	651	<i>Russula betularum</i>	96	GenBank	EU598183	Estados Unidos	<i>Russula nigrodisca</i> Rnig
				GenBank	GU220371	Estados Unidos	
				GenBank	AJ534937	Estonia	
<i>Russula olivacea</i>	735	<i>Russula aff. olivacea</i>	99	GenBank	EU284014	Estados Unidos	<i>Russula olivacea</i> Rola

Continuación

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de datos	Clave de acceso	Origen	Nombre y abreviatura utilizados en el presente trabajo
		<i>Russula olivacea</i>	99	GenBank	AF418634	Alemania	
			98	...			
<i>Russula romagnesiana</i>	646	<i>Russula aff. delica</i>	97	GenBank	DQ422005	Suecia	<i>Russula romagnesiana</i> Rrom
		<i>Russula delica</i>	97	Unite	UDB016008	Estonia	
		<i>Russula chloroides</i>	97	Unite	UDB011192	Estonia	
		<i>Russula brevipes</i>	97	Bold Systems	ONT126-08	Canadá	
... Más de dos secuencias con el mismo porcentaje de similitud							

Identidad y posición sistemática de los hongos asociados con las raíces de *M. uniflora*

La Tabla 5 muestra las comparaciones de las raíces obtenidas de *M. uniflora* con las bases de datos de Bold Systems, GenBank y Unite, tomando los valores más altos encontrados en dichas bases de datos, utilizando un porcentaje de similitud igual o mayor a 97%, que es lo recomendable para análisis filogenéticos.

Tabla 5. Comparación de las secuencias obtenidas de las raíces de *Monotropa uniflora* con las bases de datos de Bold Systems, GenBank y Unite.

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de Datos	Clave de acceso	Procedencia
<i>Monotropa uniflora</i> 4	527	<i>Russula olivobrunnea</i>	99	Unite	UDB016034	Finlandia
		<i>Russula olivobrunnea</i>	99	Unite	UDB011113	Finlandia
		<i>Russula olivina</i>	99	Unite	UDB011114	Finlandia
		<i>Russula olivina</i>	98		UDB016260	Finlandia
		<i>Russula adulterina</i>	98	GenBank	AY061651	Europa
		<i>Russula cuprea</i>	98	GenBank	AY061667	Europa
		<i>Russula aurantioflamman</i>	97	Unite	UDB015990	Estonia

Continuación

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de Datos	Clave de acceso	Procedencia
		<i>Russula cuprea</i>	97	Unite	UDB002420	Gran Bretaña
<i>Monotropa uniflora</i> 6	645	<i>Russula olivobrunnea</i>	98	Unite	UDB016034	Finlandia
		<i>Russula olivobrunnea</i>	98	Unite	UDB011113	Finlandia
		<i>Russula olivina</i>	97	Unite	UDB011114	Finlandia
		<i>Russula olivina</i>	97		UDB016260	Finlandia
		<i>Russula aurantioflamman</i> <i>s</i>	97	Unite	UDB015990	Estonia
		<i>Russula cuprea</i>	97	Unite	UDB002420	Gran Bretaña
		<i>Russula cuprea</i>	97	GenBank	AY061667	Europa
<i>Monotropa uniflora</i> 7	603	<i>Russula brevipes</i>	99	GenBank	FJ845429	Canadá
		<i>Russula</i>	98	GenBank	JX630807	Canadá

Continuación

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de Datos	Clave de acceso	Procedencia	
		<i>brevipes</i>					
		<i>Russula</i>	aff.	98	GenBank	DQ422005	Suecia
		<i>delica</i>					
		<i>Russula</i>	cf. <i>delica</i>	98	GenBank	HQ445587	Noruega
		<i>Russula</i>	<i>delica</i>	98	GenBank	GU234042	Noruega
		<i>Russula</i>	aff.	97	GenBank	JF834359	Estados Unidos
		<i>brevipes</i>					
<i>Monotropa uniflora</i>	9	<i>Russula</i>		99	Unite	UDB016034	Finlandia
		<i>olivobrunnea</i>					
		<i>Russula</i>		99	Unite	UDB011113	Finlandia
		<i>olivobrunnea</i>					
		<i>Russula</i>	<i>olivina</i>	98	Unite	UDB011114	Finlandia
		<i>Russula</i>	<i>olivina</i>	98		UDB016260	Finlandia
		<i>Russula</i>		97	Unite	UDB015990	Estonia
		<i>aurantioflamman</i>					
		<i>s</i>					
		<i>Russula</i>	<i>cuprea</i>	97	Unite	UDB002420	Gran Bretaña

Continuación

Secuencia	Número de bases	Taxon	% de similitud	Base de Datos	Clave de acceso	Procedencia
		<i>Russula cuprea</i>	97	GenBank	AY061667	Europa
<i>Monotropa uniflora</i> 10	590	<i>Russula olivobrunnea</i>	99	Unite	UDB016034	Finlandia
		<i>Russula olivobrunnea</i>	99	Unite	UDB011113	Finlandia
		<i>Russula olivina</i>	98	Unite	UDB011114	Finlandia
		<i>Russula olivina</i>	98		UDB016260	Finlandia
		<i>Russula aurantioflamman</i> <i>s</i>	97	Unite	UDB015990	Estonia
		<i>Russula cuprea</i>	97	Unite	UDB002420	Gran Bretaña
		<i>Russula cuprea</i>	97	GenBank	AY061667	Europa
<i>Monotropa uniflora</i> 12	659	<i>Russula globispora</i>	95	Unite	UDB016122	Estonia
		<i>Russula globispora</i>	94	Unite	UDB011222	Estonia
		<i>Russula dryadicola</i>	94	GenBank	JF908710	Italia
...		<i>Russula maculata</i>	89	Unite	UDB002498	Dinamarca

Continuación

<i>Russula</i> <i>maculata</i>	89	GenBank	AY061688	Europa
-----------------------------------	----	---------	----------	--------

En la Tabla 6 se presentan las secuencias de las especies representativas de los géneros de Russulaceae, subgéneros y secciones de *Russula* utilizadas en los análisis filogenéticos.

Procedentes de las bases de datos Bold Systems, GenBank y Unite.

Tabla 6. Especies representativas de los géneros de Russulaceae, subgéneros y secciones de *Russula* utilizadas en los análisis filogenéticos.

Taxon	Género	Subgénero	Sección	Base de datos	Clave de acceso	Procedencia
<i>Lactarius torminosus</i> ^a	<i>Lactarius</i>	<i>Lactarius</i>	<i>Lactarius</i>	Unite	UDB015811	Estonia
				Unite	UDB000375	Finlandia
				GenBank	GU373496	Finlandia
<i>Lactarius piperatus</i>	<i>Lactarius</i>			Unite	UDB011686	Estonia
				GenBank	JF908270	Italia
<i>Lactariusvolemus</i> ^a	<i>Lactifluus</i>	<i>Lactifluus</i>	Albati	GenBank	DQ422008	Suecia
<i>Russula</i>	<i>Russula</i>	<i>Heterophyllidia</i>	Griseinae	Unite	UDB011310	Estonia

Continuación

Taxon	Género	Subgénero	Sección	Base de datos	Clave de acceso	Procedencia
<i>aeruginea</i> ^c						
<i>Russula cremeoavellanea</i> ^d	<i>Russula</i>	<i>Coccinula</i>	Laetinae	Unite	UDB000906	Suecia
				Unite	UDB011366	Estonia
<i>Russula decolorans</i> ^d	<i>Russula</i>	<i>Coccinula</i>	Decolorantinae	GenBank	AY061670	Europa
				Unite	UDB011326	Estonia
<i>Russula emética</i> ^a	<i>Russula</i>	<i>Russula</i>	Emeticinae	GenBank	AY061673	Europa
				Unite	UDB011307	Estonia
				Unite	UDB000300	Alemania
				GenBank	JQ888196	Reino unido
<i>Russula foetens</i> ^b	<i>Russula</i>	<i>Ingratula</i>	Foetentinae	GenBank	DQ422023	Suecia
				Unite	UDB002424	Gran Bretaña
<i>Russula grisea</i> ^b	<i>Russula</i>	<i>Heterophyllidia</i>	Griseinae	GenBank	DQ422030	Suecia
<i>Russula integra</i> ^b	<i>Russula</i>	<i>Polychromidia</i>	Integrinae	GenBank	AY061683	Europa
				Unite	UDB011319	Estonia

Continuación

Taxon	Género	Subgénero	Sección	Base de datos	Clave de acceso	Procedencia
<i>Russula laricina</i> ^d	<i>Russula</i>	<i>Tenellula</i>	Laricinae	GenBank	AY061685	Europa
				GenBank	JN944008	Italia
<i>Russula lilacea</i> ^b	<i>Russula</i>	<i>Incrustatula</i>	Lilaceinae	GenBank	JN944005	Eslovaquia
				Unite	UDB016044	Finlandia
<i>Russula nigricans</i> ^b	<i>Russula</i>	<i>Compacta</i>	Nigricantinae	GenBank	DQ422010	Suecia
				Unite	UDB011331	Estonia
<i>Russula ochricompacta</i> ^a	<i>Multifurca</i>	-	-	GenBank	DQ421984	Estados Unidos
				GenBank	JQ992943	Estados Unidos

^a Especie representativa del género

^b Especie representativa del subgénero

^c Especie representativa del subgénero

A continuación se muestra el resultado del primer análisis filogenético en donde se observa la relación entre las 20 secuencias obtenidas del área de estudio (raíces y basidiomas),

incluyendo también las secuencias representativas de cada género de la familia Russulaceae (Figura 5).

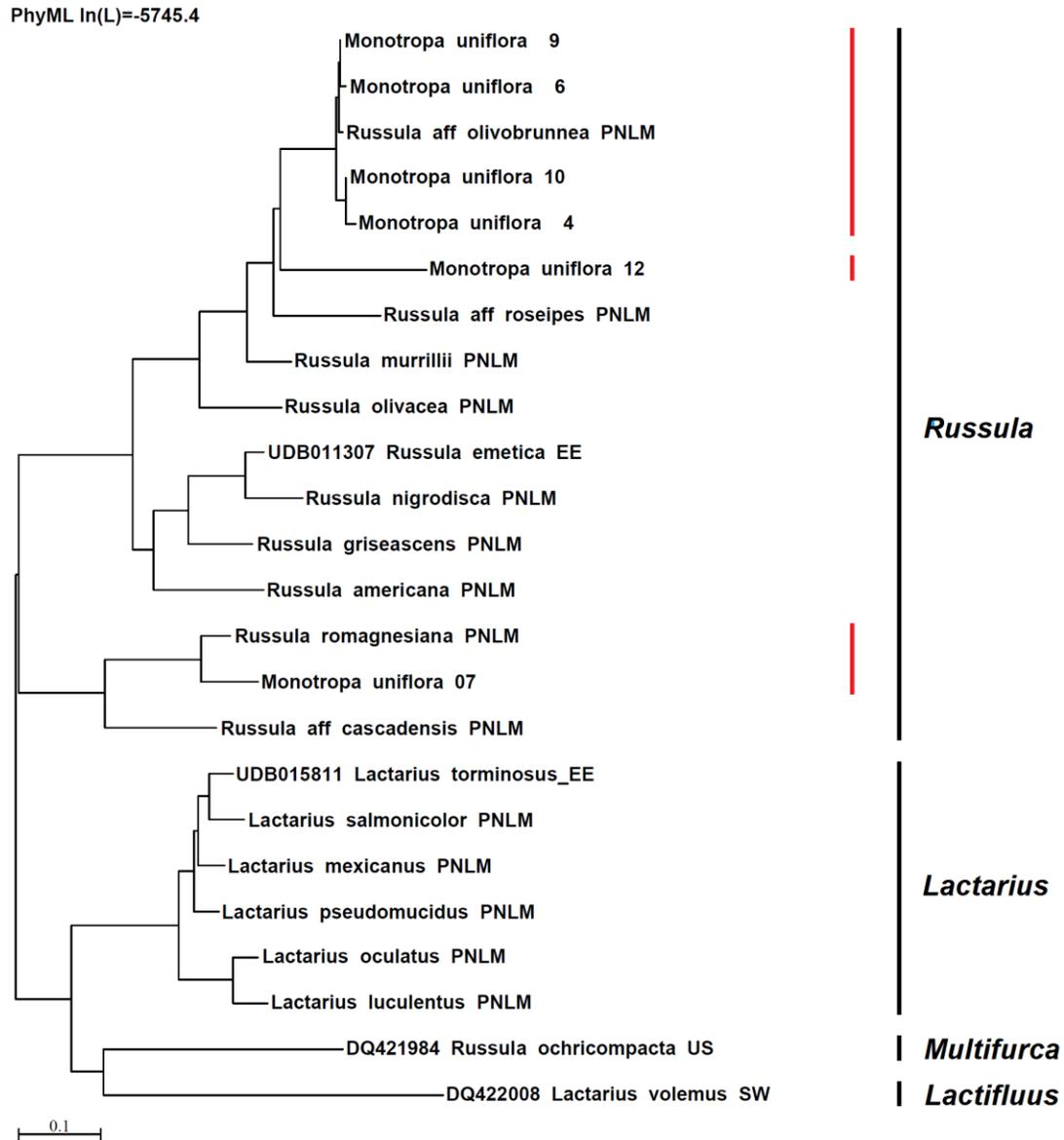
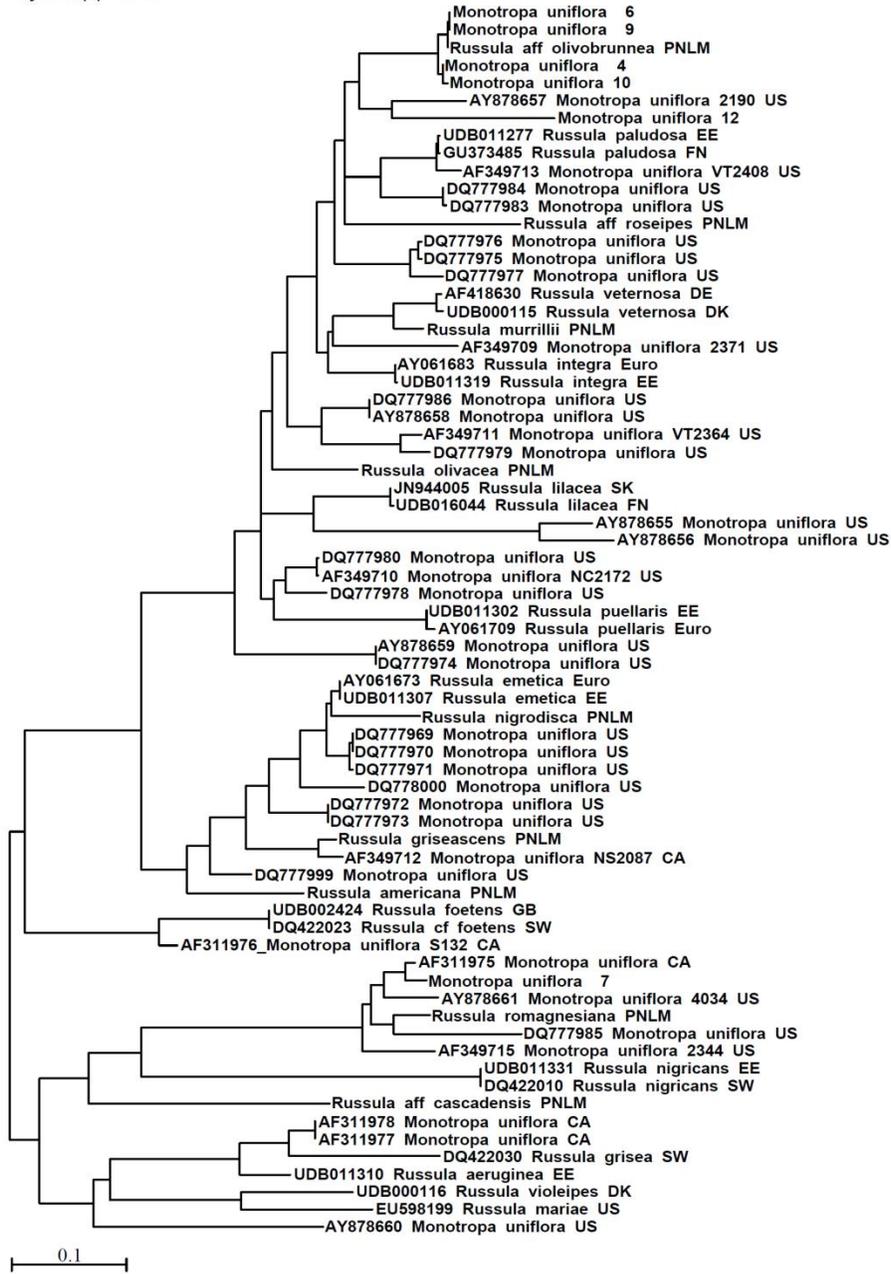


Figura 5. Árbol de máxima verosimilitud que muestra las seis secuencias procedentes de las raíces de *M. uniflora* (4-12), las 14 de los basidiomas recolectados alrededor de las plantas (PNLM) y cuatro de las especies tipo de los géneros de la familia Russulaceae. Las barras rojas muestran la ubicación de las secuencias procedentes del área de estudio. EE = Estonia, SW = Suecia, US = Estados Unidos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes, 557 patrones encontrados (de un total de 1023 sitios). 579 sitios sin polimorfismo (56,60 %), el

mejor modelo fue GTR+I+G, con una proporción de sitios invariables de 0.266000, con un parámetro de gamma de 0.826000.

Debido a que ninguna de las secuencias obtenidas de *M. uniflora* se agrupó con *Lactarius*, *Lactifluus* o *Multifurca*, las secuencias de las especies de éstos géneros se excluyeron de los análisis filogenéticos posteriores. En la Figura 6, se presentan las relaciones entre las secuencias generadas en el presente estudio, con las secuencias del género *Russula* obtenidas de *M. uniflora* por Bidartondo y Bruns (2001, 2005), Young y cols. (2002), así como de Yang y Pfister (2006), incluyéndose además, dos secuencias representativas de cada especie tipo de los subgéneros de *Russula* con base en la clasificación de Romagnesi (1967, 1987). Se observa que las secuencias *M. uniflora* 4, 6, 9, 10 y 12 se agrupan dentro del clado en donde se encuentra *R. paludosa*, la especie tipo del subgénero *Coccinula*, y la secuencia *M. uniflora* 7 en el clado que contiene a *R. nigricans*, la especie tipo del subgénero *Compacta*. Estos dos clados se estudiaron por separado para analizar con mayor detalle sus relaciones y determinar la posición sistemática de las secuencias obtenidas de *M. uniflora* del área de estudio.

PhyML ln(L)=-9012.4



Coccinula

Compacta

Figura 6. Árbol de máxima verosimilitud que muestra las relaciones entre las seis secuencias de las raíces de *M. uniflora* (4-12), nueve de los basidiomas de *Russula* recolectados alrededor de las plantas (PNLM), las secuencias generadas por Bidartondo y Bruns (2002, 2005) Young y cols. (2002) y Yang y Pfister (2006) para *M. uniflora* y las de las especies tipo de los subgéneros de *Russula* (Romagnesi 1987; Sarnari 1998). Las barras rojas corresponden con los clados en donde se ubican las secuencias en de *M. uniflora* procedentes del Parque Nacional La Malinche. CA = Canadá, DE = Alemania, DK = Dinamarca, EE = Estonia, Euro = Europa, FN = Finlandia, GB = Gran Bretaña, SK = Eslovaquia, SW = Suecia, US = Estados Unidos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes. 557 patrones encontrados (de un total de 1023 sitios), 579 sitios sin polimorfismo (56,60%), el mejor modelo fue el GTR+I+G, con una proporción de sitios invariables de 0.266000, con un parámetro de distribución gamma de 0.826000.

En la Figura 7 se muestran las relaciones presenta relaciones entre las cinco secuencias de las raíces Mu4, Mu6, Mu9, Mu10 y Mu12, correspondientes con las micorrizas del presente estudio y las de las bases de datos. También las secuencias de referencia de las secciones de los subgéneros *Coccinula*, *Insidiosula* y *Tenellula* (Tabla 6). Las barras rojas corresponden con los clados en donde se ubican las secuencias obtenidas de las raíces de *M. uniflora* y se puede observar que las micorrizas 4, 6, 9 y 10 se agrupan dentro de la sección urentinae, mientras que la Mu12 se agrupa dentro de la sección maculatinae.

PhyML ln(L)=-3848.8

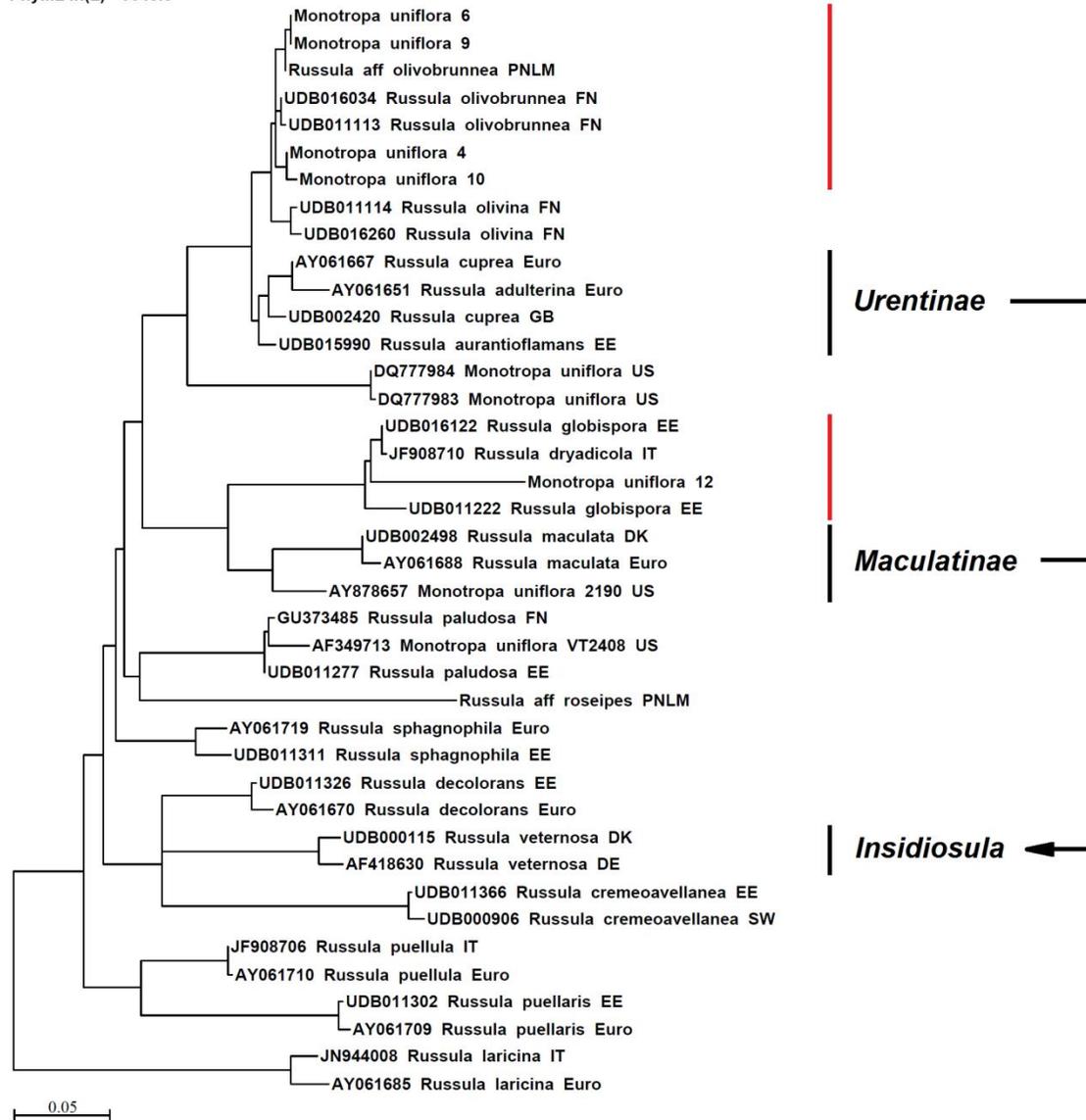


Figura 7. Árbol de máxima verosimilitud que muestra las relaciones entre las seis secuencias de las raíces *M. uniflora* 4, 6, 9, 10 y 12, con las secuencias similares de la Tabla 5 y de las especies tipo de las secciones de los subgéneros *Coccinula*, *Insidiosula* y *Tenellula* (Tabla 6). Las barras rojas corresponden con los clados en donde se ubican las secuencias obtenidas de las raíces de *M. uniflora*. Tradicionalmente, las secciones *Urentinae* y *Maculatinae* se clasifican dentro del subgénero *Insidiosula* (Romagnesi 1967, 1987), pero la especie tipo del subgénero, *Russula veterrosa*, no se relaciona con ambas secciones. DE = Alemania, DK = Dinamarca, EE = Estonia, Euro = Europa, FN = Finlandia, GB = Gran Bretaña, IT = Italia, SW = Suecia, US = Estados Unidos. Se obtuvieron los siguientes resultados 0.346 patrones encontrados de un total de 711 sitios, 442 sitios sin polimorfismos (62,17%), el mejor programa según J Model Test fue GTR+I+G, la proporción de sitios invariables fue de

0.31900 y el parámetro de distribución gamma fue de 0.734000.

La Figura 8 presenta los resultados del análisis filogenético para la secuencia de *M. uniflora* 7. Se incluyen las secuencias del clado *Compacta* (*R. romagnesianae*, *R. nigricans* y *R. cascadiensis*), las secuencias de las comparaciones entre las micorrizas de este estudio contra las bases de datos que presentaron mayor similitud con *M. uniflora* 7 y las secuencias de las especies representativas de las secciones del subgénero *Compacta*. La secuencia *M. uniflora* 7 se agrupa con una secuencia de *R. brevipes* y con un hongo (sp) que forma micorriza con *M. uniflora*, ambos de Canadá y probablemente corresponda con esta especie, para asegurar dicha mención se necesitaria hacer más análisis filogenéticos de esta sección. *R. brevipes* ha sido clasificada dentro del subgénero *Compacta* sección *Plorantinae*.

PhyML In(L)=-2601.0

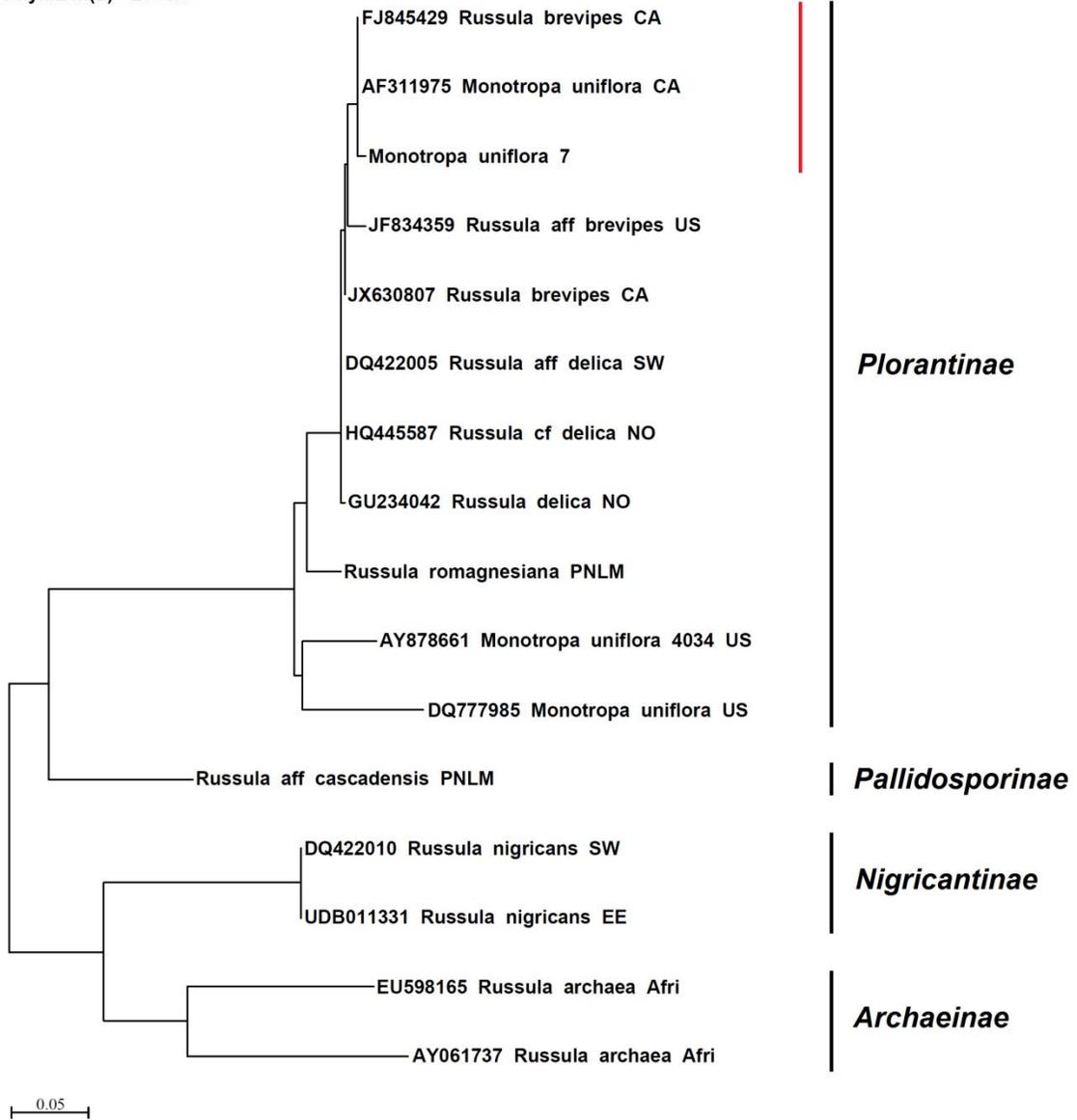


Figura 8. Árbol de máxima verosimilitud que muestra las relaciones entre la secuencia *M. uniflora* 7, con las secuencias similares de la Tabla 2 y de las especies tipo de las secciones del subgénero *Compacta* (Tabla 3). La barra roja corresponde con el clado en donde se ubican las secuencias obtenida de las raíces de *M. uniflora*. Afri = África, CA = Canadá, EE = Estonia, SW = Suecia, US = Estados Unidos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes, 294 patrones encontrados (de un total de 694 sitios) y .464 sitios sin polimorfismo (66.86 %), el mejor modelo según J Model Test fue GTR+I+G, con una proporción de sitios invariables de 0.254000, con un parámetro de gamma de 0.703000.

En la Tabla 7 se muestra la identidad y posición sistemática de las secuencias obtenidas de las raíces de seis plantas de *M. uniflora* procedentes del Parque Nacional La Malinche.

Tabla 7. Identidad y posición sistemática de los hongos asociados a las raíces de las plantas de *M. uniflora* en el Parque Nacional La Malinche.

Secuencia	Identidad	Posición sistemática ^a	Sección
		Subgénero	
<i>Monotropia uniflora</i> 4	<i>Russula olivobrunnea</i>	cf. <i>Insidiosula</i>	Urentinae
<i>Monotropia uniflora</i> 6	<i>Russula olivobrunnea</i>	cf. <i>Insidiosula</i>	Urentinae
<i>Monotropia uniflora</i> 7	<i>Russula</i> aff. <i>brevipes</i>	<i>Compacta</i>	Plorantinae
<i>Monotropia uniflora</i> 9	<i>Russula olivobrunnea</i>	cf. <i>Insidiosula</i>	Urentinae

Continuación

Secuencia	Identidad	Posición sistemática ^a	Sección
<i>Monotropa uniflora</i> 10	<i>Russula olivobrunnea</i>	cf. <i>Insidiosula</i>	Urentinae
<i>Monotropa uniflora</i> 12	<i>Russula</i> aff. <i>globispora</i>	<i>Insidiosula</i>	Maculatinae

^a Con base en la clasificación de Romagnesi (1967, 1987)

DISCUSIÓN

Diversidad de las especies de la familia Russulaceae con base en los basidiomas recolectados alrededor de las plantas de *Monotropa uniflora*

La especie con mayor número de basidiomas fue *R. cf. olivobrunnea* con 341 ejemplares que representan el 50.8% del total y 63.2% solo para *Russula*. Esto es de gran importancia puesto que refleja la relevancia del papel que parece estar desempeñando esta especie, no obstante que su función de intercambio de nutrimentos y reciclaje es el mismo que el de otros hongos ectomicorrizógenos, la abundancia de carpóforos refleja una mayor y constante actividad del micelio, pues al producir un mayor número de carpóforos, se puede suponer que fisiológicamente sus requerimientos nutrimentales son mayores que en el caso de las especies menos abundantes, esta especie juega un papel fundamental en el intercambio de nutrientes dentro del bosque de *A. religiosa*, específicamente de carbono (Figura 9).

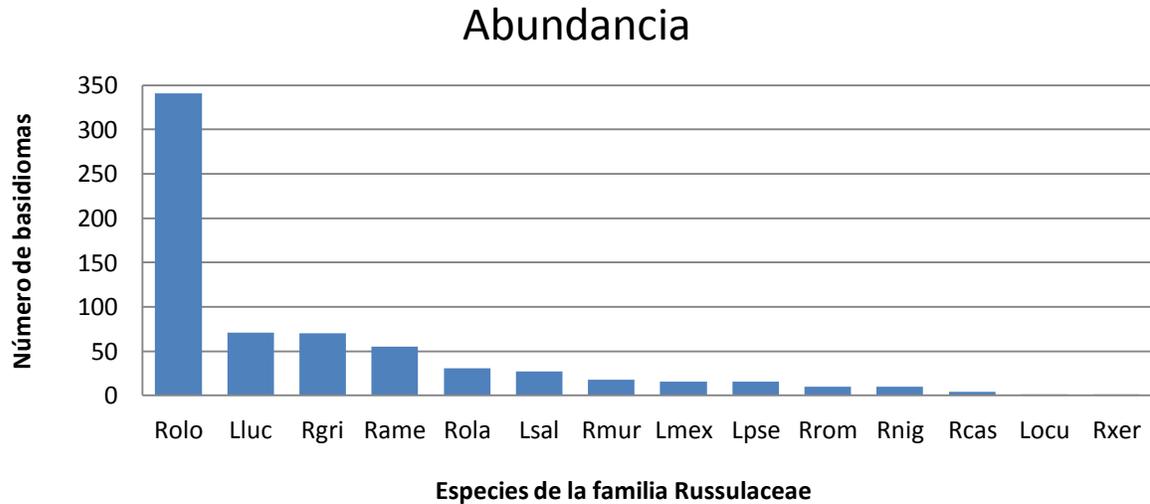


Figura 9. Abundancia de basidiomas dentro de las 12 unidades de muestreo de las especies de la familia Russulaceae durante el 2009. Abreviatura utilizada para las especies de Russulaceae, *L. luculentus* (Lluc), *L. mexicanus* (Lmex), *L. oculatus* (Locu), *L. pseudomucidus* (Lpse), *L. salmonicolor* (Lsal), *R. aff cascadiensis* (Rcas), *R. cf. olivobrunnea* (Rolo), *R. aff xerampelina* (Rxer), *R. americana* (Rame), *R. griseascens* (Rgri), *R. murrillii* (Rmur), *R. nigrodisca* (Rnig), *R. olivácea* (Rola), *R. romagnesiana* (Rrom).

Además, también fue la especie que obtuvo mayor frecuencia dentro de las unidades de muestreo, estando presente en 10 de las 12 unidades (83.3%), seguida de *R. griseascens* y *R. olivacea*, con un porcentaje de 58.3% y 50% respectivamente. *L. oculatus* y *R. aff. xerampelina* fueron las especies que se recolectaron en una sola ocasión dentro de diferentes unidades de muestreo. Esto quiere decir que estas especies no tienen las condiciones adecuadas para desarrollarse en forma de basidiomas y las pocas que lograron hacerlo posiblemente están buscando las condiciones adecuadas para establecerse, (Young y cols. 2002), al menos en la temporada de muestreo que fue en el año 2009.

Para el caso de la abundancia de basidiomas por unidad de muestreo (Mu1-Mu12) se encontró que Mu1 presentó el mayor número de basidiomas (110) así como también de especies (8 de 14), por lo que fue la unidad de muestreo que presentó los valores más altos de abundancia y riqueza (Figura 9).

Las unidades de muestreo Mu4, Mu6, Mu9 y Mu10 fueron las que presentaron a *R. cf. olivobrunnea* asociada con las raíces de *M. uniflora*. Dicha especie fue la mas abundante en

forma de basidiomas y también es la especie que presentó mayor dominancia en cuanto ha raíces colonizadas, lo que permite suponer que es un hongo bien establecido en el sitio de estudio. En este sentido Bidartondo y Bruns (2005) reportan una mejor germinación de las plantas cuando estas se asocian con el hongo que está micorrizando a la planta madre, por lo tanto se puede sugerir que *R. cf. olivobrunnea* es el hongo que se encuentra asociado a las plantas maternas y por lo tanto presenta una mayor dominancia en cuanto a micorrización.

Mientras que para Mu6 y Mu9, *L. luculentus* fue la especie más abundante en cuanto a número de basidiomas, no se encontró ninguna especie del género *Lactarius* asociada con las raíces de *M. uniflora*, lo que concuerda con los reportes de Yang y Fister (2006), quienes encontraron 20 especies asociadas con las raíces de *M. uniflora*, todas pertenecientes a la familia Russulaceae. 18 de las cuales pertenecientes al género *Russula* y sólo dos a *Lactarius*. Además, recolectaron los basidiomas de 25 especies de Russulaceae que crecían alrededor de las plantas muestreadas y observaron que sólo tres se encontraron asociadas con las raíces todas pertenecientes al género *Russula* y ninguna especie del género *Lactarius*.

En las unidades de muestreo Mu7 y Mu12, se detectó a *R. aff. brevipes* y a *R. aff. globispora* asociadas a las raíces de *M. uniflora* respectivamente, sin embargo, en ninguno de los dos casos se recolectaron especies en forma de basidiomas relacionadas con éstas dentro de las unidades de muestreo, coincidiendo así con lo reportado por Young y cols. (2002) quienes reportaron que no hubo una relación con las especies epigeas que encontraron alrededor de las plantas (basidiomas) y las relacionadas con las raíces (micorrizas), esto podría deberse a que en ese sitio las micorrizas tienen las condiciones óptimas para su desarrollo y por lo tanto no tienen la necesidad de producir basidiomas para dispersarse a otros sitios.

Para el caso de los índices de diversidad, las unidades de muestreo con los valores más altos de dominancia (*D*) fueron Mu10 (0.879), Mu8 (0.654) y Mu12 (0,641). Con base en el inverso de Simpson (*1-D*) las unidades de muestreo con los valores más altos fueron Mu5 (0.816), Mu1 (0.720) y Mu7 (0.704), estas unidades de muestreo fueron las que presentaron mayor riqueza, y en el caso de las unidades de muestreo Mu5 y Mu7 este valor se correlaciona con el índice de Pielou. Esto quiere decir que estas unidades de muestreo además de ser las más ricas en cuanto a número de especies, también presentaron abundancias equitativas, es decir que se distribuyeron homogéneamente. Las unidades de muestreo con los valores más

altos obtenidos por índice de Pielou fueron los siguientes Mu2 (0.844), Mu5 (0.921) y Mu7 (0.932). Mientras que para el índice de Shannon-Wiener (H) las unidades de muestreo que presentaron los valores más altos fueron Mu1 (1.529) y Mu5 (1.792) dichos valores se correlacionan directamente con los obtenidos por el inverso de Simpson, coincidiendo así en que las unidades de muestreo con la mayor diversidad son la Mu1 y Mu5, esto corresponde también con el número de especies recolectadas por unidad de muestreo siendo así las unidades de muestreo en las que se encontraron un mayor número de especies 8 y 7 respectivamente.

Identidad y posición sistemática de los hongos asociados con las raíces de *M. uniflora*

Como se observa en la Tabla 5, las seis secuencias de hongos asociados con las raíces de *M. uniflora* presentan mayor similitud con diferentes especies del género *Russula* y ninguna con otro género de la familia Russulaceae, esto podría deberse a la extrema especificidad que presenta *M. uniflora* con su hospedero, coincidiendo así con lo reportado por Bidartondo y Bruns (2005) quienes mencionaron que desde el momento de la germinación, las plántulas de *M. uniflora* se desarrollan mejor cuando se asocian con las especies de hongos que se encuentran micorrizando a la planta materna.

Se muestra (Figura 5) que las seis secuencias obtenidas de las raíces de *M. uniflora* coincidieron con especies que pertenecen al género *Russula*. Las muestras *M. uniflora* 4, 6, 9 y 10 se agrupan con *R. cf. olivobrunnea*, mientras que *M. uniflora* 12 queda aislada como grupo hermano de las anteriores y *M. uniflora* 7 con *R. romagnesiana*.

En la Figura 7 se muestran los resultados del análisis filogenético de 5 secuencias de *M. uniflora* 4, 6, 9, 10 y 12. En este análisis se incluyeron, además de las secuencias del clado *Coccinula*, las secuencias de la Tabla 5 que presentaron mayor similitud con *M. uniflora* 4, 6, 9, 10, 12 en las bases de datos Gene bank, Unite, bold system y las secuencias representativas de las secciones del subgénero *Coccinula*, *Insidiosula* y *Tenellula*. Se observó que las secuencias *M. uniflora* 4, 6, 9 y 10 forman un clado que incluye a *R. olivobrunnea* de

Finlandia y a un ejemplar del Parque Nacional La Malinche determinado como *Russula* cf. *olivobrunnea*. Al comparar las descripciones de ambas especies, no se observaron diferencias, excepto en el hábitat y su distribución, en asociación con *Picea abies* en el norte de Europa para *R. olivobrunnea* y en asociación con *Abies religiosa* en el centro de México, lo cual para el caso de hongos micorrizogenos es muy importante y sirve para discriminar entre especies (Shaffer 1964), con base en ello se ha preferido un criterio suficiente para considerarlas como especies distintas. Con respecto a su posición sistemática, el clado hermano de las secuencias obtenidas del área de estudio, de *R. olivobrunnea* y *R. olivina*, corresponden con el grupo de *R. cuprea* y *R. adulterina*, ambas especies clasificadas en el subgénero *Insidiosula* sección Urentinae. Por lo tanto, *R. cf. olivobrunnea* y las secuencias *M. uniflora* 4, 6, 9 y 10 se ubican en la sección Urentinae (= Cupreinae sensu Bon 1988).

Como grupo hermano de este clado se encuentra a *R. olivina*, una especie clasificada dentro del subgénero *Tenellula* sección Laricinae por Routsalainen y Vauras (1990). De igual forma, la especie *R. cf. olivobrunnea* del Parque Nacional La Malinche también fue clasificada en el subgénero *Tenellula* sección Laricinae por Kong (2004). Sin embargo, en el análisis se observa que tanto *R. puellaris*, la especie representativa del subgénero *Tenellula*, como *R. laricina*, la especie representativa de *Tenellula* sección Laricinae, no se encuentran relacionadas con *R. cf. olivobrunnea* ni con *R. olivina*, mientras que *R. cuprea* y afines sí lo están, las cuales se han clasificado dentro de la sección Urentinae del subgénero *Insidiosula*.

La secuencia de *M. uniflora* 12 no se relacionó con ninguna especie recolectada en el PNLM y forma parte del clado que contiene a *R. globispora* y *R. dryadicola*, dos especies descritas originalmente como variedades de *R. maculata* y que por lo tanto se clasifican dentro de la sección Maculatinae del subgénero *Insidiosula*, por lo tanto asumimos que a esta planta la está micorrizando un hongo de la sección Maculatinae, sin embargo durante la época de muestreo no se manifestó en forma de basidioma.

Para las secuencias *M. uniflora* 4, 6, 9, 10 y 12, no se observaron relaciones cercanas con secuencias obtenidas de las raíces de *M. uniflora* reportadas en otros trabajos (Bidartondo y Bruns 2001, 2005; Young y cols. 2002; Yang y Pfister 2006), esto quiere decir que la especificidad de la familia Russulaceae con *M. uniflora* es muy variable y resulta más compleja, como lo mencionan Bidartondo y Bruns (2001), los estudios de la diversidad

genética en poblaciones de *M. uniflora* podría ayudar a explicar si la especificidad de la familia Russulaceae surgió de manera diferente en distintos linajes.

En la Figura 8 se observan los resultados de el análisis filogenético para la micorriza 7, incluyendo secuencias similares de las bases de datos y las secuencias representativas de las secciones del subgénero *Compacta*, podemos observar que la micorriza 7 formó un clado con las especies de *R. brevipes* y *R. delica* reportadas (Bidartondo 2005) para Estados Unidos y Canadá, esto resulta de interés, puesto que *R. brevipes* y *R. delica* son especies americanas y forman un complejo puesto que *R. delica* solo se diferencia de *R. brevipes* por la ornamentación más pequeña en sus esporas (espinas) y que las láminas se encuentran más separadas en comparación con *R. brevipes* que presenta una ornamentación más grande en sus esporas y las laminas muy juntas (Shaffer 1964). Por otra parte se ha considerado a *R. chloroides* (especie europea) como sinónimo de *R. brevipes* (Shaffer 1964) pero por razones prácticas se consideró adecuado seguir llamando *R. brevipes* a las recolecciones americanas y *R. chloroides* a las europeas al no contar con un trabajo que permita esclarecer su estado taxonómico. Por otra parte, la descripción de *R. romagnesiana* (Shaffer 1964) es idéntica a la de *R. brevipes*, debido a ello podría ser considerada como una variedad de *R. chloroides* (europea) con basidiosporas pequeñas. Este intrincado de especies sinónimas y variedades da una idea de lo complejo que son las identidades y posiciones sistemáticas en los hongos.

Dentro de la problemática encontrada en los caracteres morfológicos empleados para la caracterización de los basidiomas del género *Russula*, se encuentran el sabor, el color de la esporada, la ornamentación de basidiosporas y la estructura de la pileipellis. El sabor siempre se ha considerado un carácter taxonómico importante, no obstante que presenta problemas de interpretación. Varios autores describen el sabor probado ya sea en el pileo, en las láminas o en ambas partes. En muchas ocasiones, estas diferencias no son señaladas y simplemente se menciona que presenta un sabor determinado, sin especificar en qué parte del hongo fue probado. También, existen diferencias en el estado de desarrollo del basidioma ya que algunos autores mencionan que el sabor es de cierta manera en especímenes jóvenes y de otra forma en especímenes maduros.

El color exacto de la esporada también es un carácter esencial en la delimitación de las especies. Muchas veces su determinación presenta algunos problemas de interpretación si no se cuenta con un código estandarizado como lo son las tablas de color.

Como lo menciona Buyck (1991) la ornamentación de las basidiosporas en muchas ocasiones es particular de cada especie y es de gran ayuda una buena descripción o ilustración. Los problemas se presentan principalmente cuando se comparan diferentes descripciones encontradas en la bibliografía y que no cuentan con buenas ilustraciones de las basidiosporas. Esto se presenta para una posible interpretación errónea acerca de cómo es la especie que se compara con el material en estudio. Otros problemas principalmente taxonómicos son, la falta de material tipo, diferentes conceptos de especie, problemas nomenclaturales, o carencia de una clasificación relativamente estable.

Tanto la identidad como la posición sistemática necesitan de un análisis más profundo en donde se comparen un mayor número de secuencias de los hongos involucrados como de especies ya conocidas.

CONCLUSIÓN

La riqueza de hongos de la familia Russulaceae asociada con las raíces de *M. uniflora* es más baja en comparación con la diversidad observada alrededor de las plantas, tres y 14 especies respectivamente.

Russula cf. *olivobrunnea* se presentó en la micorriza de cuatro de las seis plantas de *Monotropa uniflora* estudiadas, fue la especie con mayor abundancia por número de basidiomas y la especie más abundante en seis de las diez unidades de muestreo en donde se presentó.

Russula aff. *brevipes* y *R.* aff. *globispora*, las otras dos especies presentes en las micorrizas de *Monotropa uniflora*, no estuvieron representadas en forma de basidiomas dentro de las unidades de muestreo.

A pesar de que *Lactarius luculentus* fue la segunda especie más abundante en número de basidiomas y fue la dominante en dos unidades de muestreo, no se encontró ninguna especie de *Lactarius* asociada a las raíces de *Monotropa uniflora*.

La relación entre la abundancia de las especies recolectadas alrededor de la plantas de *Monotropa uniflora* con las presentes en sus raíces, solo se cumplió con *Russula* cf. *olivobrunnea* para dos de seis unidades de muestreo.

La identificación de las especies asociadas a las raíces de *Monotropa uniflora* con base en caracteres moleculares se ve limitada por el número de secuencias que se pueden comparar. Sin embargo, su posición sistemática a nivel de subgéneros y secciones sí es posible.

PERSPECTIVAS

La diversidad de la familia Russulaceae necesita un mayor esfuerzo de muestreo para entender mejor la dinámica de dicha familia en el bosque de *A. religiosa* en el Parque Nacional La Malinche.

Tanto la identidad como la posición sistemática necesitan de un análisis en donde se comparen un mayor número de secuencias de los hongos involucrados (basidiomas y micorrizas) como de especies ya conocidas.

REFERENCIAS

Abarenkov K, Nilsson RH, Larsson K-H, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølner R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Ursing BM, Vrålstad T, Liimatainen K, Peintner U y Kõljalg U. 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytol.* 186(2): 281-285.

- Acosta R y Kong A. 1991. Guía de las excursiones botánicas al cerro El Peñon y Cañada Grande del estado de Tlaxcala. IV Congreso Nacional de Micología. Jardín Botánico Tizatlán, Folleto 8:1-82. Tlaxcala.
- Agerer R. 1987-2002. *Color Atlas of Ectomycorrhizae*. 1st-12th del. Einhorn-Verlag. Schwäbisch Gmünd.
- Beenken L. 2004. *Die Gattung Russula Untersuchungen zu ihrer Systematik anhand von Ektomykorrhizen*. Dissertation. Universität Munich, Munich.
- Berch SM, Massicotte HB y Tackaberry LE. 2005. Re-publication of a translation of ‘The vegetative organs of *Monotropa hypopithys* L. published by F. Kamienski in 1882, with an update on *Monotropa* mycorrhizas. *Mycorrhiza* 15: 323–332.
- Bidartondo MI y Bruns TD. 2001. Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread phylogenetic and geographical structure. *Molecular Ecology* 10: 2285–2295.
- Bidartondo MI y Bruns TD. 2002. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Molecular Ecology* 11:557–569.
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD y Read DJ. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London, series B* 271: 1799–1806.
- Bidartondo MI y Bruns TD. 2005. On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): performance trade-offs during seed germination and seedling development. *Molecular Ecology* 14: 1549–1560.
- Bidartondo MI. 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *Trasley review. New Phytologist* 167: 335-352.
- Bidartondo MI y Read DJ. 2008. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology* 17:3707–3716.

- Bruns TD y Read DJ. 2000. *In vitro* germination of nonphotosynthetic myco-heterotrophic plants stimulated by fungi isolated from the adult plants. *New Phytologist* 148:335–342.
- Burlingham 1911. The lactariaceae of the pacific coast. *Mycologia* 5:305-311.
- Buyck B, Hofstetter V, Eberhardt U, Verbeken A y Kauff F. 2008. Walking the thin line between *Russula* and *Lactarius*: the dilemma of *Russula* subsect. *Ochricompectae*. *Fungal Diversity* 28: 15-40.
- Buyck B, Hofstetter V, Verbeken A y Walley R. 2010. Proposal to conserve *Lactarius* nom. cons. (Basidiomycota) with a conserved type. *Taxon* 59(1): 295-296.
- Cameron KM, Chase MW y Rudall PJ. 2003. Recircumscription of the monocotyledonous family Petrosaviaceae to include *Japanolirion*. *Brittonia* 55:214–225.
- Castellano MA y Trappe JM. 1985. Mycorrhizal associations of five species of monotropeae in Oregon. *Micología* 77: 499-502.
- Castillo J, García J y San Marín FE. 1979. Algunos datos sobre la distribución ecológica de los hongos, principalmente los macromicetos, en el centro del estado de Nuevo León. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 13: 229-237.
- Chacón S y Guzmán G. 1984. Nuevas observaciones sobre los hongos, líquenes y mixomicetos de Chiapas. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 19: 245-252.
- Cullings KW. 1994. Molecular phylogeny of the *Monotropeae* (*Ericaceae*) with a note on the placement of the *Pyroloideae*. *J. Evol. Biol.* 7: 501-516.
- Dahlberg A. 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* 150: 555-562.
- Dawson JH, Musselman LJ, Wolswinkel P y Dörr I. 1994. Biology and control of *Cuscuta*. *Reviews of Weed Science* 6: 265–317.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T y Wilson A.

2011. Geneious v5.4 (<http://www.geneious.com>).
- Duddridge JA, Malibari A y Read DJ. 1982. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport, *Nature* 287: 834-836.
- Edgar RC. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5): 1792-1797.
- Estrada-Torres, Kong A, Montoya A y Santiago Martínez G. 1991. Listado preliminar de la micobiota del estado de Tlaxcala. *Jardín Botánico Tizatlán, Folleto* 12:45-79. Tlaxcala.
- Fernández GMTE. 1987. Estudio ecológico del bosque de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham; en el Parque Nacional “La Malintzin” en el estado de Tlaxcala, México. Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. México, D. F. 74 p.
- Flores MG, Jiménez L, Madrigal S, Moncayo R. y Takaki T. 1971. Memoria del mapa de tipos de vegetación de la República Mexicana. Secretaría de Recursos Hidráulicos, México, D.F. 59 pp.
- Furness CA, Rudall PJ y Eastman A. 2002. Contributions of pollen and tapetal characters to the systematics of Triuridaceae. *Plant Systematics and Evolution* 235:209–218.
- Gándara G. 1929-1931. Nota acerca del hongo mexicano llamado “el enchilado”. *Mem. Soc. Antonio Alzate* 52:253-257.
- Gandolfo MA, Nixon KC y Crepet WL. 2002. Triuridaceae fossil flowers from the Upper Cretaceous of New Jersey. *American Journal of Botany* 89:1940–1957.
- García J, Pedraza D, Silvia CI, Andrade RL y Castillo J. 1998 Hongos del estado de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. 263 p.
- Gardes M y Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – applications to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.

- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L y Strani P. 2004. Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* 164:175–181.
- González-Fuentes I. 1987. Los hongos del estado de Tlaxcala. Contribución al conocimiento de la micoflora regional. Tesis profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Estado de México.
- Griffiths JFA. 2002. *Genética*, McGraw-Hill Interamericana. ISBN 84-486-0368-0.
- Guindon S y Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 52:696–704.
- Guindon S y Gascuel O. 2004. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52(5): 696-704.
- Guzmán G. 1961. Notas sobre algunas especies de agaricáceos no citadas en México. *An. Esc. Nal. Cienc. Biol.* 10:23-38.
- Guzmán G. 1973. Some distributional relationships between Mexican and Estados Unidos mycofloras. *Mycologia* 65: 1319-1330.
- Guzmán G. 1977. Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. Limusa, México D.F.
- Guzmán G. 1983. Los hongos de la península de Yucatán, II. Nuevas exploraciones y adiciones micológicas. *Biótica* 8:71-100.
- Heim R. 1953. A propos des Lactaries a lait rouge. *Rev. Mycol.* 18:221-224.
- Herrera T. y Guzmán G. 1961. Taxonomía y ecología de los principales hongos comestibles de diversos lugares de México. *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx.* 32: 33-135.
- Hesler LR y Smith AH. 1979. North American species of *Lactarius*. The University of Michigan Press, Ann Arbor.
- Horton TR y Bruns TD. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking

- into the black-box. *Molecular Ecology* 10: 1855-1871.
- Kibby G y Fatto R. 1990. Key to the species of *Russula* in Northeastern Northamerica. Kibby-Fatto Enterprise, Somerville.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW y Stalpers JA. 2008. *Dictionary of the Fungi.*, 10th edición (en inglés), Wallingford: CABI, p. 609. ISBN 978-85199-826-8.
- Kong A. 1998. Ectomycorrhizal Agaricales of Tlaxcala, México. *Mcllvainea* 13 (2): 13-24.
- Kong A. y Estrada-Torres A. 1994. A new species of *Lactarius* from México. *Mycotaxon* 52 (2): 443-466.
- Kong A. 1995. Estudio taxonómico sobre el género *Lactarius* (Russulales) en el volcán La Malintzi, Tlaxcala. Tesis para obtener el grado de biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kong A., A. Montoya y A. Estrada-Torres. 2005. Hongos macroscópicos. In: Fernández F., J. A. y J. C. López-Domínguez (Compiladores). Biodiversidad del Parque Nacional Malinche. Tlaxcala, México. pp. 47-72.
- Kranabetter JM y Friesen J. 2002. Ectomycorrhizal community structure on western hemlock (*Tsuga heterophylla*) seedlings transplanted from forests into openings. *Can. J. Bot.* 80:861–868.
- Leake JR. 1994. The biology of myco-heterotrophic (saprophytic) plants. *New Phytologist* 127: 171–216. *Warning: large document.*
- Leake JR. 2005. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the ‘saprophytic’ plant myth. *Mycologist* 19:113–122.
- Leopold AS. 1950. Vegetación zones of México. *Ecology* 31: 507-518.
- Lian C, Narimatsu M, Nara K y Hogetsu T. 2006. *Tricholoma matsutake* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities. *New Phytologist* 171:825–836.
- López-Domínguez, J.C., R. Acosta P. y A. I. Sánchez H. 2005. Plantas. In: Fernández F., J. A. y J. C. López-Domínguez (Compiladores). Biodiversidad del Parque Nacional

- Malinche. Tlaxcala, México. pp. 73-100.
- Madrigal SX. 1967. Contribución al conocimiento de la ecología de los bosques de oyamel (*Abies religiosa*) en el valle de México. Inst. Nac. Invest. Forest. Bol. Tecn. 18. México, D.F. 94 pp.
- Magurran AE. 1988. *Ecological Diversity and its Measurement*. Princeton University Press, Nueva Jersey.
- Malloch DW, Pirozynski KA y Raven PH. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants (A review). *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América*. 77(4): 2113-2118.
- Martínez M. 1953. *Las pináceas mexicanas*. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Subsecretaría de Recursos Forestales y de Caza. México, D.F. 363 pp.
- Martínez-Alfaro MA, Pérez-Silvia E y Aguirre-Acosta E. 1983. Etnomicología y exploraciones micológicas en la Sierra Norte de Puebla. *Bol Soc. Méx. Mic.* 18:51-63.
- McGinnis S y Madden TL. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32:W20-W25.
- Merckx V y Bidartondo MI. 2008. Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 275:1029–1035.
- Merckx V, Martin, Bidartondo MI y Nicole A. 2009. Myco-heterotrophy: when fungi host plants. *Ann Bot* 104: 1255-1261.
- Miller SL y Buyck B. 2002. Molecular phylogeny of the genus *Russula* in Europa with a comparison of modern infrageneric classifications. *Mycol. Res.* 106(3): 259-276.
- Molina R, Massicotte H y Trappe JM. 1992. Specificity phenomena in micorrhizal symbioses: Community-Ecological consequences and practical implications. In: Allen. M.F. (ed.). *Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant-Fungal Process*. Chapman y Hall, Nueva York. Pp. 357-423.

- Montoya L. 2000. Estudio del género *Lactarius* Pers. (Fungi, Basidiomycotina, Russulales) en México. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, España.
- Montoya L. 1994. Las especies de *Lactarius* (Fungi, Basidiomycotina) conocidas de México, contribución al estudio monográfico del género. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Vegetal), Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México D.F.
- Moreno CE. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. Manuales y Tesis SEA Vol. 1, Zaragoza.
- Neyland R y Hennigan MK. 2004. A cladistic analysis of *Monotropa uniflora* (Ericaceae) Inferred from large ribosomal subunit (26s) rRNA gen sequences. *Castanea* 69(4): 265-271.
- Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Hashimoto T, Umata H y Yukawa T. 2009. Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 276:761–767.
- Pérez-Silva E y Aguirre-Acosta E. 1985. Micoflora del estado de Durango. *Rev. Mex. Mic.* 1:315-329.
- Ratnasingham S y Hebert PDN. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.
- Read D y Pérez-Moreno J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems a journey towards relevance? *New Phytologist* 157: 475–492.
- Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ y Bruns TD. 2001. Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal succession. *Molecular Ecology* 10: 1025-1034.
- Richard F, Moreau P-A, Selosse M-A y Gardes M. 2004. Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Can. J. Bot.* 82: 1711-1729.

- Rinaldi AC, Comandini O y Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33: 1-45.
- Rodriguez SI y Barrera F. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. Vol VII, No 3.
- Romagnesi H. 1967. *Les Russules de Europe et de Afrique du Nord*. Bordas, Paris.
- Romagnesi H. 1987. Status et noms nouveaux pour les taxa infrafeneriques dans le genre *Russula*. *Doc. Mycol* 18 (69):39-40.
- Ronquist F y Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rzedowski J. 2006. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Sanger F y Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 25; 94(3):441-448.
- Santiago G, Kong A, Montoya A y Estrada-Torres A. 1990. Micobiota del estado de Tlaxcala. *Rev. Mex. Mic.* 6: 227-243.
- Sarnari M. 1998. *Russula* nuove o interessanti del Italia central e mediterranea-15 contributo. *Mycol. Veg. Medit.* 19(2):111-132.
- Selosse MA y Roy M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science.* 14:64-70.
- Shaffer R.L. 1964. The subsection *Lactarioideae* of *Russula*. *Mycologia* 64:202-231.
- Sharp AJ. 1945. Notas acerca de la flora de la región escarpada de la parte noreste del estado de Puebla. *Bol. Biol. (Univ. Puebla)* 11-12:29-32.
- Singer R. 1957. New and interesting species of Basidiomycetes V. *Sydowia* 11: 141-272.
- Singer R. 1973. Diagnoses Fungorum Novarum Agaricalum, III Beih. *Sydowia* 7: 1-106.

- Singer R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. 4th ed. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Smith SE y Read DJ. 1997. Mycorrhizal Symbioses. 2nd. Ed. Academic Press. Londres. 605p.
- Smith SE y Read DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis 3rd edn. London: Academic Press.
- Tanaguichi T, Kataoka R, Tamai S, Yamanaka N y Futai K. 2009. Distribution of ectomycorrhizal and pathogenic fungi in soil along a vegetational change from Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) to black locust (*Robinia pseudoacacia*). Mycorrhiza 19: 231-238.
- Taylor DL, Bruns TD, Leake JR y Read DJ. 2002. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der Heijden MGA y Sanders I (eds.). Mycorrhizal Ecology. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 375–413.
- Tedersoo L, May TW y Smith ME. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. Mycorrhiza 20: 217-264.
- Tedersoo L, Peller P, Kõljalg U y Selosse MA. 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. Oecologia. 151:206–217.
- Trudell SA, Rygielwicz PT y Edmonds RL. 2003. Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. New Phytologist 160: 391–401.
- Valenzuela R, Guzmán y Castillo J. 1981. Descripciones de especies de macromicetos poco conocidas en México, con discusiones sobre su ecología y distribución. Bol. Soc. Mex. Mic. 15: 67-120.
- Werner G. 1988. Los suelos del estado de Tlaxcala. Gobierno del estado de Tlaxcala- Universidad autónoma de Tlaxcala.
- White TJ, Bruns T, Lee S y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand H, Sninsky JS y White

TJ (eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, New York: 315-322.

Yang S y Pfister DH. 2006. *Monotropa uniflora* plants of eastern Massachusetts form mycorrhizae with a diversity of Russulacean fungi. *Mycologia* 98(4): 535–540.

Young BW, Massicotte HB, Tackaberry LE, Baldwin QF y Egger KN. 2002. *Monotropa uniflora*: morphological and molecular assessment of mycorrhizae retrieved from sites in the Sub-Boreal Spruce biogeoclimatic zone in central Columbia Británica. *Mycorrhiza* 12:75–82.

Anexos

Anexo 1.- Fotos de las 14 especies de hongos (basidiomas) encontrados en La Cañada Grande en el PNLM, con nombre y abreviatura (fotos tomadas por Kong Luz y Fátima Hernández Jiménez 2007).



Lactarius luculentus (Lluc)

Lactarius mexicanus (Lmex)



Lactarius oculatus (Locu)

Lactarius pseudomucidus (Lpse)



Lactarius salmonicolor (Lsal)

Russula cf. olivobrunnea (Rolo)



Russula americana (Rame)

Russula griseascens (Rgri)



Russula murrillii (Rmur)



Russula nigrodisca (Rnig)



Russula olivacea (Rola)



Russula aff. cascadenis (Rcas)



Russula romagnesiana (Rrom)

Russula aff. xerampelina (Rxer)

Anexo 2. Secuencias en formato Fasta obtenidas de seis hongos asociados a las raíces de *M. uniflora* y 14 de basidiomas recolectados dentro de las unidades de muestreo.

Monotropia uniflora 4

```
GTGGGTCACCCCTTTGTGGGAGGGCTTGCGTTTTACATAAACTCGATACAGTGTAGAATGTT
CTTTTTGCGGTACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGCTCTCGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACCTTGCGCCCTTGGCATTCCGAGGGGACACCCGTTTGAGTGTGCGTCAAATTCTCAAAAA
CCCTTCTTTGATCGGATTTTGGACTTGGAGGTTCAATGCTCGCCTTCAGCTTTGAAAGCGAG
CTCCTCTCAAATACATTAGTGGGGTCCGCTTTGCTGGTCCTTGACGTGATAAGATGTTTCTACGTT
TTGGATTTGGCACTGTCCCTTTGGATCCTGCTCCCAACTCGTCCGTCTCACGGACAACGATGGTG
CTCCGGTCACCGCCATTTACATCGGCGGAAGGCTGGACCCACAAAACGAACCTTGACCTCAAAT
CGG
```

Monotropia uniflora 6

```
GCGGAAGGATCATTATTGTACAACGGAGGTGCAAGGGCTGTCGCTGACCCTCAAAGGTCGTGCA
CGCCCGAGCAGCTCTCACACAATCCATCTCACCCCTTTGTGCACCACCGCGTGGGTCCCCCCC
TTTTGGGGGGGGGGCTTGCCTTTTACATAAACTCGATACAGTGTAGAATGTTCTTTTTTGC GG
TCACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGC
CCCCTTGGCATTCCGAGGGGACACCCGTTTGAGTGTGCGTCAAATTCTCAAAAACCTTTCTTTG
ATCGGATTTTTGGACTTGGAGGTTCAATGCTCGCCTTCAGCTTTTGAAGCGAGCTCCTCTCAAAT
ACATTAGTGGGGTCCGCTTTGCTGGTCCTTGACGTGATAAGATGTTTCTACGTTTTGGATTTGGCA
CTGTCCCTTTGGATCCTGCTTCCAACCTCGTCCGTCTCACGGACAACGATGGTGCTCCGGTCACCG
CCATTTACATCGGCGGGAGGCTGGACCCACAAAACGAACCTTGACCTCAAATCGG
```

Monotropia uniflora 7

```
GCTGACTTTTGGTTCGTGCACGCCCGAGTGTCTCACATACAATATCCCATCTCACCCCTTTGTGC
ATCACCGCGTGGGTCCCCTTCCTCGGAGGGGGTGCTCACGTTTTTAACATTAACACCCCATTCG
AACGTATCGTAGAATGTTCTTTGCGCGATCATGCGCGATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCT
TGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGCATTCCGAGGGGACACCCGTTTGAGTG
TCGTGAACATCCTCAACCTGCTTGGTTTTTTTTACCAAACAAAGTAGGCTTGGAAATTTGGAGTTTT
CTGCTGGCCTCCTCTGAAGCCAGCTCCTCTTAAATCTATCAGTGGGATCCGCTTTGCTAGATCCTC
GACGTTGATAAGATGTTTCTACGTTTGGGTTTTGCTCGGGAAGGACCTGCTTCTAACCGTCCCAT
CAGGGACATCGTTTGAGCCGATCGCCCTTCACGGGGTGGGAAGCTTTTCGACCCATGAAACCTT
GACCTCAAATCGG
```

Monotropa uniflora 9

CGCTGACCCTCAAGGTCGTGCACGCCCGAGCACGCTCTCACACAATCCATCTCACCCCTTTGTGC
ACCACCGCGTGGGTCCCCCCTTTGTGGGGGGGCTTGCCTTTTACATAAAACTCGATACAGTGT
AGAATGTTCTTTTTTTCGGTACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTTCGTGAAAT
TCTCAAAAACCCCTTTCCTTTGATCGGATTTTTGGACTTGGAGGTTCAATGCTCGCCTTCAGCTTTT
AAAGCGAGCTCCTCTCAAATACATTAGTGGGGTCCGCTTTGCTGGTCCCTTGACGTGATAAGATGTT
TCTACGTTTTGGATTTGGCACTGTCCCTTTGGATCCTGCTTCCAACCTCGTCCGTCTCACGGACAAC
GATGGTGCTCCGGTACCGCCATTTACATCGGCGGGAGGCTGGACCCACAAAACGAACCTTGA
CCTCAAATCGG

Monotropa uniflora 10

GCGCTGACCCTCAAGGTTGTGCACGCCCGAGCACGCTCTCACACAATCCATCTCACCCCTTTGTG
CATCACCGCGTGGGCCCCCCCTTTGTGGGAGGGCTTGCCTTTTACATAAAACTCGATACAGTGT
TAGAATGTTCTTTTTTTCGGTACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
AATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTTCGTGAAA
TTCTCAAAAACCCCTTTCCTTTGATCGGATTTTTGGACTTGGAGGTTCAATGCTCGCCTTCAGCTTTT
GAAAGCGAGCTCCTCTCAAATACATTAGTGGGGTCCGCTTTGCTGGTCCCTTGACGTGATAAGATG
TTTTACGTTTTGGATTTGGCACTGTCCCTTTGGATCCTGCTCCCAACCTCGTCCGTCTCACGGACA
ACGATGGTGCTCCGGTACCGCCATTTACATCGGCGGAAGGCTGGACCCACAAAACGAACCTT
GA

Monotropa uniflora 12

GGAAGGATCATTATCGTACAACAGAAGAGTAAGGGCGGTGCTGACCTTTAAAAGCTGTGCACGC
CTAAGCCCTCTCACACAATCCATCTCACCCCTTTTGTGCATTAACGCGTGGGTCTTCCCTTTGCCG
GGAGGGCCTGCGCTTTTATATAAAACATGATACAATGCAGAATGTTTTCTTTTTTGCAGTTATATGC
AATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATATGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTG
GCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTTCGTGAAATTCTCAAAGCCCCCTTTTCTTTGATCCTT
AGTTGGGGTTTGGAAAAGGAGTTTTGGACTTGGAGGTTCAATGCTTGCCTTTTACTTTTGAAGTG
AGCTCCTCTCAAATAAATTAGTGGGGTCCGCTTTGCTGATCCTTAACATGATAAGATGTTTCTATGT
TTTGGATTTAGCACTGTCCCTTGGATGCCTGCTCCTAACTGTCTCACGGACAATAATGGTGCTCCG
GTCCTGCCATTTATATTGGTGGAAAGGCTGGACCCACAAAATTAACCCTTGACTTCAATTCGGG
GGAGACTACCCCGCTGAAATTTAGCATATAATAAGGCGGAGGA

Lactarius luculentus

GTACAAAATGTGAGGGGCATGTGAGGGCTGTTGCCGACTCAATGTCGTGCACGCCCGAGTGTGT
CCTCTCACATAATAATCCATCTCACCCTTTGTGCATCGCCGCGTGGGCACCCTTTGGGATCATCTC
GGAGGGGGCTCGCGTTTTTACACAAAACCCCCCTTTTAAAAGTGTAGAATGACCTCATTTATGCGC
TAACCCGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCG
CCCCTTGGTATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTGCGTGAACCTCAACCTCCTTGGTTTCT
TCTTCTGGAGACCAAAGCAGGCTTGGACTTTGGAGGCCTTTGGCTGGCACCTCTCTTTTTGAAGG
TCAGCTCCTCTTAAATGAATTAGCAGGGTCCTCTTTGCTGAACCTTGACATGTGATAAGATGTTTC
CATGTCTTGGTTTCTGGCTCTGTCACTTTTGGACCCGCTTCTAATCGTCTTGACCTTGCGTGCAG
ACAATGTTGAGCACGTCTCCCTTCTCGGGGAGCTCCCTCGACCCACGAACCCTTGACCTCAA
TCGG

Lactarius mexicanus

TCGTACAAAATGTGTGAGGCACGCAAGGGCTGTGCGTGACTTTTAAATACAAAAGTGTGCACGCC
AGAGTGTGTCTCTCACATAAAATCCATCTCACCCTTTGTGCACCACCGCGTGGGCACCCTTCA
GGGTCAAACCGATCCAGGAGGGGGCTTGCCTTTTTACACAAAACCCCCCTTTTAAAAGTGTAGAG
TGACCCCATTTTTGCGATAACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTGCGTGAACCTC
CAACCTTCTCGGTTTCTTCTGGACACCGAAGGAGGCTTGGACTTTGGAGGCCTTTGGCTGGTGTCT
CTCTCTTCTGAAACCCAGCTCCTCTTAAATGAATTAGCGGGTCCTCTTTGCTGATCCTCGACGTG
TGATAAGATGTTTCCATGTCTTGGTTTCTGGCTCTGTTGCTCCTGGACCCGCTTCTAACCGTCTC
AACCTTGCATCGAGACAATGTTTGAAGCGTGTCTCCCTTCTCGGGAAACACTCTCAACCCACGAA
CCCTTGACCTCAAATCGG

Lactarius oculatus

GCGGAAGGATCATTATCGTACAAAATGTGAGGGGCATGCAAGGGCTGTGCGTGACTTCAAAGTCG
TGCACGCCCGGTGTGTCCCCTCACATAATAATCCACCTCACCCTTTGTGCATCACCGCGTGGGC
AACCTTCCGGATCATCTCGGAGGGGGCTCGCGTTTTTACACAAAACCCCCCTTTTAAAAGTGTAG
AATGACCTCATATATGCGCTAACCCGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTGCGTGAACAA
CCTCAACCTCCTTGGTTTCTTCTGGAGACCAAAGCAGGCTTGGACTTTGGAGGCCTTTGGCTGGTG
CCTCTCTTTTTGAAGGCCAGCTCCTCTTAAACAATTAGCAGGGTCCTCTTTGCCGATCCTCGAC
GTGTGATAAGATGTTTCCATGTCTTGGTTTCTGGCTCTGTCACTTTTGGACCCGCTTCTAACCGT
CTGGACCTTGCCTCGAGACAATGTTGAGCGCGTCTCCCTTCTCGGGAAGCTCCCTCGAC

Lactarius pseudomucidus

ATGTGTGAGGCACGCAAGGGCTGTGCGTGACTTTTATGATGCCAAAAGTTGTGCACGCCGGAGTGT

GTCCTCTCACATAAAATCCATCTCACCCTTTTGTGCACCACCGCGTGGGCACCCCTTCGGGATCA
AACTGATCCAGGAGGGGGCTTGCCTTTTACACAAACCCCTTTTTAAAAAGTGTAGAATGACCTCA
TTTTTGCATAACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACCTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTCTGTGAAAATCTCAACCTTC
TCGGTTTTCTTCTGGATGCCGAGGGAGGCTTGGACTTTGGAGGCCTTTGCTGGCGTCTCTCGCCA
GCTCCTCTCAAATGAATTAGCGGGGTTCCCTTTTGGCGATCCTCGACATGTGATAAGATGTTTTCCA
TGTCTTGGGTTTCTGGCTCTGTTGCCCTTTGGGACCCGCTTCTAACCGTCTCAACGACGATGTTTGT
GAGCGCGTCTCCCTTCTCGGGAAACTCTCTCTCAAACCCACGAACCCTTGACCTCAAATCGG

Lactarius salmonicolor

ATGTGTGAGGCGTGCGAGGGCTGTCGCTGACTTTCAAGTCGTGCACGCCGGAGTGTGTCCTCTC
ACATTAATCCATCTCACCCTTTTGTGCACCACCGCGTGGGCACCCCTTTGGGATCGAACCGATCC
AGGAGGGGGCTTGCCTTTTACACAAACCCCTTTTTAAATGTGTAGAATGACCCATTTTTGCGAT
AACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCG
CCCCTTGGTATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTCTGTGAAAATCTCAACCTTCTTGGTTTCTC
CTGGACACCGAAGGAGGCTTGGACTTTGGAGGCCTTTGCCGGCGTCTCTCTTTTTGAGAGCCG
GCTCCTCTTAAATGAATTAGCGGGGTTCCCTTTTGGCGATCCTCGACATGTGATAAGATGTTTCCAT
GACTTGGTTTCTGGCTCTGTCGCCCTTTGGGACCCGCTTCTAACCGTCTCGACGAGACGACGCTTG
GGCGTGTCTCCTTTCTCGGGAGACTCTCTCAACCCACGAACCCTTGACCTCAAATCGG

Russula aff cascadiensis

TATCGTACTACGGGGGCACGAAAGGCTGTCGCTGACCTTCAAAGGTCGTGCACGCCTCCAGTGC
TCTCGACAAATCCACCTCACCCCTTGTGCATCACCGCGTGGGGGCTCCTTTTGGCTCGTTCCGA
AGGGGTGCTCACGTTTCAAACATACACACCCATTAGAATTTAGTGTAGAATGTCTTATATGCGATG
ACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC
CCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTCTGTGACATCCTCAACCTTCTTGGTTTTCTT
GATCAAGAAGGCTTGGAAATTTGGAGGTTTTTGTGGCCTCCCTTTTGAAGCCAGCTCCTCTTAAAC
GAATTAGTGGGTTTACCTTGTGATCCTCGACGTGATAAGATGTTTCTACGTCTTGGGATGGAGC
AAAGAAAACCTGCTTCTAATCGTCTCTTCGGAGACATCGTTCCGGGCTACCGCCTTTCATTAGGTG
GGAAGCTCGACCCACGAAACCTTGACCTCAAATCGG

Russula aff olivobrunnea

GAGGTGCAGGGCTGTCGCTGACCCTCAAGGTCGTGCACGCCCGAGCACGCTCTCACACAATCCA
TCTACCCCTTTGTGCATCACCGCGTGGGTCCCCCCTTTGTGGGGGGGCTTGCCTTTTACATA
AAACTCGATACAGTGTAGAATGTTCTTTTTTGCGGTACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAA

TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGCATTCCGAGGGGGCACACCCGT
TTGAGTGTTCGTGAAATTCTCAAAAACCCCTTTCTTTGATCGGATTTTTGGACTTGGAGGTTCAATGC
TCGCCCTTCAGCTTTTGAAGCGAGCTCCTCTCAAATACATTAGTGGGGTCCGCTTTGCTGGTCCTT
GACGTGATAAGATGTTTCTACGTTTTGGATTTGGCACTGTCCCTTTGGATCCTGCTTCCAACCTCGT
CCGTCTCACGGACAACGATGGTGCTCCGGTCACCGCCATTTACATCGGCGGGAGGCTGGACCCA
CAAAAACGAACC

Russula americana

GCGGAAGGATCATTATCGTACACCTGAGGTGCAAGGGCTGTCGCTGACTTTTTGTCGTGCACGCC
CGAGTGTCTCAAAAACAATCCATCTCACCCCTGTGCACCACCGCGTGGGTACCCCTTCCGGCTCG
TCCGGAGGGGGGGCTTGCCTTTTACACAAACTCGATACAGTGTAGAGTGTCTTTTTCGATAACA
CGCAATCAATACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACCTTGCGCCCT
TGGCATTCCGAGGGGGCACACCCGTTTGGAGTGTTCGTGAAATTCTCAAAGCCTTTCTTTTGAAGG
GTTTTGGACTTGGAGGCTTTTTGCTGGCTTTCACCTCGAAGCGAGCTCCTCCAAAGGAATTAGT
GGGGTCCGCTTTGCCGATCCTTGACGTGATAAGATGCTTCTACGTCTCGGATTTGGCGATGCCTC
TTGGGCACCTGCTTCTAACCGTCTCATGGACAATGATGGCGTCCCGGTACCCACCGTTTCATCG
GTCGGGAGGCTTGGCCCACCAAAAAACCTTGACCTCAAATCGG

Russula griseascens

TATCGTACAACCGAGGTGCGAGGGCTGTCGCTGACTTTTTTTTGTTCGTGCACGCCCGAGTGCTCTC
ACACAATCCATCTCACCCCTATGTGCACCACCGCGTGGGGTCCCTCTTTGGCTCGCTCCGAGGG
GGGGTCTCGGTTTTTACACAAACTCGAAGCAGTGTAGAATGKCTTTTTTTTTTTTTTTCGATGACACG
CAATCAATACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTG
GCATCCGAGGGGGCACACCCGTTTGGAGTGTTCGTGAAATTCTCAAAGCCTTCTTTTGGTGGAGA
GGATTTTGGACTTGGAGGTCATTTGCTGGTTTTACCTTGAAGCGAGCTCCTCCAAATGGATTAGT
GGGGTCTGCTTTGCCGGTCTTGACGTGATAATATGTTTCTACGTCTCGGGTTTTCTGCACTGTACC
TCTGCTTCTAACCGTCTCATTGACAACGATGGTGTTCCGGTACCCGCCGATTCATCGGTGGGAGG
CTCGACCCACAAAACGACCTTGACCTCAAATCGG

Russula murrillii

CCGAGGTGCAAGGGCTGTCGCTGACCCTCAAAGGTTGTGCACGCCCAAGCGCTCTCACACATCC
ATCTCACCCCTTTTGTGCATCACCGCGTGGGCCCCCTTTGCAGGAGGGCTTGCCTTTTACATA
AACTTGATACAGTGTAGAATGTTTTCTTTTGCAGTCACATGCAATCAATACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGCATTCCGAGGGGGCACACCCGT
TTGAGTGTTCGTGAAATCATCAAAAACCCCTTTCTTTTGTATCCCTATTGTGGTCAGGAAAAGGATTTT
GGACTTGGAGGCTCATGCTTGTCTTTGCTTTCAAAGCGAGCTCCTCTCAAATGAATTAGTGGGG

TCTGCTTTGCTGGTCCTTGACGTGATAAGATGTTTCTACGTTTTGGATTTGGCACTGTCCCTTGGACGCCTGCTTTAACTGTCTCTCGAGACAATGATGGTGCTTCGGTCACCGGCCAATCTACATTGGCGGGGAGGCTGGACCCACAAAAAAAGACCTTGACCTCAAATCGG

Russula nigrodisca

GCGGAAGGATCATTATTGTAAAGCCGAGGCGCGAGGGCTGTGCTGACCTTTTCGGTTCGTGCACGCCGAGCGCTTTCACACAATCCATCTCACCCCTTGTGCACCCACCGCGTGGGTCCCTTTTTGGCTTGTCGGAGGGGGGCTCGCGTTCTCACACAACTTGAAGTAGTGTAGAATGTCCATTTTTGCGATAACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGC GCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTTGAGTGTGCTGAAATTCTCAAAGCCCTTTCTTTT TTGGTCATTTTTGACCGCGGAAAGGATTTTTGGACTTGGAGGCCCTTTGCTGGTTTTCGCCTTGAAGCGAGCTCCTCCCAAATGTATTAGTGGGGTCTGCATTGTCGGTTCCTTGGCGTGATAAGTTGCTTTTACGTCTTTTGGATTTTTGGCTCTGTACACCTGCTTCCAACCGTCTGGTTGACAAATGATGGTGCTCCGGTCGCCACCGATTTTTCGGTGGGAGGCTTGACCCACGAAAGAAACCTTGACCTCAAATCGG

Russula olivacea

TTTCCCAACGGAGTCCCGTGCTTGTGCGCCGAGTTCAAGACTGTCCCCTCCAGAAAACCTTTGGTGTCCATCGTCCCCACTGCGTAGGCTGTGGTTCGGATTTGGAGTAATCGGCCCTTGTCTAGCCAGGGAAGCAATTCGCGAGCTAGCAGGACTCACCGAGTTGGTCTTAGGAGATCAGGGCACGTCATCTGTCGCGCGGGTGCGCCGTGTCCCTCGTAGACCTTTATACCTCGCGTTTTCACACAAACCTCTGATACAGTGTAGAATGTTATTTTTACCTTTTGCGGTACACGCAATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCA GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTTCGCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGA GTGTCGTGAAATCATCAAACCTTTTCTCTTTGATCCCAAATTTATTTTGGTCGGGAAAAGGATTTGGACTTGGAGGTTCCATGCTCGCCTTCTTTTGAAGCGAGCTCCTCTCAAATGAATCAGTGGGGTCCGCTTTGCCGATCCTTGACGTGATAAGATGCTTCTACGTTTTGGATTTGGCACTGTCCCTTGGATGCCTGCTCCTAACCGTCCCATGGACAATGATGGTGCTCCGGTCAACCGCCGTCTACGTTGGCGGGGGAGGCTGGACCCAC

Russula romagnesiana

GCGGAAGGATCATTATCGtACAATGGGGGTACGACGGCTGTGCTGACTTTTTCAAAGTTGTGCACGCCGAGTGCTCTCACATACAATATCCATCTCACCCCTTTGTGCATCACCGCGTGGGTCCCC TTCCTCGGAAGGGGTGCTCACGTTTTTAACATTAACACCCATTGACGATAGTGTAGAATGTTCTTTGCGGATGACGCGTGATCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA GAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTTGAGTGTGCTGAACATCCTCAACCTGCTTTGGTTTTACCGAACCAAAGTAGGCTTGGAAATTTGGAGTTTTCTGCTGGCCTCCTCCGAAGCCAGCTCCTCTTAAATGTATCAGTGGGATCCGCTTTGCTAGATCCTCGACGTTGATAAGATGTTTCTA

CGTCTTGGGTTTTCGCTCGGGAAGGACCTGCTTCTAACCGTCCCATCAGGGACATTGATCGAGCC
GATCGCCCTTCACGGGGTGGGAAGCTTTCGACCCATGAAACCTTGACCTCAAATCGG

Russula sp

GCGGAAGGATCATTATCGTAACAATGGGGGTGCAAGGGCTGTCGCTGACCTTCAAAGGTTGTGC
ACGCCTGAGCATCCTCACACATCCATCTCACCCCTTTGTGCATCACCGCGTGGGTCTCCTTTTTCAC
AAAGGAGCTCACGTTTTCACACAAAACCTTGATACAGTGTAGAATGTTATCTTTGCGGTCACACGCA
ATCAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGG
CATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTCGTGAAACCCTCAAAAATCCTTTTTGGACTTACTGAA
AAGGATTTTTGGACTTGGAGGTTAATGCTTGCCTTTCACCTTTGAAAGTGAGCTCCTCTCAAATG
AATTAGTGGGGTCTGCTTTGCTCGATCCTTGACGTGATAAGATGTTTCTACGTTTTGGATTTTGG
CACTGTTCTTGGACGCCTGCTTCTAACTGTCTCACAGACAATGGATGGTGCTCCGGTCCCTACC
GTCTAACGTCGGTGGGAGGCTGGACCCACGAATGAAAACCTTGACCTCAAATCGG