



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

**INOCULACIÓN DE *Pinus cembroides* Zucc. CON UN
HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y
UNA BACTERIA AUXILIADORA DE LA
MICORRIZACIÓN EN DOS SUSTRATOS**

ABIGAIL JANICE ZÚÑIGA CRUZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

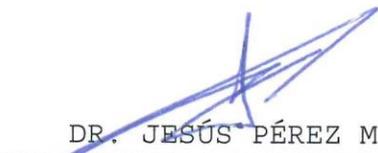
CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe ABIGAIL JANICE ZÚÑIGA CRUZ, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DR. JESÚS PÉREZ MORENO, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis INOCULACIÓN DE Pinus cembroides Zucc. CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y UNA BACTERIA AUXILIADORA DE LA MICORRIZACIÓN EN DOS SUSTRATOS.

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 30 de JULIO de 2018


Firma del
Alumno (a)


DR. JESÚS PÉREZ MORENO
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: INOCULACIÓN DE *Pinus cembroides* Zucc. CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y UNA BACTERIA AUXILIADORA DE LA MICORRIZACIÓN EN DOS SUSTRATOS realizada por la alumna ABIGAIL JANICE ZÚÑIGA CRUZ bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR

DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ

ASESORA

DRA. MAGDÁLENA MARTÍNEZ REYES

Montecillo, Texcoco; Estado de México, agosto de 2018

Esta tesis formó parte del Proyecto CONACyT 2014-Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales 246674 “Biotecnologías de los hongos comestibles ectomicorrízicos y su impacto en la mitigación del cambio climático y desarrollo forestal sustentable”, al cual se agradece su apoyo.



*“Llegar juntos es el principio. Mantenerse juntos, es el progreso. Trabajar juntos es el éxito”
Henry Ford.*

INOCULACIÓN DE *Pinus cembroides* Zucc. CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y UNA BACTERIA AUXILIADORA DE LA MICORRIZACIÓN EN DOS SUSTRATOS

**Abigail Janice Zúñiga Cruz, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018**

RESUMEN

La inoculación de árboles forestales con hongos ectomicorrízicos representa una importante herramienta en la producción de planta; el principal beneficio para ambos simbioses es el intercambio nutrimental y la respuesta benéfica a estreses ambientales. Un factor benéfico biótico adicional está constituido por las bacterias auxiliaadoras de la micorrización. *Pinus cembroides* Zucc es una especie nativa de México que se utiliza en programas de reforestación principalmente en climas semiáridos. En el presente trabajo se evaluó la inoculación del hongo *Laccaria proxima* (Lp) y la bacteria *Conhella* sp. (C) solas o combinadas en *P. cembroides* en dos sustratos con diferente cantidad de composta. En términos generales se observó un efecto sinérgico del hongo y la bacteria en biomasa, altura y diámetro del tallo. La tasa fotosintética y la transpiración fueron ocho veces mayor en comparación con las plantas no inoculadas. El contenido de clorofila y carotenos fue mayor en la inoculación de Lp y Lp+C independientemente de los sustratos. Existió translocación a la parte aérea de N, Fe, Mn y Zn de plantas inoculadas con Lp y Lp+C en el sustrato con 10% de composta. La ectomicorriza Lp cuando se inoculó con C, los porcentajes de colonización fueron 79.4% y 92.7% en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente. Por lo que se concluye que la inoculación de hongos ectomicorrízicos y rizobacterias influyeron en mejorar la calidad fisiológica y nutrimental de *P. cembroides*; demostrando el enorme potencial biotecnológico de estos microorganismos en la producción masiva de plantas de dicha especie forestal.

Palabras clave: Reforestación, sequía, sinergismo, ectomicorriza, bacterias.

INOCULATION OF *Pinus cembroides* Zucc. WITH A EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL FUNGI AND AN MYCORRHIZAL HELPER BACTERIA IN TWO SUBSTRATES

Abigail Janice Zúñiga Cruz, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The inoculation of forest trees with ectomycorrhizal fungi represents an important tool for plant production; the main benefit for both symbionts is the nutrimental exchange and the beneficial response to environmental stresses. An additional biotic beneficial factor is constituted by the mycorrhizal aid bacteria. *Pinus cembroides* Zucc is a native species of Mexico that is used in reforestation programs mainly in semi-arid climates. The present work evaluated the inoculation of the fungus *Laccaria proxima* (Lp) and the bacteria *Conhella* sp. (C) alone or combined in *P. cembroides* on two substrates with different amount of compost. In general terms, a synergic effect was observed in biomass, height and diameter of the stem. The photosynthetic and transpiration rates were eight times greater when compared to non inoculated plants. The chlorophyll and carotene contents were greater in the inoculation of Lp and Lp + C regardless of substrates. There was translocation to the aerial part of N, Fe, Mn and Zn of plants inoculated with Lp and Lp + C in the substrate with 10% of compost. The ectomycorrhiza Lp when it was inoculated with C, the colonization percentages was 79.4% and 92.7% in the substrates of 10% and 20% of compost, respectively. It is concluded that the inoculation of ectomycorrhizal fungi and rhizobacterium improved physiological and nutritional quality of *P. cembroides*; demonstrating the enormous biotechnological potential of these microorganisms in the massive plants production of these forest species.

Key words: Reforestation, drought, synergism, ectomycorrhiza, bacteria.

DEDICATORIA

***A DIOS.** Por ser mi creador, el motor de mi vida, por no haber dejado que me rinda en ningún momento e iluminarme para salir adelante; porque todo lo que tengo, lo que puedo y lo que recibo es regalo que él me ha dado.*

***A MIS PADRES, ANGELA Y PEDRO.** Mil gracias por el amor incondicional que me brindan, por todos los sacrificios que han hecho a lo largo de mi vida, así como su comprensión y paciencia en momentos difíciles que tuvimos.*

***A MIS HERMAN@S.** Por todo el amor brindado y por su comprensión. **GRACIAS ABRAHAM** por ser un pilar en mi vida.*

***A MIS AMIG@S.** Les agradezco a tod@s ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y tristes, porque esos momentos son los que hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero mucho.*



*Gracias por detenerme cuando debías y por empujarme cuando tenía miedo de seguir mis sueños. Estaré eternamente agradecida.
Abigail Janice Z. C.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por haberme dado las armas necesarias para seguir adelante, la capacidad de poder estudiar y la sabiduría para entender las cosas más difíciles en este camino de la vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme financiado los estudios de Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado de Edafología en especial al Área de Microbiología de Suelos, que contribuyeron a las enseñanzas recibidas para mi formación académica.

Infinitas GRACIAS Dr. Jesús Pérez Moreno, por aceptarme en su grupo de trabajo, por dirigir la presente investigación y ser mi Consejero, por compartir sus conocimientos sobre el maravilloso mundo de los hongos ectomicorrízicos, por su amistad y por todas las charlas emotivas que me han ayudado a madurar en estos años.

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez, por aceptar ser parte de esta investigación, por compartir sus conocimientos y su asesoría académica.

Al Dr. Faustino Hernández Santiago y a la Dra. Magdalena Martínez Reyes, por compartir sus conocimientos y su gran apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida académica.

Al personal del laboratorio y administrativo del Área de Microbiología de Suelos, gracias.

*Agradezco a todos ustedes el apoyo incondicional que han tenido conmigo.
Por siempre los llevare en mi memoria.
GRACIAS DE CORAZÓN.*



CONTENIDO

RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 LITERATURA CITADA.....	3
CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	4
2.1 OBJETIVO GENERAL	4
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	4
2.3 HIPÓTESIS GENERAL	5
2.4 HIPÓTESIS PARTICULARES	5
CAPÍTULO III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
3.1 CAMBIO CLIMÁTICO E IMPORTANCIA DE LOS BOSQUES	6
3.2 IMPACTO DE LA SEQUÍA EN ECOSISTEMAS FORESTALES	8
3.2.1 Descripción general de <i>Pinus cemborides</i> Zucc.	10
3.3 IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE LOS HONGOS ECTOMICORRÍZICOS	11
3.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES DE LAS ECTOMICORRIZAS.....	14
3.4.1 Descripción de <i>Laccaria proxima</i>	15
3.4.1.1 Descripción de esporoma	16
3.4.1.2 Caracterización micromorfológica de <i>Laccaria proxima</i>	16
3.5 BACTERIAS AUXILIADORAS DE LA MICORRIZACIÓN (BAM).....	17
3.5.1 Mecanismos funcionales de las BAM.....	19
3.5.2 Descripción de <i>Cohnella</i> sp.....	20
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E INOCULACIÓN.....	21
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
4.3 COSECHA Y EVALUACIÓN DE VARIABLES	23

4.3.1 Crecimiento	23
4.3.2 Tasa fotosintética, transpiración, clorofila y carotenos	24
4.3.3 Análisis nutrimental	25
4.3.4 Relación nutrimental parte aérea:raíz.....	26
4.3.5 Colonización micorrízica	27
4.3.6 Análisis estadístico.....	27
CAPÍTULO V. RESULTADOS	29
5.1 CRECIMIENTO.....	29
5.2 TASA FOTOSINTÉTICA, TRANSPIRACIÓN, CLOROFILA Y CAROTENOS	31
5.3 ANÁLISIS NUTRIMENTAL.....	34
5.4 RELACIÓN NUTRIMENTAL PARTE AÉREA:RAÍZ	34
5.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA MICORRIZA.....	38
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.....	41
6.1. CRECIMIENTO (BIOMASA, DIÁMETRO DEL TALLO Y ALTURA DEL VÁSTAGO)	41
6.2 ANÁLISIS NUTRIMENTAL.....	42
6.3 CONTENIDO DE CLOROFILA (A, B Y TOTALES) Y CAROTENOS	46
6.4 TASA FOTOSINTÉTICA Y TRANSPIRACIÓN	47
6.5 SINERGISMO (<i>Laccaria proxima</i> y <i>Cohnella</i> sp.).....	48
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES	50
CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Diámetro del tallo y altura de plantas de <i>Pinus cembroides</i> Zucc. a partir de los 275 días y hasta los 517 días inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> y <i>Cohnella</i> sp., crecidas en dos sustratos.	30
Cuadro 2. Contenido de clorofila a, b y total, carotenos en plantas de <i>Pinus cembroides</i> Zucc. inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> y <i>Cohnella</i> sp., crecidas en dos sustratos.....	32
Cuadro 3. Relación de macro y micronutrientes en parte aérea:raíz en plantas de <i>Pinus cembroides</i> Zucc. a los 21 meses de edad inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> y <i>Cohnella</i> sp. crecidas en dos sustratos.	35
Cuadro 4. Contenido de macronutrientes de la parte aérea, raíz y total en plantas de <i>Pinus cembroides</i> Zucc. inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> y <i>Cohnella</i> sp., crecidas en dos sustratos.....	36
Cuadro 5. Contenido de micronutrientes de la parte aérea, raíz y total en plantas de <i>Pinus cembroides</i> Zucc. inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> y <i>Cohnella</i> sp., crecidas en dos sustratos.....	37
Cuadro 6. Colonización micorrízica de <i>Pinus cembroides</i> Zucc. crecidas en dos sustratos con diferente cantidad de composta.	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Pinus cembroides* Zucc. a la edad de 5 meses (a, b) y semilla (c)..... **11**
- Figura 2.** Fotos taxonómicas de *Laccaria proxima*: esporoma (a), esporas a 100x (b) (Fuente: Carrasco, 2010)..... **17**
- Figura 3.** Micromorfología de la ectomicorriza de *Laccaria proxima* (Fuente: Carrasco, 2010)..... **17**
- Figura 4.** Inoculación de *Laccaria proxima* en sustrato con 10% de composta (a), semillas de *Pinus cembroides* Zucc. (b) **23**
- Figura 5.** Medición de diámetro del tallo (a) y altura del vástago en *Pinus cembroides* Zucc. (b)..... **24**
- Figura 6.** Medición de la tasa fotosintética (a) y peso de acículas de *Pinus cembroides* Zucc. (b) para la obtención del contenido de clorofila y carotenos..... **26**
- Figura 7.** Raíces vivas micorizadas de *P. cembroides* Zucc. (a), morfotipo de la ectomicorriza *Laccaria proxima* (b) y proceso para la obtención del corte transversal de la ectomicorriza de *P. cembroides* Zucc. (c)..... **28**
- Figura 8.** Peso seco de la parte aérea (en blanco), raíz (en negro) y total (suma de barras blancas y negras) en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. a los 619 días después de la siembra inoculadas con *Laccaria proxima* (Lp) y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos. Los valores representan promedios \pm error estándar de la media n=6, según Tukey ($p \leq 0.05$). Para cada parte de la planta barras con la misma letra son iguales. Letras mayúsculas distintas indican diferencias en el peso seco total según Tukey ($p \leq 0.05$). Psi= plantas sin inocular; PiC= plantas inoculadas con *Cohnella* sp., PiLp= plantas inoculadas con *Laccaria proxima*, PiLp+C= plantas inoculadas con *Laccaria proxima* + *Cohnella* sp..... **30**
- Figura 9.** Plantas de *Pinus cembroides* Zucc. sin inocular en comparación con plantas inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp. a los 21 meses de edad **31**
- Figura 10.** Tasa fotosintética en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. a los 503 días después de la siembra inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos. Los valores representan promedios \pm error estándar de la media n=9, según Tukey ($p \leq 0.05$). Barras con la misma letra son iguales. Psi= plantas sin inocular; PiC= plantas inoculadas con *Cohnella* sp., PiLp= plantas inoculadas con *Laccaria proxima*, PiLp+C= plantas inoculadas con *Laccaria proxima* + *Cohnella* sp..... **33**
- Figura 11.** Transpiración en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. a los 503 días después de la siembra inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos. Los valores representan promedios \pm error estándar de la media n=9, según Tukey ($p \leq 0.05$). Barras con la

misma letra son iguales. Psi= plantas sin inocular; PiC= plantas inoculadas con *Cohnella* sp., PiLp= plantas inoculadas con *Laccaria proxima*, PiLp+C= plantas inoculadas con *Laccaria proxima* + *Cohnella* sp. 33

- Figura 12.** Ectomicorriza *Laccaria proxima* de *Pinus cembroides* Zucc. en sustrato con 10% de composta a 1.20x..... 39
- Figura 13.** Ectomicorriza *Laccaria proxima* con *Pinus cembroides* Zucc. (a) y manto plectenquimatoso a 100x (b)..... 39
- Figura 14.** Ectomicorriza de *Pinus cembroides* Zucc. inoculada con *Laccaria proxima* y *Conhella* sp. en sustrato con 20% de composta. Raíces micorrizadas dicotómicas (a), corte transversal de la ectomicorriza mostrando red de Hartig (rH), manto (m), y micelio externo (me) a 40x (b)...40
- Figura 15.** Ectomicorriza de *Pinus cembroides* Zucc. inoculada con *Laccaria proxima* en sustrato con 10% de composta. Corte transversal de la ectomicorriza *L. proxima* y *Conhella* sp. mostrando red de Hartig (rH), manto (m), y micelio externo (me) a 40x (a) y corte transversal de la ectomicorriza *L. proxima* mostrando red de Hartig (rH), manto (m), y micelio externo (me) a 40 x (b)..... 40

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

De acuerdo al IPCC (2013) el cambio climático y los bosques tienen una estrecha relación ya que estos ecosistemas tienen la capacidad de capturar y almacenar dióxido de carbono. Mediante la reforestación y restauración forestal exitosa es factible la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero y la degradación de suelos así como la recarga de mantos acuíferos (FAO, 2012). En la naturaleza, los hongos ectomicorrízicos son esenciales para la salud y el crecimiento de los árboles forestales; pueden beneficiarlos al mejorar la absorción de nutrientes del suelo, particularmente para elementos con baja movilidad como P y micronutrientes (Smith y Read, 2008). Esto es correspondido por la movilización de carbohidratos del árbol al hongo a través de la raíz, haciendo que la relación sea una asociación mutualista. La ectomicorrizósfera, que forma una interfaz muy específica entre el suelo y los árboles, alberga una comunidad grande y diversa de microorganismos que pueden inhibirse o estimularse entre sí. Algunas de las bacterias promueven consistentemente el desarrollo de micorrizas, lo que ha generado el concepto de bacterias auxiliares de micorrización (BAM) (Frey-Klett *et al.*, 2007). Los hongos ectomicorrízicos y las bacterias también contribuyen conjuntamente a los procesos de mineralización y solubilización edáfica (Calvaruso *et al.*, 2006, Uroz *et al.*, 2009).

Paralelamente, el calentamiento global podría disminuirse por medio del mantenimiento de los ecosistemas forestales y la reforestación (Acosta-Mireles *et al.*, 2009; Lal, 2004; Rodríguez-Laguna *et al.*, 2009). Tomando como relevancia el estudio de especies que toleren sequía, una de ellas es *Pinus cembroides* Zucc la cual es una especie nativa de México que puede tolerar hasta ocho meses continuos sin precipitaciones (Farjon *et al.*, 1997). Por su relevancia ecológica, esta

especie se usa cada vez más en reforestaciones y en proyectos de restauración (Vázquez *et al.*, 1999).

México es un importante reservorio biológico y cultural de hongos ectomicorrízicos comestibles a nivel mundial. Un gran porcentaje de las especies de hongos silvestres comestibles en México forman asociaciones ectomicorrízicas (Pérez-Moreno *et al.*, 2008). El género *Laccaria* ha sido utilizado ampliamente, por ser un hongo cosmopolita (Cairney y Chambers, 1999). Mueller (1992) reconoció 19 especies para Estados Unidos de América y tentativamente 40 a nivel mundial. Las especies de *Laccaria* forman simbiosis ectomicorrízica con un amplio rango de angiospermas y gimnospermas. Dentro de esta gran diversidad de especies se encuentra *Laccaria proxima* formando simbiosis con especies de pinos (Carrasco *et al.*, 2010). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto que tiene la inoculación con el hongo ectomicorrízico comestible y la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp. en *Pinus cembroides* en términos de crecimiento, fisiología y calidad nutrimental en dos sustratos.

1.1 LITERATURA CITADA

- Acosta-Mireles, M., Carrillo-Anzures, F., & Díaz-Lavariega, M. 2009. Determinación del carbono total en bosques mixtos de *Pinus patula* Schl. et Cham. *TERRA Lationamericana*, 27(2), 105–114.
- Cairney, J. W. G. and Chambers, S. M. 1999. Ectomycorrhizae fungi: key genera in profile. *Ed. Springer. Berlin*. 369 p.
- Calvaruso, C., Turpault, M.P., Frey-Klett, P., 2006. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1258e1266.
- Carrasco-Hernández, V., J. Pérez-Moreno, V. Espinosa-Hernández, J. J. Almaraz-Suárez, R. Quintero-Lizaola, y M. Torres-Aquino. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.1 Núm.4 1 de octubre - 31 de diciembre, 2010 p. 567-577.
- IPCC. 2013. Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, de IPCC, 204. Cambridge.
- FAO. 2012. Los bosques y el cambio climático. 15 de 06 de 2012. <http://www.fao.org/forestry/climatechange/53459/es/> (último acceso: 11 de 07 de 2018).
- FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 2012. El estado de los bosques del mundo. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Roma. 51 p.
- Farjon, A., J. A. Pérez de la R. and B. T. Styles. 1997. A field guide to the pines of Mexico and Central America. *The Royal Botanic Gardens. Kew Publishing House. London, UK*. 147 p.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. y Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176, 22–36.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, 304, 1623–1627. doi:10.1126/science.1097396.
- Mueller, G. M. 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana: Botany*, Chicago: Field Museum of Natural History. 158 p.
- Pérez-Moreno, J.; Martínez-Reyes, M.; Yesca-Pérez, A.; Delgado-Alvarado, A. y Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Econ. Bot.* 62(3):425-436.
- Rodríguez-Laguna, R., Jiménez-Pérez, J., Aguirre-Calderón, O., Treviño-Garza, E., & Razo-Zárate, R. 2009. Estimación de carbono almacenado en el bosque de pino-encino en la reserva de la biosfera El cielo, Tamaulipas, México. *Ra Ximhai*, 5(3), 317–327.
- Smith, S. E., and D. H. Read. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Elsevier press. pp: 814.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Frey-Klett, P. 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology* 17, 378e387.
- Vázquez Y., C., A. I. Batis M., M. I. Alcocer S., M. Gual D., y C. Sánchez D. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084. CONABIO, Instituto de Ecología, UNAM. México.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo biotecnológico de la utilización de hongos comestibles ectomicorrízicos y bacterias auxiliaadoras de la micorrización en la producción de plantas de interés forestal con fines de reforestación o plantaciones en diferentes sustratos.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar el efecto de la inoculación sola o combinada de *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp. en crecimiento vegetal y calidad fisiológica y nutrimental de *Pinus cembroides* Zucc.

Evaluar la influencia de la inoculación sola o combinada de *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp. en plantas de *Pinus cembroides* en términos fisiológicos, crecidas en dos sustratos diferentes.

Evaluar la colonización ectomicorrízica de *Pinus cembroides* con *Laccaria proxima* y con *Cohnella* sp. solas o combinadas.

2.3 HIPÓTESIS GENERAL

La inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles y bacterias auxiliaadoras de la micorrización origina un mayor crecimiento, y asimilación de macro y micro nutrientes en *Pinus cembroides* dependiendo de los sustratos.

2.4 HIPÓTESIS PARTICULARES

Los tratamientos de *Pinus cembroides* inoculados con el hongo ectomicorrízico comestible y la bacteria auxiliadora de la micorrización tienen mayor crecimiento, contenido nutrimental y calidad fisiológica en comparación con el tratamiento sin inocular.

Los tratamientos inoculados de *Pinus cembroides* tienen mayor calidad fisiológica y contenido nutrimental en sustratos con menor concentración de composta en comparación con el tratamiento sin inocular.

Existe una mayor colonización ectomicorrízica cuando se inoculan *L. proxima* y *Cohnella* sp. de manera simultánea, que en plantas inoculadas de manera independiente con cada microorganismo.

CAPÍTULO III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 CAMBIO CLIMÁTICO E IMPORTANCIA DE LOS BOSQUES

Los humanos hemos transformado a la Tierra y los impactos en estas últimas décadas se han vuelto visibles a escala global (Steffen *et al.*, 2015). Dentro de estos impactos tenemos el cambio climático que está contribuyendo en alteraciones del sistema terrestre, por lo que está afectando la capa de ozono, mantos acuíferos, diversos ecosistemas y en las distribuciones de especies (IPCC, 2014). Esto está provocando un aumento en la frecuencia e intensidad de los desastres relacionados con el clima, tales como inundaciones, incendios y sequías; provocando la degradación del ecosistema, desencadenando más desastres y disminución de la capacidad del ecosistema para amortiguar los impactos del cambio climático; la pérdida de biodiversidad de los ecosistemas podría causar el colapso de las cadenas alimentarias, lo que provocaría desastres biológicos (IPCC 2013). Actualmente los bosques cubren más de la cuarta parte de la Tierra, la mitad de ellos están en los trópicos y el resto en las zonas templadas y arbóreas. Siete países albergan más del 60% de la superficie forestal mundial: Rusia, Brasil, Canadá, Estados Unidos, China, Indonesia. La mitad de los bosques que una vez cubrieron la Tierra, 29 millones de Km², han desaparecido, y cerca del 78% de los bosques primarios han sido ya destruidos y el 22% restante está amenazado por la extracción de madera (INI-PNUD, 2000; FAO, 2012). Al desaparecer los bosques sabemos que no solo se ausentan especies de árboles sino también microorganismos, desde flora y fauna.

Los ecosistemas forestales son ampliamente reconocidos por su potencial para almacenar la mayor parte del carbono terrestre, por lo que su pérdida puede tener impactos significativos en las emisiones de gases de efecto invernadero (IPCC 2013; Smyth *et al.*, 2014). La distribución de los bosques está estrechamente relacionada con la temperatura y precipitación, y se han adaptado

continuamente a los cambios en condiciones climáticas mediante modificaciones de especies vegetales (Carcaillet *et al.*, 2010). Aquellos ecosistemas que han sido regenerados tienen que hacer frente a condiciones climáticas futuras de al menos varias décadas (Wagner *et al.*, 2014).

Estas condiciones ambientales están afectando a los ecosistemas terrestres (Zhao *et al.*, 2010), generando impactos negativos sobre la salud del bosque asociados con la limitación del agua (Anderegg *et al.*, 2013); por ejemplo, la sequía es una restricción ambiental que provoca disminución en la productividad y mortalidad de árboles maduros, o la susceptibilidad al ataque de patógenos o insectos y la vulnerabilidad al daño por fuego (Zhao *et al.*, 2010 ; Reichstein *et al.* 2013). El sistema radical es la clave de los ecosistemas forestales, pues las raíces son responsables del consumo de agua y nutrientes, proporcionan estabilización física, almacenamiento nutrimental y de carbohidratos (Brunner *et al.*, 2007). Además, pueden actuar mandando señales sobre de las condiciones de déficit hídrico y enviarlas a los brotes vegetativos (Hamanishi *et al.*, 2011). Se estima que las raíces constituyen el 20-40% de la biomasa de los árboles (Jackson *et al.*, 1997). El sistema radical es complejo, porque incluye raíces que difieren en morfología y tamaño. Las raíces gruesas (> 2 mm de diámetro) son responsables de anclar los árboles al suelo y de servir como órganos para transportar el agua desde los horizontes más profundos del suelo. Las raíces finas (<2 mm de diámetro) son importantes para la absorción de agua y nutrientes (Brunner *et al.*, 2007).

En México, los bosques están dominados por géneros de angiospermas y gimnospermas formadores de ectomicorrizas, particularmente por el género *Pinus*, que está representado por 49 especies, que constituyen casi el 50% de la diversidad mundial (Styles, 1993). Los bosques de pino son los de mayor distribución entre los distintos tipos de bosques de coníferas; se estima que cubren hoy alrededor de 75% de su distribución potencial, estimada en 10 millones de hectáreas,

aunque los bosques bien conservados sólo cubren 5.2 millones de hectáreas (Challenger y Soberon, 2008).

Las circunstancias sociales son características de la situación de los bosques en México: la pobreza en la que viven la mayoría de sus habitantes y el estatus social. De principio los bosques son habitados por grupos étnicos en los que radican casi 18 millones de personas que dependen directamente de los recursos forestales para sobrevivir y cuyas condiciones de vida se encuentran en su mayoría en estado de carencia y de necesidades básicas. Para esta población los bosques son un recurso fundamental, ya que constituyen fuentes de recursos maderables y no maderables que destinan a la venta en mercados locales y que representan una fuente de ingreso suplementario (FAO, 2012).

3.2 IMPACTO DE LA SEQUÍA EN ECOSISTEMAS FORESTALES

Estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares sugieren que las plantas han desarrollado una variedad de estrategias para hacer frente a la sequía. Estas estrategias se pueden dividir en aquellas que permiten a las plantas evitar bajas precipitaciones y aquellas que les permiten tolerar la deshidratación (Verslues *et al.*, 2006). Las estrategias para evitar los bajos potenciales hídricos dependen de mecanismos que mantienen el estado hídrico de la planta. La pérdida de agua puede reducirse por el cierre de los estomas y restringir el crecimiento de los brotes. La absorción de agua se puede aumentar a través del crecimiento de la raíz (Tuberosa, 2012 ;Claeys *et al.*, 2013). Existen especies arbóreas adaptadas a los climas secos y generalmente, éstas tienen mayor número de raíces y un sistema radical más profundo, en comparación con las especies adaptadas a condiciones climáticas húmedas (Hartmann, 2011). Estos patrones han contribuido en la hipótesis de que los árboles responden al déficit de agua mediante el aumento de la relación raíz-brote y profundidad de enraizamiento (Poorter *et*

al., 2012). El transporte de agua por los conductos del xilema, va desde las raíces hasta el tallo, ramas y pecíolos de las hojas, también depende del tamaño y la etapa fisiológica del árbol (Mencuccini, 2015; Schuldt *et al.*, 2013). Las raíces finas pueden sacrificarse en respuesta a sequía, de manera similar al mecanismo de la caída de hojas (Chenlemuge *et al.*, 2013; Hertel *et al.*, 2013). Se ha demostrado que bajo condiciones de sequía la simbiosis ectomicorrízica puede mejorar el estado hídrico de los árboles, la conductividad hidráulica y los contenidos nutricionales, lo que modifica la regulación estomática a través de una mayor extensión de la raíz y una mayor área de superficie absorbente del micelio externo (Lehto *et al.*, 2011). Los hongos ectomicorrízicos (ECM) pueden afectar adicionalmente la ruta de célula a célula por el transporte de agua a través de la corteza de la raíz, que ha sido atribuida por las aquaporinas (Xu *et al.*, 2015). El mecanismo indirecto más conocido de los efectos de la ectomicorriza en la relación hídrica probablemente sea la mejora del estado nutricional del fitobionte debido a la facilitación de la adquisición de nutrientes durante la sequía. Otro mecanismo es la asimilación de carbohidratos a través de la función estomática por medio de la estructura del manto fúngico, debido a que puede controlar el movimiento del agua (Lehto *et al.*, 2011). A medida que el suelo se seca, la absorción de agua muestra un cambio gradual y la ectomicorriza asegura el equilibrio del potencial hídrico (suelo-árbol) y soporta la transpiración (Breda *et al.*, 2006). Mohan *et al.* (2014) llegaron a la conclusión de que el principal efecto de las asociaciones de hongos ECM es reducir el estrés de la planta en condiciones de sequía. A medida que aumenta la intensidad de la sequía los tejidos del xilema pueden verse dañados definitivamente (Anderegg *et al.*, 2013). El estrés hídrico causa un daño fisiológico que se asocia con una serie de características y procesos que afectan la fisiología de los árboles debido a la mortalidad prematura de raíces conforme transcurre el tiempo (Breda *et al.*, 2006); lo que deja a un árbol más vulnerable a la sequía en el

año siguiente; si un árbol acumula suficiente daño fisiológico y si este cruza cierto umbral, puede ocurrir la muerte (Anderegg *et al.*, 2013).

3.2.1 Descripción general de *Pinus cembroides* Zucc.

Existe una necesidad de realizar investigaciones en árboles forestales que respondan a un estrés ambiental como lo es la sequía. *Pinus cembroides* Zucc es una especie nativa de México que puede tolerar hasta ocho meses continuos sin precipitaciones. Los bosques del género *Pinus* se desarrollan bajo un amplio espectro de condiciones climáticas, y con frecuencia presentan perturbaciones naturales y antropogénicas, lo que ha modificado su estructura, composición y dinámica natural (Rzedowski, 2006). Dentro del género *Pinus* se encuentra el grupo de piñoneros (subgénero *Ducampopinus*) que se caracterizan por crecer en toda clase de rocas, calizas con alto contenido de yeso e ígneas, sobre suelos secos y delgados. Una de las especies más representativas es *P. cembroides* Zucc, junto con: *Pinus pinceana* Gordon, *Pinus nelsoni* Shaw, y *Pinus edulis* Eng. (Farjon *et al.*, 1997; Treviño, 2001; Rzedowski 2006 y Robert, 2012). Los bosques de piñón tienen una amplia extensión en ambas cadenas montañosas del norte de México y se distribuyen por todo el norte y centro del país, abarcando los estados de Sonora, Chihuahua, Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, México, Tlaxcala, Puebla y Veracruz (Narave y Taylor, 1997), en zonas donde la precipitación media anual oscila de 350 a 700 mm, y en altitudes de 1500 hasta 2550 msnm, desempeñando una función importante en el ecosistema y en el ciclo hidrológico, pues evitan la erosión y promueven la infiltración del agua y la recarga de los mantos acuíferos. Además es hábitat importante de la fauna silvestre, cerca del 90% del volumen de su semilla producida es consumida por muchas especies de aves y mamíferos (CONABIO, 2016). Al ser una especie que constituye parte de un ecosistema de transición entre la vegetación semiárida y los bosques templados, tiene un alto

potencial adaptativo y de reforestación (Figura 1) (Rzedowski, 2006; Constante *et al.*, 2012 y Robert 2012).

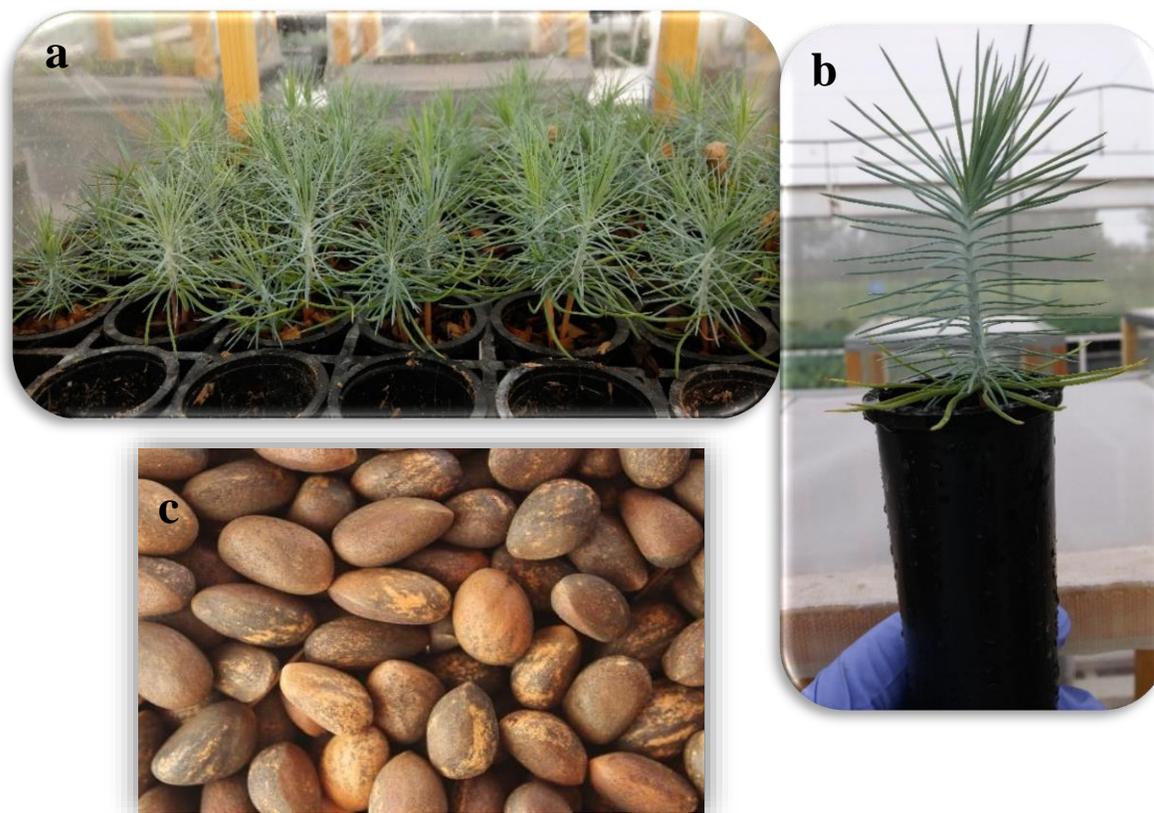


Figura 1. *Pinus cembroides* Zucc. a la edad de 5 meses (a, b) y semilla (c).

3.3 IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE LOS HONGOS ECTOMICORRÍZICOS

Los hongos son uno de los grupos de microorganismos más estudiados en suelos forestales, pues albergan comunidades abundantes y diversos taxones (Sterkenburg *et al.*, 2015). Son considerados los principales descomponedores de materia orgánica debido a su capacidad para producir una amplia gama de enzimas extracelulares que les permiten degradar de manera eficiente la biomasa de plantas muertas (Eichlerova *et al.*, 2015). Más del 90% de los árboles forestales de zonas templadas y boreales participan en la simbiosis ectomicorrízica, y solo

una minoría de árboles están asociados con micorriza arbuscular (Kluber *et al.*, 2011). Las simbiosis micorrízicas son asociaciones que ocurren entre los hongos del suelo y el sistema de raíces en la mayoría de las plantas terrestres. Se asocian siete tipos de micorrizas; principalmente dos, las ectomicorrizas y micorrizas arbusculares, se han estudiado extensamente, debido a su importancia ecológica así como por su distribución filogenética, número de especies vegetales y fúngicas involucradas (Smith y Read, 2008; van der Heijden *et al.*, 2015).

Las ectomicorrizas son características de árboles y arbustos, sus hifas permanecen de manera extracelular (inducción de cambios en la morfogénesis de la raíz) sólo conduce a modificaciones en la epidermis o células corticales (Bonfante, 2001). En las endomicorrizas (arbusculares, ericoides, y orquídeas) sus hifas penetran en las células de la raíz para establecer una simbiosis intracelular (Bonfante *et al.*, 2008). La simbiosis ectomicorrízica es un componente esencial en la mayoría de las comunidades forestales; se han descrito unas 6 000 especies de hongos ectomicorrízicos de los Phyla Ascomycota y Basidiomycota (Tedersoo *et al.*, 2010). Cada especie de árbol puede formar asociaciones simbióticas con varias especies de hongos ectomicorrízicos; mientras que algunos hongos ECM están restringidos a un solo género de árbol o incluso a solo algunas especies. (Richard *et al.*, 2005).

En México, la ectomicorriza es de enorme interés estructural y funcional en ecosistemas templados, subtropicales y tropicales. Los estudios de la simbiosis ectomicorrízica en el país nos demuestran que es un importante reservorio de géneros de árboles de enorme importancia forestal, tanto de pinos y encinos. México ocupa el primer lugar en biodiversidad de los géneros *Pinus* y *Quercus* con 72 taxa y 151 especies, respectivamente. Adicionalmente, el país alberga más de 40% de los géneros de hongos ectomicorrízicos conocidos a nivel mundial (Pérez-Moreno *et al.* 2012).

No se conoce totalmente la distribución total de especies de hongos por entidades federativas; sin embargo, del 47% de ellas se tiene datos publicados; como es el caso de Veracruz, estado con mayor número de especies, registró 1 517 (Guzmán *et al.*, 2003), siguiéndole Jalisco con 1 040 (Guzmán-Dávalos, 2001), Estado de México con 726 (Frutis-Molina *et al.*, 2009), Sonora con 658 (Esqueda *et al.*, 2010), Michoacán con 652 (Gómez-Peralta *et al.*, 2005), Querétaro con 633, Durango con 614, Chihuahua con 580, Tamaulipas con 563 (García-Jiménez *et al.*, 2005), Morelos con 480 (Contreras- MacBeath *et al.*, 2006), Quintana Roo con 447 (López *et al.*, 2011), Aguascalientes con 372 (Pardavé- Díaz *et al.*, 2007), Puebla con 181 (Vázquez-Mendoza *et al.*, 2010), Campeche con 154 (Ancona-Méndez *et al.*, 2010) y Yucatán con 153 (López *et al.*, 2011).

En México se han descrito las ectomicorrizas de: *Laccaria bicolor* en *P. montezumae* (Santiago-Martínez *et al.*, 2003); *Boletus clavipes*, *Laccaria laccata*, *Suillus pseudobrevipes* en *P. patula* y *S. pseudobrevipes* en *P. greggii* (Carrera-Nieva y López-Ríos, 2004); *Pisolithus tinctorius* en *Eucalyptus urophylla* y *P. greggii* (García-Rodríguez *et al.*, 2006); *Boletus rubropunctus* en *Quercus* sp. (Smith y Pfister, 2009); *P. tinctorius*, *Scleroderma texense* en *P. devoniana* y *P. pseudostrobis* (Valdés *et al.*, 2010); *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, *Hebeloma alpinum*, *H. leucosarx* y *H. mesophaeum* en *P. patula* y *P. pseudostrobis* (Carrasco- Hernández, 2010; Carrasco-Hernández *et al.*, 2010; Jiménez-Ruiz, 2011). *Geopora* sp., *Hebeloma helodes*, *H. leucosarx*, *Peziza* sp. 1, *P. aff. ostracoderma*, Pezizaceae sp. 1, sp. 2, sp. 4, *Pulvinula constellatio*, *Sebacina* sp. 1, sp. 2, Sordariales sp. 1, sp. 2 y *Tuber separans* (Garibay-Orijel *et al.*, 2013).

3.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES DE LAS ECTOMICORRIZAS

El hongo provee a la planta de nutrimentos minerales, principalmente nitrógeno y fósforo; además de proporcionar agua, hormonas y protección contra agentes patógenos y factores ambientales extremos (Estrada, 2007).

Red de Hartig: Los hongos ectomicorrízicos establecen asociaciones con plantas formando una envoltura alrededor de la raíz que crece internamente entre las células de la raíz, construyendo la Red de Hartig, incrementando la superficie del área para la absorción de agua y nutrientes (Pérez-Moreno *et al.*, 2007). Es el lugar de masivos intercambios bidireccionales de nutrientes. Por otra parte, la planta hospedera asigna fotosintatos a los hongos simbioses para la formación de sus cuerpos fructíferos. Los hongos transfieren a las plantas nutrientes esenciales, principalmente moléculas de N, P y K, las cuales son absorbidos por la hifa extraradical (Marmeisse *et al.*, 2004).

Manto fúngico: El hongo cubre las raíces cortas formando un manto o vaina. Las hifas crecen de este manto hacia afuera en el sustrato y hacia dentro entre los espacios intersticiales (entre las células) de las células corticales de la raíz (Pérez-Moreno *et al.*, 2007).

Micelio externo: De acuerdo con Chalot (2002), una de las funciones más importantes de dicho micelio es el conectar plantas en la naturaleza. Debido a su habilidad para: 1) absorber y transportar nutrientes minerales y orgánicos; 2) iniciar asociaciones ectomicorrízicas al contactar hospederos jóvenes; 3) funcionar como propágulo fúngico al ser separado por modificaciones físicas de los suelos de los árboles asociados; 4) iniciar la formación de cuerpos fructíferos como primordios; 5) conectar árboles de la misma o diferente especie.

La forma de mejorar, el estado fisiológico de los fitobiontes es a través del incremento en la absorción de agua y nutrimentos, el micelio se extiende por el suelo y se convierte en un

órgano de absorción que llega a tener dimensiones con una razón raíz:micelio de 1:105, y tienen un papel importante en la protección de la planta contra factores ambientales adversos como: sequía, presencia de patógenos y de metales pesados (Selossé *et al.*, 2006). Algunos de los hongos ectomicorrízicos se consideran como un recurso forestal no maderable, pues sus estructuras reproductivas son un recurso económico muy importante que permite obtener un producto que puede comercializarse fácilmente (Niveiro *et al.*, 2009).

Los primeros pasos que se dan entre plantas hospederas y hongos micorrízicos comienzan con el reconocimiento de moléculas señalizadoras que son liberadas por ambos socios. Las plantas exudan muchos metabolitos primarios y secundarios en la rizósfera, incluyendo azúcares, hormonas y enzimas que afectan al microbioma de la raíz. Por otro lado la presencia de moléculas quimiotácticas de la raíz que son capaces de atraer el micelio de los hongos ectomicorrízicos. Por ejemplo, los fenilpropanoides se acumulan en las células de las raíces antes de la colonización, por lo cual, los flavonoides juegan un papel importante en el inicio de la simbiosis micorrízica (Simard, 2009).

3.4.1 Descripción de *Laccaria proxima*

Laccaria proxima tiene una gran importancia como especie comestible en diversas partes del centro y sur de México, en donde son conocidas como “xocoyotl”, “xocoyoli” o “chocoyul” (Pérez-Moreno *et al.*, 2008). Adicionalmente, diversas investigaciones han utilizado especies del género *Laccaria*, para su aplicación en la micorrización controlada de planta de vivero, debido a que se han registrado efectos benéficos en las plantas inoculadas, en comparación con las plantas no inoculadas en términos de crecimiento aéreo, radical y contenido nutricional; por ejemplo, *Laccaria laccata* con *Pinus pinaster* (Pera y Parladé, 2005), y *L. bicolor* con *Pseudotsuga*

menziesii (Parladé *et al.*, 1999), *Pinus pinea* (Rincón *et al.*, 2001) y *Pinus pinaster* (Parladé *et al.*, 1999).

3.4.1.1 Descripción de esporoma

Laccaria proxima. Su píleo es plano, con un diámetro aproximado de 20–60 mm, de coloración tendiendo a vino (Figura 2a). Láminas libres, de color rosa pálido. Estípite cilíndrico de 20–80 mm de longitud y 3.6–9.3 mm de ancho, de color vino ligeramente más oscuro que el píleo. Esporas globosas y cafés, de diámetro aproximado a 5 μm , con ornamentación aparentemente nodulosa (Carrasco, 2010).

3.4.1.2 Caracterización micromorfológica de *Laccaria proxima*.

La ectomicorriza presenta un tipo de ramificación en su mayoría ausente y en menor proporción dicotómica, con una longitud de 1 a 8 mm y 0.2 mm de diámetro, la morfología de las puntas no ramificadas fueron sinuosas o inclinadas. De jóvenes presenta una coloración café claro distribuido homogéneamente; por el contrario, con el tiempo se va diferenciado la base de un color café oscuro y la punta café claro, con la terminación cilíndrica (Figura 3) en su etapa adulta la base es mayor que el ápice. El tipo de manto en la superficie era liso, su anatomía fue plectenquimatos. Macromorfológicamente, se apreciaron estructuras alargadas de las hifas, color café y blanco en las puntas (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010).

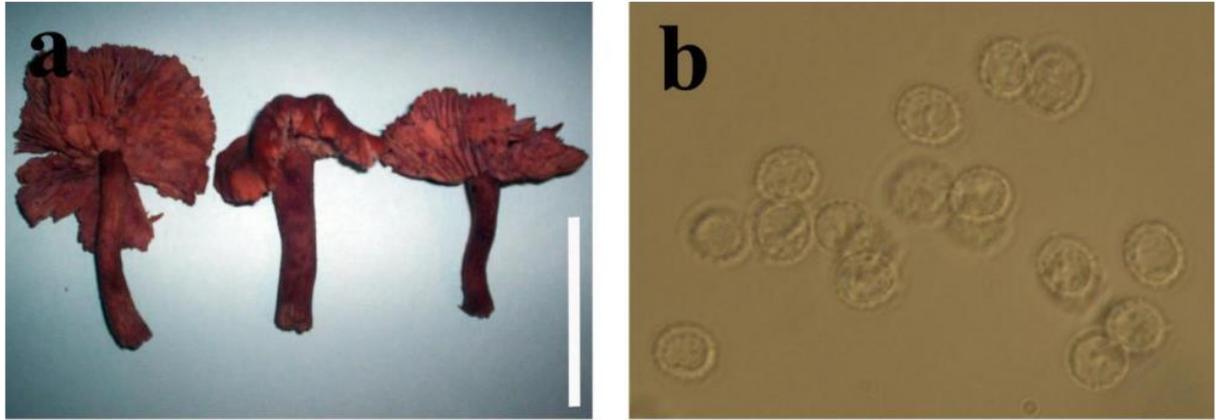


Figura 2. Fotos taxonómicas de *Laccaria proxima*: esporoma (a), esporas a 100x (b) (Fuente: Carrasco, 2010).

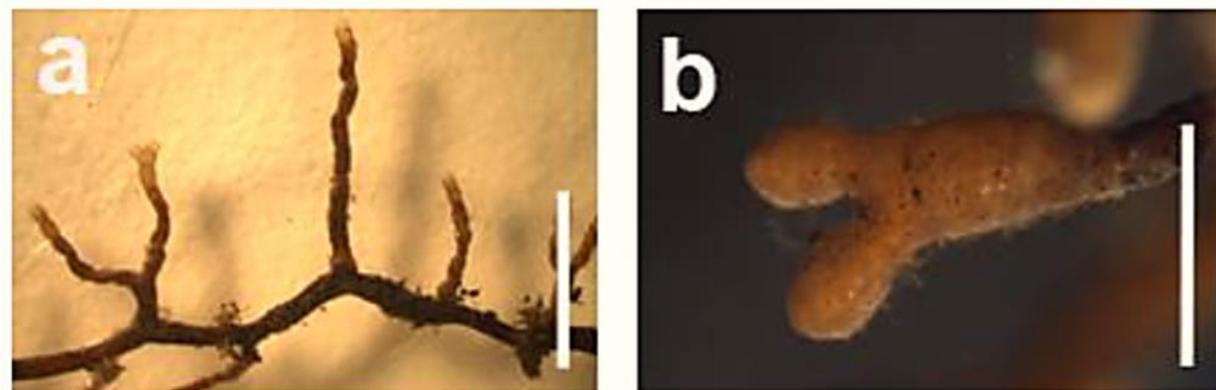


Figura 3. Micromorfología de la ectomicorriza de *Laccaria proxima* (Fuente: Carrasco, 2010).

3.5 BACTERIAS AUXILIADORAS DE LA MICORRIZACIÓN (BAM)

De acuerdo con Gómez y Corlay (2007) las bacterias son los organismos menos evolucionados, de menor complejidad estructural y los más pequeños. Carecen de una membrana nuclear que aísla el material genético del resto de los componentes celulares, por lo cual se conocen como procariontas. Son organismos unicelulares con forma esférica, cilíndrica o en espiral; la mayoría de las bacterias del suelo son gram-negativas. En la rizósfera se pueden encontrar bacterias fijadoras de nitrógeno, promotoras del crecimiento vegetal, solubilizadoras de

fosfatos y patógenas. Las bacterias son los principales agentes naturales responsables de la fijación de N en ecosistemas forestales (Reed *et al.*, 2011) y participan en procesos, como la mineralización que conduce a la liberación de nutrientes inorgánicos (Uroz *et al.*, 2011). En condiciones naturales, las bacterias asociadas con hongos micorrízicos colonizan la superficie de las hifas extrarradical o por lo menos en algunos taxones de hongos (Bonfante *et al.*, 2009).

La importancia de los hongos ectomicorrízicos está cambiando con una apreciación sobre el papel de las bacterias como componente principal de los ecosistemas forestales (Baldrian, 2017). Hallazgos recientes indican que las bacterias comúnmente albergan genes que codifican enzimas que degradan la pared celular de la planta (Berlemont *et al.*, 2015) y contribuyen significativamente a la descomposición de la materia orgánica (Štursova *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2014). Sin embargo, las funciones de las bacterias y los hongos no deben verse como algo separado. La gran abundancia de biomasa fúngica en los suelos forestales tiene múltiples consecuencias para las bacterias, incluida la creación de nichos específicos (Walker *et al.*, 2014), el suministro de nutrientes, la descomposición de la materia orgánica (Bonito *et al.*, 2014) y el aumento en la conectividad del suelo por medio del micelio, pues permite que ciertas bacterias se muevan a través del ambiente (Uroz *et al.*, 2007). El funcionamiento de la micorriza está relacionado por las bacterias auxiliaadoras de la micorrización (BAM) (Bonfant *et al.*, 2001; Izumi *et al.*, 2006). Los ecosistemas forestales proporcionan una amplia gama de hábitats para bacterias, incluidos los tejidos y el suelo (Lauber *et al.*, 2009); además del pH, que parece ser el impulsor más importante de la composición bacteriana de la comunidad en los suelos, el contenido de materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes, las condiciones climáticas y las interacciones bióticas afectan en la composición de las comunidades bacterianas (Chemidlin *et al.*, 2011).

Las BAM aisladas de las ectomicorrizas de diferentes simbiontes mejoran la formación de micorrizas o apoyan la simbiosis previamente establecida (Labbe *et al.*, 2014; Frey-Klett *et al.*,

2007). En la micorrizósfera, las plantas, los hongos ECM y las BAM forman asociaciones tripartitas en las que cada uno afecta críticamente el metabolismo de los demás. Se ha propuesto que los hongos ECM seleccionan comunidades bacterianas mediante la exudación de compuestos de bajo peso molecular, como ácidos orgánicos y aminoácidos (Fransson *et al.*, 2016). Las BAM influyen tanto en los hongos ECM como en su fitobionte (Kurth *et al.*, 2013).

Los estudios sugieren que la liberación de moléculas y el contacto físico entre las bacterias y los hongos ectomicorrízicos son importantes para el establecimiento de sus interacciones. Esto recuerda los principales mecanismos de señalización identificadas entre rizobios y leguminosas (Oldroyd *et al.*, 2008), así como en las micorrizas arbusculares. Los microorganismos liberan moléculas que se perciben recíprocamente (Bouwmeester *et al.*, 2007), y también la activación de las respuestas son mediadas por Ca (Kosuta *et al.*, 2008). Se requiere un contacto físico entre el hongo y la planta para estimular las reacciones que preceden a la colonización fúngica (Genre *et al.*, 2008).

Los linajes de las BAM identificadas pertenecen a grupos y géneros de Gram-negativos del Phylum Proteobacteria (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Rhizobium*), Gram-positivas del Phylum Firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus*, y *Paenibacillus*) y Gram-positivas del Phylum actinobacteria (*Rhodococcus*, *Streptomyces*, y *Arthrobacter*) (Duponnois; Garbaye, 1994).

3.5.1 Mecanismos funcionales de las BAM

a. *Promoción del establecimiento de la simbiosis por estimulación de la extensión micelial.* La germinación de las esporas y el crecimiento micelial son mejorados por la producción de factores de crecimiento (Keller *et al.*, 2007; Garbaye, 1994).

b. *Incremento del contacto y colonización raíz – hongo.* Incremento del número de raíces laterales, mediado por la producción de fitohormonas (Aspray *et al.*, 2006). Mejora de la colonización radical por inducción de la producción de flavonoides (Xie *et al.*, 1995).

c. *Reducción del impacto a factores ambientales adversos sobre el micelio del hongo micorrízico.* Las bacterias pueden realizar una detoxificación de suelos, de forma similar lo liberan de la contaminación generada por metales pesados (Brulé *et al.*, 2001) y reducen las concentraciones de compuestos fenólicos antagonistas.

3.5.2 Descripción de *Cohnella* sp.

El género *Cohnella*, perteneciente a la familia *Paenibacillaceae* del phylum *Firmicutes*, fue propuesto por primera vez por Kämpfer *et al.* (2006) con *Cohnella thermotolerans* como especie tipo. El género *Cohnella* es un grupo de bacterias Gram-positivas, formadoras de endosporas o no formadoras de endosporas, aeróbicas o facultativamente aeróbicas. Los miembros de este género se han aislado de diversos hábitats ecológicos, incluida la industria de producción de almidón (Kämpfer *et al.*, 2006), estanque volcánico (Cho *et al.*, 2007), nódulos de raíz (García-Fraile *et al.*, 2008), suelo (Khiangam *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2007 y Hameed *et al.*, 2013), agua dulce (Shiratori *et al.*, 2010), heces de búfalo (Khiangam *et al.*, 2012) y de la rizósfera (Hameed *et al.*, 2013).

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E INOCULACIÓN

Las semillas de *Pinus cembroides* Zucc procedieron del municipio de Tehuacán, Puebla y fueron recolectadas en noviembre de 2015; la localidad está a una altitud 1620 m, longitud: 97°23'34" O, latitud: 18°27'41" N, con una precipitación media anual de 474 mm y temperatura media de 18.8°C. Las semillas fueron esterilizadas previo a su siembra con H₂O₂ a 30% por 20 minutos y lavadas siete veces con agua estéril.

Se utilizaron dos sustratos para la germinación de las semillas, y para el crecimiento de los pinos, el primero consistió en una mezcla de aserrín-corteza (3.75:2.25) y composta al 10% y el otro con mezcla de aserrín-corteza (3:2) y composta al 20%; ambos sustratos se esterizaron en autoclave a 18 lb de presión. Este proceso se realizó durante 4 h durante un día, posteriormente se dejó reposar 24 h y finalmente se efectuó otra esterilización durante 4 h. Se utilizaron tubetes de plástico de 130cm³ desinfectados con alcohol a 96°. Como fuente de inóculo se utilizó el hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria proxima* el cual fue adquirido en mercados locales de Ozumba, Estado de México y se utilizaron exclusivamente los píleos que fueron deshidratados a 36°C para mantener la viabilidad de propágulos, las cuales fueron molidas y pasadas a través de un tamiz de 1 mm para la homogeneización de tamaño de partícula. Se pesaron 1.5 g de inóculo y se colocaron en tubos ependorf, los cuales fueron almacenados a 5°C hasta su utilización.

La siembra se realizó a finales del mes de marzo de 2016; en la parte inferior de cada tubete se colocó algodón estéril, posteriormente sustrato, seguido del inóculo, después dos semillas de *Pinus cembroides* a una profundidad 2.0 a 3.0 cm aproximadamente. Simultáneamente a la siembra, los sustratos se inocularon con la especie fúngica a una concentración de 10⁶ a 10⁸ esporas y finalmente se agregó otra capa de sustrato. Se aplicó en el

riego fungicida Captan® M-50 en una proporción de 2g/litro con agua destilada, una vez por semana para evitar la presencia de *damping-off* originada por *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. durante los primeros tres meses del experimento (Figura 4). A los cinco meses de edad las plantas fueron inoculadas por segunda vez en su sistema radical con *L. proxima* (1.5 g) y con *Cohnella* sp. Para preparar el inóculo bacteriano, se utilizó la cepa de *Cohnella* sp. proporcionada por el Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados la cual ha sido previamente identificada con Biología Molecular (Barragan *et al.*, 2018). Dicho inóculo se activó y se cultivó en medio de caldo nutritivo Merck en 10 frascos de 100 mL durante siete días en movimiento constante a 26°C. Posteriormente se centrifugó 40 mL de caldo nutritivo con la bacteria a 7000 rpm durante 15 minutos y se resuspendió en agua destilada estéril. En total se aplicaron 2 mL de inóculo bacteriano a una concentración de 10^8 ufc/mL por planta. Todos los tratamientos se mantuvieron en un invernadero tipo semicircular, durante 21 meses; efectuando un riego periódico tres veces por semana en promedio.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental fue un factorial completamente al azar, con dos factores (sustrato e inoculación), para el sustrato fueron dos niveles y para la inoculación fueron tres niveles; cada uno de los 8 tratamientos resultantes tuvo 9 réplicas para dar un total de 72 unidades experimentales, cada una constituida por una planta. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) Psi= plantas sin inocular; 2) PiC= plantas inoculadas con *Cohnella* sp.; 3) PiLp= plantas inoculadas con *Laccaria proxima*; 4) PiLp+C= plantas inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp. simultáneamente. Estos cuatro tratamientos fueron repetidos para los dos sustratos mencionados anteriormente.

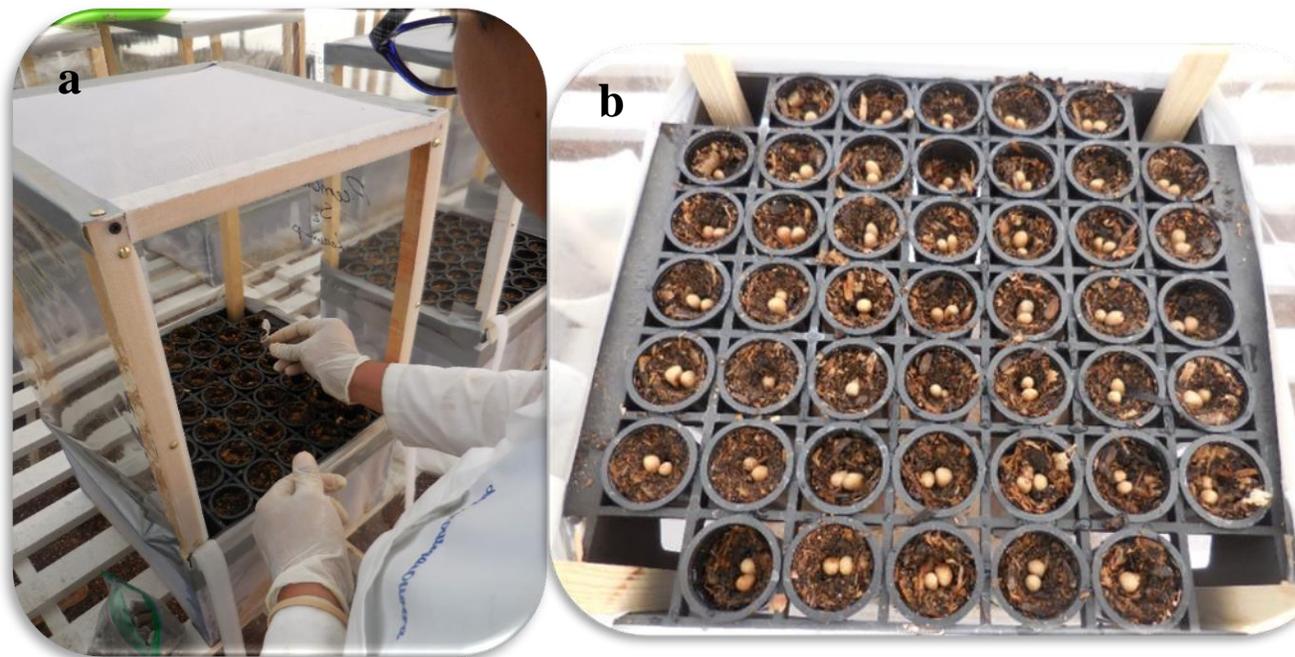


Figura 4. Inoculación de *Laccaria proxima* en sustrato con 10% de composta (a), semillas de *Pinus cembroides* Zucc. (b).

4.3 COSECHA Y EVALUACIÓN DE VARIABLES

4.3.1 Crecimiento

A partir de los nueve meses de edad, se evaluó la altura del vástago y diámetro del tallo de todas las plantas por tratamiento al azar mensualmente durante ocho meses. El diámetro del tallo se tomó en el cuello de la raíz utilizando un vernier digital marca Truper con precisión a 0.001 mm (Figura 5a). La medición de la altura se realizó desde el cuello de la raíz hasta la yema apical de la planta utilizando una regla graduada (mm) (Figura 5b). Para la determinación del peso seco de la parte aérea, raíz y total se cosecharon seis plantas en forma aleatoria por tratamiento, dado que las restantes tres plantas de cada tratamiento se utilizaron para la evaluación de la colonización micorrízica. Mediante análisis destructivo se extrajeron las plantas de los tubetes separando en dos partes (raíz y tallo), tomando como punto de referencia para dicha separación el

cuello de la raíz. Cada una de las partes de cada planta se colocó en bolsas de papel en una estufa (marca: Shel Lab) a 70 °C durante 48 h, después se pesaron en una balanza analítica (marca: Scout-Pro SP202, peso máximo 200 g) para obtener el peso seco de la parte radical y del vástago.

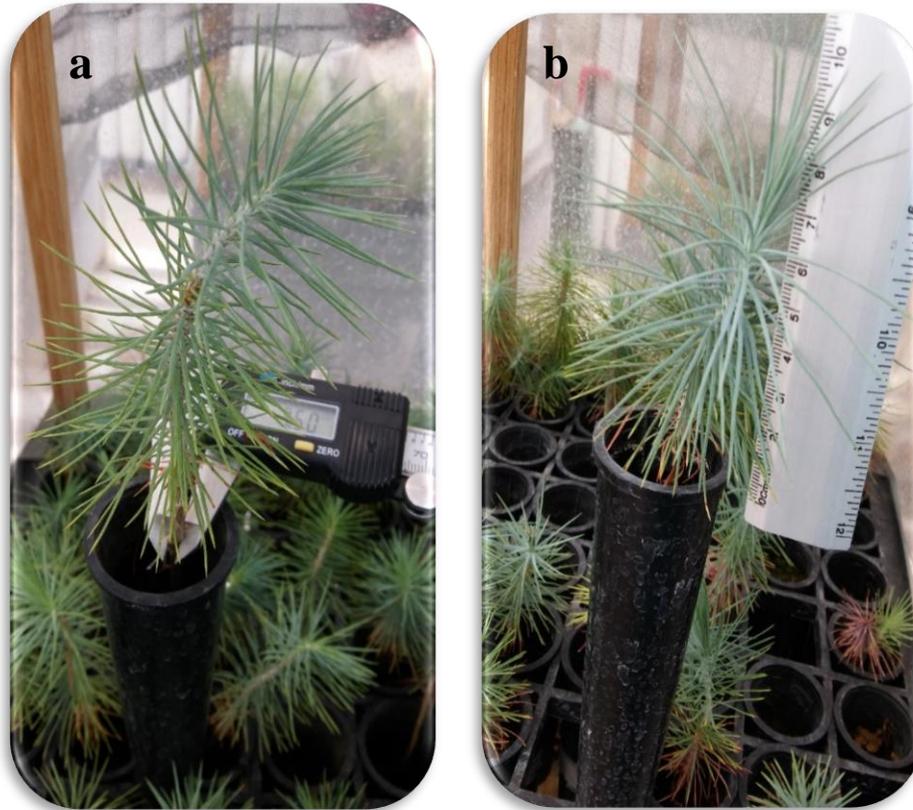


Figura 5. Medición de diámetro del tallo (a) y altura del vástago en *Pinus cembroides* Zucc. (b).

4.3.2 Tasa fotosintética, transpiración, clorofila y carotenos

La tasa fotosintética y transpiración se evaluó en las 9 repeticiones de cada tratamiento con un analizador de gases infrarrojo (IRGA, PP-Systems® modelo Ciras-3, EUA) y una cámara de asimilación de gases (PPSystems®, accesorio original de Ciras-3 CPY-4, EUA) (Figura 6a); las condiciones ambientales de la celda se mantuvieron a una temperatura de 25°C; los datos se colectaron cuando las condiciones y los parámetros del intercambio de gases de la celda fueron

estables, las mediciones se realizaron en días soleados entre las 08:00 y las 12:00 hrs en plantas previamente irrigadas.

Para obtener el contenido de clorofila a, b, total y carotenos se determinó por el método de acetona (Zhang, 1986). Se tomaron siete plantas por tratamiento y se pesaron 0.05 g de acículas por planta, las cuales se colocaron en un mortero, se agregó 10 mL de acetona, se trituraron y se filtraron con papel filtro Whatman número 42 (Figura 6b). El proceso se realizó en condiciones de bajas de luminosidad. Finalmente la solución obtenida se colocó en una celda de cuarzo de 3.5 mL para su análisis en el espectrofotómetro Hewlett Packard® 8453, siguiendo la metodología propuesta por Zhang (1986). Se realizaron lecturas de absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 663 nm, 647 nm y 470 nm y mediante las ecuaciones de Lichtenthaler (1987) se obtuvieron la concentración de clorofilas y carotenos:

$$\text{Clorofila a} = (12.25 \times A_{663\text{nm}}) - (2.79 \times A_{647\text{nm}})$$

$$\text{Clorofila b} = (21.5 \times A_{647\text{nm}}) - (5.1 \times A_{663\text{nm}})$$

$$\text{Clorofila total} = (7.15 \times A_{663\text{nm}}) + (1.87 \times A_{647\text{nm}})$$

$$\text{Carotenos} = \frac{(1000 \times A_{470\text{nm}}) - (1.82 \times \text{Clorofila a}) - (85.2 \times \text{Clorofila b})}{198}$$

4.3.3 Análisis nutrimental

El análisis de N, P, K y Mg se realizó en la parte aérea y en la raíz en 6 plantas seleccionadas al azar. Para este análisis se utilizaron las mismas plantas donde se había efectuado la evaluación de peso seco de la parte aérea y raíz correspondiente a cada tratamiento. El contenido de N se determinó mediante digestión diácida y por arrastre de vapor (Bremmer, 1965); el P por fotolorimetría por reducción con molibdato-vanadato (Harris y Warren, 1962) y el contenido de K por espectrofotometría de emisión de flama (Alcántar y Sandoval, 1999). El análisis de los micronutrientes (Cu, Fe, Mn y Zn) se realizó mediante la extracción de amonio por

fotocolorimetría con azometina. El análisis de estos elementos minerales se realizó en el laboratorio de Nutrición Vegetal en el programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco; Estado de México.

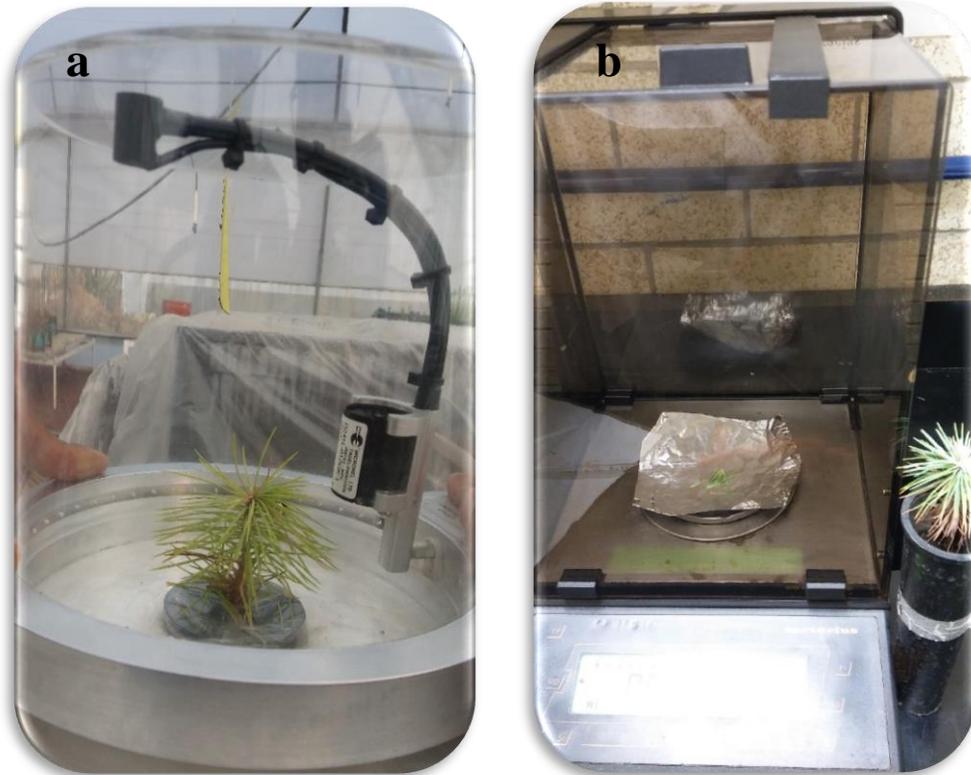


Figura 6. Medición de la tasa fotosintética (a) y peso de acículas de *Pinus cembroides* Zucc. (b) para la obtención del contenido de clorofila y carotenos.

4.3.4 Relación nutrimental parte aérea:raíz

Esta relación se calculó entre el contenido nutrimental de la parte aérea y raíz de las plantas inoculadas versus no inoculadas. Mediante esta relación se obtiene un indicador de la eficiencia de la movilización de cada nutrimento por parte de los microorganismos simbiotes evaluados hacia la parte aérea de la planta.

4.3.5 Colonización micorrízica

Para obtener el porcentaje de colonización y comprobar la asociación micorrízica en el sistema radical, se cosecharon al azar tres plantas inoculadas y otras no inoculadas. La metodología que se siguió fue separar la raíz del vástago; el cepellón se lavó con agua a presión, empleando tres tamices con diferentes diámetros (1.19, 0.18 y 0.08 mm) para poder tener la mayor cantidad de raíces; las raíces ya limpias se colocaron en frascos de vidrio con agua destilada. Posteriormente se cuantificó el número total de raíces micorrizadas, no micorrizadas y muertas, y se calculó el porcentaje de colonización ectomicorrízica, mediante la fórmula: Raíces cortas vivas micorrizadas / (Raíces cortas vivas micorrizadas + Raíces cortas vivas no micorrizadas)*100. Se efectuaron microfotografías en un microscopio estereoscópico y de campo claro, identificando las tres estructuras características de la ectomicorriza (red de Hartig, manto y micelio externo) siguiendo los métodos establecidos en Deemy (2018) (Figura 7).

4.3.6 Análisis estadístico

Todas las variables se sometieron a un el análisis de varianza correspondiente y a una prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$). Para lo anterior se utilizó el paquete estadístico SAS® ver. 8.0.

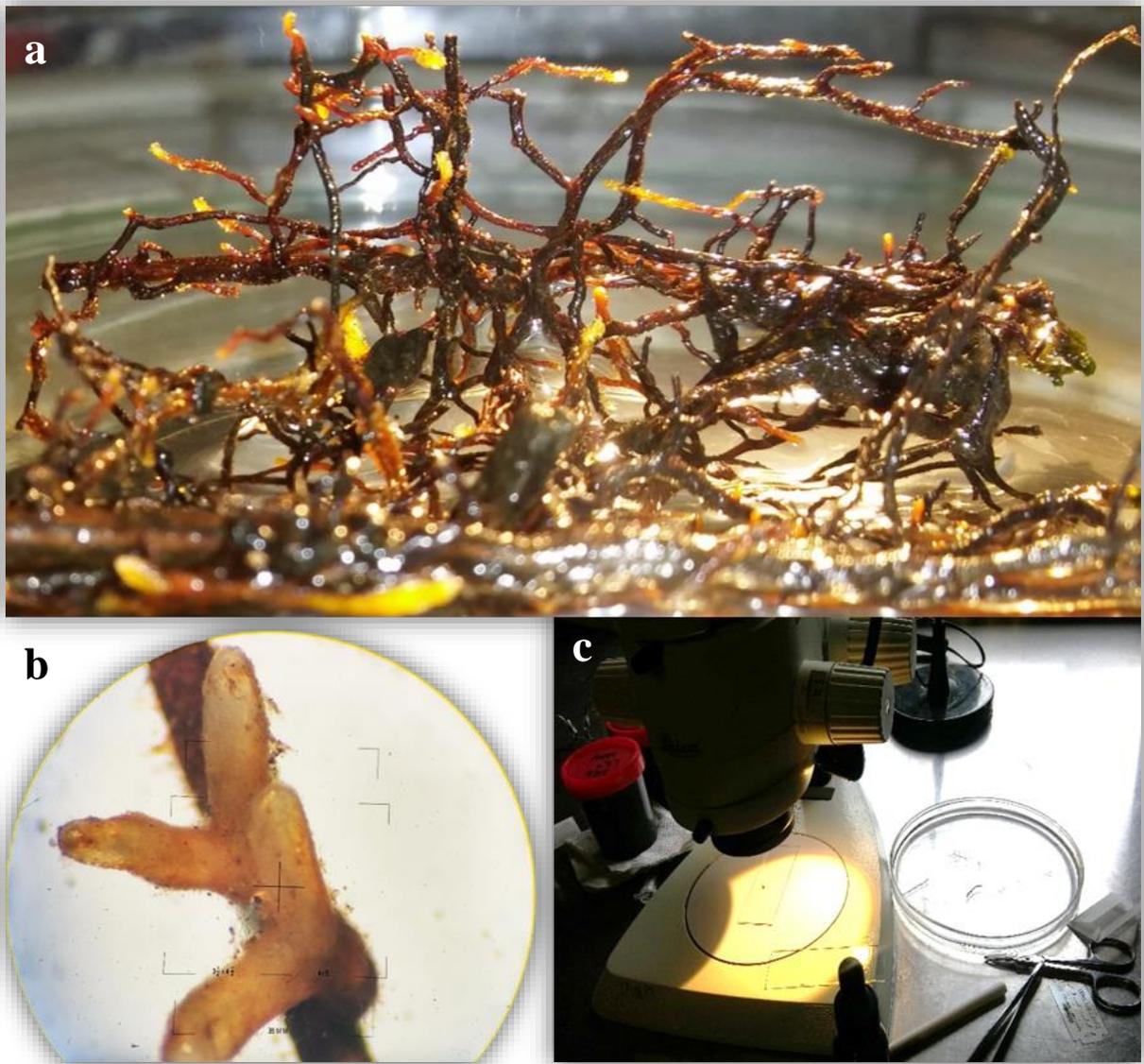


Figura 7. Raíces vivas micorrizadas de *P. cembroides* Zucc. (a), morfotipo de la ectomicorriza *Laccaria proxima* (b) y proceso para la obtención del corte transversal de la ectomicorriza de *P. cembroides* (c).

CAPÍTULO V. RESULTADOS

5.1 CRECIMIENTO

Existió un efecto sinérgico cuando se inoculó *L. proxima* simultáneamente con *Cohnella* sp., independientemente del sustrato utilizado. En el caso del peso seco total, el efecto fue mayor cuando el sustrato contenía 20% de composta en comparación con 10%. Para el peso seco de la raíz, de la parte aérea y total no se observaron diferencias significativas cuando se inoculó exclusivamente el hongo o la bacteria en comparación con las plantas no inoculadas independientemente del sustrato. En el caso de la parte aérea en plantas crecidas en sustrato con 10% se observó la misma tendencia; sin embargo, en la parte aérea de plantas crecidas en el sustrato con 20% se observó una tendencia distinta, cuando se inoculó con Lp se observaron valores mayores en comparación con las plantas no inoculadas (Figura 9).

El efecto sinérgico del peso seco total en plantas inoculadas con Lp más *Cohnella* sp. fue 2.5 y 5.0 veces mayor comparado con las plantas no inoculadas en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente (Figura 8). De manera similar que para el peso seco, se observó un efecto sinérgico para el diámetro del tallo y la altura cuando se inoculó Lp+C. En este caso las plantas crecidas en el sustrato con 10% de composta presentaron mayor efecto sinérgico en diámetro y altura en comparación con aquellas crecidas en el sustrato con 20% de composta (Cuadro 1).

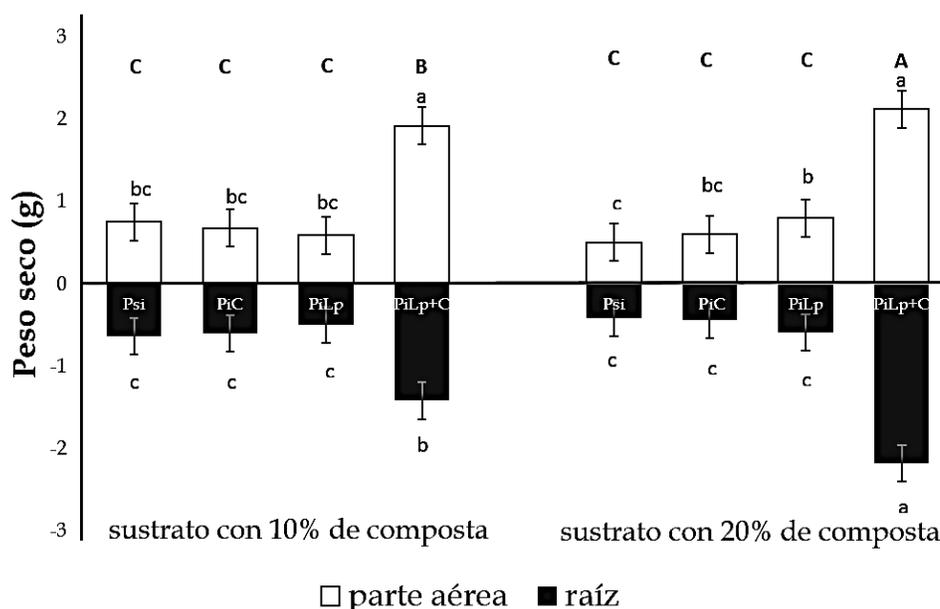


Figura 8. Peso seco de la parte aérea (en blanco), raíz (en negro) y total (suma de barras blancas y negras) en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. a los 619 días después de la siembra inoculadas con *Laccaria proxima* (Lp) y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos. Los valores representan promedios \pm error estándar de la media $n=6$, según Tukey ($p \leq 0.05$). Para cada parte de la planta barras con la misma letra son iguales. Letras mayúsculas distintas indican diferencias en el peso seco total según Tukey ($p \leq 0.05$). Psi= plantas sin inocular; PiC= plantas inoculadas con *Cohnella* sp., PiLp= plantas inoculadas con *Laccaria proxima*, PiLp+C= plantas inoculadas con *Laccaria proxima* + *Cohnella* sp.

Cuadro 1. Diámetro del tallo y altura de plantas de *Pinus cembroides* Zucc. a partir de los 275 días y hasta los 517 días inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos.

Tratamiento	Diámetro de tallo	
	(mm)	Altura (cm)
Sustrato 10% en composta		
Plantas sin inocular	2.77 \pm 0.06 d	4.43 \pm 0.07 d
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp. (C)	3.06 \pm 0.09 c	4.80 \pm 0.06 c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> (Lp)	2.71 \pm 0.10 d	3.05 \pm 0.06 f
Plantas inoculadas con Lp + C	4.23 \pm 0.12 a	7.38 \pm 0.18 a
Sustrato 20% en composta		
Plantas sin inocular	2.77 \pm 0.08 d	3.58 \pm 0.07 e
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	2.68 \pm 0.06 d	3.02 \pm 0.03 f
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	2.52 \pm 0.10 e	2.86 \pm 0.29 f
Plantas inoculadas con Lp + C	3.85 \pm 0.15 b	6.34 \pm 0.22 b

Los valores representan promedios \pm error estándar de la media. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey ($p \leq 0.05$) $n=9$.

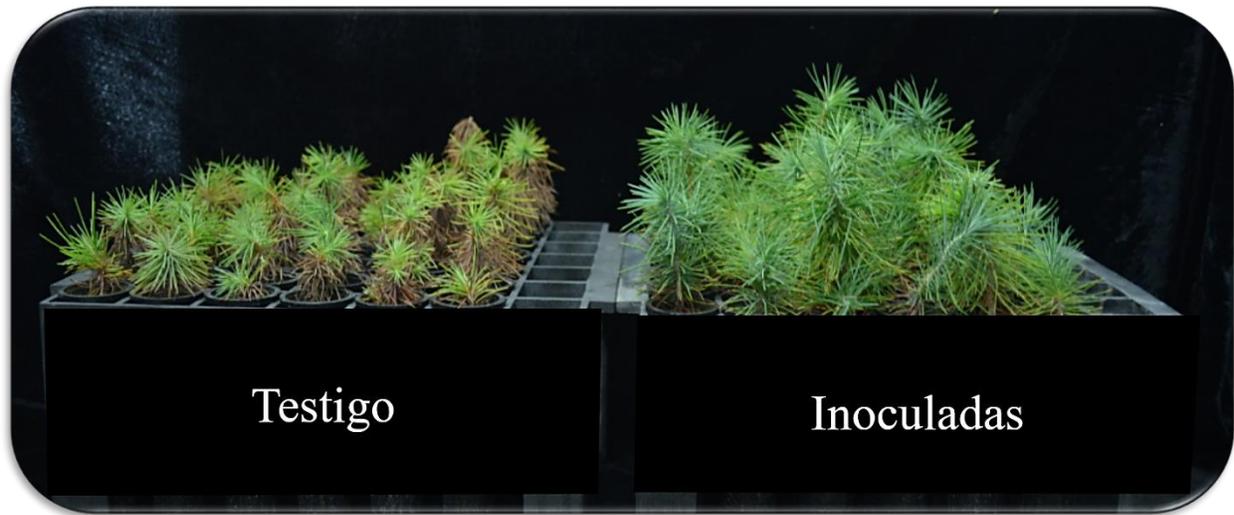


Figura 9. Plantas de *Pinus cembroides* Zucc. sin inocular en comparación con plantas inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp. a los 21 meses de edad.

5.2 TASA FOTOSINTÉTICA, TRANSPIRACIÓN, CLOROFILA Y CAROTENOS

De manera similar que para las variables de crecimiento, en el caso de la tasa fotosintética existió un marcado efecto sinérgico cuando se inoculó Lp+C, en comparación cuando fueron inoculadas solo con Lp o C o plantas no inoculadas independientemente del sustrato, no se observaron diferencias significativas. El efecto sinérgico en plantas inoculadas con Lp+C fue 5.5 y 8.0 veces mayor comparado con las plantas no inoculadas en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente (Figura 10). En el caso de la transpiración existió un evidente efecto sigérgico cuando se inocularon plantas con Lp+C en comparación con la inoculación solo con Lp o C este efecto fue mayor cuando el sustrato contenía 20% de composta en comparación con 10%. Independientemente del sustrato, cuando se inoculó con Lp se observó mayor transpiración que cuando se inoculó con C o sin inocular. En contraste no existieron diferencias significativas cuando se inoculó la bacteria sola o cuando no se inoculó (Figura 11). El efecto sinérgico en plantas inoculadas con Lp+C fue 4.0 y 8.0 veces mayor comparado con las plantas no inoculadas

en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente de igual manera que para la tasa fotosintética y las variables de crecimiento. Las plantas inoculadas con *Cohnella* sp. o no inoculadas no presentaron diferencias en sus contenidos de clorofila o carotenos, independientemente del sustrato. Las plantas inoculadas con Lp o Lp+C presentaron mayor contenido de clorofila y carotenos en comparación con aquellas inoculadas con *Cohnella* sp. o no inoculadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Contenido de clorofila a, b y total, carotenos en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos.

Tratamiento	Clorofila						Carotenos					
	a		b		Total							
Sustrato 10% en composta												
Plantas sin inocular	2.62	± 0.43	bc	1.84	± 0.41	c	2.04	± 0.35	bc	0.82	± 0.10	b
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp. (C)	2.63	± 0.20	bc	1.75	± 0.15	c	2.02	± 0.15	bc	0.91	± 0.07	b
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> (Lp)	5.66	± 0.19	a	3.93	± 1.08	a	4.38	± 0.27	a	4.38	± 0.27	a
Plantas inoculadas con Lp + C	5.23	± 0.28	a	4.01	± 0.73	a	4.03	± 0.30	a	4.03	± 0.30	a
Sustrato 20% en composta												
Plantas sin inocular	2.19	± 0.26	c	1.30	± 0.19	c	1.66	± 0.19	c	0.70	± 0.07	b
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	3.37	± 0.18	b	2.07	± 0.22	bc	2.56	± 0.13	b	0.99	± 0.07	b
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	5.14	± 0.34	a	3.46	± 0.33	ab	3.98	± 0.24	a	3.98	± 0.24	a
Plantas inoculadas con Lp + C	5.69	± 0.35	a	3.46	± 0.21	ab	4.24	± 0.22	a	4.24	± 0.22	a

Los valores representan promedios ± error estándar de la media n=7, según Tukey ($p \leq 0.05$). Para cada variable barras con la misma letra son iguales. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey ($p \leq 0.05$).

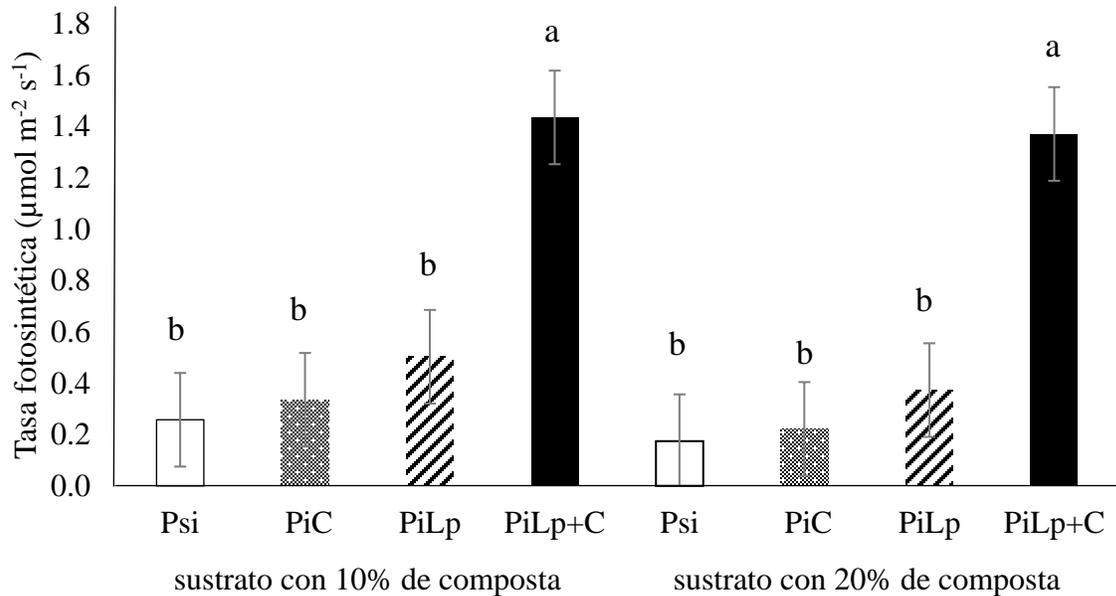


Figura 10. Tasa fotosintética en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. a los 503 días después de la siembra inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos. Los valores representan promedios \pm error estándar de la media $n=9$, según Tukey ($p \leq 0.05$). Barras con la misma letra son iguales. Psi= plantas sin inocular; PiC= plantas inoculadas con *Cohnella* sp., PiLp= plantas inoculadas con *Laccaria proxima*, PiLp+C= plantas inoculadas con *Laccaria proxima* + *Cohnella* sp.

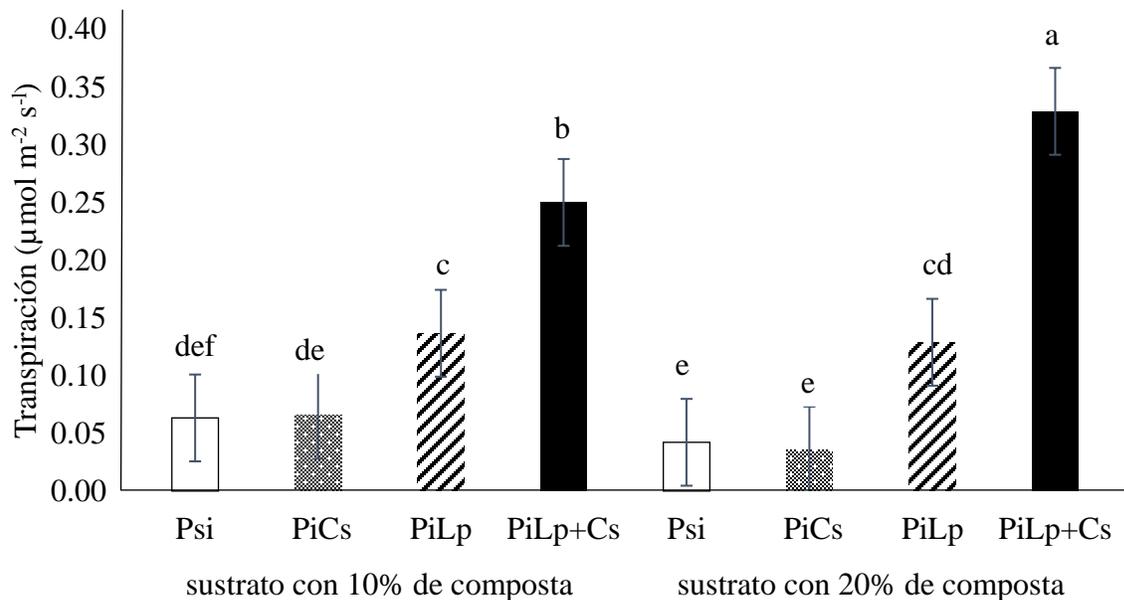


Figura 11. Transpiración en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. a los 503 días después de la siembra inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos. Los valores representan promedios \pm error estándar de la media $n=9$, según Tukey ($p \leq 0.05$). Barras con la misma letra son iguales. Psi= plantas sin inocular; PiC= plantas inoculadas con *Cohnella* sp., PiLp= plantas inoculadas con *Laccaria proxima*, PiLp+C= plantas inoculadas con *Laccaria proxima* + *Cohnella* sp.

5.3 ANÁLISIS NUTRIMENTAL

Se observa en el cuadro 4 el contenido de macronutrientes en plantas de *Pinus cembroides* con los distintos tratamientos tanto de inoculación como de sustrato. Para N, P, K y Mg total existió un efecto sinérgico cuando se inoculó Lp+C el cual fue mayor cuando el sustrato contenía 20% de composta en comparación con el 10%. Dicho efecto se observó en el contenido de N y K total en plantas inoculadas con Lp+C el cual fue 3.0 y 4.0 veces mayor comparado con las plantas no inoculadas en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente. El contenido total de P y Mg en plantas inoculadas con Lp+C fue 3.0 y 4.5 veces mayor comparado con las plantas no inoculadas en los sustratos con 10% y 20% de composta, respectivamente.

En el cuadro 5 se observa un efecto sinérgico cuando se inoculó Lp+C, este efecto fue mayor cuando el sustrato contenía 20% de composta en comparación con el 10%. El contenido total de Cu en plantas inoculadas con Lp+C fue 1.7 y 3.7 veces mayor comparado con las plantas no inoculadas en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente. El contenido total de Fe en plantas inoculadas con los dos microorganismos fue 2.5 y 9.7 veces mayor comparado con las plantas no inoculadas en los sustratos de 10% y 20% de composta. El contenido de Mn y Zn total en plantas inoculadas con Lp+C fue 2.6 y 4.9 veces mayor comparado con las plantas no inoculadas en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente.

5.4 RELACIÓN NUTRIMENTAL PARTE AÉREA:RAÍZ

En las plantas crecidas en el sustrato con 10% de composta existió una conspicua movilización de N, Fe y Mn en plantas inoculadas con Lp o Lp+C. También se registró una movilización a la parte aérea de Zn en plantas inoculadas con Lp+C en contraste en las plantas crecidas en el sustrato con 20% de composta en donde solamente se detectó movilización de N y Mn pero no de Fe en plantas inoculadas con Lp o Lp+C. De la misma manera en plantas

inoculadas con Lp+C no existió movilización de Zn a la parte aérea contrariamente a lo observado en plantas crecidas en sustrato con 10% de composta. Existió un efecto sinérgico en la movilización de Fe, Mn y Zn a la parte aérea de plantas crecidas en sustrato con 10% de composta inoculadas con Lp+C en comparación con aquellas inoculadas con Lp o C individualmente, mientras que este efecto no se observó en plantas crecidas con 20% de composta (cuadro 3).

Cuadro 3. Relación de macro y micronutrientes en parte aérea:raíz en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. a los 21 meses de edad inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp. crecidas en dos sustratos.

Tratamiento	Macronutrientes				Micronutrientes			
	N	P	K	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
Sustrato con 10% de composta								
Plantas sin inocular	0.52	1.86	3.44	0.77	0.413	0.122	1.130	1.037
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp. (C)	1.21	2.59	3.80	0.86	0.501	0.092	2.026	1.253
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> (Lp)	1.07	2.29	2.23	0.91	0.193	0.205	1.959	1.043
Plantas inoculadas con Lp + C	0.98	2.44	3.16	1.04	0.414	0.446	3.369	1.606
PiC:Psi	2.35	1.39	1.10	1.12	1.21	0.75	1.79	1.21
PiLp:Psi	2.07	1.23	0.65	1.19	0.47	1.68	1.73	1.01
PiLp+C:Psi	1.90	1.32	0.92	1.35	1.00	3.64	2.98	1.55
Sustrato con 20% de composta								
Plantas sin inocular	0.48	2.40	3.41	0.86	0.295	0.110	1.067	0.892
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	1.44	2.87	4.74	1.14	0.262	0.157	1.812	0.682
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	1.08	2.43	2.88	0.91	0.175	0.055	1.532	0.942
Plantas inoculadas con Lp + C	0.71	2.93	3.85	0.61	0.226	0.026	1.442	0.656
PiC:Psi	2.98	1.19	1.39	1.32	0.890	1.420	1.700	0.760
PiLp:Psi	2.231	1.014	0.845	1.047	0.595	0.501	1.436	1.056
PiLp+C:Psi	1.460	1.220	1.130	0.704	0.767	0.234	1.352	0.735

Psi= plantas sin inocular, PiC= plantas inoculadas con *Cohnella* sp., PiLp= plantas inoculadas con *Laccaria proxima*, PiLp+C= plantas inoculadas con *Cohnella* sp. y *Laccaria proxima*.

Cuadro 4. Contenido de macronutrientes de la parte aérea, raíz y total en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos.

Tratamiento	Macronutrientes (mg)			
	N	P	K	Mg
Parte aérea				
Sustrato 10% en composta				
Plantas sin inocular	2.51 ± 0.28 d	2.36 ± 0.30 e	3.10 ± 0.49 de	1.70 ± 0.25 b
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp. ©	3.09 ± 0.47 cd	3.93 ± 0.60 c	5.42 ± 0.83 c	2.48 ± 0.38 b
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> (Lp)	4.32 ± 0.23 bc	2.71 ± 0.15 cde	2.93 ± 0.16 e	1.92 ± 0.10 b
Plantas inoculadas con Lp + C	10.75 ± 0.66 a	8.44 ± 0.52 b	9.51 ± 0.58 b	5.79 ± 0.35 a
Sustrato 20% en composta				
Plantas sin inocular	2.47 ± 0.38 d	2.51 ± 0.38 de	3.23 ± 0.49 cde	1.63 ± 0.25 b
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	3.36 ± 0.47 cd	3.27 ± 0.46 cde	4.84 ± 0.67 cd	2.30 ± 0.32 b
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	5.61 ± 0.50 b	3.79 ± 0.34 cd	4.26 ± 0.38 cde	2.33 ± 0.21 b
Plantas inoculadas con Lp + C	11.89 ± 0.80 a	12.02 ± 0.80 a	13.36 ± 0.89 a	6.29 ± 0.42 a
Raíz				
Sustrato 10% en composta				
Plantas sin inocular	4.86 ± 0.47 c	1.27 ± 0.22 b	0.90 ± 0.20 b	2.21 ± 0.18 c
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	2.55 ± 0.41 c	1.52 ± 0.25 b	1.43 ± 0.23 b	2.89 ± 0.47 c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	4.05 ± 0.30 c	1.18 ± 0.09 b	1.31 ± 0.10 b	2.10 ± 0.16 c
Plantas inoculadas con Lp + C	10.94 ± 1.07 b	3.45 ± 0.34 a	3.01 ± 0.29 a	5.58 ± 0.55 b
Sustrato 20% en composta				
Plantas sin inocular	5.10 ± 0.63 c	1.04 ± 0.13 b	0.95 ± 0.12 b	1.89 ± 0.23 c
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	2.33 ± 0.22 c	1.14 ± 0.11 b	1.02 ± 0.10 b	2.01 ± 0.19 c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	5.20 ± 0.94 c	1.56 ± 0.28 b	1.48 ± 0.27 b	2.58 ± 0.47 c
Plantas inoculadas con Lp + C	16.85 ± 2.26 a	4.10 ± 0.55 a	3.47 ± 0.47 a	10.32 ± 1.38 a
Total				
Sustrato 10% en composta				
Plantas sin inocular	7.38 ± 0.40 cd	3.63 ± 0.43 c	4.00 ± 0.65 d	3.91 ± 0.42 cd
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	5.65 ± 0.88 d	5.44 ± 0.84 c	6.84 ± 1.06 c	5.37 ± 0.84 c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	8.38 ± 0.45 cd	3.89 ± 0.20 c	4.24 ± 0.22 d	4.03 ± 0.22 c
Plantas inoculadas con Lp + C	21.70 ± 1.64 b	11.89 ± 0.81 b	12.52 ± 0.83 b	11.37 ± 0.85 b
Sustrato 20% en composta				
Plantas sin inocular	7.57 ± 0.88 cd	3.55 ± 0.46 c	4.17 ± 0.56 d	3.52 ± 0.41 c
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	5.70 ± 0.66 d	4.42 ± 0.55 c	5.86 ± 0.76 cd	4.31 ± 0.49 c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	10.82 ± 1.27 c	5.34 ± 0.54 c	5.74 ± 0.57 cd	4.91 ± 0.60 c
Plantas inoculadas con Lp + C	28.74 ± 2.74 a	16.12 ± 1.18 a	16.83 ± 1.20 a	16.61 ± 1.63 a

Los valores representan promedios ± error estándar de la media n=6, según Tukey ($p \leq 0.05$). Para cada variable barras con la misma letra son iguales. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuadro 5. Contenido de micronutrientes de la parte aérea, raíz y total en plantas de *Pinus cembroides* Zucc. inoculadas con *Laccaria proxima* y *Cohnella* sp., crecidas en dos sustratos.

Tratamiento	Micronutrientes (mg)							
	Cu	Fe	Mn	Zn				
Parte aérea								
Sustrato 10% en composta								
Plantas sin inocular	0.0019 ± 0.0003	cd	0.0593 ± 0.0098	c	0.0536 ± 0.0058	d	0.0104 ± 0.0029	bc
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp. ©	0.0026 ± 0.0004	bc	0.0515 ± 0.0079	c	0.1106 ± 0.0169	c	0.0155 ± 0.0024	b
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> (Lp)	0.0007 ± 0.0000	f	0.0843 ± 0.0046	c	0.0528 ± 0.0029	d	0.0120 ± 0.0007	bc
Plantas inoculadas con Lp + C	0.0033 ± 0.0002	b	0.1334 ± 0.0253	b	0.2044 ± 0.0125	b	0.0372 ± 0.0023	a
Sustrato 20% en composta								
Plantas sin inocular	0.0016 ± 0.0002	de	0.0542 ± 0.0083	c	0.0469 ± 0.0072	d	0.0081 ± 0.0012	c
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	0.0020 ± 0.0003	cd	0.0666 ± 0.0093	c	0.0729 ± 0.0101	d	0.0087 ± 0.0012	c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	0.0011 ± 0.0001	ef	0.0520 ± 0.0046	c	0.0756 ± 0.0067	d	0.0144 ± 0.0013	b
Plantas inoculadas con Lp + C	0.0047 ± 0.0003	a	0.4131 ± 0.0089	a	0.2626 ± 0.0176	a	0.0327 ± 0.0022	a
Raíz								
Sustrato 10% en composta								
Plantas sin inocular	0.0046 ± 0.0008	bc	0.4848 ± 0.0918	b	0.0474 ± 0.0079	bc	0.0101 ± 0.0024	c
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	0.0051 ± 0.0008	bc	0.5586 ± 0.0904	b	0.0546 ± 0.0088	bc	0.0124 ± 0.0020	c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	0.0037 ± 0.0003	c	0.4109 ± 0.0307	b	0.0270 ± 0.0020	c	0.0115 ± 0.0009	c
Plantas inoculadas con Lp + C	0.0079 ± 0.0008	b	0.9269 ± 0.0906	b	0.0607 ± 0.0059	b	0.0232 ± 0.0023	b
Sustrato 20% en composta								
Plantas sin inocular	0.0053 ± 0.0006	bc	0.4908 ± 0.0604	b	0.0439 ± 0.0054	bc	0.0091 ± 0.0011	c
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	0.0077 ± 0.0007	b	0.4237 ± 0.0397	b	0.0402 ± 0.0038	bc	0.0128 ± 0.0012	c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	0.0060 ± 0.0011	bc	0.9411 ± 0.1700	b	0.0493 ± 0.0089	c	0.0153 ± 0.0028	bc
Plantas inoculadas con Lp + C	0.0207 ± 0.0028	a	5.1662 ± 0.6924	a	0.1821 ± 0.0244	a	0.0499 ± 0.0067	a
Total								
Sustrato 10% en composta								
Plantas sin inocular	0.0064 ± 0.0010	cd	0.5441 ± 0.0989	c	0.1010 ± 0.0108	d	0.0205 ± 0.0045	cd
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	0.0077 ± 0.0012	bcd	0.6102 ± 0.0982	bc	0.1652 ± 0.0257	c	0.0279 ± 0.0044	cd
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	0.0044 ± 0.0003	d	0.4952 ± 0.0329	c	0.0798 ± 0.0041	d	0.0236 ± 0.0013	cd
Plantas inoculadas con Lp + C	0.0111 ± 0.0009	b	1.3400 ± 0.1114	b	0.2651 ± 0.0175	b	0.0604 ± 0.0043	b
Sustrato 20% en composta								
Plantas sin inocular	0.0068 ± 0.0008	cd	0.5450 ± 0.0648	c	0.0908 ± 0.0109	d	0.0173 ± 0.0020	d
Plantas inoculadas con <i>Cohnella</i> sp.	0.0098 ± 0.0010	bc	0.4903 ± 0.0479	c	0.1131 ± 0.0135	cd	0.0216 ± 0.0023	cd
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	0.0070 ± 0.0011	cd	0.9931 ± 0.1725	bc	0.1249 ± 0.0137	cd	0.0298 ± 0.0036	c
Plantas inoculadas con Lp + C	0.0254 ± 0.0029	a	5.2996 ± 0.6969	a	0.4446 ± 0.0365	a	0.0826 ± 0.0080	a

Los valores representan promedios ± error estándar de la media n=6, según Tukey ($p \leq 0.05$). Para cada variable barras con la misma letra son iguales. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey ($p \leq 0.05$).

5.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA MICORRIZA

Laccaria proxima presentó un tipo de ramificación en su mayoría con proporción dicotómica, con una longitud de 1.0 a 5.0 mm y 0.25 mm de diámetro, la morfología de las puntas de la ectomicorriza fue sinuosa. En estado temprano presentaron una coloración café claro con una distribución homogénea, pasado el tiempo se fue diferenciando la base a un color café oscuro y la punta de color café claro, con terminación cilíndrica. En etapa adulta la base fue mayor que el ápice (Figura 12). Macromorfológicamente, se apreciaron estructuras alargadas de las hifas, color café claro y blanco en las puntas. Se observó una Red de Hartig que penetró de dos a tres capas de células corticales y un manto plectenquimatoso (Figura 13, 14 y 15). No existió presencia de rizomorfos ni esclerocios. En general, existió mayor colonización ectomicorrízica en plantas inoculadas en comparación con plantas no inoculadas, independientemente de la cantidad de composta. Cuando se inoculó Lp+C se observó mayor porcentaje de colonización en comparación con solo Lp o C o sin inocular en el sustrato con 20% de composta. Los porcentajes de colonización ectomicorrízica alcanzaron hasta el 79.4% y 92.7% en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 6. Colonización micorrízica de *Pinus cembroides* Zucc. crecidas en dos sustratos con diferente cantidad de composta.

Tratamiento	Vivas			Muertas		% Colonización				
	RCVM	RCVNM	RCMM	RCMNM						
Sustrato 10% en composta										
Plantas sin inocular	0.00 ± 0.00	c	94.33 ± 17.49	b	0.00 ± 0.00	c	240.33 ± 42.98	a	0.00	c
Plantas inoculadas con <i>Colmella</i> sp (C)	0.00 ± 0.00	c	95.67 ± 29.24	b	0.00 ± 0.00	c	236.33 ± 21.53	a	0.00	c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> (Lp)	93.00 ± 32.53	bc	73.00 ± 14.57	b	101.33 ± 7.88	b	9.00 ± 5.51	c	54.35	b
Plantas inoculadas (Lp + C)	258.00 ± 102.14	a	35.33 ± 24.85	b	170.33 ± 37.49	a	43.33 ± 43.33	bc	79.45	ab
Sustrato 20% en composta										
Plantas sin inocular	0.00 ± 0.00	c	0.00 ± 0.00	b	0.00 ± 0.00	c	324.33 ± 40.40	a	0.00	c
Plantas inoculadas con <i>Colmella</i> sp	0.00 ± 0.00	c	295.00 ± 123.65	a	0.00 ± 0.00	c	114.33 ± 37.88	b	0.00	c
Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>	94.00 ± 45.65	bc	89.00 ± 58.11	b	93.67 ± 15.60	b	0.00 ± 0.00	c	56.38	b
Plantas inoculadas (Lp + C)	147.67 ± 20.74	ab	12.67 ± 7.31	b	191.33 ± 18.80	a	8.33 ± 6.89	c	92.74	a

RCVM=Raíces cortas vivas micorrizadas, RCVNM= Raíces cortas vivas no micorrizadas, RCVM=Raíces cortas muertas micorrizadas, RCMNM=Raíces cortas muertas no micorrizadas.



Figura 12. Ectomicorriza *Laccaria proxima* de *Pinus cembroides* Zucc. en sustrato con 10% de composta a 1.20x.

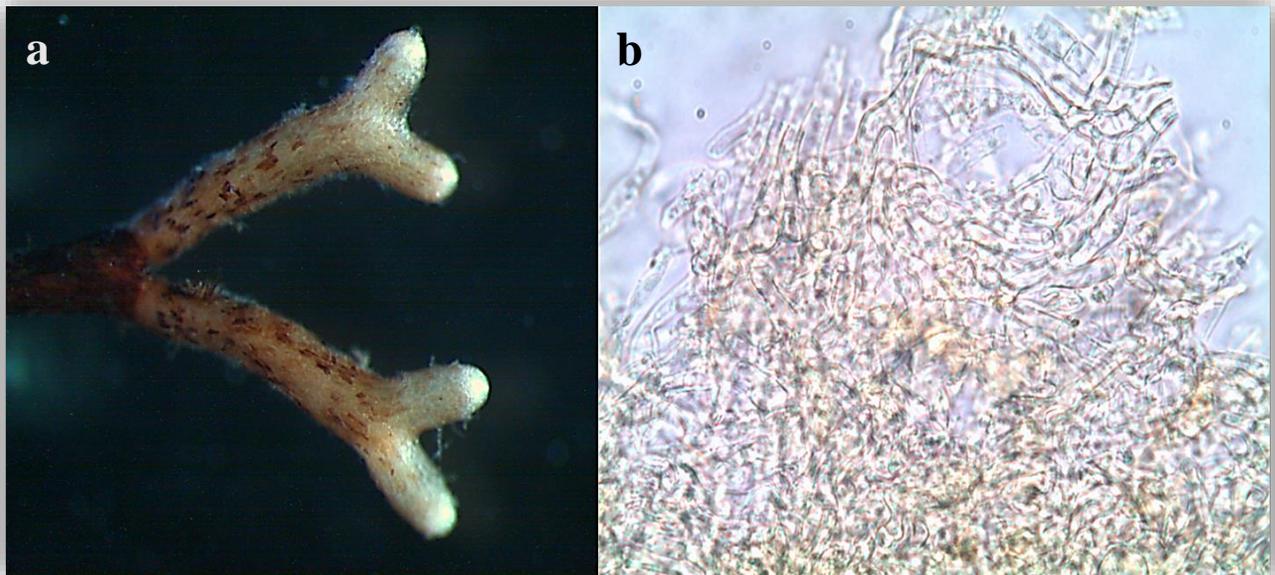


Figura 13. Ectomicorriza *Laccaria proxima* en *Pinus cembroides* Zucc. a 1.8x (a) y manto plectenquimatoso a 100x (b).

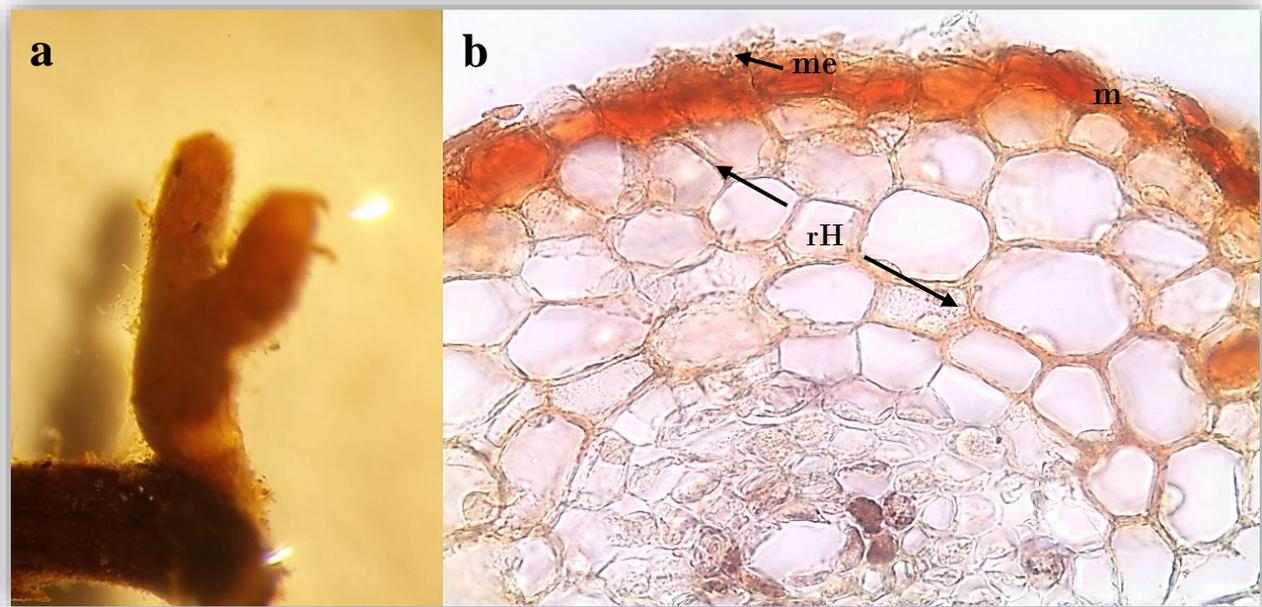


Figura 14. Ectomicorriza de *Pinus cembroides* Zucc. inoculada con *Laccaria proxima* y *Conhella* sp. en sustrato con 20% de composta. Raíces micorrizadas dicotómicas (a), corte transversal de la ectomicorriza mostrando red de Hartig (rH), manto (m) y micelio externo (me) a 40x (b).

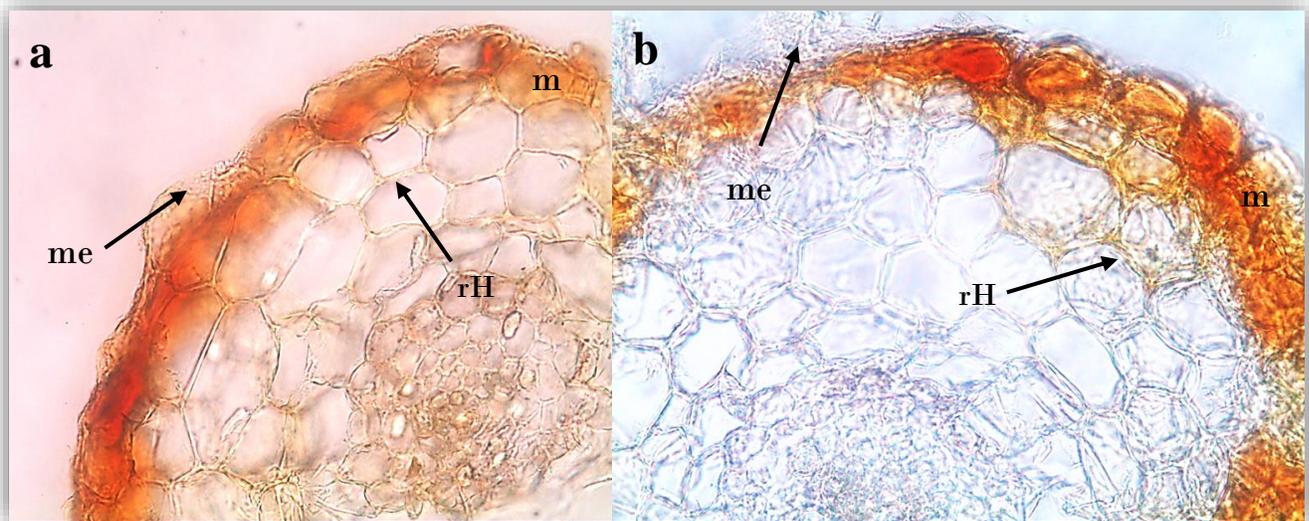


Figura 15. Ectomicorriza de *Pinus cembroides* Zucc. inoculada con *Laccaria proxima* en sustrato con 10% de composta. Corte transversal de la ectomicorriza *L. proxima* y *Conhella* sp. mostrando red de Hartig (rH), manto (m) y micelio externo (me) a 40x (a) y corte transversal de la ectomicorriza *L. proxima* mostrando red de Hartig (rH), manto (m) y micelio externo (me) a 40x (b).

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN

6.1. CRECIMIENTO (BIOMASA, DIÁMETRO DEL TALLO Y ALTURA DEL VÁSTAGO)

En el presente trabajo se observó que la inoculación con *Lp* incrementó en el peso seco del vástago en comparación con las plantas no inoculadas. Perea-Estrada *et al.* (2009) al inocular *Hebeloma* sp., *Laccaria* sp. y *Clavulina* aff. *cinerea* en plantas de *P. patula* y *P. hartwegii* observaron un efecto benéfico en términos de peso seco, altura y diámetro del tallo. Martínez-Reyes *et al.* (2012) evaluaron el crecimiento de *Pinus greggii* inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum*, sus resultados mostraron que tanto el peso seco de la parte aérea y raíz, altura y diámetro del tallo fueron mayores en las plantas inoculadas. Martínez *et al.* (2016) inocularon *Russula delica* en *Pinus engelmannii* producida en vivero y encontraron que las plantas inoculadas tuvieron mejor diámetro del tallo y biomasa seca de la raíz, en comparación con plantas no inoculadas. Jouranda *et al.* (2014) inocularon *Pisolithus albus* en *Acacia spirorbis* y *Eucalyptus globulus*, encontrando que la simbiosis ectomicorrízica mejoró el crecimiento de la planta en términos de biomasa de brotes y raíces. Valdés *et al.* (2010) mencionaron que la inoculación con *Pisolithus tinctorius* a los 18 meses puede incrementar significativamente el volumen y biomasa de *P. pseudostrobus*. Carrasco-Hernández *et al.* (2011) inocularon seis especies ectomicorrízicas comestibles de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* en *P. patula* y *P. pseudostrobus*, en condiciones de invernadero y observaron un efecto benéfico en el crecimiento de ambos pinos como resultado de la inoculación en términos de peso seco en parte aérea y radical. La investigación de Oliveira *et al.* (2012) al inocular *Suillus bovinus* + *Laccaria laccata* + *Lactarius deterrimus* en plantas de *P. pinaster* obtuvieron mayor biomasa. Onwuchekwa *et al.* (2014) en plantas de *P. banksiana* y *Picea glauca* inocularon *Hebeloma crustuliniforme*, *Suillus tomentosus* y *Laccaria bicolor*, en general existió un mayor efecto en la

tasas de crecimiento de altura, biomasa seca y diametro de tallos en *P. banksiana*. En contraste, la inoculación de *Suillus luteus*, *Hebeloma mesophaeum* y *Rhizopogon roseolus* en *P. ponderosa* no produjo diferencias en el diámetro ni en la altura del vástago, en comparación con las plantas control (Barroetaveña *et al.*, 2012).

6.2 ANÁLISIS NUTRIMENTAL

En el presente trabajo se observó mayor contenido de N en la parte aérea de plantas inoculadas con *Cohnella* sp. en comparación con plantas no inoculadas, independientemente de la proporción de composta en el sustrato. La atmósfera es el reservorio más grande de N con un 79% en su forma elemental (N_2) (Philippot *et al.*, 2005). Se sabe que el N es un elemento esencial para los seres vivos, pues forma parte de aminoácidos, aminoenzimas, ácidos nucleicos, clorofila y alcaloides, siendo el elemento del suelo más absorbido por las plantas (Perdomo *et al.*, 1994). Dicho elemento puede ser absorbido por las plantas en la forma de nitrato (NO_3) o amonio (NH_4^+), la forma preferencial en la absorción de este elemento, difiere entre las especies vegetales (Coraspe *et al.*, 2009). El N en forma gaseosa es la principal fuente primaria de entrada para los ecosistemas, existen organismos simbioses y de vida libre con la capacidad de fijarlo de la atmósfera (Vitousek *et al.*, 1991). Previamente, diversos autores han documentado mayores contenidos de macronutrientes al inocular árboles con hongos ectomicorrízicos. Méndez-Neri *et al.* (2011) inocularon *Hebeloma mesophaeum*, *Laccaria laccata* y *Suillus pseudobrevipes*, solos o combinados, en plantas de *Pinus greggii* y registraron mayor contenido de N en plantas inoculadas. Jenkins *et al.* (2018) en plantas de *Pinus albicaulis* inocularon con *Suillus* en suelos impactados por el fuego y reportaron que la inoculación ectomicorrízica con hongos específicos del huésped originó un mayor contenido de N foliar. Yanbin Liu *et al.* (2018) investigaron los patrones espaciales y la transferencia de N en redes de hongos ectomicorrízicos como *Suillus*

luteus, *Gomphidius rutilus*, *Laccaria laccata* y *Lycoperdon pyriforme* en una plantación de *Pinus sylvestris* var. *Mongolica* y encontraron que las redes tienen una eficiencia de transferencia de N. Asimismo, en el presente trabajo, el análisis de movilización de nutrientes basado en las relaciones entre los contenidos de macronutrientes entre la parte aérea y raíz demostraron una movilización de N a la parte aérea en plantas inoculadas con la bacteria *Cohnella* sp. Previamente, se ha demostrado que existen especies dentro de dicho género, como *C. capsici* (Wang *et al.*, 2015) y *C. plantaginis* (Wang *et al.*, 2012), las cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno. Por lo tanto, la movilización de N registrada podría estar inducida por la capacidad de la cepa empleada para fijar dicho elemento.

En esta investigación se observó mayor crecimiento cuando se inoculó Lp+C en el sustrato de 20% de composta en comparación con las plantas no inoculadas. Previamente, se ha demostrado que existen bacterias auxiliaoras de la micorrización asociadas a hongos ectomicorrízicos. El efecto de dicha acción se le conoce como sinergismo que es resultado de la acción de dos o más organismos o sustancias que, actuando en conjunto provocan una respuesta mayor a la suma de los efectos que provocarían por separado. En la mayoría de las investigaciones donde se indica dicha interacción se demuestra un aumento en el contenido de nutrientes y variables de crecimiento como fisiológicas en la planta. Las bacterias pueden mejorar la simbiosis ectomicorrízica de dos maneras (Frey-Klett *et al.*, 2007), ayudando a que se produzca la simbiosis ectomicorrízica o mediante la mejora de la tasa de micorrización dentro de las plantas (Courty *et al.*, 2010). Los mecanismos por los cuales las bacterias interactúan con los hongos implican la estimulación del crecimiento micelial, el aumento de puntos de contacto entre las raíces y los hongos, y la reducción del estrés ambiental en el micelio (Kurth *et al.*, 2013) No obstante, la actividad de las bacterias también puede ser perjudicial para la simbiosis micorrízica, y en algunos casos, llega a ser selectiva (Kataoka *et al.*, 2009).

Con respecto a la movilización de Fe a la parte aérea mostró un efecto mayor cuando se inoculó *L. proxima* y *Cohnella* sp.; previamente, se ha demostrado que existen especies de bacterias las cuales tienen la capacidad de transferirlo a la planta a través de sideróforos (Matthijs *et al.*, 2007). Por lo tanto, la movilización de Fe registrada en el sustrato de 10% de composta en el presente trabajo podría estar inducida por la capacidad de la cepa empleada aunado a los efectos que aportan los hongos ectomicorrízicos. El Fe es necesario para la formación de la clorofila en las células de las plantas; aun cuando la molécula de clorofila no contiene Fe, los cloroplastos son muy ricos en este elemento y es activador de procesos bioquímicos como la respiración, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. López-Gutiérrez *et al.* (2018) inocularon *Hebeloma alpinum*, *Laccaria trichodermoprhora* y *Thelephora terrestris* en plantas de *P. pringlei* y evaluaron el efecto en la translocación de nutrientes y registraron movilizaciones de Fe, K y Zn a los vástagos de dicho árbol. Adeleke *et al.* (2012) inocularon plantas de *P. patula* con *Pisolithus tinctorius*, *Paxillus involutus*, *Laccaria bicolor* y *Suillus tomentosus* en presencia del mineral de hierro; los resultados fueron que las raíces de pino micorrizadas fueron capaces de movilizar dicho elemento. Rineau *et al.* (2008) realizaron ensayos de microplacas para comparar la quelación de hierro, la absorción de hierro libre y la producción de oxalato por *Lactarius subdulcis* y *Xerocomus* sp. y los resultados mostraron que *L. subdulcis* fue menos eficiente que *Xerocomus* sp. para acceder al hierro libre o complejo. Estos trabajos demuestran que los diferentes micobiontes originan movilizaciones de Fe a sus fitobiontes asociados.

El Mn es esencial para el metabolismo de las plantas, pero a altas concentraciones es extremadamente tóxico (Adeleke *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015), y tiene un papel vital en la formación y fotosíntesis de cloroplastos, el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de varias enzimas (Millaleo *et al.*, 2010; Karki *et al.*, 2013). En la movilización de este micronutriente se observó mayor contenido en la parte aérea cuando se inoculó Lp+C en comparación con plantas

no inoculadas, en el sustrato que contenía 10% de composta. Las concentraciones adecuadas de Mn en el tejido foliar son importantes para evitar el daño a los procesos metabólicos de la planta. Canton *et al.* (2016) estudiaron si el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* está influenciado por Mn en *Eucalyptus grandis*; las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión S-transferasa se activaron cuando el hongo se expuso a Mn por lo tanto *P. tinctorius* proporciona protección para sus plantas hospederas para concentraciones potencialmente tóxicas de Mn. Yulin Qi *et al.* (2016) seleccionaron a *Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum geophilum*, *Boletus reticulatus*, *Suillus bovinus*, *P. tinctorius chdx*, *P. tinctorius*, *Suillus granulatus*, *Amanita virgineoides*, *Suillus luteus* y *S. luteus chdx* para investigar sus respuestas al estrés de Mn, en donde identificaron a *P. tinctorius* y *B. reticulatus* mostrando una alta tolerancia a Mn que podrían ser utilizados en la reforestación de suelos mineros de dicho elemento. Mitchell *et al.* (2008) inocularon boro con *Pisolithus tinctorius* en plantas de *Pinus echinata* y los resultados fue el aumento del contenido foliar y total de Mn y otros nutrimentos como B, Ca, Cu, Fe, K, P y Mg.

En la movilización del micronutriente Zn se observó mayor contenido en la parte aérea cuando se inoculó Lp+C en comparación con plantas inoculadas con Lp o C o sin inocular, en el sustrato de 10% de composta. La cantidad de Zn que ocupan las plantas para crecer y desarrollarse adecuadamente es muy pequeña pues oscila entre 15 y 20 miligramos por kilogramo de tejido seco; estos valores representan menos de 0.1% del peso seco total del tejido. Por tal razón, el Zn es clasificado como micronutriente y está relacionado por su capacidad de actuar como estabilizador de la estructura de las proteínas o como un cofactor (ión inorgánico) necesario para la activación de las enzimas involucradas en diferentes procesos metabólicos (Alloway, 2008). Es necesario para llevar a cabo el metabolismo de los ácidos nucleicos, ya que este elemento forma parte de las enzimas y proteínas que están involucradas en la síntesis y expresión del DNA. Asimismo, el Zn es necesario para mantener activo tanto al fotosistema II, el cual es el

encargado de captar la luz durante el proceso de fotosíntesis, como a la enzima anhidrasa carbónica, involucrada en la hidratación del dióxido de carbono en las plantas (Lin *et al.*, 2012). Previamente diversos autores como Ruytinx *et al.* (2013) reportaron que en sitios contaminados con Zn el basidiomiceto ectomicorrízico *Suillus bovinus* presenta una tolerancia elevada en estos suelos. Turnau *et al.* (2001) probaron a *Suillus luteus* en *P. sylvestris*, como posibles biofiltros y los análisis mostraron una fuerte acumulación de Zn dentro del manto fúngico y en el rizomorfo.

En este sentido, se ha demostrado que los flujos de N, Fe, Mn, Zn dentro de las hifas fúngicas ectomicorrízicas, son interdependientes. La mayor transferencia de N, Fe, Mn y Zn en el presente trabajo, se encontró en plantas inoculadas con hongos ectomicorrízicos y la bacteria auxiliadora de la micorriza en comparación con plantas no inoculadas. Esto puede ser explicado en función de la habilidad que tienen las hifas fúngicas para explotar la materia orgánica existente en la composta, adicionada a los sustratos; debido a una exploración extensiva y una rápida colonización en el suelo (Pérez-Moreno y Read 2004). Por otra parte los hongos simbioses ectomicorrízicos de los pinos, liberan cantidades significativas de enzimas como quitinasas, fosfatasas y proteasas. Esto permite que los residuos orgánicos sean aprovechados directamente para la obtención de N (Tibbet *et al.*, 2002).

6.3 CONTENIDO DE CLOROFILA (A, B Y TOTALES) Y CAROTENOS

Al evaluar las variables de contenido de clorofila y carotenos se demostró que las plantas inoculadas con Lp o Lp+C presentaron mayor contenido de clorofila y carotenos en comparación con aquellas inoculadas con *Cohnella* sp. o no inoculadas. Sanchez-Zabala *et al.* (2013) inocularon *Lactarius deliciosus*, *L. quieticolor*, *Pisolithus arhizus* y *Suillus luteus* en plantas de *P. pinaster* en condiciones de vivero, las plántulas inoculadas mostraron un aumento significativo en el contenido de clorofila total y carotenoides. Sebastiana *et al.* (2013) utilizaron a *Pisolithus*

tinctorius para la colonización ectomicorrízica en *Quercus suber* y el desarrollo de la ectomicorriza originó un aumento significativo en los pigmentos fotosintéticos. Yue *et al.* (2010) demostraron la influencia benéfica de los hongos ectomicorrízicos en el contenido de clorofila en *Pinus massoniana*, *P. elliottii* y *P. thunbergii*, inoculadas con *Boletus edulis*, *B. speciosus*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon luteous*, *Laccaria aemthystea* y *Amanita pantherina*, encontrando que dicha inoculación incrementó de manera evidente el contenido de clorofila. Huang Yi *et al.* (2004) evaluaron la tolerancia de *P. sylvestris* al estrés por metales pesados inoculadas con *Suillus bovinus*; este hongo mostró diferencias en el contenido de clorofila (>30%) en comparación con las plantas no micorrizadas. Morte *et al.* (2001) inocularon plantas de *P. halepensis* con *Suillus mediterraneensis* y reportaron que el contenido de clorofila fue mayor en plantas micorrizadas que en plantas no micorrizadas.

6.4 TASA FOTOSINTÉTICA Y TRANSPIRACIÓN

En trabajos anteriores se ha demostrado que los hongos ectomicorrízicos mejoran la fotosíntesis de las plantas hospederas, pues estos simbiontes aumentan la demanda de carbono subterráneo (Heinonsalo *et al.*, 2015). En esta investigación se pudo observar que en la tasa fotosintética existió un marcado efecto sinérgico cuando se inoculó Lp+C, en comparación con plantas inoculadas con Lp o C o sin inocular independientemente del contenido de composta. Dicho efecto sinérgico en plantas inoculadas fue 5.5 y 8.0 veces mayor contraste con las plantas no inoculadas en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente. De manera similar para la variable de transpiración este efecto fue mayor cuando el sustrato contenía 20% de composta en comparación con el 10%. Xu *et al.* (2015) mostraron que las hifas de *Laccaria bicolor* en plantas de *Picea glauca* aumentaron la transpiración y la tasa fotosintética. Makita *et al.* (2012) determinaron como *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma citrinum*, *Laccaria*

amethystea y *Astraeus hygrometricus* afectan la fisiología de las plantas de *Quercus serrata*, debido a la colonización de la raíz, y mostraron que la tasa fotosintética fue mayor en las plantas inoculadas con *S. citrinum*, *L. amethystea* y *A. hygrometricus* en comparación con las de control y *P. tinctorius*. Canton *et al.* (2016) compararon las respuestas bioquímicas en *Eucalyptus grandis* que habían sido colonizadas por el hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* observando que las plantas micorrizadas presentaron valores más altos en tasa fotosintética que las plantas no micorrizadas. Shi *et al.* (2017) examinaron los efectos de *Cenococcum geophilum*, *Pisolithus* sp. y *Laccaria amethystea* sobre la capacidad de fotosíntesis en plantas de *P. thunbergii*, las plantas micorrizadas mostraron un aumento significativo al promover el proceso de fotosíntesis en comparación con las plantas no inoculadas. En contraste con la investigación de Mrnka *et al.* (2012) al inocular el hongo micorrízico *Hebeloma mesophaeum* en plantas de *Populus nigra* con un suelo contaminado por una mezcla de metales pesados (principalmente Cd, Pb y Zn) los niveles fotosintéticos disminuyeron, aunque *H. mesophaeum* redujo fuertemente la acumulación de Cd y Fe en brotes. Sebastiana *et al.* (2018) investigaron si la inoculación del hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* en plantas de *Quercus suber* podría aumentar rendimiento bajo sequía, los resultados fueron negativos para la variable de fotosíntesis ya que los valores no aumentaron.

6.5 SINERGISMO (*Laccaria proxima* y *Cohnella* sp.)

En el presente trabajo se observó un efecto sinérgico al inocular Lp+C en las variables de crecimiento, tasa fotosintética, transpiración, translocación de nutrientes y porcentaje de colonización. Ejemplo de este efecto lo demostró Pohjanen *et al.* (2014) al inocular *Methylobacterium extorquens* junto con *Suillus variegatus* y *Pisolithus tinctorius* mejoraron el crecimiento de las plantas de *Pinus sylvestris*. Asimismo, Domínguez *et al.* (2015)

demonstraron que la inoculación de plantas de *Pinus halepensis* con la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* CECT 844 y *T. melanosporum* mejoró el crecimiento de las plantas, la absorción de N y duplicó la tasa de micorrización. Xiao-Qin *et al.* (2012) observaron efectos benéficos al co-inocular el hongo ectomicorrízico *Boletus edulis* con *Bacillus cereus* HB12 o HB59 sobre el crecimiento y la absorción de nutrientes de *Pinus thunbergii*. En otros experimentos se ha demostrado el sinergismo entre microorganismos como *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Laccaria laccata* inoculados, individualmente o en combinación, y como respuesta han mejorado significativamente el crecimiento y la biomasa de las plantas de *Pinus wallichiana*. La co-inoculación de *L. laccata* con *P. fluorescens* resultó en mayor colonización de la raíz y la inoculación combinada de *L. laccata* con *T. harzianum* y *P. fluorescens* aumentó significativamente en contenido de N, P y K en plantas de *P. wallichiana* (Ahangar *et al.*, 2012). Barragán *et al.* (2018) tuvo mejor crecimiento y calidad fisiológica en plantas de *Pinus moctezumae* al inocular con *Hebeloma mesophaeum* más *Cohnella* sp. y *Azospirillum brasilense*.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

Existió un efecto sinérgico en la variable del peso seco de la parte aérea, raíz y total, así como en la tasa fotosintética y en transpiración cuando se inoculó Lp+C, independientemente del contenido de composta en el sustrato en comparación con plantas no inoculadas. En el caso del diámetro del tallo y altura del vástago también se registró un efecto sinérgico cuando se inoculó con Lp+C, solo en el caso del sustrato que contenía 10% de composta. Existió un sinergismo en la movilización de Fe, Mn y Zn cuando se inoculó Lp+C en el sustrato con el 10% de composta, en comparación con la inoculación Lp, C o plantas no inoculadas; sin embargo dicho sinergismo no se registró en el sustrato con 20% de composta. Cuando se inoculó con Lp existió una mayor transpiración en comparación con la inoculación solo con C o plantas sin inocular, independientemente del contenido de composta del sustrato. En el caso del contenido de clorofilas totales y carotenos se observaron incrementos cuando se inoculó Lp o Lp+C en comparación con la inoculación de C o sin inocular, independientemente del sustrato. Se observó incremento sustancial en el porcentaje de colonización cuando se inoculó solo *Laccaria proxima* en comparación con la inoculación de Lp+C, demostrando que la bacteria promovió conspicuamente la colonización ectomicorrízica. Los porcentajes de la inoculación dual fue de 79.4% y 92.7% en los sustratos de 10% y 20% de composta, respectivamente. Existió una mayor movilización de N a la parte aérea cuando se inoculó solo la cepa de *Conhella* sp. independientemente del sustrato, en comparación con plantas no inoculadas.

La coinoculación de *L. proxima* y la bacteria *Cohnella* sp. mejoró la calidad nutrimental y fisiológica de *Pinus cembroides*, una especie de importancia forestal tolerante a climas semiáridos. Por lo tanto se demuestra en esta investigación el potencial sinérgico de inocular con

hongos ectomicorrízicos más bacterias para la producción de plantas útiles en programas de reforestación en áreas con bajas precipitaciones.

CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA

- Adeleke, R. A., Cloete, T. E., Bertrand, A. and Khasa, D. P. 2012. Iron ore weathering potentials of ectomycorrhizal plants. *Mycorrhiza* 22:535–544.
- Acosta-Mireles, M., Carrillo-Anzures, F., y Díaz-Lavariega, M. 2009. Determinación del carbono total en bosques mixtos de *Pinus patula* Schl. et Cham. *TERRA Lationamericana*, 27(2), 105–114.
- Ahangar, M. A., Dar, G. H. and Bhat, Z. A. 2012. Growth response and nutrient uptake of blue pine (*Pinus wallichiana*) seedlings inoculated with rhizosphere microorganisms under temperate nursery conditions of Kashmir. *Ann Forest Res.* 55:217–227.
- Alcántar, G. y Sandoval, V. M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. Publicación especial 10. *Sociedad Mexicana de la ciencia del Suelo, A.C.*
- Alloway, B. J. 2008. Zinc in soils and crop nutrition, 2.a ed., Bruselas y París, International Zinc Association/International Fertilizer Industry Association.
- Ancona-Méndez, L., Cetz-Zapata, G. y Garma-Baéz, P. 2010. Hongos. En la biodiversidad en Campeche. Estudio de estado. Conabio, Gobierno del estado de Campeche, Universidad de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur, México. p. 186-189.
- Anderegg, W. R. L., Kane, J. M. and Anderegg, L. D. L. 2013. Consequences of widespread tree mortality triggered by drought and temperature stress. *Nat. Clim. Change* 3, 30–36.
- Anderegg, L. D. L., Anderegg, W. R. L., and Berry, J. A. 2013. Not all droughts are created equal: translating meteorological drought into woody plant mortality. *TreePhysiol.*
- Aspray, T. J., Frey-Klett, P., Jones, J. E., Whipps, J. M., Garbaye, J. and Bending, G. D. 2006. Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering.
- Baldrian, P. 2017. Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiol Rev* 41:109–130.
- Barragán-Soriano, J. L., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J., Carcaño-Montiel, M. G. and Medrano-Ortíz, K. I. 2018. Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 24(1), 3-16.
- Barroetaveña, C., V. N. Bassani y M. Rajchenberg. 2012. Inoculación micorrízica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. *Bosque* 33:163-169.
- Berlemont, R. and Martiny, A. C. 2015. Genomic potential for polysaccharides deconstruction in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 81:1513–1519.
- Bonfante, P. 2001. At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In *Mycota, IX Fungal Associations*, Berlin: ed. B Hock Springer-Verlag, pp. 45–91.
- Bonfante, P. and Genre, A. 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary developmental perspective. *Trends Plant Sci.* 13:492–98
- Bonfante, P., Balestrini, R., Genre, A. and Lanfranco, L. 2009. Establishment and functioning of arbuscular mycorrhizas. In *The Mycota, V: Plant Relationships*, ed. H Deising, Berlin: Springer-Verlag. 2nd ed. pp. 1112 257–72.

- Bonito, G., Reynolds, H., Robeson, M. S., Nelson, J., Hodkinson, B. P., Tuskan, G., Schadt, C. W. and Vilgalys, R. 2014. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Mol Ecol* 23:3356–3370.
- Bouwmeester, H. J., Roux, C., Lopez-Raez, J. A. and Becard, G. 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci.* 12:224–30
- Breda, N., Huc, R., Granier, A., and Dreyer, E. 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long term consequences. *Ann. For.Sci.* 63, 625–644.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. in: Black CA (ed) Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy. *American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin. 9:1149-1178.
- Brulé, C., Frey-Klett, P., Pierrat, J. C., Courrier, S., Gérard, F., Lemoine, M. C., Rousselet, J. L., Sommer, G. and Garbaye, J. 2001. Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and the effects of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol Biochem* 33:1683–1694.
- Brunner, I. and Godbold, D. L. 2007. Tree roots in a changing world. *J. For.Res.* 12, 78–82.
- Canton, G. C., Bertolazi, A. A., Cogo, A. J., Eutrópico, F. J., Melo, J. and de Souza, S. B. 2016. Biochemical and ecophysiological responses to manganese stress by ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and in association with *Eucalyptus grandis*. *Mycorrhiza*, 1–13.
- Calvaruso, C., Turpault, M.P. and Frey-Klett, P., 2006. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1258e1266.
- Cairney, J. W. G. and Chambers, S. M. 1999. Ectomycorrhizae fungi: key genera in profile. *Ed. Springer. Berlin.* 369 p.
- Carcaillet, C., Richard, P. J. H., Bergeron, Y., Fréchette, B., and Ali, A. A. 2010. Resilience of the boreal forest in response to Holocene fire-frequency changes assessed by pollen diversity and population dynamics. *Int. J. Wildland Fire* 19(8): 1026–1039.
- Carrasco-Hernández, V. 2010. Aspectos ecofisiológicos de la raíz de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula* y especies ectomicorrízicas comestibles de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados. Montecillo. 89 p
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J. J., Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.1 Núm.4 p. 567-577.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J. J., Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural* 84:83-96.
- Carrera-Nieva, A. y López-Ríos, G. F. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10:93-98.
- Challenger, A. y Soberon, J. 2008. Los ecosistemas terrestres. In Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (ed.). México, D. F. p. 87-108.
- Chalot, M., Javelle, A., Blaudez, D., Lambilliotte, R., Cooke, R., Sentenac, H., Wipf, D. and Botton, B. 2002. An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant and Soil.* 244: 165–175.

- Chemidlin, N., Maron, P. A., Ranjard, L., Nowak, V., Dufrene, E., Damesin, C., Soudani, K. and Lata, J. C. 2011. Seasonal dynamics of the bacterial community in forest soils under different quantities of leaf litter. *Appl Soil Ecol* 47:14–23.
- Chen, Y. H., Nara, K., Wen, Z. G, Shi, L., Xia, Y., Shen, Z. G. and Lian, C. L. 2015. Growth and photosynthetic responses of ectomycorrhizal pine seedlings exposed to elevated Cu in soils. *Mycorrhiza* 25:561–571.
- Chenlemuge, T., Hertel, D., Dulamsuren, C., Khishigjargal, M., Leuschner, C., and Hauck, M. 2013. Extremely low fine root biomass in *Larix sibirica* forests at the southern drought limit of the boreal forest. *Flora* 208, 488–496.
- Cho, E. A., Lee, J. S., Lee, K. C., Jung HC, Pan, J. G. and Pyun, Y. R. 2007. *Cohnella laeviribosi* sp. nov., isolated from a volcanic pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2902–2907
- Claeys, H., and Inzé, D. 2013. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *PlantPhysiol.* 162, 1768–1779.
- CONABIO 2016. *Pinus cembroides*. (Web en línea). Disponible desde Internet en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/54pinac11m.pdf (con acceso el 03 de diciembre de 2016).
- Constante García, V., Villanueva Díaz, J., Cerano Paredes, J., Cornejo Oviedo, E. y Valencia Manzo, S.. 2012. Dendrocronología de *Pinus Cembroides* Zucc. y Reconstrucción de Precipitación Estacional para el Sureste de Coahuila. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*; 34 (106): 17-39.
- Contreras-MacBeath, J., Jaramillo-Monroy, F. y Boyás- Delgado, J. C. 2006. La diversidad biológica en Morelos. Estudio de estado. Conabio, UAEM. p. 40.
- Coraspe, H., Takashi, M., Vinicus, I., Contreras, F.; Ocheuze, P. 2009. Absorción de Macronutrientes por plantas de Papa (*Solanumtuberosum* L.) en La Producción de Tubérculo-Semilla. *Agronomía Tropical*, 59 (1): 45 – 58.
- Courty, P., Buee, M., Diedhiou, A., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M., Uroz, S., and Garbaye, J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biol. Biochem.* 42(5): 679–698.
- DEEMY. An information System for Characterization and Determination of Ectomicorrhizae. Disponible en: <http://www.deemy> (consultado en mayo 2018).
- Dominguez-Nuñez, J. A., Medina, M., Berrocal-Lobo, M., Anriquez, A. and Albanesi, A. 2015. The combined effects of *Pseudomonas fluorescens* CECT 844 and the black truffle co-inoculation on *Pinus nigra* seedlings. *Forest – Biogeosciences and Forestry*.
- Duponnois, R., Garbaye, J. 1990. Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi bacteria. *Canadian Journal of Botany* 68:2148-2152.
- Eichlerova, I., Homolka, L., Žifčáková, L., Lisa, L., Dobiašova, P. and Baldrian, P. 2015. Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. *Fungal Ecol* 13:10–22.
- Esqueda, M., Coronado, M., Gutiérrez, A., Valenzuela, R., Chacón, S., Gilbertson, R. L., Herrera, T., Lizárraga, M., Moreno, G., Pérez-Silva, E. y Van Devender, T. R. 2010. Hongos. In *Diversidad biológica de Sonora*, F. E. Molina-Freaner y T. R. Van Devender (eds.). UNAM, CONABIO, México, D. F. p. 189-205.
- Estrada, T. A. 2007. Ecología de los hongos ectomicorrízicos. En: Ferrera-Cerrato, R, y 1128 Alarcón, A. (Eds) Trillas. *Microbiología Agrícola*. pp 134-168.
- FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 2012. Los bosques y el cambio climático. 15 de 06 de 2012. <http://www.fao.org/forestry/climatechange/53459/es/> (último acceso: 11 de 07 de 2018).

- FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 2012. El estado de los bosques del mundo. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Roma. 51 p.
- Farjon, A., J. A. Pérez de la R. and B. T. Styles. 1997. A field guide to the pines of Mexico and Central America. *The Royal Botanic Gardens*. Kew Publishing House. London, UK. 147 p.
- Fransson, P., Andersson, A., Norstrom, S., Bylund, D., Bent, E. 2016. Ectomycorrhizal exudates and pre-exposure to elevated CO₂ affects soil bacterial growth and community structure. *Fungal Ecol* 20:211–224.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. and Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176, 22–36.
- Frutis-Molina, I. y Valenzuela, R. 2009. Macromicetos. La diversidad biológica del Estado de México. Estudio de estado, G. Ceballos, R. List, G. Garduño, R. López-Cano, M. J. Muñozcano-Quintanar, E. Collado y J. E. San Román (comps.). Gobierno del Estado de México, Biblioteca. Mexiquense del Bicentenario, Toluca. p. 243-249.
- Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197-210.
- García-Fraile, P., Velázquez, E., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., and Raul, R. 2008. *Cohnella phaseoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus coccineus* in Spain, and emended description of the genus *Cohnella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1855–1859
- García-Jiménez, J. y Guevara-Guerrero, G. 2005. Macromicetos (Hongos Superiores) de Tamaulipas. In Biodiversidad Tamaulipeca, Vol. 1, L. Barrientos-Lozano, A. Correa-Sandoval, J. V. Horta-Vega y J. García-Jiménez (eds.). Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. Cd. Victoria. p. 67-79.
- García-Rodríguez, J. L., Pérez-Moreno, J., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, B. M. y Vaquera-Huerta, H. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia* 40:665-676.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M. y Flores-García, A. 2013. Caracterización morfológica y genética de las Ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:153-169
- Genre, A. 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20, 1407–1420
- Gómez, C. y Corlay, L. 2007. Microbiota edáfica y su importancia en la agricultura. In: Ferrera-Cerrato R. y Alarcón, A. *Microbiología Agrícola*. (eds) Trillas. pp 39-55.
- Gómez-Peralta, M. y Gómez-Reyes, V. M. 2005. Hongos y líquenes. In La biodiversidad en Michoacán. Estudio de estado, G. L. E. Villaseñor (ed.). Gobierno del Estado de Michoacán, Secretaría Urbanismo y Medio Ambiente, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia. p. 64-67.
- Guzmán-Dávalos, L. 2001. Jalisco, México. Hongos del Nevado de Colima. Rapid Color Guide No. 87, versión 1.1. Foster, RB, M. Metz y E. Fanti (productores). Programas ambientales y de conservación, The Field Museum, Chicago.
- Guzmán, G., Ramírez-Guillén, F. y Munguía, P. 2003. Introducción a la microbiota del estado de Veracruz (México). *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 27:223-229.
- Hamanishi, E. T. and Campbell, M. M. 2011. Genome-wide responses to drought in forest trees. *Forestry* 84, 273–283.

- Hameed, A., Hung, M. H., Lin, S. Y., Hsu, Y. H., Liu, Y. C., Shahina, M., Lai, W. A., Huang, H. C., Young, L. S. and Young, C. C. 2013. *Cohnella formosensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the rhizosphere of *Medicago sativa* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:2806–2812.
- Harris, C. I. and Warren, G. F. Determination of phosphorus fixation capacity in organic soils. *Soil Science. Soc. Am. Proc.* 1962. 26:381.
- Hartmann, H. 2011. Will a 385 million year-struggle for light become a struggle for water and for carbon? – how trees may cope with more frequent climate change-type drought events. *Global Change Biol.* 17, 642–655.
- Heinonsalo, J., Juurola, E., Lindena, A. and Pumpanena, J. 2015. Ectomycorrhizal fungi affect Scots pine photosynthesis through nitrogen and water economy, not only through increased carbon demand. *Environmental and Experimental Botany* 109. 103–112.
- Hertel, D., Strecker, T., Müller-Haubold, H., and Leuschner, C. 2013. Fine root biomass and dynamics in beech forests across a precipitation gradient – is optimal resource partitioning theory applicable to water-limited mature trees? *J. Ecol.* 101, 1183–1200.
- Huang, Y. and Tao, S. 2004. Influences of excessive Cu on photosynthesis and growth in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *J Environ Sci-China* 16:414–419.
- INI-PNUD. Instituto Nacional Indigenista - Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. 2000. Estado del desarrollo económico y social de los pueblos indígenas de México. Base electrónica 2000.
- IPCC. 2013. *Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático*, de IPCC, 204. Cambridge.
- IPCC-Grupo de Trabajo II. 2014. *Cambio Climático 2014, Impactos, adaptación y vulnerabilidad*. (C. B. Field, & V. R. Barros, Eds.) Suiza: IPCC.
- Izumi, H., Anderson, I. C., Alexander, I. J., Killham, K. and Moore, E. R. 2006. Diversity and expression of nitrogenase genes (*nifH*) from ectomycorrhizas of Corsican pine (*Pinus nigra*). *Environ Microbiol* 8:2224–2230.
- Jackson, R. B., Mooney, H. A. and Schulze, E. D. 1997. A global Budget for fine root biomass, Surface area, and nutrient contents. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 7362–7366.
- Jenkins, M. L., Cripps C. L. and Gains-Germain. 2018. Scorched Earth: *Suillus* colonization of *Pinus albicaulis* seedlings planted in wildfire-impacted soil affects seedling biomass, foliar nutrient content, and isotope signatures. *Plant Soil*.
- Jiménez-Ruiz, M. 2011. Estudio etnomicológico y biotecnológico de hongos silvestres comestibles ectomicorrízicos en *Pinus pseudostrabus* y evaluación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados. Montecillo. 120 p.
- Jouranda, P., Hannibala, L., Majorela, C., Mengantb, S., Ducoussoc, M. and Lebrund, M. 2014. Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. *Journal of Plant Physiology* 171 / 164– 172.
- Karki, P., Lee, E. and Aschner, M. 2013. Manganese neurotoxicity: a focus on glutamate transporters. *Ann Occup Environ Med* 25:4.
- Kataoka, R., Taniguchi, T. and Futai, K. 2009. Fungal selectivity of two mycorrhiza helper bacteria on five mycorrhizal fungi associated with *Pinus thunbergii*. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1815–1819.

- Kämpfer, P., Rosselló-Mora, R., Falsen, E., Busse, H., J. and Tindall, B., J. 2006. *Cohnella thermotolerans* gen. nov., sp. nov., and classification of 'Paenibacillus hongkongensis' as *Cohnella hongkongensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 781–786.
- Keller, S., Schneider, K. and Sussmuth, R. D. 2007. Structure elucidation of auxofuran, a metabolite involved in stimulating growth of fly agaric, produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH505. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 59, 801_803.
- Khianngam, S., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Kim, K. K., Lee, K. C. and Lee, J. S. 2010. *Cohnella xylanilytica* sp. nov. and *Cohnella terrae* sp. nov., xylanolytic bacteria from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2913–2917.
- Khianngam, S., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Kim, K. K., Lee, K. C. and Lee, J. S. 2012. *Cohnella cellulositytica* sp. nov., isolated from buffalo faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1921–1925
- Kluber, L. A., Smith, J. E. and Myrold, D. D. 2011. Distinctive fungal and bacterial communities are associated with mats formed by ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 43:1042–1050.
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H. and Morris, R. J. 2008. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:9823–28
- Kurth, F., Zeitler, K., Feldhahn, L., Neu, T. R., Weber, T., Krištůfek, V., Wubet, T., Herrmann, S., Buscot, F. and Tarkka, M. 2013. Detection and quantification of a mycorrhization helper bacterium and a mycorrhizal fungus in plant-soil microcosms at different levels of complexity. *BMC Microbiol* 13:205.
- Labbe, J. L., Weston, D. J., Dunkirk, N., Pelletier, D. A. and Tuskan, G. A. 2014. Newly identified helper bacteria stimulate ectomycorrhizal formation in *Populus*. *Front Plant Sci* 5:579.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, 304, 1623–1627.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R. and Fierer, N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* 75: 5111–5120.
- Lehto, T., and Zwiazek, J. J. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21, 71–90.
- Li, Q., Chen, L. S, Jiang, H. X., Tang, N., Yang, L. T. and Lin, Z. H. 2010. Effects of Mn-excess on CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport of leaves, and antioxidant systems of leaves and roots in *Citrus grandis* seedlings. *BMC Plant Biol* 10:1–16.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382.
- Lin, Y. F. and M. G. M. Aarts. 2012. The molecular mechanisms of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69:3187-3206
- López-Gutiérrez, A., Pérez-Moreno, J., Hernández-Santiago, F., Uscanga-Mortera, E., Antonio García-Esteva, A., Cetina-Alcalá, V. M., Cardoso-Villanueva, M. R and Xoconostle-Cázares, B. 2018. Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Botanical Sciences* 96 (2): 286-304.
- López Y., C., G. Guevara-Guerrero y J. I. Alonso Riverol. 2011. Hongos macromicetos. In Riqueza biológica de Quintana Roo. Un análisis para su conservación. Tomo 2, C. Pozo

- (ed.). El Colegio de la Frontera Sur, Conabio, Gobierno del estado de Quintana Roo y Programa de Pequeñas Donaciones (PFC), México, D. F. p. 24-29.
- Makita, N., Hirano, Y., Yamanaka, T., Yoshimura, K. and Kosugi, Y., 2012. Ectomycorrhizal-fungal colonization induces physio-morphological changes in *Quercus serrata* leaves and roots. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 175, 900–906.
- Marmeisse, R., Guidot, G., Gayl, R., Lambilliotte, H., Sentenac, J., Combiel, D., Melayah, L., Fraissinet-Tachet, J. and Debaud, C. 2004. *Hebeloma cylindrosporum* a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to 1134 ecosystem. *New Phytologist*. 163: 481-498.
- Martínez Nevárez, L. E., López, H., Sigala Rodríguez, J. A., Rosales Morales, S. and Montoya Ayón, J. B. 2016. Response to induced *Russula delica* Fr. inoculation in *Pinus engelmannii* Carr. plants in the nursery. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. Vol. 7 (33): 108-117
- Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J. J. y Honrubia-García, M. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. Inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18:183-192.
- Matthijs, S., Tehrani, K. A., Laus, G., Jackson, R. W., Cooper, R. M., Cornelis, P. 2007. *Thioquinolobactin*, a *Pseudomonas siderophore* with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ Microbiol.* 9:425–434.
- Mencuccini, M. 2015. Dwarf trees, super-sized shrubs and scaling: why is plant stature so important? *Plant Cell Environ.* 38,1–3.
- Méndez-Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero-Lizaola, R., Hernández-Acosta, E. y Lara-Herrera. A. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana* 29:73-81.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A. G., Mora, M. L., Alberdi, M. 2010. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *J Soil Sci Plant Nutr* 10:470–481.
- Mitchell, R. J., Garrett, H. E., Cox, G. S. and Atalay, A. 2008. Boron and ectomycorrhizal influences on mineral nutrition of container- grown *Pinus ehinata* mil. *Journal of Plant Nutrition*.
- Mohan, J. E., Cowden, C. C., Baas, P., Dawadi, A., Frankson, P. T. and Helmick, K. 2014. Mycorrhizal fungi mediation of terrestrial ecosystem responses to global change: mini-review. *Fungal Ecol.* 10, 3–19.
- Morte, A., Díaz, G., Rodríguez, P., Alarcon, J. J. and Sanchez-Blanco, M. J. 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biol Plant* 44(2):263–267.
- Mrnka, L., Kuchár, M., Cieslarová, Z., Matějka, P., Száková, J., Tlustoš, P. and Vosátka, M. 2012. Effects of Endo- and Ectomycorrhizal Fungi on Physiological Parameters and Heavy Metals Accumulation of Two Species from the Family Salicaceae. *Water Air Soil Pollut* 223:399–410.
- Mueller, G. M. 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana: Botany*, Chicago: Field Museum of Natural History. 158 p.
- Narave, F. H., and Taylor, K. 1997. Pinaceae. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Ver., University of California, Riverside, CA. Fascículo 98. 50 pp.

- Niveiro, N., Popoff, O. and Edgardo, O. A. 2009. Hongos comestibles silvestres: especies exóticas de *Suillus* (Boletales, Basidiomycota) y *Lactarius* (Russulales, Basidiomycota) asociadas a cultivos de pinus *Elliottii* del nordeste argentino. *Bonplandia*. (1): 65- 71.
- Oldroyd, G. E. and Downie, J. A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:519–46.
- Oliveira, R. S., Franco, A. R. and Castro, P. M. L. 2012. Combined use of *Pinus pinaster* plus and inoculation with selected ectomycorrhizalfungi as an ecotechnology to improve plant performance. *Ecol.Eng.*; 43:95-103.37.
- Onwuchekwa, N. E., Zwiazek, J. J., Qureshi, A. and Khasa, D. P. 2014. Growth of mycorrhizal jack pine (*Pinus banksiana*) and white spruce (*Picea glauca*) seedlings planted in oil sands reclaimed areas. *Mycorrhiza*.
- Pardavé-Díaz, L. M., Flores-Pardavé, L., Franco-Ruiz, V. y Robledo-Cortés, M. 2007. Contribución al conocimiento de los hongos (macromicetos) de la Sierra Fría, Aguascalientes. *Investigación y Ciencias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 37:4-12.
- Parladé, J., Álvarez, I. F. and Pera, J. 1999. Coinoculation of containerized Douglas-fin (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza*.8:189-195.
- Perdomo, C., Barbazán, M. y Duran, J. 1994. Nitrógeno. Cátedra de Fertilidad. Facultad de Agronomía. Universidad de la Republica. Montevideo. Uruguay, 74 pp.
- Pera, J. y Parladé, J. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales*. 14(3):419-433.
- Perea-Estrada, V., M., Pérez-Moreno, J., Villarreal, L. R., Santos, A. T., Cetina, V. M. y Tijerina, L. C. 2009. Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Rev. Fitotec. Mex.* 32:93-102.
- Pérez-Moreno, J. and Read, D. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.
- Pérez-Moreno, J y Read, D. 2007. Ecología fisiológica y simbiosis ectomicorrizica. *In* 1130 Ferrera-Cerrato R. y Alarcón. pp 134-168. *Microbiología Agrícola*. (eds) Trillas.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Yesca-Pérez, A., Delgado-Alvarado, A. y Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Econ. Bot.* 62(3):425-436.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Yesca-Pérez, A., Delgado-Alvarado, A. y Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Econ. Bot.* 62(3):425-436.
- Pérez-Moreno, J. 2012. Los hongos comestibles ectomicorrízicos y su biotecnología. *In*: Sánchez, J., E., and G. Mata (eds). *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural*. ECOSUR-INECOL, México. 19-28 pp.
- Perry, J. P. 1991. The pines of Mexico and Central America. Timber Press. *Inc. Portland, OR. USA*. 231 p.
- Philippot, L. and Germon, J. C. 2005. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. pp. 159-176. *In*: F. Buscot and A. Varma (eds). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. *Soil Biology*. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany.

- Pohjanen, J., Koskimaki, J., Pirttilä, A. M. 2014. Interactions of meristem-associated endophytic bacteria, p 103–113. In Verma VC, Gange AC (ed), *Advances in endophytic research*, 1st ed. Springer India, New Delhi, India.
- Pohl, K., Therrell, M. D., Blay, J. S., Ayotte, N., Cabrera, J. J., Díaz, S. C., Cornejo, E. H., Elvir, J. A., González, M. E., Opland, D. Park, J., Pederson, G., Bernal, S. S., Vázquez, L. S., Villanueva-Díaz, J. and D. W. Stahle. 2003. A cool season precipitation reconstruction for Saltillo, Mexico. *Tree-ring Research*. 59(1): 11 – 19.
- Poorter, H., Niklas, K. J., Reich, P. B., Oleksyn, J., Poot, P., and Mommer, L. 2012. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytol.* 193, 30–50.
- Reed, S. C., Cleveland, C. C. and Townsend, A. R. 2011. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42:489 –512.
- Reichstein, M., Bahn, M., Ciais, P., Frank, D., Mahecha, M. D. and Seneviratne, S. I. 2013. Climate extremes and the carbon cycle. *Nature* 500, 287–295.
- Richard, F., Millot S., Gardes, M. and Selosse. 2005. Diversidad y especificidad de hongos ectomicorrízicos recuperados de un bosque mediterráneo de viejo crecimiento dominado por *Quercus ilex*. *New Phytologist* (2005) 166: 1011–1023.
- Rincón, A., Álvarez, I. F. and Pera, J. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 11:265-271.
- Rineau, F., Courty, P. E., Uroz, S., Buée, M. and Garbaye, J. 2008. Simple microplate assays to measure iron mobilization and oxalate secretion by ectomycorrhizal tree roots. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2460-2463.
- Robert Francoise, M. 2012. Notas sobre el estudio ecológico y fitogeográfico de los bosques de *Pinus cembroides* en México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(10).
- Rodríguez-Laguna, R., Jiménez-Pérez, J., Aguirre-Calderón, O., Treviño-Garza, E., y Razo-Zárate, R. 2009. Estimación de carbono almacenado en el bosque de pino-encino en la reserva de la biosfera El cielo, Tamaulipas, México. *Ra Ximhai*, 5(3), 317–327.
- Ruytinx, J., Hoai, N., Van Hees, M., Op De Beeck, M., Vangronsveld, J., Carleer, R., Colpaert, J. V. and Adriaensen, K. 2013. Zinc export results in adaptive zinc tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus bovinus*. *Metallomics* 5:1225–1233.
- Rzedowski, J. 2006. *Vegetación de México*. 1a. edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Sánchez-Zabala, J., Majada, J., Martín-Rodríguez, N., González-Murua, C., Ortega, U., Alonso-Graña, M., Arana, O. and Duñabeitia, M. K. 2013. Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza* 23: 627-640.
- Santiago-Martínez, G., Estrada-Torres, A., Varela, L. y Herrera, T. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis in vitro de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* 37:575-584.
- Schuldt, B., Leuschner, C., Brock, N. and Horna, V. 2013. Changes in wood density, Wood anatomy and hydraulic properties of the xilem along the root to shoot flow path in tropical rain forest trees. *TreePhysiol.* 33, 161–174.
- Sebastiana, M., Pereira, V., Alcantara, A., Pais, M., Silva, A. 2013. Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* increases the performance of *Quercus suber* L. (cork oak) nursery and field seedlings. *New For* 44(6):937–949.

- Sebastiana, M., Bernardes da Silva, A., Rita Matos, A., Alcântara, A., Silvestre, S. and Malhó, R. 2018. Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* reduces stress induced by drought in cork oak
- Selossé, M., Frank, A., He, X and Simard, S. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons 1141 dangereuses? *Ecology and Evolution*. Vol.21 No.11
- Shi, L., Wang, J., Liu, B., Nara, K., Lian, C., Shen, Z., Xia, Y. and Chen, Y. 2017. Ectomycorrhizal fungi reduce the light compensation point and promote carbon fixation of *Pinus thunbergii* seedlings to adapt to shade environments. *Mycorrhiza* (2017) 27:823–830.
- Shiratori, H., Tagami, Y., Beppu, T., Ueda, K. 2010. *Cohnella fontinalis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from fresh water. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1344–1348
- Simard, W. S. 2009. The foundational role of mycorrhizal networks in self-organization 1171 of interior Douglas-fir forests. *Forest Ecology and Management* (258): 95– 107.
- Smith, M. E. y D. H. Pfister. 2009. Tuberculate ectomycorrhizae of Angiosperms: The interaction between *Boletus rubropunctus* (Boletaceae) and *Quercus* species (Fagaceae) in the United States and Mexico. *American Journal of Botany* 96:1665-1675.
- Smith, S. E., y D. H. Read. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Elsevier press. pp: 814.
- Smyth, C. E., Stinson, G., Neilson, E., Lemprière, T. C., Hafer, M., Rampley, G. J. and Kurz, W. A. 2014. Quantifying the biophysical climate change mitigation potential of Canada's forest sector. *Biogeosciences*, 11, 3515–3529.
- Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S. E., Fetzer, I., Bennett, E. M., Biggs, R., Carpenter, S. R., de Vries, W., de Wit, C.A., Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G.M., Persson, L.M., Ramanathan, V., Reyers, B. and Sörlin, S., 2015. Planetary boundaries: guiding human development on a changing planet. *Science* 347.
- Sterkenburg, E., Bahr, A., Brandstrom, Durling, M., Clemmensen, K. E., Lindahl, B. D. 2015. Changes in fungal communities along a boreal forest soil fertility gradient. *New Phytol* 207:1145–1158.
- Štursova, M., Žifc̣akova, L., Leigh, M. B., Burgess, R., Baldrian, P. 2012. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiol Ecol* 80:735–746.
- Styles, B. T. 1993. Genus *Pinus*: A Mexican purview. In *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*, T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds). Oxford University Press, Oxford. p. 397-420.
- Tedersoo, L., T. May and M. Smith. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217-263.
- Tian, J. H., Pourcher, A. M., Bouchez, T., Gelhaye, E. and Peu, P. 2014. Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9527–9544.
- Tibbett, M., and Sanders, F. E. 2002. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany*, 89, 783–789.
- Treviño, E. J. 2001. Estratificación de la información en el procesamiento digital de imágenes de satélite aplicado a la cartografía de los bosques de *Pinus cembroides*. *Investigaciones Geográficas (Mx)*; 44:54-63.
- Tuberosa, R. 2012. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front.Physiol.* 3:347.

- Turnau, K., Przybylowicz, W. J. and Przybylowicz, M. J. 2001. Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas as revealed by micr-PIXE analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 181:649-658.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., Pierrat, J. C., Mustin, C. and Frey-Klett, P. 2007. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Appl Environ Microbiol* 73:3019–3027.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Frey-Klett, P. 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology* 17, 378 e 387.
- Uroz, S., Oger, P., Lepleux, C., Collignon, C., Frey-Klett, P. and Turpault, M. P. 2011. Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Res Microbiol* 162:820–831.
- Valdés, M., Ambriz, E., Camacho, A. y Fierros, A. M. 2010. Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 2(1):53-64.
- van der Heijden, M. G. A, Martin, F., Selosse, M. A. Sanders, and I. R. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytology* 205:1406-1423.
- Vázquez-Mendoza, S. y Valenzuela-Garza, R. 2010. Macromicetos de la Sierra Norte del estado de Puebla, México. *Naturaleza y Desarrollo* 8:46-61.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., and Zhu, J.-K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *PlantJ.* 45, 523–539.
- Vitousek, P. M. and R. W. Howarth. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13:87-115.
- Vorišková, J., Brabcova V., Cajthaml, T., Baldrian, P. 2014. Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytol* 201:269 –278.
- Wagner, S., Nocentini, S., Huth, F. and Hoogstra-Klein, M., 2014. Forest management approaches for coping with the uncertainty of climate change: trade-offs in service provisioning and adaptability. *Ecol. Soc.* 19 art32.
- Walker, J. K, Cohen, H., Higgins, L. M. and Kennedy, P. G. 2014. Testing the link between community structure and function for ectomycorrhizal fungi involved in a global tripartite symbiosis. *New Phytol* 202:287–296.
- Wang, L.Y., Chen, S. F., Wang, L., Zhou, Y. G. and Liu, H. C. 2012. *Cohnella plantaginis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from plantain rhizosphere soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102:83–89.
- Wang, L. Y., Wang, T. S. and Chen, S. F. 2015. *Cohnella capsici* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from *Capsicum annuum* rhizosphere soil, and emended description of *Cohnella plantaginis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 107:133–139.
- Xiao-Qin, W., Liang-Liang, H., Jiang-Mei, S., Jia-Hong, R., Zheng, L., Chen, D. and Jian-Ren, Y. 2012. Effects of ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* and mycorrhiza helper *Bacillus cereus* on the growth and nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 385–391.
- Xie, Z. P., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemken, A., Jabbouri, S., Broughton, W. J., Vogeli, L. R. and Boller, T. 1995. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and onnodulating soybeans. *Plant Physiology* 108:1519-1525.

- Xu, H., Kemppainen, M., El Kayal, W., Lee, S. H., Pardo, A. G. and Cooke, J. E. K. 2015. Overexpression of *Laccaria bicolor* aquaporin JQ585595 alters root water transport properties in ectomycorrhizal White spruce (*Picea glauca*) seedlings. *New Phytol.* 205, 757–770.
- Yanbin, L., Hongmei, C, and Pu, M. 2018. Spatial patterns nitrogen transfer models of ectomycorrhizal networks in a Mongolian scotch pine plantation. *J. For. Res.* (2018) 29(2):339–346.
- Yoon, M. H., Ten, L. N. and Im, W. T. 2007. *Cohnella panacarvi* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from ginseng cultivating soil. *J Microbiol Biotechnol* 17:913–918
- Yulin, Q., Nanxing, Z., Jianjun, L. and Jian Huang. 2016. Biochemical Responses of Ten Ectomycorrhizal Fungal Isolates to Manganese. *Water Air Soil Pollut* (2016) 227: 477.
- Zhang, Z. X. 1986. Determination of chlorophyll content of plants - acetone and ethanol mixture method. *Liaoning Agricultural Science*, 3, 26–28.
- Zhao, M and Running, S. W. 2010. Drought-induced reduction in global terrestrial net primary production from 2000 through 2009. *Science* 329, 940– 943.