

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

COINOCULACIÓN CON UN HONGO COMESTIBLE ECTOMICORRÍZICO Y BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y SU EFECTO EN LA ECOFISIOLOGÍA DE *Pinus montezumae* Lamb.

BARRAGÁN SORIANO JOSÉ LUIS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO 2016

La presente tesis titulada: **COINOCULACIÓN CON UN HONGO COMESTIBLE ECTOMICORRÍZICO Y BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y SU EFECTO EN LA ECOFISIOLOGÍA DE *Pinus montezumae* Lamb.** realizada por el alumno: **José Luis Barragán Soriano** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



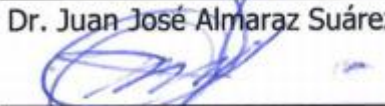
Dr. Jesús Pérez Moreno

ASESOR



Dr. Juan José Almaraz Suárez

ASESOR



M.C. Moisés Carcaño Montiel

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto 2016.



Esta tesis de Maestría en Ciencias forma 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”*,



La vida es una obra de teatro que no permite ensayos..... Por eso, canta, ríe, baila, llora y vive intensamente cada momento de tu vida... antes que el teletón baje y la obra termine sin aplausos.

(Charles Chaplín)

Si alguno de ustedes requiere de sabiduría, pídasela a dios y él se la dará, pues dios se la da a todos en abundancia y sin haber ningún reproche

A decorative border with intricate gold scrollwork and floral designs, featuring several roses in shades of pink, red, and white with green leaves. The border is set against a light blue background.

DEDICATORIA

*Este trabajo está dedicado en me memoria de mí gran
hermana Ma. Alma Rosa Barragán Soriano, quien me
enseñó a nunca rendirme.*



AGRADECIMIENTOS

- ❖ Agradezco a **dios**, por permitirme terminar una nueva etapa en mi vida, por ponerme en el lugar indicado con las personas indicadas.
- ❖ A mi hermosa **familia**; mi padre Fernando Barragán; mi madre Clotilde Soriano; mi hermano Alejandro, por siempre estar apoyándome incondicionalmente.
- ❖ A **Karla Isabel Medrano**, por ser mi gran compañera de vida y sobre todo estar a lo largo de esta nueva etapa, por su apoyo incondicional, por toda su ayuda en mi trabajo y sobre todo porque nunca me ha dejado solo.

La familia no siempre es de sangre. Son aquellos en tu vida que te quieren en la suya. Aquellos que harían lo que fuera por verte sonreír todos los días.

- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), por la beca otorgada para la maestría.
- ❖ Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (**COMECyT**) por su apoyo con la beca Tesis Posgrado.
- ❖ Al Dr. **Jesús Pérez Moreno**, por permitirme ser parte de este gran equipo de trabajo, por ser, no solo un maestro sino un guía y gran amigo, por enseñarme el lado positivo de la vida, y mostrarme lo más importante de la ciencia con una sonrisa.
- ❖ Al Dr. **Juan José Almaraz**, por su amistad por su apoyo, por todo el tiempo que me destino para aclarar mis dudas en este trabajo.
- ❖ Al M.C. **Moisés G. Carcaño Montiel**, por su valioso aporte a esta investigación, por aportar valioso material para realizar el trabajo.
- ❖ A **Itzel Dinora Galindez**, por aclarar mis dudas para establecer mi experimento.
- ❖ A mis compañeros del laboratorio de micorrizas por su apoyo.
- ❖ A la Dr. **Magda** por su amistad en estos años.
- ❖ Al Dr. **Javier López Upton**, por permitirme trabajar en los invernaderos del programa forestal.



"La meta final de la verdadera educación es no sólo hacer que la gente haga lo que es correcto, sino que disfrute haciéndolo; no sólo formar personas trabajadoras, sino personas que amen el trabajo; no sólo individuos con conocimientos, sino con amor al conocimiento; no sólo seres puros, sino con amor a la pureza; no sólo personas justas, sino con hambre y sed de justicia."

John Ruskin

**COINOCULACIÓN CON UN HONGO COMESTIBLE ECTOMICORRÍZICO Y
BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y SU EFECTO
EN LA ECOFISIOLOGÍA DE *Pinus montezumae* Lamb.**

Barragán Soriano José Luis

Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo 2016

RESUMEN

La ectomicorriza y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), resultan fundamentales en los ecosistemas forestales al mejorar la calidad fisiológica de los árboles asociados. Se estudió el efecto de la inoculación con el hongo ectomicorrízico comestible *Hebeloma mesophaeum* (*Hm*) solo o coinoculado con las bacterias *Cohnella* sp. (*C*) o *Azospirillum brasilense* (*Ab*) en la calidad ecofisiológica de *Pinus montezumae* Lamb. Se evaluó el crecimiento, fotosíntesis, transpiración, contenido de clorofilas y carotenos, unidades SPAD, colonización de raíz y contenido vegetal de N, P y K. Se observó un incremento en el crecimiento, fotosíntesis y contenido nutrimental de plantas inoculadas con el hongo solo o coinoculado con las BPCV. En contraste no existieron diferencias cuando se inoculó exclusivamente con las bacterias. La transpiración se incrementó solo en los tratamientos con *Hm* y *Hm+C*. La inoculación con *Hm* incrementó la concentración de clorofila a, y la coinoculación con *Hm+C* incrementó la concentración de clorofila a, b, total y carotenos. Los porcentajes de colonización en plantas inoculadas fueron siempre superiores a 68%. Existió un sinergismo en plantas inoculadas con *Hm+Ab* en el contenido de N aéreo y total, en comparación con plantas inoculadas con *Hm* o *Ab* exclusivamente. Se demuestra por primera ocasión el potencial biotecnológico de la coinoculación

con *Hm*, *C* y *Ab* en la producción de plantas de *Pinus montezumae* Lamb., el cual, por su gran importancia forestal en México es usado ampliamente en programas de reforestación o restauración.

Palabras clave: Micorriza, tasa fotosintética, clorofila, biotecnología forestal, mitigación cambio climático.

**COINOCULATION OF ECTOMYCORRHIZAL EDIBLE MUSHROOM WITH
BACTERIA AND PROMOTING PLANT GROWTH AND ITS EFFECT ON
ECOPHYSIOLOGY *Pinus montezumae* Lamb.**

Barragán Soriano José Luis
Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo 2016

ABSTRACT

The ectomycorrhiza and the plant growth promoting bacteria (PGPB) are fundamental in the functioning of forest ecosystems by improving the physiological quality of the associated trees. In this work the effect of the inoculation with the edible ectomycorrhizal mushroom *Hebeloma mesophaeum* (*Hm*) alone or coinoculated with the PGPB *Cohnella* sp. (*C*) or *Azospirillum brasilense* (*Ab*) on the ecophysiological quality of plants of *Pinus montezumae* Lamb was studied. Growth, photosynthesis, transpiration, chlorophyll and carotene contents, SPAD units, root colonization and plant contents of N, P and K were evaluated. Increases in terms of growth, photosynthesis and nutrient content of inoculated plants with the edible ectomycorrhizal mushroom alone or coinoculated with PGPB was recorded. In contrast, there were no differences when the PGPB were inoculated alone. Increased shoot respiration was observed only in the treatments inoculated with *Hm* and *Hm + C*. Inoculation with *Hm* increased the concentration of chlorophyll a, while the co-inoculation with *Hm + C* increased the concentration of chlorophyll a, b, total and carotenes. Colonization percentages in inoculated plants were always above 68%. There was a synergism in plants inoculated with *Hm + Ab* in terms of shoot and total N content compared to plants inoculated exclusively either with *Hm* or *Ab*. The

biotechnological potential of co-inoculation with *Hm*, *C* and *Ab* in the production of plants of *Pinus montezumae* Lamb, which has a great importance in reforestation and soil restoration programs in Mexico, is demonstrated for the first time.

Key words: mycorrhiza, photosynthetic rate, chlorophyll, forest biotechnology, climate change mitigation.

CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	8
1.1.1 LITERATURA CITADA	12
CAPÍTULO II	15
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	15
2.1 Objetivo General	15
2.1.1 Objetivos Particulares	15
2.2 Hipótesis particulares	16
CAPITULO III	17
REVISIÓN DE LITERATURA	17
3.1 Importancia de los bosques	17
3.2 Descripción del género <i>Pinus</i>	18
3.2.1 Importancia ecológica del género <i>Pinus</i>	19
3.3 Deforestación en México	19
3.3.1 La reforestación en México	20
3.4 Clasificación de la calidad de planta	20
3.5 Descripción general de <i>Pinus montezumae</i> Lamb.	21
3.5.1 Distribución de <i>Pinus montezumae</i> Lamb	23
3.5.2 Interacción de <i>Pinus montezumae</i> y hongos ectomicorrízicos	24
3.6 Definición de micorriza	24
3.7 Ectomicorriza	26
3.7.1 Estructura de la ectomicorriza	26
3.7.2 Beneficios de la simbiosis ectomicorrízica	27
3.7.3 Efectos de la ectomicorriza en la fisiología de las plantas	27

3.7.4 Interacción de los hongos ectomicorrízicos-plantas	27
3.7.5 Descripción del género <i>Hebeloma</i>	28
3.7.6 Interacciones de los hongos ectomicorrízicos con bacterias y plantas	30
3.8 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	30
3.8.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	31
3.8.2 Modo de acción de las BPCV	31
3.8.3 Beneficios de la interacción Planta-BPCV	32
3.8.4 Interacción BPCV con hongos ectomicorrízicos	32
3.9 Generalidades del género <i>Azospirillum</i>	33
3.9.1 <i>Azospirillum</i> y hongos ectomicorrízicos	34
3.10 <i>Cohnella</i> sp.	34
CAPITULO IV	35
4.1 INTRODUCCIÓN	35
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.2.1 Preparación del sustrato e inoculación	37
4.2.2 Cultivo de cepas bacterianas	38
4.2.3 Diámetro y peso seco	38
4.2.4 Tasa de asimilación de CO ₂	39
4.2.5 Contenido de clorofila	39
4.2.6 Transpiración	40
4.2.7 Análisis nutrimental y evaluación de unidades SPAD	40
4.2.8 Porcentaje de colonización	41
4.2.9 Diseño experimental	41
4.2.10 Dispositivo experimental	42
RESULTADOS	45
4.3 Biomasa seca de parte aérea, radical y total	45
4.3.1 Diámetro del tallo	47
4.3.3 Transpiración	48
4.3.4 Contenido de clorofilas a, b, clorofilas totales y carotenos	52

4.3.5 Unidades SPAD	52
4.3.6 Contenido de N, P y K	54
4.3.7 Porcentaje de colonización	56
4.4 DISCUSIÓN	58
4.4.1 Biomasa seca de parte aérea, radical, total y diámetro del tallo	58
4.4.2 Tasa fotosintética	59
4.4.3 Transpiración	60
4.4.5 Contenido de clorofilas a, b, clorofilas totales y carotenos	60
4.4.6 Porcentaje de colonización	61
4.4.7 Contenido de N, P y K	62
4.5 CONCLUSIONES	63

LISTA DE CUADROS

- CUADRO 1.** PESO SECO DE PARTE RADICAL, AÉREA Y TOTAL DE PLANTAS DE *PINUS MONTEZUMAE* INOCULADAS, O NO, CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y DOS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL, SOLAS O COMBINADAS, A LOS 420 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA..... **46**
- CUADRO 2.** TASA FOTOSINTÉTICA POR PLANTAS DE *PINUS MONTEZUMAE* INOCULADAS, O NO, CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y DOS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL, SOLAS O COMBINADAS DURANTE, 360 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA..... **49**
- CUADRO 3.** TRANSPIRACIÓN (EN GRAMOS DE AGUA) DE PLANTAS DE *PINUS MONTEZUMAE* INOCULADAS, O NO, CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y DOS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL, SOLAS O COMBINADAS DURANTE, 420 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA..... **50**
- CUADRO 4.** CONTENIDO DE CLOROFILAS A, B, TOTALES Y CAROTENOS DE PLANTAS DE *PINUS MONTEZUMAE* INOCULADAS, O NO, CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y DOS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL, SOLAS O COMBINADAS, 480 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA..... **51**
- CUADRO 5.** CUADRO 5. DINÁMICA DE UNIDADES SPAD DE PLANTAS INOCULADAS, O NO, CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y DOS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL, SOLAS O COMBINADAS DURANTE, 420 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA..... **53**
- CUADRO 6.** CONTENIDO DE N, P Y K EN PLANTAS DE *PINUS MONTEZUMAE* INOCULADAS, O NO, CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE

Y DOS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL, SOLAS
O COMBINADAS, 420 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA..... **55**

CUADRO 7. PORCENTAJE DE RAÍCES VIVAS Y MUERTAS DE PLANTAS DE
PINUS MONTEZUMAE INOCULADAS, O NO, CON HONGO
ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y DOS BACTERIAS PROMOTORAS DEL
CRECIMIENTO VEGETAL, SOLAS O COMBINADAS, 421 DÍAS DESPUÉS
DE LA SIEMBRA. **56**

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** *PINUS MONTEZUMAE* LAMB. (WWW.CANADAPLANTS.CA)..... **22**
- FIGURA 2.** DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *PINUS MONTEZUMAE* LAMB. EN MÉXICO Y GUATEMALA. (HTTPS://EN.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/PINUS_MONTEZUMAE)..... **23**
- FIGURA 3.** TIPOS DE MICORRIZA, ARBUTOIDE MONOTROPOIDE, ECTOMICORRIZA, ERICOIDE, ORQUIDEOIDE Y ARBUSCULAR. (CAMARGO-RICALDE ET AL., 2012)..... **25**
- FIGURA 4.** *HEBELOMA MESOPHAEUM* EN CAMPO. (HTTP://WWW.FUNGHIITALIANI.IT/)..... **29**
- FIGURA 5.** A) PUESTO DE HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES EN TIANGUIS DE OZUMBA, ESTADO DE MÉXICO; B), C), D) SELECCIÓN DE GRUPOS DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS COMESTIBLES Y PROCESO DE DESHIDRATACIÓN, E) Y F) PROTOTIPO PARA EL AISLAMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS..... **43**
- FIGURA 6.** A) EVALUACIÓN DEL DIÁMETRO DEL CUELLO DEL TALLO; B), C) PREPARACIÓN PARA LA EVALUACIÓN DE TRANSPIRACIÓN; E) CÁMARA DE ASIMILACIÓN DE GASES; E) ANALIZADOR DE GASES INFRA-ROJO (IRGA). **44**
- FIGURA 7.** DIÁMETRO DEL TALLO DE PLANTAS DE *PINUS MONTEZUMAE* INOCULADAS, O NO, CON UN HONGO ECTOMICORRÍZICO COMESTIBLE Y DOS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL SOLAS O COMBINADAS. PSI= PLANTAS SIN INOCULAR; HM=*HEBELOMA MESOPHAEUM*; C=*COHNELLA* SP.; AB=*AZOSPIRILLUM BRASILENSE*. LOS VALORES DE LAS BARRAS REPRESENTAN PROMEDIOS ± ERROR

ESTÁNDAR DE LA MEDIA N=7. VALORES CON LA MISMA LETRA PARA CADA FECHA SON IGUALES SEGÚN TUKEY. 47

FIGURA 8. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ECTOMICORRIZAS DE *HEBELOMA MESOPHAEUM* (HM). A) VISTA GENERAL DE MORFOTIPOS DE HM MOSTRANDO EL ABUNDANTE MICELIO EXTERNO DE COLOR BLANQUECINO A CREMA; B) MORFOTIPO DE HM CON *AZOPHILLUM BRASILENSE* MOSTRANDO EL MICELIO EXTERNO QUE CUBRE LA TOTALIDAD DE LA ECTOMICORRIZA; C) MORFOTIPO DE HM+AB, DE LA CUAL SE LE HA RETIRADO EL MICELIO EXTERNO; D) CORTE TRANSVERSAL, RH) RED DE HARTIG, M) MANTO ME) MICELIO EXTERNO. 57

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Los bosques son los ecosistemas terrestres más extensos del planeta, ocupan el 30% de la superficie emergida, a esta importancia espacial se le añade su enorme valor en términos de biodiversidad (Ruiz *et al.*, 2007). Se encuentran en todas partes del planeta desde las regiones tropicales, subtropicales, mediterráneas, templadas y boreales, representan en gran parte todas las ecorregiones terrestres (Barbut, 2012).

Se estima que albergan al menos el 75% de las especies continentales, desempeñan funciones ambientales de gran importancia a distintas escalas desde la local a la global (Ruiz *et al.*, 2007). Son los almacenes más importantes del mundo, responsables de la mayor parte de los flujos de carbono entre la tierra y la atmósfera a través de la fotosíntesis y la respiración (Rodríguez *et al.*, 2006).

Los suelos de los bosques son ecosistemas complejos y se conoce que los microorganismos de sus suelos tienen efectos significativos en la diversidad y productividad de las plantas (Mahmoud, 2012; Kurth *et al.*, 2013). La microbiota del suelo juega un papel fundamental en la regulación de los ecosistemas terrestres influyendo en la productividad, diversidad y estructura de las comunidades vegetales, mediante la adquisición de nitrógeno, el ciclo del carbono y la formación de suelo, entre otros (Marcel *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2011). Las interacciones y asociaciones que se establecen entre ellos y el mismo suelo es colosal (Reyes, 2002).

La mayoría de los árboles forma una gama de asociaciones mutualistas con microorganismos del suelo forestal (Zhengzhong *et al.*, 2010). Una de las relaciones más importantes entre las plantas y los microorganismos es la micorriza (Pérez-Moreno y Read, 2004).

La micorriza es una simbiosis mutualista entre las raíces de las plantas y algunos hongos del suelo. Entre las más importantes destacan las ectomicorrizas, cuya característica principal es el crecimiento del hongo ectomicorrízico, sobre la superficie de las raíces secundarias formando tres estructuras características, red de Hartig, manto y micelio externo (Amora-Lazcano *et al.*, 2006). Se estima que más de 6000 taxones de hongos están involucrados en la formación de la ectomicorriza y una amplia diversidad funcional que corresponde a este elevado número de micobiontes (Herrmann *et al.*, 2004). La micorriza es un componente importante de la circulación de nutrientes en el sistema ecológico natural, juega un papel clave en la absorción de nutrientes y agua del suelo, reducción de toxicidad de metales pesados y otros contaminantes, incrementa la resistencia a patógenos y mejora el crecimiento de las plantas (Carrera-Nieva y López-Ríos, 2004; Lei *et al.*, 2009). En los bosques templados y boreales más del 90% de las raíces finas de los árboles se encuentran colonizadas por hongos ectomicorrízicos (Aspray *et al.*, 2006).

El área del suelo que rodea las raíces micorrizadas se denomina micorrizosfera, representa una zona química-biológica distinta del suelo. En consecuencia, la comunidad microbiana es diferente a la encontrada en el suelo e incluye a los microorganismos que interactúan de manera positiva y negativa con los hongos y

las plantas simbiotas (Aspray *et al.*, 2006). En las últimas décadas se ha descubierto que existen cepas bacterianas que habitan en la micorrizosfera, las cuales estimulan la formación de las micorrizas y el crecimiento de las plantas (Zhao *et al.*, 2014). Por esta razón hoy en día existe un creciente interés en el uso de bacterias benéficas como inoculantes para semillas de árboles de vivero, esto debido a las repetidas demostraciones de la estimulación del crecimiento de las plantas agrícolas y hortícolas, estas bacterias son conocidas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Domenech *et al.*, 2004).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se caracterizan por estimular el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas tales como, auxinas, citoquininas y giberilinas. Otros mecanismos responsables de la estimulación del crecimiento han sido vinculados a la mejora de la absorción del agua y nutrientes principalmente en la fijación del N (Dominguez-Nuñez *et al.*, 2012).

Por otro lado la historia de la humanidad esta entrelazada con la utilización de los diversos bosques del planeta y sus múltiples productos. Ya que estos han sido fuente de materia prima para la construcción, el transporte y la comunicación, fuente de alimentos y de combustible para cocinarlos (FAO, 2012).

México es un país que posee una superficie de dos millones de kilómetros cuadrados y una población de un poco más de cien millones de habitantes. Cuenta con una gran riqueza de recursos naturales y diversidad biológica que lo

posicionan entre los países con mayor biodiversidad y riqueza biológica a nivel mundial (Céspedes y Moreno 2010).

Los bosques templados de México están dominados por géneros de angiospermas y gimnospermas formadores de ectomicorriza, principalmente por el género *Pinus*, que está representado casi por el 50% de la diversidad mundial (Garibay-Orijel *et al.*, 2013).

Sin embargo nuestro país como todo el planeta atraviesa de manera constante la problemática de la deforestación, tan solo del 2005 al 2010 se perdieron 775 mil hectáreas de bosques y selvas a lo largo del territorio nacional de acuerdo a la Evaluación de los Recursos Forestales mundiales (FRA) (CONAFOT 2013). Por lo que se están buscando nuevas alternativas para mejorar la fisiología, crecimiento y nutrición de las plantas en invernadero que serán utilizadas para las reforestaciones. Como se había mencionado anteriormente las especies forestales dependen de la simbiosis que realizan con los hongos ectomicorrízicos para su crecimiento óptimo (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010).

En la actualidad se están utilizando microorganismos para ayudar a las reforestaciones en suelos degradados, en donde se ha observado un potencial considerable de los beneficios de la inoculación de hongos ectomicorrízicos comestibles y bacterias (Sousa *et al.*, 2015). Sin embargo es poca la información que existe sobre este tipo de inoculación y su efecto en la fisiología, nutrición y crecimiento de las plantas en invernadero.

Bajo este contexto el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la inoculación sola o combinada de un hongo ectomicorrizico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la fisiología, crecimiento y nutrición de *Pinus montezumae* Lamb.

1.1.1 LITERATURA CITADA

Amora -Lazcano, E. Carreon-Abud, Y. Martínez, T. M. 2006. Las ectomicorrizas y su uso como inoculantes. *Ciencia Nicolatina* 44: 75-92.

Aspray, T. J. Jones, E. E. Whipps, J. M. Bending, G. D. 2006. Importance of mycorrhization helper bacteria cell density and metabolite localization for the *Pinus sylvestris* *Lactarius rufus* symbiosis. *FEMS Microbiol Ecology*. 56: 25-33.

Barbut, M. 2012. Un nuevo clima para los bosques intervención de la FMAM en favor de la ordenación forestal sostenible. Fondo para el medio ambiente mundial invertir en nuestro planeta. 1-32 pp.

Carrasco-Hernández, V. Pérez-Moreno, J. Espinoza-Hernández, V. Almaraz-Suarez, J. J. Quintero-Lizaola, R. Torres-Quino, M. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(4):5667-577.

Carrera-Nieva A, López-Ríos GF. 2004. Manejo y Evaluación de Ectomicorrizas en Especies Forestales. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10(2):93-98.

Céspedes F., S. E., Moreno S., E. 2010. Estimación del valor de la pérdida de recursos forestales y su relación con la reforestación en las entidades federativas. *Investigación Ambiental*. 2(2): 5-13.

CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2013. Pierde México 155 mil ha por deforestación cada año. Boletín 39. SEMARNAT, México DF. 2 p.

- Domenech J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Lucas-García, J, A., Colón, J, J., Gutiérrez-Mañero, F, J. 2004. *Bacillus* spp. And *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. *ballota*: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management*. 194:293–303.
- Dominguez-Nuñez, J, A., Muños, D., Planelles, R., Grau, J, M., Artero, F., Anriquez, A., Albnesi, A. 2012. Inoculation with *Azospirillum brasilense* enhances the quality of mesquite *Prosopis juliflora* seedlings. (3):364-372.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2012. El estado delos bosques del mundo. 49 pp.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M., 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.
- Herrmann S, Oelmüller R, Buscot F. 2004. Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*. 161:509– 517.
- Kurth F, Zeitler K, Feldhahn L, Neu RT, Weber T, Krištůfek V, Wubet T, Herrmann S, Buscot F, Tarkka TM. 2013. Detection and quantification of a mycorrhization helper bacterium and a mycorrhizal fungus in plant-soil microcosms at different levels of complexity. *BMC Microbiology*. 13:2-10.
- Marcel, G. A. Bardgett, R. D. Straalan, N. M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystem. *Ecology Letters*. 11: 296-310.
- Pérez, C. A. Rojas, S. J. Montes V. D. 2011. Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para sostenibilidad de los

- agrocistemas de praderas en el caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 2: 367-385.
- Pérez-Moreno, J. Read, D. J. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29: 239-247.
- Reyes, J. I. 2002. Asociaciones biológicas en el suelo: La micorriza arbuscular. *Contactos*. 44: 5-10.
- Rodríguez L. R., Jiménez P. J., Aguirre C. O.A., Treviño G. E. 2006. Estimación del carbono almacenado en un bosque de niebla en Tamaulipas, México. *Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León*. 9(2): 179- 188.
- Ruiz M. C., García C. F., Sayer J. A., 2007. Los servicios ambientales de los bosques. *Ecosistemas*. 16(3): 81-90.
- Sousa RN, Franco RA, Ramos AM, Oliveira SR, Castro LMP. 2015. The response of *Betula pubescens* to inoculation with an ectomycorrhizal fungus and a plant growth promoting bacterium is substrate-dependent. *Ecological Engineering*. 81:439–443
- Zhao L, Wu XQ, Jian-Ren Y, Li H, Gui-E L. 2014. Isolation and characterization of a mycorrhiza helper bacterium from rhizosphere soils of poplar stands. *Biol Fertil Soils*. 50:593–601.
- Zhengzhong, J. Jiaqian, L. Xinwen, X. Shengyu, L. Jinglong, F. Sifeng, Z. 2010. Characteristics of the soil microbial population in forest land irrigated with saline water in the desert area. *Journal of arid land*. 2: 107-115.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

Determinar la influencia de la inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, en la nutrición, crecimiento y estado fisiológico de *Pinus montezumae* Lamb. establecidos en invernadero.

2.1.1 Objetivos Particulares

- ❖ Evaluar el efecto de la inoculación sola o combinada de *Hebeloma mesophaeum* y las bacterias *Cohnella* sp. y *Azospirillum brasilense* en la micorrización, el crecimiento y contenido nutrimental (N, P y K) de *Pinus montezumae* Lamb.
- ❖ Determinar el efecto de la inoculación sola o combinada de *Hebeloma mesophaeum* y las bacterias *Cohnella* sp. y *Azospirillum brasilense* en las variables fisiológicas: tasa fotosintética, transpiración, concentración de clorofilas a, b, clorofilas totales y unidades SPAD.

2.2 Hipótesis particulares

1. La coinoculación con el hongo ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal *Cohnella* sp. y *Azospirillum brasilense* estimula la micorrización, el crecimiento y la absorción de nutrientes.
2. Las variables fisiológicas tasa fotosintética, transpiración, concentración de clorofilas a, b, clorofilas totales y unidades SPAD son afectadas de forma positiva al coinocular el hongo ectomicorrízico comestible *Hebeloma mesophaeum* y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

CAPITULO III

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Importancia de los bosques

A lo largo de la historia los bosques han sido uno de los recursos naturales fundamentales para la vida del hombre (Velázquez *et al.*, 2002). Los servicios que proporcionan los bosques a menudo los denominados servicios de ecosistemas, como por ejemplo regulación del agua, control de inundaciones, almacenamiento de carbono y disminución de la erosión del suelo, no se valoran, a pesar de ser muy importantes para la humanidad (Barbut, 2012).

En México los bosques templados están dominados por géneros de angiospermas y gimnospermas formadores de ectomicorriza, principalmente por el género *Pinus*, el cual está representado casi por el 50% de la diversidad mundial (Garibay-Orijel *et al.*, 2013). Las gimnospermas comprenden alrededor de 900 especies, la mayoría localizadas en el hemisferio norte, que comprenden alrededor del 60% son coníferas. El registro fósil muestra que los ancestros de la familia *pinaceae* evolucionaron a finales del Carbonífero, hace aproximadamente 300 millones de años y comenzó su diversificación en el Cretácico inferior (Sánchez, 2008).

La riqueza aproximada de especies de pinos a nivel mundial es de 111 especies. En México y América central se localizan alrededor de 46 especies de pinos con diversas variedades y formas (Sánchez, 2008). Los pinos se encuentran representados por 4 familias: *Pinaceae* (4 géneros y 61 especies), *Cupressaceae*

(4 géneros y 29 especies), *Podocarpaceae* (1 género y 3 especies) y *Taxaceae* (1 especie). De las 111 especies de coníferas mexicanas, 43 son endémicas del país, de éstas 18 tienen un rango de distribución limitado a 3 o menos estados (Gernandt y Pérez, 2014).

3.2 Descripción del género *Pinus*

El género *Pinus* está representado por árboles o arbustos dioicos o monoicos con la corteza rugosa o lisa, en placas grandes y gruesas con fisuras o en tiras largas y delgadas. Se caracteriza por presentar hojas simples, generalmente angostas a veces muy pequeñas pero vascularizadas. Presentan un tallo que consta de un sistema secundario vascularizado prominente. El xilema secundario forma la madera y consiste de traqueidas y a veces tiene conductos de resina (Gernandt y Pérez, 2014).

Todas las coníferas presentan dos tipos de conos o estróbilos: el masculino (donde se produce el polen), es más pequeño y se denomina microestróbilo o conillo y el femenino megaestróbilo, donde se produce la semilla, ésta como en todas las gimnospermas se encuentra desnuda, es decir, no incluida dentro de un carpelo como en las angiospermas. De ahí que, a pesar de su uso generalizado, es incorrecto usar el término “fruto” para denominar al cono femenino. Esta estructura es uno de los atributos morfológicos más útiles para la diagnosis de géneros y especies de coníferas (Castillo *et al.*, 2004).

La distribución geográfica de las especies está determinada por el clima, que influye en el establecimiento de y el desarrollo de los individuos, lo que induce

en los patrones de estructura y productividad de la vegetación en la composición y biología de los seres vivos (Pérez *et al.*, 2014).

3.2.1 Importancia ecológica del género *Pinus*

Desde el punto de vista ecológico los pinos son importantes, ya que, son el elemento dominante, en varios tipos de vegetación incluidos los bosques templados y subtropicales de zonas húmedas, subhúmedas y áridas. Por lo que se consideran importantes prestadores de servicios ambientales como captación de humedad atmosférica, fijación de carbono y retención de suelo. También, guardan estrechas relaciones con hongos basidiomicetos ectomicorrízicos, plantas epífitas, insectos, aves y mamíferos. Además, son de gran importancia económica, principalmente por su madera, porque algunas tienen usos medicinales (Castillo *et al.*, 2004).

3.3 Deforestación en México

México es un país que posee una superficie de dos millones de kilómetros cuadrados y una población de poco más de cien millones de habitantes. Aunque cuenta con una gran riqueza de recursos naturales y diversidad biológica, que lo posiciona entre los países con mayor biodiversidad y riqueza ecológica a nivel mundial, sufre de graves problemas ambientales, tales como la sobre explotación y contaminación de acuíferos y como el de mayor relevancia, la deforestación (Céspedes y Moreno, 2010).

La deforestación es una problemática que ha enfrentado de manera constante nuestro país. Tan sólo del 2005 al 2010 se perdieron 775 mil hectáreas de

bosques y selvas a lo largo del territorio nacional, de acuerdo a la Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales (CONAFOR, 2013).

3.3.1 La reforestación en México

Debido a las altas tasas de deforestación, la reforestación es una actividad forestal de las más importantes (Sáenz *et al.*, 2010). Esta actividad ha cambiado en los últimos años entre otras cosas por un mayor énfasis hacia la restauración de los ecosistemas forestales con auge significativo en actividades de reforestación para diversos fines (Orozco *et al.*, 2010).

El éxito de la reforestación depende principalmente de la calidad de la planta que se produce en los viveros, la cual puede asegurar una mayor probabilidad de sobrevivir y desarrollarse a partir de su establecimiento en el lugar definitivo (Sáenz *et al.* 2013). A nivel nacional, la supervivencia de plantas trasplantadas de invernadero a campo es muy variable y puede ser tan baja como 10 % (CONAFOR, 2009; Orozco *et al.*, 2010).

La calidad de la planta forestal es el conjunto de características físicas y fisiológicas necesarias para que sobrevivan y se desarrollen en cualquier ambiente (Cetina-Alcalá *et al.*, 2001).

3.4 Clasificación de la calidad de planta

La clasificación de la calidad de planta se realiza con base en variables morfológicas y fisiológicas; entre las primeras se incluye la altura, el diámetro basal del tallo o del collar, tamaño, forma y volumen del sistema radical así como la relación altura/diámetro del collar, la relación tallo/raíz, la presencia de yema

terminal y micorrizas, el color del follaje y la sanidad, el peso seco de los tallos el follaje y la raíz. En los atributos fisiológicos se considera: resistencia al frío, días para que la yema principal inicie su crecimiento, índice de mitosis, potencial hídrico, contenido nutricional y de carbohidratos, tolerancia a la sequía, fotosíntesis neta, micorrización y capacidad de emisión de nuevas raíces (Sáenz *et al.*, 2014).

Diversas especies de *Pinus* se usan tradicionalmente en programas de reforestación; sin embargo, su establecimiento ha fallado porque en este proceso y durante su crecimiento son dependientes de la ectomicorriza, la cual no se incorpora tradicionalmente en los viveros en México.

3.5 Descripción general de *Pinus montezumae* Lamb.

Es una especie de aprovechamiento maderable sobretodo en el Eje Neovolcánico. Se utiliza para la obtención de chapa, celulosa, papel durmientes, postes muebles duelas y resinas, así como en la reforestación en suelos degradados (Figura 1) (Zamora *et al.*, 2007). Es una de las especies más utilizadas para reforestación y restauración forestal en México (Hernández *et al.*, 2014).

Es un árbol de 25 a 30 m con un diámetro normal de 50 a 80 cm. Las ramas son largas y más horizontales y tienen una densa copa piramidal, crece sobre los 1300 a 3200 msnm en una zona templada fría (Reverchon *et al.*, 2012).

El crecimiento inicial de las especie se caracteriza por una nula elongación del epicotilo y una abundante producción de hojas primarias y secundarias (estado

cespitoso) durante un periodo que puede durar de 2 a 6 años (Calderón *et al.*, 2006).



Figura 1. *Pinus montezumae* Lamb.
(www.canadaplants.ca).

3.5.1 Distribución de *Pinus montezumae* Lamb.

Pinus montezumae presenta amplia distribución natural en la república mexicana desde Chiapas hasta Nuevo León, Coahuila y Durango (Figura 2) (Jiménez *et al.*, 1998).



Figura 2. Distribución geográfica de *Pinus montezumae* Lamb. en México y Guatemala. (https://en.wikipedia.org/wiki/Pinus_montezumae)

3.5.2 Interacción de *Pinus montezumae* y hongos ectomicorrízicos

La historia evolutiva de las plantas vasculares indica una estrecha asociación simbiótica con los microorganismos del suelo (Pimienta *et al.*, 2009).

Los pinos son simbioses obligados con las ectomicorrizas y dependen de su asociación con hongos ectomicorrízicos para ser capaces de sobrevivir y establecerse con éxito (Pérez-Moreno y Read, 2004). En trabajos anteriores se han realizado muestreos de esporomas donde se identificaron varios géneros de hongos asociados con *Pinus montezumae* entre los que se encuentran: *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Hygrophorus*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Russula*, *Suillus* y *Tricholoma* (Reverchon *et al.*, 2012).

3.6 Definición de micorriza

El vocablo micorriza fue acuñado en 1885, por Anton B. Frank (1885) (Pérez, 2012). El término, proviene de las raíces griegas *myces*, que significa hongo y *rhiza*, raíz, es representada entre algunos hongos (micobionte) y las raíces de las plantas (fitobionte) (Camargo-Ricalde, 2012).

De acuerdo con la forma de penetrar el hongo en la raíz y por las estructuras que desarrollan las especies de hongos y de plantas involucradas, las micorrizas se han agrupado en micorrizas con manto fúngico y micorrizas sin manto fúngico (Figura 8, a), b), c) y d)). Las micorrizas con manto fúngico a su vez se han clasificado en: a) Ectomicorrizas, b) Micorriza arbutoide y c) Micorriza monotropoide. Por su parte las micorrizas sin manto fúngico se han clasificado

en: (a) Micorriza arbuscular, (b) Micorriza ericoide, (c) Micorriza orquideoide (Figura 3) (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

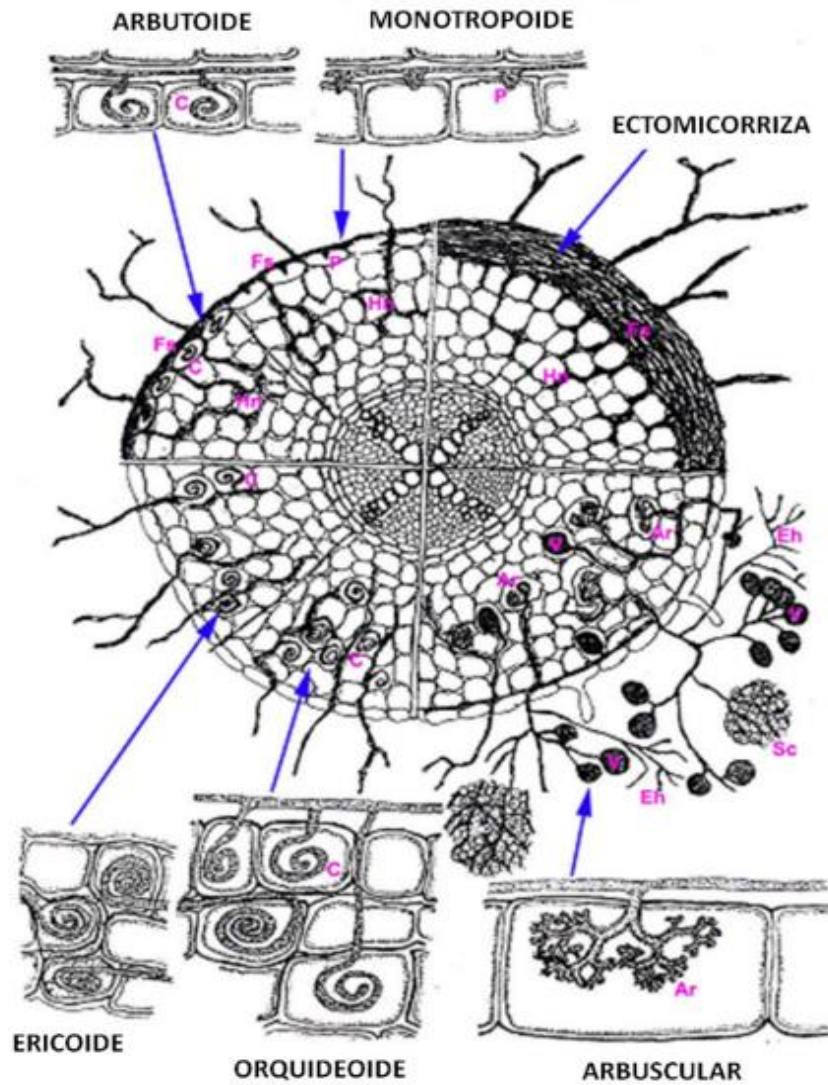


Figura 3. Tipos de micorriza, arbutoide monotropoide, ectomicorriza, ericoide, orquideoide y arbuscular. (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012)

3.7 Ectomicorriza

La ectomicorriza es una simbiosis que se establece entre alrededor de 2000 especies de plantas y 6000 especies de hongos. Dicha simbiosis resulta fundamental en la estructura y funcionamiento de ecosistemas boreales, templados y algunos tropicales (Méndez *et al.*, 2011).

La simbiosis ectomicorrízica se caracteriza por raíces que se encuentran colonizadas por hongos de los grupos Basidiomicetes y Ascomicetes, característicos de zonas boreales, de clima templado, en el mediterráneo y bosques subtropicales, donde se encuentran colonizando las especies arbóreas dominantes, por ejemplo roble, pino, álamo, abedul, eucalipto, etc. (Sebastiana *et al.*, 2013).

3.7.1 Estructura de la ectomicorriza

La ectomicorriza está constituida por un sistema micelial unido a las raíces colonizadas las cuales se caracterizan por la presencia de tres componentes estructurales: **el manto**, está constituido por hifas septadas que envuelven las raíces formando un pseudotejido; hifas laberintiformes, que crecen entre las células corticales de la raíz y que forman la llamada **red de Hartig**, el cual es el sitio de intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo. Externamente, el manto está conectado al esporocarpo del hongo con una extensa red de **hifas emanantes** que exploran el suelo para absorber agua y nutrientes, que son transportados a la raíz micorrizada o bien pueden almacenarse en el manto y

quedar disponibles cuando la planta los requiera (Figura 8, a), b), c) y d)) (Amora-Lazcano *et al.*, 2006).

3.7.2 Beneficios de la simbiosis ectomicorrízica

La simbiosis ectomicorrízica en particular mejora la absorción de nutrimentos inorgánicos, permiten el uso de nutrimentos orgánicos y pueden proteger a la planta de altas concentraciones de metales pesados y de patógenos. Los hongos obtienen azúcares simples que llegan a constituir hasta el 30 % de la productividad primaria neta en el caso de plántulas (Garibay-Origel *et al.*, 2013).

3.7.3 Efectos de la ectomicorriza en la fisiología de las plantas

Además de los efectos de los hongos ectomicorrízicos en el desarrollo de las plantas, también es conocido que estimulan la fotoasimilación y protegen a las plantas contra el estrés (Herrmann *et al.*, 2004). La inoculación, puede mejorar el estado fisiológico mediante la mejora de su capacidad fotosintética y por el aumento de la absorción de agua y nutrientes y la acumulación de éstos en los tejidos de plántulas (Duñabeitia *et al.*, 2004)

3.7.4 Interacción de los hongos ectomicorrízicos-plantas

Las ectomicorrizas hasta la fecha han sido descritas interactuando en 140 géneros de árboles. Algunas especies de las familias *Pinaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae*, y *Dipterocarpaceae* son totalmente dependientes de la simbiosis para su establecimiento, crecimiento y supervivencia, la interacción no es específica (Buscardo *et al.*, 2009).

En México la ectomicorriza es de enorme interés estructural y funcional, en ecosistemas templados, subtropicales y tropicales. Aunque los estudios de la simbiosis ectomicorrízica se encuentran en su infancia, el país es un importante reservorio de géneros de árboles de enorme importancia forestal, como los pinos y los 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, 2012).

3.7.5 Descripción del género *Hebeloma*

El género *Hebeloma* (*Cortinariaceae*, *Agaricales*), se distribuye en las zonas templadas de todo el mundo. Las especies de *Hebeloma* forman ectomicorrizas y pocas especies son capaces de descomponer desechos animales. Muchas de sus especies están asociadas con un número de especies de árboles, y algunas son pioneras, entre los primeros hongos ectomicorrícicos que aparecen durante la sucesión (Aanen *et al.*, 2000).

Hebeloma ha sido reconocido como un grupo, desde que Fries, (1821) describieron como una tribu de *Hebeloma* a nivel de género, donde ha permanecido desde entonces, con *H. fastibile* como especie tipo, sin embargo, la identidad es discutible, otros autores reconocen tres subgéneros dentro *Hebeloma*: *Porphyrospora*, *Myxocybe*, *Hebeloma* y dos secciones dentro del subgénero *Hebeloma*: *Hebeloma* (especies con una cortina persistente)(Boyle *et al.*, 2006).



Figura 4. *Hebeloma mesophaeum* en campo. (<http://www.funghiitaliani.it/>)

El género *Hebeloma* se distribuye ampliamente, de acuerdo a varios informes este género ha sido registrado desde Europa, Australia, Asia, América del Norte y América del sur (Carrasco *et al.*, 2015).

3.7.6 Interacciones de los hongos ectomicorrízicos con bacterias y plantas

Además de hongos micorrízicos, la salud y crecimiento de las plantas se mejora por la interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Los más conocidos grupos de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas son aquellas que existen en vida libre, en la superficie de la raíz o como endófitos dentro de los tejidos de la raíz (Pohjanen *et al.*, 2104). Los hongos y las bacterias han coexistido en la profundidad y hasta la superficie de la tierra, la aparición de los hongos en los ecosistemas terrestres ha tenido un fuerte impacto en la evolución de las bacterias (Bravo *et al.*, 2013).

3.8 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

El suelo es un microcosmos en el cual interactúan diversos microorganismos con las raíces de las plantas (Huauya, 2001). Los microorganismos son, factores importantes, en los procesos funcionales como, la descomposición de la materia orgánica, rotación y liberación de nutrientes, particularmente, nitrógeno (N) y fosforo (P), para su posterior captura por la planta (Zhang *et al.*, 2014). Se considera la actividad microbiana como parámetro principal en el funcionamiento correcto de un ecosistema (Tsimilli *et al.*, 2000).

El desarrollo y crecimiento de las plantas está fuertemente influenciado por factores bióticos y abióticos (Chamam *et al.*, 2013). Por lo que en la raíz se encuentran microorganismos que crecen en su área de influencia y simbiontes (hongos ectomicorrízicos, micorrízico-arbusculares y bacterias), que cumplen diversas funciones, como estimular el crecimiento de la raíz y de proveer

nutrientes y agua. Algunos microorganismos del suelo tienen otras funciones como atrapar y excluir iones tóxicos, influir en la fotosíntesis y actividad hidráulica de la planta y controlar patógenos (Valdez, 2011).

3.8.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Muchos microorganismos como algunas bacterias asociativas son consideradas como promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos (Loredo *et al.*, 2004).

Las BPCV pueden ser de vida libre o asociativas, aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Loredo *et al.*, 2004). Estas bacterias están asociadas a muchas de las especies de plantas que están presentes en la mayoría de los ambientes y se encuentran ampliamente representadas en diversos géneros microbianos (Rives *et al.*, 2007).

3.8.2 Modo de acción de las BPCV

Las BPCV pueden mejorar el estado nutricional de las plantas a través de 5 mecanismos (Vassey, 2003):

1. Fijación biológica del nitrógeno.
2. Aumento de la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera.
3. Inducción del crecimiento de la raíz.
4. Mejoramiento de otras simbiosis benéficas en el huésped.
5. Combinación de modos de acción (Vassey, 2003).

3.8.3 Beneficios de la interacción Planta-BPCV

Se ha demostrado que las BPCV afectan algunas características en la planta como: la tasa de germinación de semillas, crecimiento de la raíz, rendimiento, área foliar, contenido de clorofila, la absorción de nutrientes, contenido de proteínas, la actividad hidráulica, la tolerancia al estrés abiótico, control de enfermedades y retrasar la senescencia. Otros efectos benéficos de cepas BPCV incluyen la mejora de la disponibilidad de fósforo, fijación biológica del nitrógeno secuestro de hierro por producción de sideroforos, la mejora de la biosíntesis de compuestos de sabor como furanona en fresa, producción de hormonas como giberelinas, citoquininas, auxinas y la síntesis de la enzima 1-amino ciclopropano-1-carboxil desaminasa (Adesemoye y Kloepper, 2009).

Los efectos de estas bacterias en el desarrollo de las plantas son especialmente interesantes cuando se consideran como compañeros de inoculantes de hongos micorrízicos en especies que son micorrízicas obligadas. En general estas bacterias pueden asumirse como bacterias auxiliadoras de la micorrización cuando no son capaces de estimular directamente el crecimiento en ausencia de una apropiada micorrización (Domenech *et al.*, 2004).

3.8.4 Interacción BPCV con hongos ectomicorrízicos

La simbiosis entre plantas hospederas y hongos ectomicorrízicos puede ser mejorada por la asociación con bacterias que apoyan la función y formación de la micorriza. Los hongos ectomicorrízicos se asocian con bacterias y pueden promover el crecimiento de las plantas y aumentar la tolerancia a las condiciones

desfavorables, también se ha escrito que aceleran la fito-remediación (Hrynkiewicz *et al.*, 2010; Hrynkiewicz *et al.*, 2012). Las bacterias claramente mejoran el crecimiento de las plántulas incrementando el número de las raíces micorrizadas. Por otro lado, las cepas de BPCV pueden no afectar al establecimiento de la simbiosis micorrizica, pero pueden presentar efectos sinérgicos sobre el crecimiento de plantas (Domenech *et al.*, 2004)

Probanza *et al.* (2001) registraron aumento en el crecimiento de plantas de *Pinus pinea* coinoculadas con *Pisolithus tinctorius* y (*Bacillus licheniformis* CECT 5106 y *Bacillus pumilus* CECT 5105).

Diversos géneros bacterianos han sido aislados de plantas y del suelo rizosférico, dentro de los cuales se encuentran *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azotobacter* y *Bacillus* (Rives *et al.*, 2007).

3.9 Generalidades del género *Azospirillum*

El nombre de *Azospirillum* proviene de la frase Azote, que significa nitrógeno y del grupo *Spirillum* que significa pequeña espiral. Su descubrimiento data del año 1925, cuando Beijerinck describió una nueva especie de bacteria, aislada a partir de suelo holandés, a la que primeramente nombró *Azotobacter spirillum* y que posteriormente denominó *Spirillum lipoferum* (Parra y Cuevas, 2001).

Las bacterias pertenecientes a este género son organismos fijadores de nitrógeno que poseen una amplia distribución ecológica, ya que ha sido posible detectar su presencia en zonas templadas, tropicales y subtropicales. Se describen en la literatura como Gram negativas, la morfología depende de las condiciones

nutricionales y edad del cultivo, se observan como formas de “S” y vibroides de 0.8 a 1 x 2 a 5 micrómetros de tamaño; se asocia además a la aparición de formas quísticas o en C, como vía de resistencia a las condiciones de estrés y del mismo modo como mecanismo de supervivencia en la rizosfera (Parra y Cuevas, 2001). Se ha encontrado que al colonizar promueven el crecimiento y aumenta el rendimiento de numerosas especies de plantas (Holguin y Bashan, 1996).

La descripción de las diferentes especies de *azospirillum* ha incrementado exponencialmente cada año, de 1980 a 2014 más de 14 especies de *azospirillum* han sido descritas en la actualidad se encuentran descritas 19 especies; *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. doebereineriae*, *A. melinis*, *A. formosense*, *A. irakense*, *A. halopraeferens*, *A. amazonense*, *A. melinis*, *A. oryzae*, *A. zaeae*, *A. canadense*, *A. thiophilum*, *A. palatum*, *A. picis*, *A. humicireducens*, *A. fermentarium* (Dario *et al.*, 2015).

3.9.1 Azospirillum y hongos ectomicorrízicos

Tilak *et al.* (1988) aisló tres cepas de *Azospirillum* de esporocarpos de hongos ectomicorrízicos asociados con abeto Douglas: *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* y *Rhizopogon vinicolor*.

3.10 Cohnella sp.

El género *Cohnella* fue propuesto por Kampfer *et al.* (2006), quien las categorizó como bacterias Gram-positivas, son formadoras de esporas aerobias, en forma de bastón, el género *Cohnella* está compuesto por 12 especies reconocidas y aisladas de diversos entornos como el suelo y agua dulce (Jiang *et al.*, 2012).

CAPITULO IV

4.1 INTRODUCCIÓN

La deforestación es una problemática de gran relevancia en México. Tan sólo del 2005 al 2010 se perdieron 775 mil hectáreas de bosques y selvas a lo largo del territorio nacional (CONAFOR, 2013). Aunado a este problema, existe poco éxito en las reforestaciones, debido a la baja calidad de las plantas producidas en los viveros. A nivel nacional, la supervivencia de plantas trasplantadas de invernadero a campo es muy variable y puede ser tan baja como 10 % (CONAFOR, 2009; Orozco *et al.*, 2010). Diversas especies de *Pinus* se usan tradicionalmente en programas de reforestación; sin embargo, su establecimiento ha fallado porque en este proceso y durante su crecimiento son dependientes de la ectomicorriza, la cual no se incorpora tradicionalmente en la plantación de planta en México. La simbiosis ectomicorrízica se establece entre angiospermas y gimnospermas y más de 20,000 especies de hongos principalmente Basidiomicetes y Ascomicetes (Rinaldi *et al.*, 2008) y originan beneficios mutualistas y adaptativos a condiciones de estrés a los árboles asociados, mediante el mejoramiento de la fisiología de la planta micorrizada (Smith y Read, 2008; Mrnka *et al.*, 2012). Recientemente se ha demostrado que los beneficios originados por la ectomicorriza son potenciados enormemente en presencia de diversos grupos microbianos denominados auxiliadores de la micorrización principalmente bacterias (Kurth *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014).

Actualmente, la producción de inoculantes basados en hongos ectomicorrízicos ha cobrado una enorme importancia en los países con tradición forestal, sin embargo, en países como México, esta biotecnología ha recibido escasa atención, a pesar de su enorme potencial. (Martínez-Reyes *et al.*, 2012). Paradójicamente uno de los centros de distribución genética a nivel mundial de especies de importancia forestal se encuentra en el país, el cual incluye por ejemplo, 72 especies de pinos diferentes, que constituyen el primer lugar para dicho género. *Pinus montezumae* es una especie de aprovechamiento maderable principalmente en el Eje Neovolcanico, se utiliza para la obtención de chapa, celulosa, papel, durmientes, postes, muebles, duelas y resinas, así como en la reforestación en suelos degradados (Zamora-Campos *et al.*, 2007). Es una de las especies más utilizadas para reforestación y restauración forestal en México (Hernández *et al.*, 2014). Por su parte uno de los criterios de selección de hongos ectomicorrízicos principal es su comestibilidad (Zambonelli y Bonito, 2012). *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. es un hongo ectomicorrízico que tiene una gran importancia como especie comestible en diversas partes del centro de México (Pérez-Moreno *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inoculación solo o combinado de un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias auxiliaadoras de la micorrización en el crecimiento, fisiología y contenido nutrimental de *Pinus montezumae*.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Micorrizas e invernaderos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. El germoplasma utilizado de *Pinus montezumae* fue proveniente de San Rafael, municipio de Tlalmanalco, Estado de México. Las semillas fueron esterilizadas con H₂O₂ a 30 % durante 20 minutos, posteriormente se enjuago tres veces con agua destilada estéril previo a la siembra. Para la preparación del inóculo, se utilizaron esporomas provenientes de bosque de pinos del municipio de Ozumba, Estado de México. El inóculo se obtuvo a partir de púleos de *Hebeloma mesophaeum* (Hm), los cuales se cortaron de los estípites y se deshidrataron a 35 °C en un deshidratador de frutas Jersa®. Posteriormente, se molieron en un molino eléctrico, para obtener un tamaño de partícula homogéneo se pasó a través de un tamiz de 1mm de apertura. El inóculo a si obtenido se almacenó a una temperatura de 5 °C.

4.2.1 Preparación del sustrato e inoculación

El sustrato utilizado para el experimento consistió en una mezcla de arena, corteza y suelo forestal, en una proporción 2:2:1, el cual se esterilizó en tres ocasiones con vapor de agua a una presión de 1.3 kg·cm² a 125 °C durante cinco horas. Las semillas se sembraron en tubetes de plástico negro de 125 cm³ que contenían el sustrato descrito anteriormente. Cada planta se inoculó a una concentración de 10⁷ y 10⁸ esporas de *Hebeloma mesophaeum*. La concentración de dichas esporas se evaluó con un hematocitómetro. Se realizaron dos

inoculaciones con las esporas del hongo: la primera se efectuó simultáneamente con la siembra y la segunda 90 días después.

4.2.2 Cultivo de cepas bacterianas

La cepa bacteriana *Cohnella sp.* (C) fue obtenida del cepario del área de Microbiología del Colegio Postgraduados, Campus Montecillo, y la cepa *Azospirillum brasilense* (Ab) se el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las cepas fueron cultivadas en caldo nutritivo Merck®, en movimiento constante a 28 °C hasta alcanzar una concentración de 10^8 UFC mL⁻¹ (unidades formadoras de colonias por mililitro). El cultivo bacteriano se centrifugó a 7000 rpm y se eliminó el sobrenadante, al concentrado bacteriano se le dieron tres lavados con agua destilada estéril para eliminar los restos del medio de cultivo y después se resuspendió en agua destilada estéril para dejarlo a la misma concentración de 10^8 UFC/mL. Se aplicaron tres mililitros de la suspensión bacteriana a cada planta en las primeras horas del día y no se regaron en tres días para evitar la pérdida de las bacterias con el riego. El experimento se mantuvo en condiciones de invernadero durante 420 días.

4.2.3 Diámetro y peso seco

Se midió el diámetro del tallo con un vernier digital, a los 30, 120 y 420 días después de la siembra (dds) para esto se seleccionaron siete plantas al azar por tratamiento. Para la evaluación de biomasa se tomaron siete plantas al azar por

tratamiento para determinar peso seco de raíz parte aérea y total, las muestras se deshidrataron durante tres días a una temperatura de 70 °C hasta tener valores constantes, se pesó por separado la parte aérea y la parte radical.

4.2.4 Tasa de asimilación de CO₂

La asimilación de CO₂ se evaluó a 240, 300 y 360 dds en tres plantas por tratamiento, las evaluaciones fueron realizadas utilizando el analizador de gases infra-rojo (IRGA) PP-Systems® modelo Ciras-3 y la cámara de asimilación de gases CPY-4 en invernadero.

4.2.5 Contenido de clorofila

El contenido de clorofila a, b, total y carotenos, se determinó por el método de acetona Zhang (1986). Se tomaron 7 plantas por tratamiento, posteriormente se pesaron 0.05 g de acículas por pino, se cortaron en pequeños trozos, los cuales se colocaron en un mortero, se le agregaron 10 mL de acetona, se maceraron y se filtraron con papel filtro Whatman número 42. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de muy baja 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:

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

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

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

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

198

4.2.6 Transpiración

Se seleccionaron 5 plantas al azar por tratamiento, las cuales fueron regadas a capacidad de campo, se colocó una bolsa por planta hasta el tallo, las bolsas se amarraron en el tallo con la finalidad de evitar la fuga de agua, se pesó cada planta estando dentro de la bolsa. Este procedimiento se realizó antes de salir el sol, se pesaron las unidades experimentales 12 horas después de la primera evaluación de peso.

4.2.7 Análisis nutrimental y evaluación de unidades SPAD

Para la evaluación de unidades SPAD, se seleccionaron tres plantas al azar de cada tratamiento, en cada planta se eligieron tres acículas jóvenes totalmente desarrolladas, se unieron las acículas para cubrir el área del sensor del medidor de clorofila y de esta forma se tomó la lectura de contenido relativo de clorofila (unidades SPAD). Esta variable se determinó con el medidor portátil SPAD 502 plus Konica Minolta®. Los análisis de nutrimentos se realizaron en cuatro plantas de cada tratamiento; el Nitrógeno (N) se determinó por el método de semimicro-Kjeldahl (Bremner 1965); el fósforo total (P), según el método de Allen *et al.* (1997); y el Potasio (K), mediante extracción con acetato de amonio por fotometría de llama.

4.2.8 Porcentaje de colonización

Se tomaron tres plantas de cada tratamiento para la evaluación del porcentaje de micorrización. Los cepellones se extrajeron de los tubetes y la parte radical se lavó bajo chorro de agua con baja presión y con tamices de diferente diámetro de abertura (1.19, 0.180 y 0.085 mm), para reducir la pérdida de raíces cortas. La identificación de raíces vivas micorrizadas se realizó con un microscopio estereoscópico. Se contaron todas las raíces cortas del cepellón y se efectuaron cortes a mano para su análisis micromorfológico. Adicionalmente se realizó toma de fotografías de las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza: manto, red de Hartig y micelio externo (Figura 8) siguiendo la técnica propuesta por (Agerer 1994)

4.2.9 Diseño experimental

El diseño experimental se ajustó a un modelo de bloques al azar, en el cual se establecieron 6 tratamientos: i) Plantas sin inocular; ii) *Hebeloma mesophaeum* (*Hm*); iii) *Cohnella sp*; iv) *Azospirillum brasilense* (*Ab*); v) (*Hm*+C); vi) (*Hm*+*Ab*). Para el análisis de datos se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey con el paquete estadístico SAS® (2009). En el caso de los valores de colonización micorrízica, que se expresan como porcentajes, los datos se transformaron y se utilizó logaritmo natural, en los análisis de varianza.

4.2.10 Dispositivo experimental

Se diseñaron dispositivos con la finalidad de evitar la contaminación entre tratamientos, estos consistieron en una reja forestal con una estructura cubica de madera de 40 cm de alto la cual se forró de cada lado con hule, en la parte inferior se colocó una charola con una manguera conectada a un recipiente para coleccionar el agua que escurre del riego y evitar la contaminación Figura 5, f).



Figura 5. a) Puesto de hongos silvestres comestibles en tianguis de Ozumba, Estado de México; b), c), d) selección de grupos de hongos ectomicorrízicos comestibles y proceso de deshidratación, e) y f) Prototipo para el aislamiento de los tratamientos

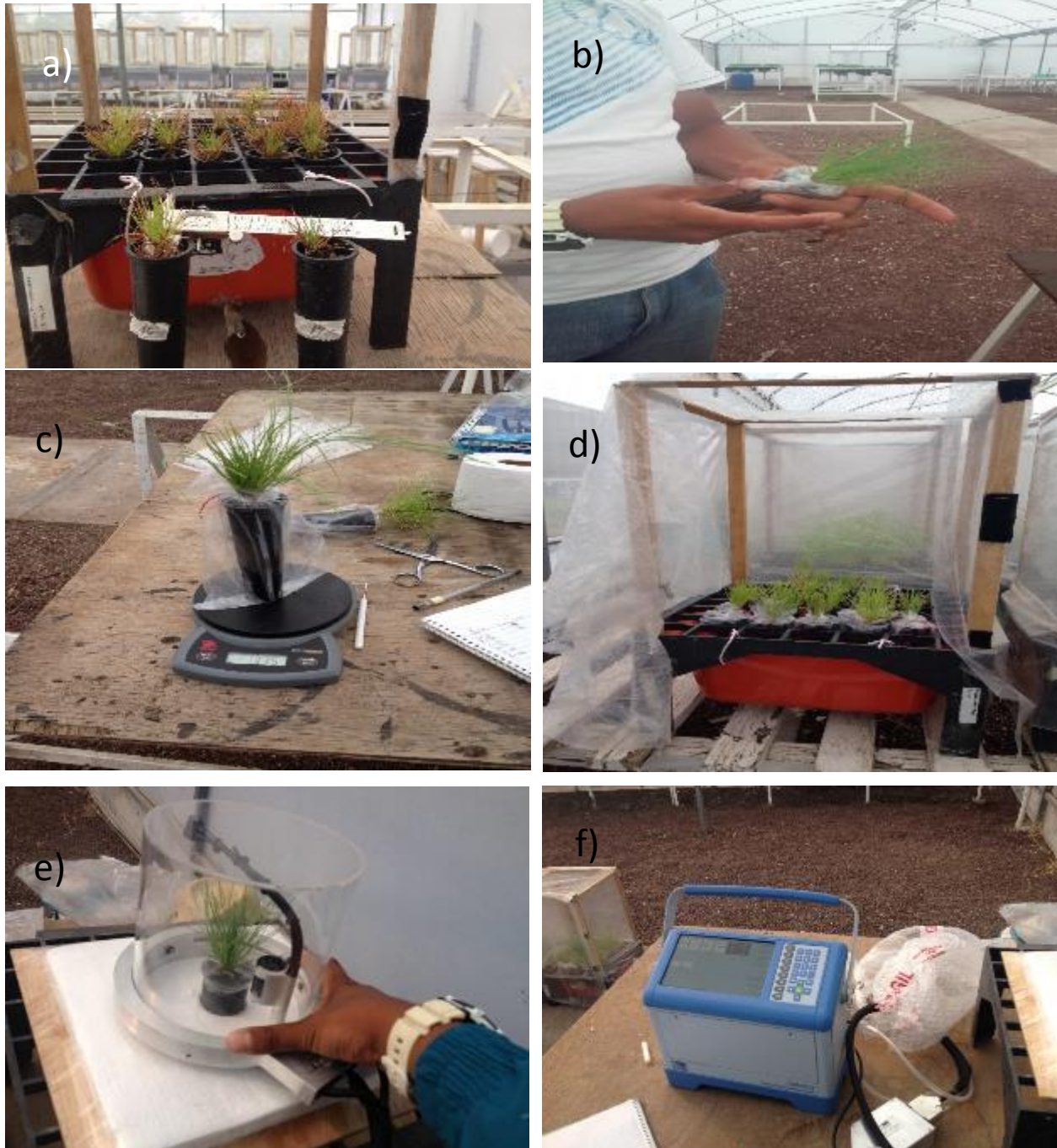


Figura 6. a) Evaluación del diámetro del cuello del tallo; b), c) preparación para la evaluación de transpiración; d) cámara de asimilación de gases; e) Analizador de Gases Infra-rojo (IRGA).

RESULTADOS

4.3 Biomasa seca de parte aérea, radical y total

En términos generales la biomasa seca de la raíz, parte aérea y total, fue mayor en las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico solo o coinoculado con cualquiera de las dos cepas de bacterias en comparación con el de las plantas sin inocular (Cuadro 1). Cuando se inoculó exclusivamente cualquiera de las dos cepas de bacterias la biomasa seca de las plantas (raíz, parte aérea y total) fueron iguales a los de las plantas no inoculadas. En el caso de la biomasa seca de la raíz, existió un efecto sinérgico cuando se inoculó *Hm+Ab* siendo este tratamiento hasta 6.4 veces mayor en peso seco en comparación con las plantas sin inocular.

Sin embargo al evaluar numéricamente las plantas inoculadas exclusivamente con las bacterias y las plantas no inoculadas se observó un aumento de 2.27 y 1.72 veces mayor en la biomasa seca de parte radical en las plantas inoculadas con *Ab* y *C* respectivamente al comparar con las plantas no inoculadas.

Cuadro 1. Peso seco de parte radical, aérea y total de plantas de *Pinus montezumae* inoculadas, o no, con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solas o combinadas, a los 420 días después de la siembra.

Tratamientos	Peso seco (g)		
	Raíz	Parte aérea	Total
Plantas sin inocular	0.22±0.02c	0.26±0.02c	0.48±0.04c
Plantas inoculadas con <i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	1.10±0.07b	1.15±0.12ba	2.25±0.19ba
<i>Cohnella sp.</i> (C)	0.38±0.05c	0.34±0.02c	0.70±0.07c
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	0.50±0.06c	0.42±0.04c	0.92±0.10c
Hm+C	1.08±0.05b	0.96±0.08b	2.04±0.12b
Hm+Ab	1.41±0.12a	1.33±0.08a	2.75±0.18a

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=7. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey (p=0.05).

4.3.1 Diámetro del tallo

Conforme trascurrieron los días se observó un incremento generalizado en el diámetro del tallo, en todos los tratamientos, a partir de los 30 días y hasta los 420 días (Figura 7). Se observaron incrementos en el diámetro del tallo en las plantas inoculadas con *Hm* y en plantas coinoculadas con *Hm+C* y *Hm+Ab*, a los 30, 120 y 420 dds, a los 120 días se observó un incremento en *Hm* y en plantas coinoculadas con *Hm+C* y *Hm+Ab* de 2.25, 2.47 y 2.30 veces superior respectivamente en comparación con las plantas no inoculadas. La inoculación con cualquiera de las dos bacterias no originaron diferencias del diámetro del tallo en comparación con plantas sin inocular.

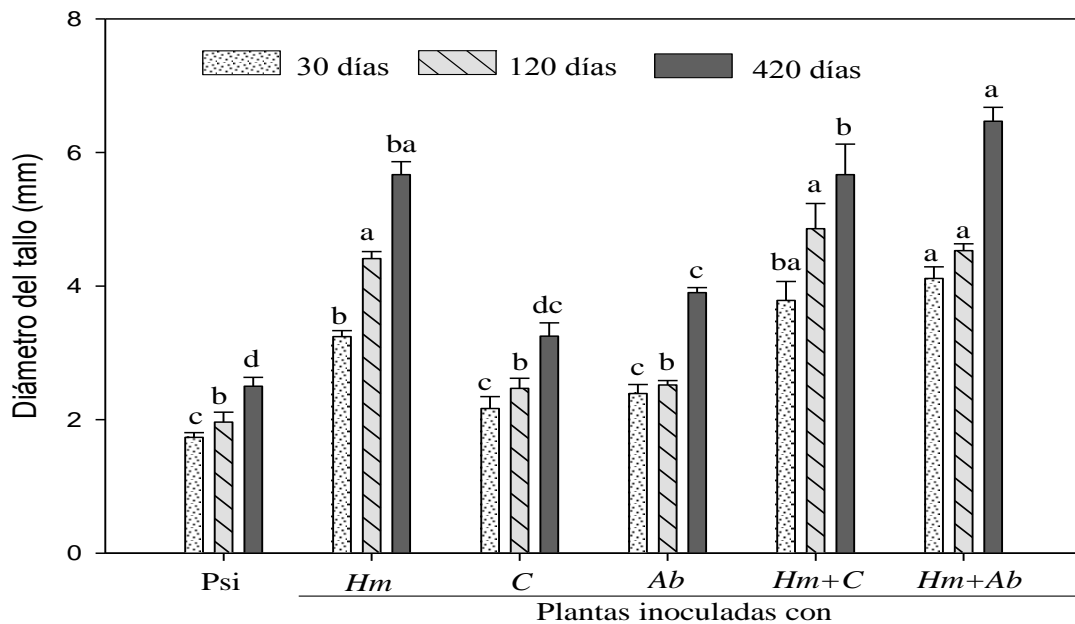


Figura 7. Diámetro del tallo de plantas de *Pinus montezumae* inoculadas, o no, con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal solas o combinadas. Psi= plantas sin inocular; *Hm*=*Hebeloma mesophaeum*; *C*=*Cohnella* sp.; *Ab*=*Azospirillum brasilense*. Los valores de las barras representan promedios \pm error estándar de la media $n=7$. Valores con la misma letra para cada fecha son iguales según Tukey.

4.3.2 Tasa fotosintética

Las diferencias en la tasa fotosintética entre plantas inoculadas y no inoculadas se observaron a partir de los 300 dds, cuando se registraron los mayores valores de la tasa fotosintética en plantas inoculadas con *Hm* o coinoculadas con *Hm+C* y *Hm+Ab*. La tasa fotosintética a los 360 dds fue 4.0 y 3.7 veces mayor en plantas inoculadas con *Hm+C* y *Hm+Ab* en comparación con las plantas sin inocular (Cuadro 2). Al inocularse exclusivamente con las bacterias no se observaron diferencias en relación a cuando no se inoculó, a los 300 y 360 días después de la siembra. Conforme transcurrió el tiempo, se observó un incremento generalizado de la tasa fotosintética en todos los tratamientos, particularmente en *Hm+Ab*; en este caso la tasa fotosintética a los 360 dds fue 2.6 veces mayor que a los 240 días.

Por otro lado al comparar las plantas inoculadas exclusivamente con las bacterias y las plantas no inoculadas se observó que numéricamente las plantas inoculadas exclusivamente con *Ab* presentaron un incremento en la tasa fotosintética de 1.73 veces superior a las plantas no inoculadas a los 360 días después de la siembra

4.3.3 Transpiración

El tratamiento que presentó mayores diferencias en términos de transpiración a partir de los 300 dds fue el coinoculado con *Hebeloma mesophaeum* y *Azospirillum brasilense* en comparación con el tratamiento sin inocular. También se registró una mayor transpiración en plantas inoculadas con *Hm* en

comparación con plantas no inoculadas a los 420 dds (Cuadro 3). La transpiración fue 3.2 y 2.5 veces mayor en plantas inoculadas con *Hm+Ab* y *Hm* 420 dds, respectivamente comparadas con las plantas no inoculadas.

Cuadro 2. Tasa fotosintética por plantas de *Pinus montezumae* inoculadas, o no, con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solas o combinadas durante, 360 días después de la siembra.

Tratamiento	Días después de la siembra		
	240	300	360
	(g CO ₂ m ⁻² hr ⁻¹)		
Plantas sin inocular	0.21±0.14a	0.24±0.05c	0.23±0.07c
Plantas inoculadas con <i>Hebeloma mesophaeum</i> (<i>Hm</i>)	0.73±0.07a	0.77±0.06ba	0.79±0.16ba
<i>Cohnella sp.</i> (<i>C</i>)	0.28±0.09a	0.28±0.06c	0.25±0.06c
<i>Azospirillum brasilense</i> (<i>Ab</i>)	0.32±0.03a	0.34±0.05bc	0.40±0.03bc
<i>Hm+C</i>	0.71±0.01a	0.73±0.07ba	0.84±0.05ba
<i>Hm+Ab</i>	0.36±0.04a	0.88±0.07a	0.94±0.06a

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey (p =0.05).

Cuadro 3. Transpiración (en gramos de agua) de plantas de *Pinus montezumae* inoculadas, o no, con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solas o combinadas durante, 420 días después de la siembra.

Tratamiento	Días después de la siembra			
	240	300	360	420
Plantas sin inocular	1.1±0.10b	1.2±0.37bc	1.1±0.10b	1.1±0.10c
Plantas inoculadas con				
<i>Hebeloma mesophaeum (Hm)</i>	2.1±0.31a	2.2±0.20bac	2.2±0.48ba	2.8±0.58ba
<i>Cohnella sp. (C)</i>	1.4±0.24ba	1.1±0.31c	1.6±0.40ba	1.6±0.24bc
<i>Azospirillum brasilense (Ab)</i>	1.6±0.24ba	1.4±0.24bac	1.8±0.20ba	1.6±0.24bc
<i>Hm+C</i>	2.0±0.10a	2.4±0.24ba	2.1±0.10ba	2.4±0.40bac
<i>Hm+Ab</i>	1.8±0.2ba	2.6±0.40a	2.8±0.48a	3.6±0.24a

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=5. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey (p=0.05).

Cuadro 4. Contenido de clorofilas a, b, totales y carotenos de plantas de *Pinus montezumae* inoculadas, o no, con un hongo ectomicorrizico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solas o combinadas, 480 días después de la siembra.

Tratamientos	Contenido de clorofila (mg/g)			Carotenos
	a	b	Total	
Plantas sin inocular	30.22±1.59b	31.91±1.23b	62.12±2.50b	10.73±0.53b
Plantas inoculadas con				
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	42.24±2.84a	42.43±4.15ba	84.65±6.92ba	10.83±0.60b
<i>Cohnella sp.</i> (C)	39.53±2.49ba	50.27±3.39a	89.77±5.69a	11.85±0.72ba
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	36.63±2.24ba	44.22±2.83ba	80.83±4.99ba	11.75±0.51ba
Hm+C	43.89±3.61a	49.08±4.75a	92.94±8.26a	13.41±0.88a
Hm+Ab	39.06±2.13ba	39.89±1.74ba	78.93±3.80ba	13.41±0.48a

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=7. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey (p=0.05).

4.3.4 Contenido de clorofilas a, b, clorofilas totales y carotenos

Para el contenido de clorofilas a, b, clorofilas totales y carotenos se registraron valores iguales en las plantas sin inocular y en plantas inoculadas exclusivamente con las bacterias *C* y *Ab*. En las plantas inoculadas con *Hm* se observó un mayor contenido de clorofila a en comparación con las plantas sin inocular, lo cual no ocurrió en el caso de los contenidos de clorofila b, clorofilas totales y carotenos (Cuadro 4). Cuando se coinoculó con *Hm* y *C* se registró un mayor contenido de clorofilas a, b, totales y carotenos en comparación con las plantas no inoculadas.

4.3.5 Unidades SPAD

Las unidades SPAD incrementaron conforme transcurrió el tiempo en todos los tratamientos desde la primera medición realizada a los 240 dds, hasta la última evaluación efectuada 420dds. Se observaron mayores valores SPAD en plantas inoculadas con el hongo solo o en coinoculación con las bacterias, en comparación con las plantas no inoculadas (Cuadro 5). En contraste, no existieron diferencias al inocular exclusivamente con bacterias y cuando no se inocularon las plantas. Al final del experimento se registraron 1.78, 1.67 y 1.65 valores de unidades SPAD en plantas inoculadas con *Hm+Ab*, *Hm+C* y *Hm* respectivamente, en comparación con los valores de las plantas no inoculadas.

Cuadro 5. Cuadro 5. Dinámica de unidades SPAD de plantas inoculadas, o no, con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solas o combinadas durante, 420 días después de la siembra

Tratamientos	Días después de la siembra.			
	240	300	360	420
Plantas sin inocular	9.72±2.18c	16.03±1.02bdc	15.33±1.27b	17.32±0.31b
Plantas inoculadas con				
<i>Hebeloma mesophaeum (Hm)</i>	24.09±0.51ba	26.01±1.77ba	27.97±2.99a	28.62±4.05a
<i>Cohnella sp.(C)</i>	13.23±0.14bc	13.80±1.91dc	15.24±2.07b	16.29±2.22b
<i>Azospirillum brasilense (Ab)</i>	13.81±2.84bc	11.03±0.40d	17.29±0.38b	17.61±0.20b
<i>Hm+C</i>	23.83±0.63ba	23.71±0.62bac	28.54±1.73a	28.95±1.40a
<i>Hm+Ab</i>	30.73±4.28a	29.07±5.50a	29.56±0.74a	30.90±1.26a

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey (p=0.05).

4.3.6 Contenido de N, P y K

Cuando se inoculó exclusivamente con *Hm* existieron mayores cantidades de N en la parte aérea, raíz y total, en comparación con plantas no inoculadas. Mientras tanto, cuando se inoculó exclusivamente con cualquiera de las dos bacterias, no existieron diferencias en la cantidad de N, en comparación con las plantas no inoculadas independientemente de la parte de la planta. Se observó un efecto sinérgico en la cantidad de N en la parte aérea y total cuando se inoculó con *Hm+Ab* (Cuadro 6). Tendencias similares fueron observadas en el caso de P y K excepto que no existió efecto sinérgico cuando se inoculó con *Hm+C* o *Hm+Ab* para estos tratamientos.

Cuadro 6. Contenido de N, P y K en plantas de *Pinus montezumae* inoculadas, o no, con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solas o combinadas, 420 días después de la siembra.

	Psi	Plantas inoculadas con				
		<i>Hm</i>	<i>C</i>	<i>Ab</i>	<i>Hm+C</i>	<i>Hm+Ab</i>
N (mg)						
Parte						
aérea	1.96±0.29c	5.18±1.40b	1.82±0.08c	2.08±0.29c	4.28±0.38cb	10.52±0.65a
Raíz	1.40±0.20b	6.47±0.71a	2.65±0.29b	2.45±0.29b	5.42±0.38a	6.02±0.23a
Total	3.36±0.48c	11.64±1.73b	4.48±0.32c	4.53±0.57c	9.69±0.69b	16.54±0.82a
P (mg)						
Parte						
aérea	0.48±0.07b	1.68±0.34a	0.35±0.02b	0.56±0.08b	1.69±0.15a	1.54±0.09a
Raíz	0.37±0.05b	1.49±0.16a	0.53±0.06b	0.88±0.10b	1.62±0.11a	1.70±0.07a
Total	0.85±0.12b	3.17±0.50a	0.88±0.06b	1.44±0.18b	3.31±0.24a	3.24±0.15a
K (mg)						
Parte						
aérea	0.37±0.05c	3.08±0.62a	0.67±0.03c	1.48±0.21c	3.10±0.28a	2.30±0.14a
Raíz	0.23±0.03c	1.41±0.16a	0.82±0.09b	0.90±0.11b	1.21±0.09a	1.60±0.06a
Total	0.60±0.09c	4.49±0.77a	1.49±0.10c	2.38±0.31bc	4.31±0.34a	3.89±0.19ba

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=4, valores con la misma letra en la misma fila son iguales según Tukey (p=0.05). Psi= plantas sin inocular; *Hm*= *H. mesophaeum*; *C*= *Cohnella sp.*; *Ab*= *Azospirillum brasilense*.

4.3.7 Porcentaje de colonización

Los tratamientos que presentaron los porcentajes más altos de raíces vivas micorrizadas (Figura 1), fueron las plantas inoculadas con *Hm* solo o coinoculado con cualquiera de las dos bacterias *Ab* y *C*, con porcentajes de hasta 76.5, 76.4 y 68.7% respectivamente superiores en relación a plantas no inoculadas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de raíces vivas y muertas de plantas de *Pinus montezumae* inoculadas, o no, con hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solas o combinadas, 421 días después de la siembra.

Tratamientos	Vivas		Muertas	
	Micorrizadas	No Micorrizadas	Micorrizadas	No Micorrizadas
Plantas sin inocular	2.75±0.25c	84.60±0.77a	1.88±0.27b	10.74±0.96a
Plantas inoculadas con <i>Hebeloma mesophaeum</i> (<i>Hm</i>)	76.15±1.36a	8.62±2.18b	8.73±2.31a	6.47±1.82a
<i>Cohnella sp.</i> (<i>C</i>)	12.89±7.85c	66.81±6.27a	1.82±0.59b	18.35±8.79a
<i>Azospirillum brasilense</i> (<i>Ab</i>)	12.95±5.37bc	71.2±5.95a	4.57±0.98ba	11.27±1.77a
<i>Hm</i> + <i>C</i>	68.67±2.18a	10.85±0.78b	10.52±2.07a	9.94±0.66a
<i>Hm</i> + <i>Ab</i>	76.41±5.13a	5.02±1.13b	10.82±2.01a	7.70±2.09a

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey (p=0.05).

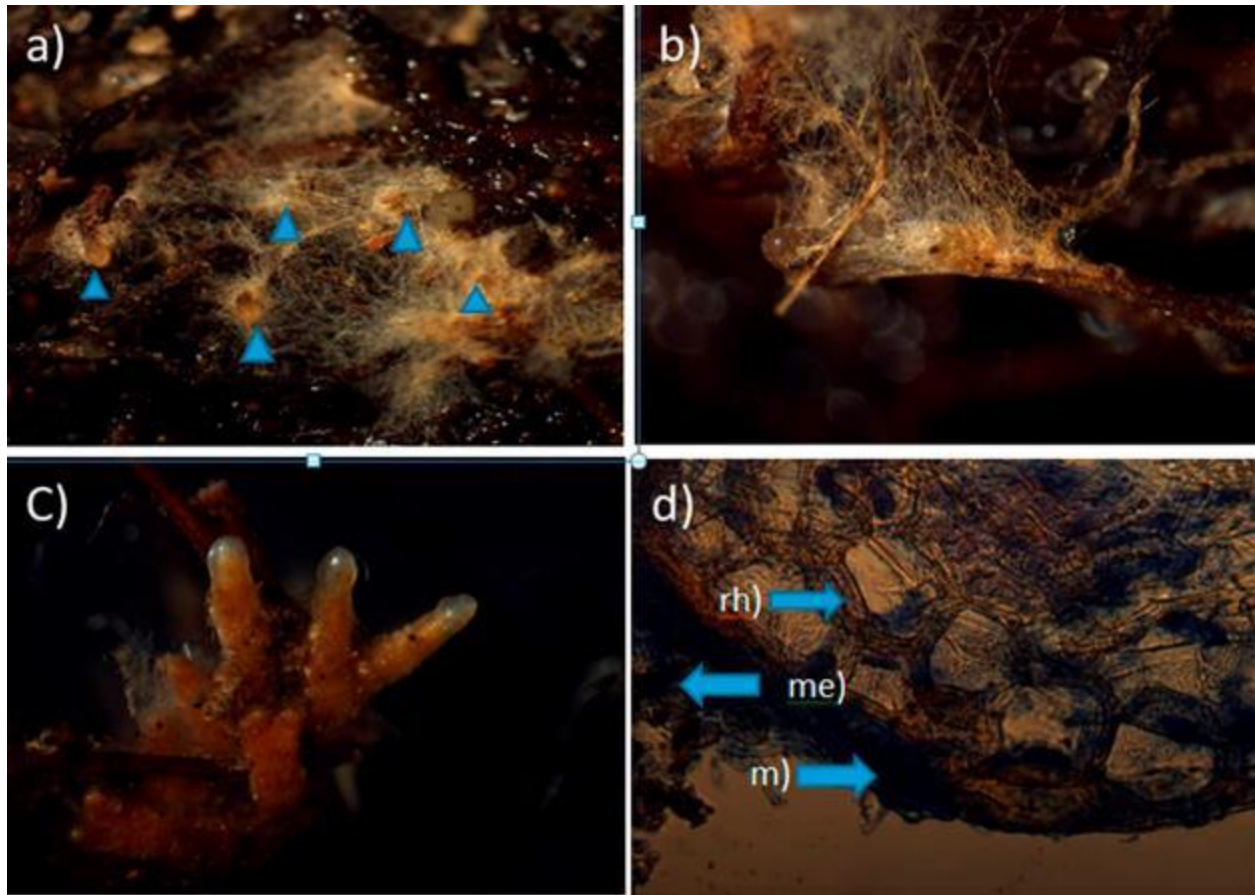


Figura 8. Características generales de las ectomicorrizas de *Hebeloma mesophaeum* (Hm). a) Vista general de morfotipos de Hm mostrando el abundante micelio externo de color blanquecino a crema; b) Morfotipo de Hm con *Azopirillum brasilense* mostrando el micelio externo que cubre la totalidad de la ectomicorriza; c) Morfotipo de *Hm+Ab*, de la cual se le ha retirado el micelio externo; d) Corte transversal, rh) red de hartig, m) manto me) micelio externo.

4.4 DISCUSIÓN

4.4.1 Biomasa seca de parte aérea, radical, total y diámetro del tallo

Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que al inocular el hongo ectomicorrízico comestible *Hebeloma mesophaeum* solo o coinoculado con cualquiera de las dos bacterias *Cohnella* sp. o *Azospirillum brasilense*, favoreció el incremento de biomasa seca en términos de raíz, parte aérea, biomasa seca total y diámetro del tallo en comparación con las plantas que no se inocularon. Previamente, se ha demostrado que la inoculación con hongos ectomicorrízicos origina incremento en biomasa en las plantas asociadas. Por ejemplo, Carrasco-Hernández *et al.* (2011) demostraron el efecto benéfico en términos de peso seco y diámetro del tallo en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* inoculados con *Hebeloma* spp. y *Laccaria laccata*; Gómez-Romero *et al.* (2015) observaron que *P. pseudostrobus* inoculado con *Pisolithus tinctorius* registró incrementos en biomasa aérea y radical. Yin *et al.* (2016) observaron, que al inocular plantas de *P. sylvestris* var. *mongolica* con *Suillus luteus* se incrementó la biomasa total en comparación con plantas que no fueron inoculadas. En el presente trabajo los pinos coinoculados con *H. mesophaeum* y *A. brasilense* presentaron un sinergismo en el aumento de biomasa radical en comparación con plantas inoculadas solamente con el hongo o con las bacterias. En algunas investigaciones se ha reportado los beneficios de la coinoculación con hongos y bacterias, entre ellos el aumento de biomasa, por ejemplo Kataoka y Futai (2009) reportaron un incremento de biomasa en raíz de *Pinus thumbergii* coinoculado con *Suillus granulatus* y *Burkholderia* sp. Los incrementos pueden ser debido a

los metabolitos producidos por las bacterias como las fitohormonas y otros compuestos que se relacionan con la promoción del crecimiento de las plantas, ayudando a una mayor captación de nutrimentos y agua reduciendo el estrés (Borris, 2011). Recientes investigaciones sobre rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal revelan que pueden promover el crecimiento de las plantas por medio de los mecanismos siguientes: 1) la producción de reguladores del crecimiento de las plantas como el ácido indol acético, ácido giberelico y citocininas (Domínguez-Núñez *et al.*, 2012), 2) la fijación asimbiótica de nitrógeno (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006) 3) la producción de sideroforos que pueden tener una actividad antagónica contra fitopatógenos y 4) la solubilización de fosfatos y otros nutrimentos (Bhattacharyya y Jha, 2012).

4.4.2 Tasa fotosintética

Las plantas inoculadas con *Hm* y principalmente las coinoculadas con *Hm+C* y *Hm+Ab* presentaron un incremento en la tasa fotosintética. Canton *et al.* (2016) reportaron que la inoculación con *Pisolithus tinctorius* en *Eucalyptus grandis* originó mayores tasas fotosintéticas que en plantas no inoculadas. Chen *et al.* (2015) registraron que la inoculación de los hongos ectomicorrízicos *Pisolithus* sp. y *Cenococcum geophilum* en *Pinus densiflora*, en altas concentraciones de Cu, incrementaron la tasa fotosintética 45 días después de la inoculación. También se ha reportado que *Picea glauca*, *P. mariana* y *Pinus banksiana* inoculados con *Hebeloma crustuliniforme* y *Laccaria bicolor* crecidas en altas concentraciones de NaCl y Na₂SO₄, presentaron altas tasas fotosintéticas y que la presencia de fotosintatos desempeñaron un papel importante en la resistencia de estrés por

salinidad para las plantas inoculadas (Nguyen *et al.*, 2006). Otros autores han mencionado que el hongo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* inoculado en *Picea glauca* no solo incrementa la tasa fotosintética sino que origina una mayor transpiración (Xu *et al.*, 2015).

Por otro lado el aumento en la tasa fotosintética que se registró al comparar únicamente las bacterias y las plantas sin inocular de lo atribuimos a el efecto de La inoculación de *Azospirillum* quien el cual se ha observado que induce cambios significativos en varios parámetros de crecimiento, aumento de la biomasa aérea de la planta incrementando en la respiración de la planta (Méndez *et al.*, 2014)

4.4.3 Transpiración

En el presente trabajo se observó que al inocular *Pinus montezumae* con *Hm* y *Hm+Ab* se incrementó la transpiración 2.5 y 3.2 veces respectivamente en comparación con las plantas sin inocular. En trabajos anteriores otros investigadores demostraron que la inoculación con hongos ectomicorrízicos también incrementa la transpiración. Por ejemplo Turgeman *et al.* (2011) registraron que al inocular *Helianthemum sessiliflorum* con *Terfezia boudieri* se incrementó la transpiración 1.24 veces más en relación con plantas no inoculadas.

4.4.5 Contenido de clorofilas a, b, clorofilas totales y carotenos

La inoculación de *Pinus montezumae* con *Hm*, originó un incremento en la concentración de clorofila a; de forma similar también se observó que la

concentración de clorofila a, b, clorofilas totales y carotenos se incrementó cuando las plantas se coinocularon con *Hm+C* en comparación con plantas no inoculadas. Datos similares fueron reportados por Yin *et al.* (2014) quienes registraron un incremento en los contenidos de clorofila a, b y carotenos en plantas de *Pinus sylvestris* inoculadas con *S. luteus*, Sebastiana *et al.* (2013) registraron que *Quercus suber* inoculado en *Pisolithus tinctorius* incrementó su concentración de clorofilas y carotenos en comparación con aquellas plantas no inoculadas. Por otra parte, la concentración de carotenos aumentó cuando se coinoculó con el hongo *Hm* y la bacteria *Ab* al compararse con las plantas sin inocular. Este incremento en carotenos registrado coincide con lo reportado anteriormente por Mrnka *et al.* (2009) quienes registraron que la inoculación de *Hebeloma bryogenes* y *Cadophora finlandica* en *Picea abies* incrementó la concentración de carotenos comparado con plantas testigo.

4.4.6 Porcentaje de colonización

Las plantas inoculadas con *Hm* solo o combinado con cualquiera de las dos bacterias *Hm+Ab* y *Hm+C* registraron altas colonizaciones de 76.2, 76.4 y 68.7 % respectivamente. De manera similar Méndez-Neri *et al.* (2011) reportaron en *Pinus greggii* inoculado con *Hebeloma mesophaeum*, *Laccaria laccata* y *Suillus* aff. *pseudobrevipes*, una colonización de 77 %. Mientras que (Sanchez-Zabala *et al.*, 2013) registraron una cantidad menor de 30% en plantas de *Pinus pinaster* inoculado con *Lactarius deliciosus*, *Lactarius quieticolor*, *Pisolithus arhizus*, y *Suillus luteus*.

4.4.7 Contenido de N, P y K

La importancia de la adquisición de nutrientes en plantas micorrizadas ha sido claramente demostrada (Smith y Read, 2008; Martins *et al.*, 2015). En el presente trabajo el contenido de N, P y K fue mayor cuando se inocularon las plantas de *Pinus montezumae* solo con *Hebeloma mesophaeum* o en coinoculación con *Cohnella sp.* o *A. brasilense* en comparación con las plantas sin inocular. Kayama *et al.* (2015) registraron que la presencia de hongos ectomicorrizicos estimuló el incremento de N de plantas *Larix kaempferi*; Heinonsalo *et al.* (2015) reportaron un incremento de N en las plantas de *P. sylvestris* inoculadas con *Piloderma croceum*, *Suillus variegatus*, *Amanita porphyria*, *Lactarius rufus*, *Suillus bovinus*, *Cenococcum geophilum*, *Tylospora echinospora* y *Thelephora terrestres*. Zong *et al.* (2015) registraron en *Pinus densiflora* y *Quercus variabilis* inoculados con *Pisolithus sp.* *Cenococcum geophilum* y *Laccaria laccata* un incremento en la cantidad de P significativamente mayor que en las plantas no inoculadas. En cuanto al contenido de K, Martínez-Reyes *et al.* (2012) reportaron que en plantas inoculadas con *Hebeloma mesophaeum* en *Pinus greggii* se incrementó 2.5 veces más la concentración de K en comparación con plantas no inoculadas.

En el presente trabajo se registró un sinergismo en el contenido de N aéreo y total en plantas coinoculadas con *Hm+Ab*. Algunos investigadores han descrito los beneficios de la coinoculación con hongos ectomicorrizicos más bacterias, principalmente en la toma de nutrientes en las plantas. Xiao-Qin *et al.* (2012) registraron que al inocular plantas de *Pinus thunbergii* con el hongo

ectomicorrízico *Boletus edulis* y la bacteria *Bacillus cereus*, se incrementó la movilización nutrientes principalmente de N y P en las plantas coinoculadas en comparación con plantas no inoculadas. Sousa *et al.* (2015) registraron incrementos de N y P en plantas de *Betula pubescens* co-inoculadas con *Paxillus involutus* y *Mesorhizobium*.

4.5 CONCLUSIONES

Se demostró que la inoculación de Hm sola o combinada con C y Ab mejora el crecimiento y la calidad fisiológica de plantas de *Pinus montezumae* Lamb., dado que incrementa la biomasa, fotosíntesis, respiración, concentración de clorofilas, carotenos, unidades SPAD y contenido de N, P y K. En contraste la inoculación sola de C y Ab no originan incrementos de ninguna de las variables evaluadas. Se observó un efecto sinérgico en términos de biomasa radical y contenido de N en parte aérea cuando se coinoculó con Hm+Ab. Estos efectos estuvieron asociados con altas colonizaciones ectomicorrízicas las cuales varían de 69 a 76% en los tratamientos inoculados con Hm solo o coinoculado.

El presente trabajo demuestra que la inoculación biotecnológica con Hm solo o coinoculado con las bacterias auxiliaadoras de la micorrización C y Ab, posee un enorme potencial en la producción de plantas de calidad de *Pinus montezumae* Lamb., una de las especies más utilizadas en programas de reforestación y restauración de suelos en México.

4.6 LITERATURA CITADA

- Aanen, D. K., Kuyper, T. W., Boekhout, T., Hoekstra, R. F. 2000. Phylogenetic relationships in the genus *Hebeloma* based on ITS1 and 2 sequences, with special emphasis on the *Hebeloma crustuliniforme* complex. *Mycologia*. 92 (2): 269-281.
- Adesemoye, A. O., Kloepper, J. W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1-12.
- Agerer R. 1994. Characterization of ectomycorrhiza. In J. R. Norris, D. J. Read, & A.K. Varma eds. London: Academic Press, 25-73.
- Allen, S. E., Grimshaw, H. M., Parkinson JA, y Quarmby C. 1997. Chemical analysis of ecological materials. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Amora-Lazcano, E., Carreon-Abud, Y., Martínez, T. M., 2006. Las ectomicorrizas y su uso como inoculantes. *Ciencia Nicolatina* 44: 75-92.
- Aspray, T. J., Jones, E. E., Whipps, J. M., Bending, G. D. 2006. Importance of mycorrhization helper bacteria cell density and metabolite localization for the *Pinus sylvestris*, *Lactarius rufus* symbiosis. *FEMS Microbiol Ecol*. 56: 25-33
- Barbut, M. 2012. Un nuevo clima para los bosques intervención de la FMAM en favor de la ordenación forestal sostenible. Fondo para el medio ambiente mundial invertir en nuestro planeta. 1-32 pp.
- Bhattacharyya, P.N. y Jha D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agricultura. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 28: 1327-1350.
- Borriss, R. 2011. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In: Maheshwari D.K. (ed) *Bacteria in Agrobiolgy: plant growth responses*. Springer, Berlin, pp 41-76.

- Boyle, H., Zimdars, B., Renker, C., Buscot, F. 2006. A molecular phylogeny of *Hebeloma* species from Europe. *mycological research*. 110: 369 – 380.
- Bravo, D., Cailleau, G., Bindschedler, S., Simon, A., Job, D., Verrecchia, E., Junier, P. 2013. Isolation of oxalotrophic bacteria able to disperse on fungal mycelium. *Federation of European Microbiological Societies*. 348: 157–166.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen: Methods of soil analysis. Madison. In C. A. Black Ed. Wis- Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy Press, 1149-117.
- Buscardo, E., Rodríguez-Echeverría, S., De Angelis, P., Freitas, H. 2009. Comunidades de hongos ectomicorrizicos en ambientes propensos al fuego: Compañeros esenciales de pinares mediterráneos. *Ecosistemas*. 2: 55-63.
- Calderón, P. N., Jasso, M. J., Martínez, H. J. J., Vargas, H. J., Gómez, G. 2006. Estimulación temprana del crecimiento del epicotilo en plántulas de *Pinus montesumae*. *Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable*. 2 (3): 847-864.
- Camargo-Ricalde, S. L., Montano, M. N., De la Rosa-, Mera C. J., Montano, A. A. 2012. Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*. 13: 1-19.
- Canton, C. C., Bertolazi, A. A., Cogo, A. J. D., Eutrópio, J. F., Melo, J., de Souza BS, Krohling, A. C., Campostrini E., da Silva, G. A., Façanha, R. A., Sepúlveda, N., Cruz, C., Ramos, C. A. 2016. Biochemical and ecophysiological responses to manganese stress by ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and in association with *Eucalyptus grandis*. *Mycorrhiza*. 1-15.
- Carcaño-Montiel, M. G., Ferrera- Cerrato, R., Pérez-Moreno, J., Molina-Galán, J. D., Basahn Y. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas,

- sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana*, 24(4): 493-502.
- Carrasco, H. V., Pérez, M. J., Quintero L. R., Espinoza S. T., Lorenzana F. A., Espinoza H V. 2015. Edible species of the fungal genus *Hebeloma* and two neotropical pines. *Pak. J. Bot.* 47 (1): 319-326.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suarez, J. J., Quintero-Lizaola 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.
- Castillo, F. R., Pérez, R. J. A., Vargas, A. G., Rivera, G. R., 2004. Coníferas. Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología UNAM. Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza. México. 141-158 pp.
- Céspedes, F., S. E., Moreno S., E. 2010. Estimación del valor de la pérdida de recursos forestales y su relación con la reforestación en las entidades federativas. *Investigación Ambiental.* 2 (2): 5-13.
- Cetina, A. V. M., Ortega, D. M. L., Gonzales, H. V. A., Vargas, H. J. J., Colinas L. M. T., Villegas, M. A. 2001. Fotosíntesis y contenido de carbohidratos de *Pinus greequi* engelm. En respuesta a la poda y al régimen de riego en vivero. *Agrociencia.* 35: 599-607
- Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Dye, W. F., Bertrand, C., Prigent, C. C. 2013. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. *Phytochemistry.* 87: 65-77.
- Chen, Y., Nara, K., Wen, Z., Shi, L., Xia, Y., Shen, Z., y Lian, C. 2015. Growth and photosynthetic responses of ectomycorrhizal pine seedlings exposed to elevated Cu in soils. *Mycorrhizal.* 25: 561-571.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2009. Informe de Evaluación Externa de los Apoyos de Reforestación, Ejercicio Fiscal 2009. 140 p.

- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2013. Pierde México 155 mil ha por deforestación cada año. Boletín 39. SEMARNAT, México DF. 2 p.
- Dario, C. F., Okon, Y., Creus M. C. 2015. Handbook for *Azospirillum*, Technical Issues and Protocols. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. 514 pp.
- Domenech, J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Lucas-García J.A., Colón J.J., Gutiérrez-Mañero F.J. 2004. *Bacillus* spp. And *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. *ballota*: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. Forest Ecology and Management. 194: 293–303.
- Dominguez-Núñez, J. A., Muñoz D., Planelles R., Grau, J. M., Artero, F., Anriquez, A., Alnanesi, A. 2012. Inoculation with *Azospirillum brasilense* enhances the quality of mesquite *Prosopis juliflora* seedlings. Forest Systems. 21(3): 364-372.
- Duñabeitia, K. M., Hormilla, S., García, P. J. I., Txarterina, K., Arteche, U., Becerril, J. M. 2004. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. Mycorrhiza. 14: 11–18.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M., 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.
- Gernandt D. S., Pérez R. J. A. 2014. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad 85: 126-133.
- Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R., Del Val, E. 2015. Efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus pseudostrobus* y *Pisolithus tinctorius*. Botanical Sciences 4: 731-740.

- Heinonsalo, J., Juurola, E., Linden, A., Pumpanen, 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.
- Hernández, Z. L., Aldrete A., Ordaz, C. V. M., López, U. J., López, L. M. A. 2014. Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb. En vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. *Agrociencia*. 48 (6): 627-637.
- Herrmann, S., Oelmüller, R., Buscot, F. 2004. Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis. *Journal Plant Physiol*. 161: 509– 517.
- Holguin, G., Bashan, Y. 1996. Nitrogen-Fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp). *Soil Biol. Biochem*. 28 (12): 1651-1660.
- Hrynkiewicz, K., Ciesielska, A., Haug, I., Baum, C. 2010. Ectomycorrhiza formation and willow growth promotion as affected by associated bacteria: role of microbial metabolites and use of C sources. *Biol Fertil Soils*. 46: 139–150.
- Hrynkiewicz, K., Dabrowska, G., Baum C., Niedojadlo, K., Leinweber, P. 2012. Interactive and Single Effects of Ectomycorrhiza Formation and *Bacillus cereus* on Metallothionein MT1 Expression and Phytoextraction of Cd and Zn by Willows. *Water Air Soil Pollut*. 223: 957–968.
- <http://www.funghiitaliani.it/>)
- https://en.wikipedia.org/wiki/Pinus_montezumae.
- Huauya, R. M., Juscamaita, M. J., Calderón, M. C. 2001. Evaluación de diazotrofos asociados a cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en condiciones de agricultura natural. *Anales científicos UNALM*. 1: 215- 230.

- Jiang, F., Dai, J., Wang, Y., Xue, X., Xu, M., Li, W., Fang, C., Peng, F. 2012. *Cohnella arcticasp.* nov., isolated from Arctic tundra soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 817–821.
- Jiménez, C. M., Jasso, M. J., López, P. M. C., Vargas, H. J. J. 1998. Efecto del ácido Giberelico, La bencilaminopurina y sales en la ontogenia de *Pinus montesumae* Lamb. *Revista Ciencia Forestal en México*. 84: 39-46.
- Kampfer, P., Rosselló-Mora, R., Falsen, E., Busse, H., J., 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.
- Kataoka, R., Futai, K. 2009. A new mycorrhizal helper bacterium, *Ralstonia* species, in the ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus thunbergii* and *Suillus granulatus*. *Biology and Fertility of Soils*. 45: 315–320.
- Kayama, M., Qu, L., Koike, T. 2015. Elements and ectomycorrhizal symbiosis affecting the growth of *Japanese larch* seedlings regenerated on slopes of an active volcano in northern Japan. *Trees*. 29: 1567–1579
- Kurth F, Zeitler K, Feldhahn L, Neu RT, Weber T, Křišťůfek V, Wubet T, Herrmann S, Buscot F, Tarkka TM. 2013. Detection and quantification of a mycorrhization helper bacterium and a mycorrhizal fungus in plant-soil microcosms at different levels of complexity. *BMC Microbiology*. 13: 2-10.
- Lichtenthaler, H., K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol*. 148: 350–382.
- Loredo, O. C., López, R. L., Espinosa, V. D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. 22 (2): 225-239.
- Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., FerreraCerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J. J., Honrubia-García, M.

2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 2: 183-192.
- Martinz, G. M. A., Graziotti, H. P., Rossi, J. M., Fonseca G. S. C. D., de Barros, S. E., Ragonezi, C. 2015. Growth and nutrition of *Eucalypt* rooted cuttings promoted by ectomycorrhizal fungi in commercial nurseries. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 39: 1554-1565.
- Méndez, G. M., Castro M. E., García P. E. 2014. *Azospirillum* una rizobacteria con uso potencial en la agricultura. Biológicas. 16(1): 11-18.
- Méndez, N. M., Pérez, M. J., Quintero, L. R., Hernández, A. E., Lara, H. A. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. Terra Latinoamericana 1(29): 73-81.
- Méndez-Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero, L. R., Hernández, A. E., Lara, H. A., 2011. Growth and Nutrimental Content of *Pinus greggii* Inoculated with Three Edible Ectomycorrhizal Fungi. Terra Latinoamericana. 29: 1-9.
- Mrnka L, Kuchár M, Cieslarová Z, Matejka P, Záková J, Tlustos P, 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.
- Mrnka, L., Tokárová, H., Vosátka, M., Matejka, P. 2009. Interaction of soil filamentous fungi affects needle composition and nutrition of Norway spruce seedlings. Trees. 23: 887–897.
- Nguyen, M. H., Polanco, C. M., Zwiazek, J. J. 2006. Gas Exchange and Growth Responses of Ectomycorrhizal *Picea mariana*, *Picea glauca*, and *Pinus banksiana* Seedlings to NaCl and Na₂SO₄. Plant Biology. 8: 646 – 652.

- Orozco, G. A., Muños, F. H. J., Rueda S. A., Sígala, R. J. A., Prieto, R. J. A., García, M. J. J. 2010. Diagnóstico de la calidad de planta en los viveros forestales del estado de Colima. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 1: 134-145.
- Parra, J., Cuevas, F. 2001. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales*. 23: 31-41.
- Pérez, M. J. 2012. Hongos comestibles ectomicorrizicos y su biotecnología. *Los hongos comestibles y medicinales en iberoamerica* 1: 1-357.
- Pérez, M. R., Moreno, S. F., González, H. A., Arriola, P. V. J. 2014. Distribución de *Abies religiosa* (Kunth) Schldtl. et. Cham and *Pinus montesumae* Lamb. Ante el cambio climático. *Rev. Mex. Cien. For.* 5 (25): 19-20.
- Pérez-Moreno J, Martínez-Reyes M, Yesca-Pérez A, Delgado-Alvarado A y Xoconostle-Casares B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and case study at Ozumba. *Econ. Bot.* 3: 425-436.
- Pérez-Moreno, J., Read, D. J. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29: 239-247.
- Pimienta, B. E., Zañudo, H. J., López, A. E. 2009. Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Acta Botánica Mexicana*. 89: 63-78.
- Pohjanen, J., Koskimäki, J.J., Sutela, S., Ardanov, P., Suorsa, M., Niemi, K., Sarjala, T., Häggman, H., Pirttilä, A. M. 2014. Interaction with ectomycorrhizal fungi and endophytic *Methylobacterium* affects nutrient uptake and growth of pine seedlings in vitro. *Tree Physiology* 34: 993-1005.
- Probanza, A., Mateos, J. L., Garcia, J. A. L., Ramos, B., de Felipe, M. R., Mañero, G. F. J. Effects of Inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus*

- tinctorius* on *Pinus pinea* L. Growth, Bacterial Rhizosphere Colonization, and Mycorrhizal Infection. *Microb Ecol.* 41: 140-148.
- Reverchon F., Ortega L. M. P., Bonilla R.G., Pérez M. J. 2012. Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. *FEMS Microbiol Ecol* 80: 479–487.
- Rinaldi A. C., Comandini O y Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity.* 33: 1-45.
- Rives N., Acebo Y., Hernández A. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en cultivos de arroz (*Oriza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos tropicales.* 28 (2): 29-38.
- Sáenz, R. T., Muños M, j., Pérez D., C. M. A., Rueda S. a., Hernández, R. J. 2014. Calidad de planta de planta de tres especies de pino en el vivero Morelia” Nota de investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales.* 26 (5): 98-111.
- Sánchez, G. A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques.* 14 (1): 107-120.
- Sánchez-Zabala, J., Majada, J., Martín-Rodríguez, N., Gonzales-Murua, C., Ortega, U., Alonso-Graña, M., Arana, O., Duñabeitia, M. K. 2013. Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza.* 23: 627–640.
- Sebastiana, M., Pereira, T. V., Alcantara, A., Pais, S. M., Bernardes, S. A. 2013. Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* increases the performance of *Quercus suber* L. (cork oak) nursery and field seedlings. *New Forests.* 44: 937–949.
- Smith, S. E., Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis.* Third edition. Academic Press, New York, USA.

- Sousa, R. N., Franco, R. A., Ramos, A. M., Oliveira, S. R., Castro, L. M. P. 2015. The response of *Betula pubescens* to inoculation with an ectomycorrhizal fungus and a plant growth promoting bacterium is substrate-dependent. *Ecological Engineering* 81: 439–443.
- Tilak, K. V. B. R., Li, C. Y., Trappe, J. M. 1998. Characterization of Nitrogen-fixing *Azospirillum* isolated from within Sporocarps of Ectomycorrhizal fungi associated with Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Indian J. Microbiol* 4:315-319.
- Tsimilli, M. M., Eggenberg, P., Biro, B., Koves, P. K., Voros, I., Strasser, R. J. 2000. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal, fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. *Applied Soil Ecology* 15: 169–182.
- Turgeman, T., Asher, B. J., Roth-Bejerano, N., Kagan-Zur, V., Kapulnik, Y., Sitrit Y. 2011. Mycorrhizal association between the desert truffle *Terfezia boudieri* and *Helianthemum sessiliflorum* alters plant physiology and fitness to arid conditions. *Mycorrhiza* 21: 623–630.
- Valdés, R. M. 2011. El cambio climático y el estado simbiótico de los árboles del bosque. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 2:5-14.
- Vassey, K. J. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571–586.
- Velázquez, A., J. F. Mas, R. Mayorga, S. J. R. Alcántara, R. Castro, T. Fernández, J. L. Palacio, G. Bocco, G. Gómez, R. L. Luna, G. L. López, G. M. Palma, A. Peralta, J. Prado, M. F. 2002. El estado actual y dinámica de los recursos forestales de México. CONABIO. *Biodiversitas* 41: 8-15.
- www.canadaplants.ca
- Xiao-Qin, W., Liang-Liang, H., Jiang-Mei, S., Jia-Hong, R., Zheng, L., Chen, D., Jian-Ren, Y. 2012. Effects of ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* and

- mycorrhiza helper *Bacillus cereus* the growth and nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. *Biology and Fertility of Soils*. 48: 385–391.
- Xu, H., Kemppainen, M., El Kayal, W. Lee, H. E., Pardo, G. A., Cooke, K. E. J., Zwiasek, J. J. 2015. Overexpression of *Laccaria bicolor* aquaporin JQ585595 alters root water transport properties in ectomycorrhizal white spruce (*Picea glauca*) seedlings. *New Phytologist*. 205: 757–770.
- Yin, D., Deng, X., Chet, I., Song, R. 2014. Physiological Responses of *Pinus sylvestris* var. *Mongolica* Seedlings to the Interaction Between *Suillus luteus* and *Trichoderma virens*. *Current Microbiology*. 69: 334–342.
- Yin, D., Deng, X., Song, R. 2016. Synergistic effects between *Suillus luteus* and *Trichoderma virens* on growth of Korean spruce seedlings and drought resistance of *Scotch pine* seedlings. *Journal of Forest Research*. 1: 193–201.
- Zambonelli A, Bonito GM (eds.) 2012. Edible ectomycorrhizal mushrooms. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Zamora, C. E. M., Vázquez, C. O. G., Pérez, A. A., Cano, F. R., Aparicio, R. A., Fernández, P. E. 2007. Variación natural de la densidad de la madera en *Pinus montesumae* en tres altitudes del parque nacional la malinche Tlaxcala México. *Foresta veracruzana*. 9 (2): 33-37.
- Zhang, L., Fan, J., Ding, X., He, X., Zhang, F., Feng, G. 2014. Hyphosphere interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate solubilizing bacterium promote phytate mineralization in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 74: 177-183.
- Zhang, Z. X. 1986. Determination of chlorophyll content of plants - acetone and ethanol mixture method. *Liaoning Agricultural Science*. 3: 26–28.
- Zhao, L., Wu. X. Q., Jian-Ren, Y., Li, H., Gui-E, L. 2014. Isolation and characterization of a mycorrhiza helper bacterium from rhizosphere soils of poplar stands. *Biol Fertil Soils*. 50: 593–601.

Zong, K., Huang, J., Nara, K., Chen, Y., Shen, Z., Lian, C. 2015. Inoculation of ectomycorrhizal fungi contributes to the survival of tree seedlings in a copper mine tailing. *Journal of Forest Research*. 20: 493–500.