

# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE BOTÁNICA**

**EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS COMUNIDADES  
MICROBIANAS ASOCIADAS CON LAS RAÍCES MICORRIZADAS DE  
*Pinus Montezumae* y *Pinus greggii***

**REYES MOLINA SAMANTA ADRIANA**

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

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

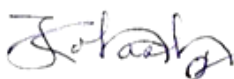
2011

La presente tesis titulada: “**Evaluación y cuantificación de las comunidades microbianas asociadas con las raíces micorrizadas de *Pinus montezumae* y *Pinus greggii***” realizada por la alumna: Samanta Adriana Reyes Molina bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
BOTÁNICA

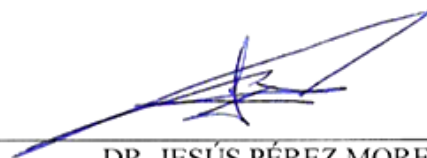
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. JOSUÉ KOHASHI SHIBATA

DIRECTOR  
DE TESIS



DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR



DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ

ASESOR



M. C. ANTONIO GARCÍA ESTEVA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio 2011

# **EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ASOCIADAS CON LAS RAÍCES MICORRIZADAS DE *Pinus montezumae* y *Pinus greggii***

Samanta Adriana Reyes Molina, M.C  
Colegio de Postgraduados, 2011

## **RESUMEN**

La ectomicorriza (ECM) es una simbiosis de enorme importancia estructural y funcional en los ecosistemas forestales boreales, templados y algunos tropicales. A su vez, la ECM establece relaciones simbióticas con diversos grupos de organismos dentro de los que se incluyen otros grupos microbianos, tales como hongos, bacterias y actinomicetos. Diversas investigaciones han determinado que el establecimiento, propagación y dinámica de los hongos ectomicorrízicos en las raíces de sus hospederos se encuentra influenciado por diversos microorganismos rizosféricos y de la micorrizósfera. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las comunidades microbianas asociadas con las ECMs establecidas entre *Pinus greggii* y *P. montezumae* y tres hongos ectomicorrízicos de los géneros *Laccaria*, *Hebeloma* y *Boletus*. Adicionalmente, se evaluó el efecto en diversas variables de crecimiento en los pinos citados como consecuencia de la inoculación. Para la evaluación de las comunidades microbianas de raíces ectomicorrizadas, o no, de ambas especies de pinos se eligieron al azar 24 plantas de las dos especies de pinos inoculadas con los hongos mencionados anteriormente. Mediante el método de dilución y conteo en placa se evaluaron las unidades formadoras de colonias de hongos, bacterias, actinomicetos totales, bacterias fijadoras de N y solubilizadoras de fosfatos. Para ello se utilizaron los medios de cultivo: Papa-Dextrosa-Agar, Agar nutritivo, Czapeck, Rennie y Picovskaya. Adicionalmente se evaluaron las poblaciones de bacterias endófitas de la raíz fijadoras de N y solubilizadoras de fosfatos en ambas especies de pino.

Se registraron variables de crecimiento como el número de acículas y fascículos así como de peso seco. Los resultados mostraron un efecto positivo como consecuencia de la inoculación ectomicorrízica, en términos de crecimiento vegetal, independientemente de la especie de hongo inoculado en relación a plantas no inoculadas. Adicionalmente se encontró que las poblaciones de hongos, bacterias y actinomicetos totales variaron dependiendo de las combinaciones entre especies vegetales y hongos ectomicorrízicos evaluados. Las bacterias fijadoras de N fueron abundantes en las dos especies de pino independientemente de las especies de hongos ectomicorrízicos inoculados. No se detectaron bacterias solubilizadoras de fosfatos, en *P. greggii* no inoculados mientras que las poblaciones fueron abundantes en árboles inoculados con las tres especies de hongos. Una tendencia distinta se observó en el caso de *P. montezumae* en donde se registraron poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato tanto para las plantas sin inocular como para las plantas inoculadas, sin embargo, las poblaciones fueron mayores en este último caso. Se registraron bacterias endófitas de la raíz para ambas especies de pinos, tanto de fijadoras de N como solubilizadoras de fosfato. A pesar de que esta investigación es seminal en México, es de interés señalar las grandes posibilidades potenciales para el desarrollo de investigaciones futuras más precisas desde el punto de vista de la importancia ecofisiológica y biotecnológica de los microorganismos de importancia funcional asociados con las ectomicorrizas.

**Palabras clave:** Bacterias promotoras del crecimiento vegetal, hongos ectomicorrízicos, colonización micorrízica.

**EVALUATION AND QUANTIFICATION OF MICROBIAL  
COMMUNITIES ASSOCIATED WITH MICORRHIZAL ROOTS OF  
*Pinus montezumae* and *Pinus greggii***

Samanta Adriana Reyes Molina, M.C  
Colegio de Postgraduados, 2011

**ABSTRACT**

The ectomycorrhiza has a key structural and functional importance in boreal, temperate and some tropical forest ecosystems. Additionally, the ectomycorrhizal symbiosis establishes simultaneously symbiotic relationships with different groups of organisms which include other microbial groups such as fungi, bacteria and actinomycetes. Research has determined that the formation, spread and dispersion of ectomycorrhizal fungi in the roots of their hosts is influenced by a range of rhizosphere and microorganisms mycorrhizosphere. The aim of this study was to evaluate the microbial communities associated with ectomycorrhizas established between *Pinus greggii* and *P. montezumae* and three ectomycorrhizal fungi of the genus *Laccaria*, *Hebeloma* and *Boletus*. Additionally, we evaluated the effect on growth variables in such trees as a result of inoculation. For the evaluation of the microbial communities on ectomycorrhizal roots, 24 plants were randomly selected in both species of pines inoculated and non-inoculated with the fungi mentioned above. By the method of dilution and plate count, colony forming units were assessed for fungi, bacteria, actinomycetes, total nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizing bacteria. For this purpose, we used the following solid culture media in plates: potato-dextrose- agar, nutrient agar, Czapeck, Rennie and Picovskaya. Additionally, we evaluated bacterial populations of the root endophytic N-fixing and phosphate solubilizing in both pine species. Growth variables were recorded as the number of needles and fascicles and dry weight.

The results indicated a positive effect on plant growth due to ectomycorrhizal inoculation, regardless of species of fungus inoculated relative to un-inoculated plants. Additionally, it was found that the populations of fungi, total bacteria and actinomycetes varied depending on the combinations of plants and ectomycorrhizal fungi tested. N-fixing bacteria were abundant in the two pine species regardless of ectomycorrhizal fungi species inoculated. We detected no phosphate solubilizing bacteria in non-inoculated *P. greggii* but populations were abundant in trees inoculated with the three species of fungi. A different trend was observed in the case of *P. montezumae* where there were populations of phosphate solubilizing bacteria in both non-inoculated plants and inoculated plants, however, stocks were higher in the latter case. Endophytic bacteria were recorded in the root for both species of pine, both N-fixing and phosphate solubilizing. Although this research is seminal in Mexico, it is of interest to note the great potential possibilities for the development of future, more accurate research from the ecophysiological and biotechnological points of view of the microbial communities of functional importance associated with mycorrhizae.

**Keywords:** Plant growth-promoting bacteria, ectomycorrhizal fungi, mycorrhizal colonization

*Esta tesis está dedicada especialmente a mis hermanos que **NO** tienen voz, que día a día sufren dolor y agonía en alguna calle de algún lugar del mundo soportando la indiferencia de millones de seres humanos.*

*Con todo mi reconocimiento*



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a DIOS por permitirme la oportunidad de poder concluir esta investigación.

Agradezco a mi familia: Papa, Lore, Bren, Brenducita, Roy y Dago. Gracias por el apoyo en cada paso de esta historia llamada "vida".

Agradezco al CONACyT por el apoyo que me otorgo durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Agradezco el Dr. Ebandro Uscanga Mortera por todo su apoyo que me brindo en mi estancia en el Colegio de Postgraduados, por mostrar su real preocupación con nosotros los alumnos, por el conocimiento compartido y su entrega mostrada a la ciencia.

Agradezco infinitamente al Dr. Josue Kohashi Shibata, por sus asesorías, por su entrega total en esta investigación, por compartir su gran conocimiento conmigo, por su plena atención, por su paciencia, por su dedicación en esta tesis.

Agradezco al Dr. Jesús Pérez Moreno por invitarme a participar en su proyecto de investigación, enseñarme una nueva forma de ver a la ciencia, por sus asesorías y su tiempo.

Agradezco al Dr. Juan José Almaraz Suarez, por compartir su conocimiento, por toda su paciencia mostrada en el transcurso de la investigación, por todas las asesorías, por todo el tiempo que me apoyo en mi estancia en el laboratorio.

Agradezco al Maestro en Ciencias Antonio García Esteva, por su comprensión, su dedicación, su tiempo, por compartir conmigo su conocimiento, por su paciencia, por su excelente carácter y forma de transmitir el conocimiento.

Gracias al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato y Alejandro Alarcón, por compartir su conocimiento en sus cursos impartidos, por permitirme trabajar en el laboratorio de Fijación de Nitrógeno.

Gracias a todo el equipo que conforma el Laboratorio de Fijación de Nitrógeno, y todo su apoyo durante mi estancia en él.

Agradezco a mis compañera(o)s que me ayudaron con mi investigación, a Magdalena Reyes, Violeta Carrasco, Jesús Torres e Iris Galvan.

Agradezco a mis hermosos Angelitos Caninos: Crayzy, Fido, Dalí, Van Gogh, Rodin, Garfield, Negra, Camila, Alfa, Beta, Gamma, Epsilon, Bombon, Monet, Degas, Matisse, Magritte, Onca, Gauguin, Cezanne, Katara, Diamanda, Vaquero, Saratí, Calabacita, Snoopy, Colmillo, el pequeño Jacke, Alice, Fisgón y a mi alfa Gala, por la mejor enseñanza en la vida y la mejor amistad del mundo. GRACIAS;



## ÍNDICE GENERAL

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>RESUMEN</b> - - - - -   | iii           |
| <b>ABSTRACT</b> - - - - -  | v             |
| <b>ÍNDICE GENERAL</b> - - - - -  | vii           |
| <b>ÍNDICE DE CUADROS</b> - - - - -   | ix            |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> - - - - -   | x             |
| <br>   |               |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> - - - - -   | 1             |
| <br>   |               |
| <b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> - - - - -  | 3             |
| <br>   |               |
| <b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> - - - - -   | 5             |
| 3.1 La microbiota edáfica - - - - -  | 5             |
| 3.1.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal - - - - -                   | 6             |
| 3.1.2 Bacterias auxiliares de la micorrización - - - - -                           | 7             |
| 3.1.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno - - - - -                                   | 10            |
| 3.1.4 Microorganismos solubilizadores de fosfatos - - - - -                        | 11            |
| 3.1.5 Actinomicetos - - - - -  | 12            |
| 3.1.6 Hongos filamentosos - - - - -  | 12            |
| 3.2 Hongos ectomicorrízicos - - - - -  | 13            |
| 3.2.1 <i>Boletus edulis</i> s.l - - - - -  | 13            |
| 3.2.2 <i>Hebeloma mesophaeum</i> (Pers.) Qué. s.l - - - - -                        | 14            |
| 3.2.3 <i>Laccaria laccata</i> s.l - - - - -  | 15            |
| 3.3 Características de las ectomicorrizas - - - - -                                | 16            |
| 3.3.1 Red de Hartig - - - - -  | 17            |
| 3.3.2 Manto fúngico - - - - -  | 17            |
| 3.3.3 Micelio externo - - - - -  | 18            |
| 3.3.4 Ectomicorrizas, morfotipos y especies - - - - -                              | 22            |
| 3.3.5 Asociación simbiótica entre hongos ectomicorrízicos y <i>Pinus</i> - - - - - | 24            |
| 3.4 Descripción del género <i>Pinus</i> - - - - -                                  | 24            |
| 3.4.1 Descripción de <i>Pinus montezumae</i> Lamb - - - - -                        | 25            |
| 3.4.2 Descripción de <i>Pinus greggii</i> - - - - -                                | 26            |
| 3.5 Variables de crecimiento y su importancia - - - - -                            | 27            |
| 3.5.1 Altura de planta y diámetro basal del tallo - - - - -                        | 28            |
| 3.5.2 Peso seco de raíz y de vástago - - - - -                                     | 29            |
| 3.5.3 Número de acículas - - - - -   | 29            |
| 3.5.4 Índice de esbeltez - - - - -   | 29            |
| 3.5.5 Índice de Calidad de Dickson (ICD) - - - - -                                 | 29            |
| 3.5.6 Relación raíz-vástago - - - - -  | 31            |
| <br>   |               |
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   |               |

#### **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 4.1 Material biológico  | - | - | - | - | - | - | - | - | 32 |
| 4.2 Preparación del inóculo e inoculación                     | - | - | - | - | - | - | - | - | 32 |
| 4.3 Evaluación de poblaciones microbianas en rizósfera        | - | - | - | - | - | - | - | - | 33 |
| 4.4 Evaluación de poblaciones microbianas en raíces endófitas | - | - | - | - | - | - | - | - | 33 |
| 4.5 Variables de crecimiento evaluadas                        | - | - | - | - | - | - | - | - | 35 |
| 4.6 Índice de esbeltez  | - | - | - | - | - | - | - | - | 37 |
| 4.7 Índice de calidad de Dickson (ICD)                        | - | - | - | - | - | - | - | - | 37 |
| 4.8 Evaluación ectomicorrízica y caracterización morfológica  | - | - | - | - | - | - | - | - | 37 |
| 4.9 Análisis estadístico                                      | - | - | - | - | - | - | - | - | 38 |

#### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

|  |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 5.1 Bacterias totales                                    | - | - | - | - | - | - | - | - | 39 |
| 5.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno                     | - | - | - | - | - | - | - | - | 41 |
| 5.3 Microorganismos solubilizadores de fosfatos          | - | - | - | - | - | - | - | - | 42 |
| 5.4 Actinomicetos  | - | - | - | - | - | - | - | - | 43 |
| 5.5 Hongos filamentosos                                  | - | - | - | - | - | - | - | - | 44 |
| 5.6 Bacterias endófitas                                  | - | - | - | - | - | - | - | - | 46 |
| 5.7 Variables de crecimiento de la planta                | - | - | - | - | - | - | - | - | 48 |
| 5.7.1 Longitud y diámetro basal del tallo                | - | - | - | - | - | - | - | - | 48 |
| 5.7.2 Número de fascículos y de acículas frescas y secas | - | - | - | - | - | - | - | - | 48 |
| 5.7.3 Peso seco de órganos                               | - | - | - | - | - | - | - | - | 50 |
| 5.8 Relación raíz-vástago                                | - | - | - | - | - | - | - | - | 53 |
| 5.9 Índice de esbeltez                                   | - | - | - | - | - | - | - | - | 53 |
| 5.10 Índice de Calidad de Dickson (ICD)                  | - | - | - | - | - | - | - | - | 53 |
| 5.11 Porcentaje de colonización micorrízica              | - | - | - | - | - | - | - | - | 57 |

|                        |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| <b>6. CONCLUSIONES</b> | - | - | - | - | - | - | - | - | 58 |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

|                             |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| <b>7. LITERATURA CITADA</b> | - | - | - | - | - | - | - | - | 60 |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

|                  |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| <b>8. ANEXOS</b> | - | - | - | - | - | - | - | - | 72 |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

## ÍNDICE DE CUADROS

|  | <b>Páginas</b> |
|--|----------------|
| <b>Cuadro 5.1</b> Resultados de comparación de poblaciones de microorganismos aislados de la rizósfera, plantas de <i>Pinus montezumae</i> y <i>P. greggii</i> - - - -   | 45             |
| <b>Cuadro 5.2</b> Comparación de poblaciones de microorganismos aislados de las raíces endófitas, plantas de <i>Pinus montezumae</i> - - - - -   | 47             |
| <b>Cuadro 5.3</b> Respuesta de la inoculación con los hongos ectomicorrízicos en las variables de crecimiento de <i>Pinus montezumae</i> y <i>Pinus greggii</i> - - - -  | 49             |
| <b>Cuadro 5.4</b> Peso seco ( $\text{g pl}^{-1}$ ) de diferentes estructuras en plantas de dos especies de pino inoculadas con diferentes cepas de hongos ECM y su testigo no inoculado -                                | 51             |
| <b>Cuadro 5.5</b> Relación raíz-vástago, Índice de Calidad de Dickson e Índice de esbeltez en <i>P. montezumae</i> y <i>P. greggii</i> inoculados con diferentes cepas de hongos ECM y su testigo no inoculado - - - - - | 54             |
| <b>Cuadro 5.6</b> Porcentaje de colonización micorrízica de <i>P. montezumae</i> y <i>P. greggii</i> inoculados con diferentes cepas de hongos ECM y su testigo no inoculado -   | 56             |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Páginas |
|---|---------|
| <b>Figura 3.1</b> Imagen de <i>Boletus edulis</i> s.l - - - - -   | 14      |
| <b>Figura 3.2</b> Imagen <i>Hebeloma mesophaeum</i> (Pers.) Quél. s.l - - -   | 15      |
| <b>Figura 3.3</b> Imagen de <i>Laccaria laccata</i> s.l - - - - -   | 16      |
| <b>Figura 3.4.</b> Corte transversal de la raíz ectomicorrizada de la simbiosis <i>Pinus ponderosa</i> asociada a <i>Hebeloma crustuliniforme</i> - - - - - | 18      |
| <b>Figura 4.1.</b> Imagen de un fascículo con tres acículas - - - - -   | 36      |
| <b>Figura 5.1</b> Grafico de peso seco del vástago de <i>P. greggii</i> - - - - -   | 52      |
| <b>Figura 5.2</b> Grafico de peso seco del vástago de <i>P. montezumae</i> - - - - -  | 52      |
| <b>Figura 5.3</b> a) Colonias de bacterias expresadas en placas de Agar nutritivo -   | 55      |
| b) Bacterias solubilizadoras de fosfatos, expresadas en placas con medio de Picovskaya  | 55      |
| c) Plantas de <i>Pinus montezumae</i> inoculadas con <i>Boletus edulis</i> - - - - -  | 55      |
| d) Plantas de <i>Pinus greggii</i> inoculadas con <i>Boletus edulis</i> - - - - -   | 55      |
| e) Raíz ectomicorrizada de <i>Pinus montezumae</i> inoculada con <i>Hebeloma mesophaeum</i>   | 55      |
| f) Raíz ectomicorrizada de <i>Pinus greggii</i> inoculada con <i>L. laccata</i> - - - - -   | 55      |

# 1. INTRODUCCIÓN

Las zonas forestales de clima templado-frío en México presentan características climáticas y edáficas aptas para la producción de hongos ectomicorrízicos (ECM). En México se ha estimado que la diversidad fúngica es mayor de 20 000 especies y sólo el 4% es conocida (Estrada-Martínez *et al.*, 2009). La simbiosis se establece principalmente entre angiospermas y gimnospermas, con hongos principalmente del grupo de los Basidiomicetos y Ascomicetos (Buscot *et al.*, 2000, Pérez-Moreno y Read, 2004, Futai *et al.*, 2008). Los hongos ECM son esenciales para la conservación y supervivencia de árboles como los de la familia Pinaceae (Marmeisse, 2004). Recientemente en algunos viveros se han empezado a utilizar hongos ectomicorrízicos con el propósito de incrementar la supervivencia y las tasas de crecimiento de los pinos en el vivero y en el campo. En México existe poca investigación al respecto, aun cuando la utilización de especies de rápido crecimiento como es el caso de *P.greggii* en simbiosis con hongos ectomicorrízicos comestibles podría ser trascendente en la recuperación de áreas deforestadas (Carrera-Nieva y López-Ríos, 2004). El establecimiento de la simbiosis entre los hongos ectomicorrízicos y las raíces de los pinos también está afectado por otros microorganismos de la rizósfera, especialmente por bacterias, que promueven el desarrollo de las micorrizas. De aquí surge el concepto de micorrización auxiliada por bacterias (MBHs) (Garbaye, 1994). En la rizósfera algunas bacterias fijan el N<sub>2</sub> simbiótica o asociativamente, otras son importantes en la conversión del N de compuestos orgánicos a formas inorgánicas (NH<sub>4</sub> y NO<sub>3</sub>). Es relevante la aptitud de algunas bacterias rizosféricas para disolver fosfatos insolubles (nativo y aplicado) mediante ácidos orgánicos, mientras que otras son más activas en la liberación del fosfato de compuestos orgánicos mediante enzimas fosfatasas (Vega, 2007). Las rizobacterias

promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), son bacterias de vida libre presentes en el suelo, capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de las plantas, afectando (negativa o positivamente) o no su crecimiento (Glick *et al.*, 1999).

En la silvicultura algunas RPCV, están siendo utilizadas para mejorar e incrementar el crecimiento. En el caso de los hongos ectomicorrízicos. La inoculación con *Pisolithus tinctorius* de plantas de caoba oscura mejoran la sobrevivencia de plantas. La inoculación conjunta de RPCV y ECM podría incrementar más el crecimiento de plantas forestales en vivero y mejorar la supervivencia y desarrollo de los árboles en las áreas reforestadas. Sin embargo, en México el estudio de RPCV en plantas forestales es incipiente, particularmente en torno a su papel como bacterias que auxilian a los hongos micorrízicos. En el presente trabajo se evaluaron las poblaciones microbianas que crecen asociadas a las ectomicorrizas de dos especies de pino y el efecto de la inoculación de hongos ectomicorrízicos en el crecimiento de las plantas el crecimiento, la reforestación de sitios, y la tolerancia a la sequía (Madigan, 2001).

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### Objetivo general

Evaluar las comunidades microbianas de importancia en la translocación nutrimental asociadas con raíces ectomicorrízicas de *Pinus montezumae* y *P. greggii*, inoculadas previamente con los hongos simbios: *Laccaria laccata* s.l., *Hebeloma mesophaeum* s.l. y *Boletus edulis* s.l. y relacionarlas con el crecimiento de ambas especies de pinos en condiciones de invernadero.

### Objetivos particulares

- Cuantificar las comunidades microbianas totales de: bacterias totales, bacterias fijadoras de nitrógeno, microorganismos solubilizadores de fosfatos, actinomicetos y hongos filamentosos en raíces micorrizadas y no micorrizadas.
- Evaluar la respuesta, en términos de crecimiento, que presentan dos especies de pino (*Pinus montezumae* y *P. greggii*) a la inoculación de tres especies de hongos ectomicorrízicos (*Laccaria laccata*, *Hebeloma mesophaeum* y *Boletus edulis*) en invernadero.

### **Hipótesis general**

Existe mayor abundancia de microorganismos, particularmente de grupos funcionales bacterianos de importancia en la translocación nutrimental, asociados con las raíces micorrizadas de *Pinus montezumae* y *P. greggii*, que de microorganismos asociados con las raíces de plantas no micorrizadas.

### **Hipótesis particulares**

- Existe una mayor abundancia de poblaciones microbianas totales de: hongos filamentosos, bacterias y actinomicetos, asociadas con las raíces micorrizadas de *Pinus montezumae* y *P. greggii*, en comparación con las comunidades asociadas con raíces de plantas no micorrizadas.
- La inoculación con hongos ectomicorrizicos favorece el crecimiento de las plantas de *Pinus montezumae* y *P. greggii* en diferente grado según la especie.



### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 La microbiota edáfica

La microbiota edáfica es responsable de muchos procesos que son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas, como son: la transformación de elementos minerales (P, Ca, Fe, Mn, entre otros), supresión de algunas enfermedades de las plantas, mineralización de la materia orgánica, disponibilidad de nutrientes, síntesis de compuestos orgánicos, fijación biológica de N<sub>2</sub> y degradación de compuestos contaminantes del suelo (Gómez y Corlay 2007), además participan en el ciclo de nutrientes y agregación de partículas (Silva *et al.*, 2009).

Los microorganismos del suelo, influyen en los procesos del crecimiento de la planta, incluyendo el crecimiento de las raíces que pueden afectar de manera local la química de la rizósfera, mediante la exudación de carbono, la excreción y absorción de iones.

El crecimiento de las plantas en asociación con microorganismos del suelo de vida libre puede ser alterado por la presencia de organismos simbióticos que colonizan las raíces de las plantas, tales como los hongos ECM. Los hongos ECM pueden influenciar comunidades microbianas alterando la fisiología y morfología de la raíz, y ésta a su vez afecta la rizósfera y altera la cantidad y calidad del carbono que se deposita en ésta. Los tipos de micorriza y el micelio vegetativo, representan un nicho idealmente adecuado para el crecimiento de las bacterias asociadas. La colonización micorrízica puede también alterar la tensión de oxígeno, humedad y pH del suelo y la disponibilidad de los nutrientes (Hawkes, 2003).

Pérez-Moreno y Read (2007) sugirieron que las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> pueden estar asociadas con micorrizas, específicamente en la micorrizósfera de los árboles del bosque, y que la finalidad de esta asociación, puede contribuir de manera significativa al suelo, hongos y plantas.

### **3.1.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

De acuerdo con Gómez y Corlay (2007) “las bacterias son los organismos menos evolucionados, de menor complejidad estructural y los más pequeños. Carecen de una membrana nuclear que aisle el material genético del resto de los componentes celulares, por lo cual se conocen como procariotas. Son organismos unicelulares con forma esférica, cilíndrica o en espiral. La mayoría de las bacterias del suelo son gramnegativas, con dimensiones variables y peso aproximado de 10<sup>-12</sup>g”. En la rizósfera se pueden encontrar bacterias: fijadoras de nitrógeno, promotoras del crecimiento vegetal, solubilizadoras de fosfatos y patógenas”.

Según Bashan *et al.*, (2007) “las bacterias promotoras de crecimiento en plantas son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y la productividad vegetal. Entre los organismos más conocidos están las especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum*. Las RPCV pueden clasificarse en dos grupos: a) bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo a otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el

metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y de minerales), mejorando el desarrollo radical, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas, b) bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos”.

Lucas García *et al.*, (2004) investigaron *in vitro* cuatro cepas de bacterias (*Enterobacter intermedius*, *Pseudomonas fluorescens*, *Chryseobacterium balustinum*, y *Phosphorobacillus latus*) en plantas de encino (*Quercus ilex* ssp. *Ballota*) y pino (*Pinus pinea*) en condiciones de vivero en un bosque. Todas las cepas aumentaron la longitud del tallo, diámetro del cuello y peso seco. El diámetro del cuello de la raíz mostró en general el menor aumento. Se observó una interacción planta-cepa bacteriana. Algunas cepas aumentaron los parámetros de crecimiento de la parte aérea en ambas especies de plantas, mientras que otras cepas lo hicieron principalmente en una sola especie.

### **3.1.2 Bacterias auxiliares de la micorrización**

Garbaye (1994) acuñó el término “bacterias auxiliares de la micorrización” (MHBs por sus siglas en inglés) para referirse a la asociación de bacterias que de manera consistente favorecen el desarrollo de las micorrizas y que mejoran el crecimiento de las plantas y considera cinco hipótesis de mecanismos cuyo efecto está implicado en la especificidad fúngica de algunos MHBs.

Founoune *et al.*, (2002) reportaron inoculación exitosa de bacterias auxiliares de las micorrizas para promover el establecimiento de los hongos micorrízicos en *Acacia* y el crecimiento de las plantas, y señalan que este tipo de rizobacterias pueden tener gran importancia ecológica en áreas tropicales a través de su utilización en los programas de reforestación. Por lo tanto, la combinación de los dos tipos de organismos (micorrizas y RPCV) en un biofertilizante podría ser de enorme interés para la producción de plantas en viveros (Barriuso *et al.*, 2005).

Barbieri *et al.*, (2007) estudiaron la diversidad de comunidades de bacterias asociadas con los ascocarpos de *Tuber magnatum* e identificaron los grupos predominantes de bacterias durante la maduración de las trufas. Sus resultados de la secuenciación del rDNA 16S mostraron que la mayor parte de las bacterias asociadas a los ascocarpos pertenecían al grupo  $\alpha$ -*Proteobacteria* (más de 80%), mientras que los otros grupos como  $\beta$ -*Proteobacteria*,  $\gamma$ -*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* estuvieron pobremente representados, esto independientemente del grado de maduración de las trufas.

Barriuso *et al.*, (2008) estudiaron la capacidad de diez rizobacterias para incrementar el crecimiento de *Pinus pinea* y la micorrización; observaron que casi todas las cepas afectaron positivamente el crecimiento y encontraron que una de las cepas bacterianas ensayadas fue la mejor en promover la simbiosis ectomicorrízica, y sugieren que ésta es una buena candidata para ser utilizada en la producción de un biofertilizante bacteriano dirigido a incrementar el crecimiento del pino y su micorrización, lo cual podría resultar en una mejor tasa de establecimiento de las plantas usadas en reforestación. Estos investigadores concluyen que existe cierta especificidad entre bacterias inoculadas y las

micorrizas que la planta selecciona, implicando un uso potencial de la biotecnología en la producción de hongos con valor añadido.

Los resultados de Barriuso *et al.*, (2005) sugieren que *Pinus pinaster*, selecciona para bacterias de la micorrizósfera que movilizan nutrientes, mientras que *P. pinea* selecciona para bacterias que tienen la capacidad de incrementar el crecimiento de la raíz mediante la producción de reguladores del crecimiento vegetal.

Zhang *et al.*, (2010) investigaron los efectos de inoculación con tres especies de hongos ectomicorrízicos, en la biomasa microbiana y diversidad funcional de comunidades microbianas en la rizósfera de plántulas de pino Chino (*Pinus tabulaeformis* Carr.) en condiciones experimentales de campo. Los resultados mostraron que la inoculación con hongos ectomicorrízicos incrementaron significativamente la colonización ectomicorrízica comparados con las plántulas que no fueron inoculadas. Las inoculaciones con hongos ectomicorrízicos tuvieron una alta biomasa microbiana del suelo respecto del testigo. Además encontraron que los tratamientos inoculados presentaron los índices más altos de diversidad funcional con respecto a los testigos.

La importancia de la asociación bacteriana con las raíces micorrizadas, se ha destacado en la identificación de micorrizas y de bacterias que ayudan a mejorar el crecimiento de las plantas, y en la identificación de la diversidad de grupos de bacterias como  $\alpha$ -proteobacteria y  $\beta$ -proteobacteria, que pueden asociarse con la micorrizosfera de árboles forestales, en donde se puede tener una estrecha relación entre las micorrizas y bacterias fijadoras de  $N_2$ , cuya importancia funcional radica en que pueden contribuir significativamente a las entradas de nitrógeno al suelo (Khetmalas *et al.*, 2002).

### **3.1.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno**

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso clave en la biosfera, por el cual, microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado (D'Haeze *et al.*, 2002).

La FBN la llevan a cabo diversos microorganismos procariotes que viven libres en el suelo o que establecen simbiosis con las raíces de las plantas formando nódulos. Se estima que ambos grupos fijan anualmente entre 140 y 175 millones de toneladas de nitrógeno (Almaraz y Ferrera-Cerrato, 2007).

Las bacterias diazotróficas puede desempeñar un papel importante en la rehabilitación y la sostenibilidad de los ecosistemas, ya que incorporan nitrógeno a través de la fijación biológica y producen y liberan sustancias que regulan el crecimiento de las plantas, tales como las auxinas, giberelinas y citocininas (Neroni *et al.*, 2007).

La fijación de nitrógeno por los microorganismos de vida libre podría ser la principal fuente de entrada de N en el suelo. Además de afectar el crecimiento de plantas mediante el suministro de nitrógeno, algunas bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> pueden producir hormonas como las auxinas que fomentan el crecimiento vegetal (Sprent, 2005).

### **3.1.4 Microorganismos solubilizadores de fosfatos**

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos (PSMs por sus siglas en inglés) son ubicuos en los suelos y pueden jugar un papel importante en el suministro de P a la planta. Aún cuando la solubilización de los compuestos de fósforo por los microorganismos es muy común bajo condiciones de laboratorio, los resultados en campo son muy variables. Esta variabilidad ha dificultado el uso masivo de los PSMs en la agricultura (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Se estima que los PSMs pueden mejorar el crecimiento de las plantas mediante el incremento de la eficiencia en la fijación biológica del nitrógeno, el incremento de la disponibilidad de otros elementos traza, tales como Fe y Zn y a través de la producción de sustancias promotoras del crecimiento (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Los PSMs que participan en la solubilización de fosfatos, fueron conocidos tempranamente en 1903. Desde entonces, han sido estudiados de manera extensiva en la solubilización de fosfatos minerales. Los organismos involucrados en la solubilización de fosfatos inorgánico (PSMs) son ubicuos y sus números varían de suelo a suelo. En el suelo las bacterias solubilizadoras de fosfato constituyen del 1-50% y los hongos solubilizadores de 0.5%-0.1% del total de la población respectiva. En general, el número de bacterias solubilizadoras de fosfato duplica la cantidad de hongos solubilizadores. La mayoría de los PSMs solubilizan las moléculas complejas de fosfato con el Ca y pocos pueden solubilizar los fosfatos de Fe y Al.

Mientras que los PSMs pueden ser efectivos en suelos calcáreos en donde los complejos de Ca-P están presentes, estos son ineficientes en otros suelos como alfisoles, en donde los fosfatos son completamente fijados con iones de Fe y Al. Por lo tanto, los PSMs pueden ser efectivos si estos suelos son suplementados con roca fosfato (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

### **3.1.5 Actinomicetos**

Según Gómez y Corlay (2007) “existe un gran grupo de microorganismos relacionados con las bacterias en sus características químicas, pero son más complejos en su morfología al formar filamentos a manera de micelios además de esporas. En los actinomicetos, se incluyen desde organismos unicelulares hasta formas ramificadas que semejan estructuras miceliales rudimentarias. En cuanto al pH, muchos son activos en pH mayores que 5.0, con algunas excepciones”.

En el suelo, su proporción es menor que la de las bacterias pero en mayor número que la de los hongos, con rangos estimativos entre  $1.0 \times 10^5$  y  $1.0 \times 10^8$  por gramo de suelo seco, en zonas templadas y considerando la viabilidad de las esporas. Pero si se toma en cuenta la biomasa, la que proporcionan los hongos es mayor que la de actinomicetos. Sin embargo estos últimos representan una parte considerable en la vida microbiana del suelo (Gray y Williams, 1971 citados por Gómez y Corlay 2007).

### **3.1.6 Hongos filamentosos**

Gómez y Corlay (2007) indican que “los hongos son organismos con núcleo bien diferenciado (eucariotes), pueden ser mucilaginosos o filamentosos, el conjunto de filamentos llamadas hifas forman el micelio. Las hifas están rodeadas de pared celular que contiene celulosa y a menudo quitina. Todos son aclorofílicos, requieren materia orgánica



preformada para su nutrición, la cual obtienen por absorción, ayudados por las secreciones de enzimas extracelulares. Son organismos que se reproducen sexual y asexualmente con la producción de esporas”. Estas mismas autoras señalan que los hongos son microorganismos unicelulares, como las levaduras y los quitridiomicetos, o bien pluricelulares, como sucede en la mayoría de los hongos.

### **3.2 Hongos ectomicorrízicos**

Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre los hongos especializados y las raíces finas de la mayoría de las especies de plantas superiores (Smith y Read, 1997). Las micorrizas pueden producir su efecto benéfico mediante la ampliación de la principal área de absorción del sistema radical, es decir, el aumento de la absorción de nutrientes en la planta, en particular, el fósforo. Por esta razón, en el contexto de la mejora de la tasa de supervivencia de las plántulas al ser trasplantadas a áreas deforestadas, estimular el establecimiento y desarrollo de las micorrizas es de gran interés. Algunas de las micorrizas del tipo ectomicorrízico, forman setas comestibles, que son algunos de los alimentos más caros del mundo, con un mercado mundial que se mide en miles de millones de dólares (Barriuso *et al.*, 2005).

#### **3.2.1 *Boletus edulis* s.l.**

Píleo de 50 a 70 mm de diámetro, convexo, de color café ladrillo. Superficie lisa, brillante, húmeda. Contexto sólido de color blanco, no cambia al ser expuesto. Unión del contexto homogéneo. Himenóforo formado por tubos y poros de 6 a 11 mm de largo, de color café-oliváceo claro, no cambian de color al ser expuestos, poros cubiertos con una especie de polvo blanco. Estípites de 70 a 100 x 26 a 35 mm, cilíndrico, central, de color

blanquecino. Contexto sólido-esponjoso, de color blanco, no cambia al ser expuesto. Esporas de 11 a 18 x 4 a 5.5  $\mu\text{m}$  fusiformes a elípticas. Asociado con *Pinus* spp. (Pérez-Moreno *et al.*, 2010) (Figura 3.1).



**Figura 3.1** *Boletus eduliss.l.*

### **3.2.2** *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. s.l.

Píleo de 25 a 44mm de diámetro, convexo en estadios jóvenes y plano en adultos, de color crema a café claro, más atenuado en el centro. Margen enrollado en ejemplares jóvenes y rectos en adultos. Borden del margen liso. Superficie subviscosa con brillo mate. Himenóforo lamelado, láminas sinuadas, muy juntas, de color café-chocolate, más intenso que el color de píleo. Estípite de 30-54 x 7-9mm, cilíndrico subulboso, central, de color blanco-cremoso. Consistencia cartilaginosa. Contexto solido de color blanco crema, no cambia de color al ser expuesto, con reminiscencias (Peréz-Moreno *et al.*, 2010).



**Figura 3.2** *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. s.l. Tomado de Jordan (2004)

### **3.2.3** *Laccaria laccata* s.l.

Este hongo es muy abundante y esta circunstancia suple a su pequeñez. El casquete mide 2.5 a 5 cm de diámetro, y el tallo de 5 a 8 cm de altura. El hongo todo es de color de almagre o rojo indio, más intenso en el casquete que en las hojuelas y el tallo. El casquete es su forma ondulado o escarolado, y el tallo tiene fibras enrolladas en torzal. Las hojuelas son muy anchas y separadas, teniendo a veces adheridas las esporas blancas, lo cual hace al hongo pulverulento o harinoso. Aunque sano y comestible, este hongo es pobre en olor y sabor (Tablada, 1983) (Figura 3.2).



**Figura 3.3** *Laccaria laccata* s.l. tomado de Miller y Miller (2006)

### **3.3 Características de las ectomicorrizas**

El hongo provee a la planta de nutrimentos minerales, principalmente nitrógeno y fósforo., además de que le proporciona agua, hormonas y protección contra agentes patógenos y factores ambientales extremos. A su vez, la planta le confiere al hongo los carbohidratos que requiere para su desarrollo, así como algunas vitaminas. Los hongos ectomicorrízicos se encuentran entre los elementos más conspicuos de las microbiotas de zonas templadas; en la actualidad más de 5000 especies del mundo. En México, se conocen más de 550 especies de hongos potencialmente ectomicorrizógenicas, aunque hay fuertes evidencias de que este número dista todavía mucho de los valores reales (Estrada, 2007).

Los componentes estructurales de la simbiosis ectomicorrízica incluyen:

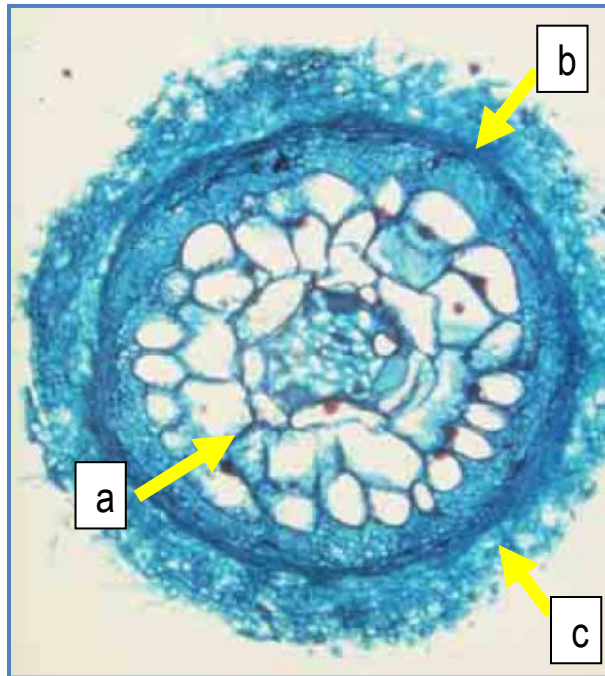
- a) las raíces modificadas que contienen tejidos vegetales fúngicos
- b) las estructuras fúngicas reproductivas
- c) micelio externo que incluye hifas absorbentes cordones miceliales y rizomorfos.

### **3.3.1 Red de Hartig**

Los hongos ectomicorrízicos establecen asociaciones con plantas formando una envoltura (manto) alrededor de la raíz que crece internamente entre las células de la raíz de la corteza construyendo la Red de Harting, incrementando la superficie del área para la absorción del agua y nutrientes (Figura 4) (Pérez-Moreno, 2007). Es el lugar de masivos intercambios bidireccionales de nutrientes. Por otra parte, la planta hospedera asigna una significativa cantidad de fotosintatos (en un rango de 10-20%) a los hongos simbios que ayudan casi completamente a su metabolismo, al crecimiento y a la formación de cuerpos fructíferos. Los hongos transfieren a las plantas nutrientes esenciales, principalmente moléculas de N, P y K, las cuales son absorbidos por la hifa extraradical (Marmeisse *et al.*, 2004).

### **3.3.2 Manto fúngico**

El hongo cubre las raíces cortas formando un manto o vaina. Las hifas crecen de este manto hacia afuera en el sustrato y hacia dentro entre los espacios intersticiales de las células corticales de la raíz (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Corte transversal de la raíz ectomicorrizada de la simbiosis *Pinus ponderosa* asociada a *Hebeloma crustuliniforme*. Donde se observan las estructuras de la ectomicorriza: a) Red de Hartig, b) Manto fúngico y c) Micelio externo. Tomada de Castellano y Molina (1989).

### 3.3.3 Micelio externo

De acuerdo con Chalot *et al.*, (2002) “Una de las funciones más importantes de dicho micelio es conectar plantas en la naturaleza. Debido a su habilidad para: 1) absorber y transportar nutrientes minerales y orgánicos, un papel comparable desde el punto de vista ecológico al de los hongos saprofitos; 2) iniciar asociaciones ectomicorrízicas al contactar hospederos jóvenes; 3) funcionar como propágulo fúngico al ser separado por (modificaciones físicas de los suelos) de los arboles asociados; 4) iniciar la formación de cuerpos fructíferos como primordios; 5) conectar arboles de la misma o diferente especie de la naturaleza. Tiene la habilidad para movilizar nutrientes del suelo. A pesar de esto y como fue señalado por Read (1992), la estructura, función y hasta la presencia de este componente han sido frecuentemente ignoradas. La principal razón de este hecho pudiera ser que, comparado con los otros componentes de la simbiosis ECM, el micelio externo es

la parte más difícil de examinar y manipular experimentalmente de un modo no destructivo. El transporte de nutrientes, es decir, la absorción de la solución del suelo, así como la transferencia de nutrientes del hongo a la planta y el carbono en movimiento de la planta a los hongos son las principales características de la simbiosis micorrizica”.

Los hongos ectomicorrizicos también están asociados simbióticamente con microorganismos cuya importancia ecológica ha sido demostrada repetidamente. Existe una cantidad considerable de investigaciones destinadas a evaluar la capacidad de los hongos ectomicorrizicos y ectomicorrizas que utilizan fuentes orgánicas de nitrógeno. El destino de las proteínas del suelo, péptidos y aminoácidos se ha estudiado desde varios puntos de vista. Se han detectado y caracterizado enzimas hidrolíticas exocelulares en una serie de hongos ectomicorrizicos y ericoides. Los estudios sobre el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática han demostrado la capacidad de los hongos ectomicorrizicos para emplear los productos de la actividad proteolítica. Las investigaciones sobre el metabolismo intracelular de aminoácidos ácidos, han permitido la identificación de las vías metabólicas implicadas. La inmunocitoquímica se emplea para examinar las posibles compartimentaciones intracelulares de aminoácidos ácidos. Además, la translocación de aminoácidos en los tejidos simbióticos se ha establecido mediante experimentos con trazadores isotópicos, aunque la naturaleza exacta de los compuestos nitrogenados transferidos en la interfaz simbiótica sigue sin estar clara. Uno de los principales retos a futuro en la fisiología de la adquisición de nitrógeno orgánico es determinar la naturaleza, regulación y ubicación de los transportadores de N-compuesto en el suelo-hongo y las interfaces de plantas a los hongos. El enfoque molecular que está surgiendo en este ámbito de investigación en particular mejorará en gran medida nuestro



conocimiento. Las investigaciones futuras también deberían abordar el alcance de la competencia por nitrógeno orgánico entre diferentes especies y entre las diferentes poblaciones microbianas y de hongos ectomicorrízicos (Chalot y Brun 1998).

Los hongos ectomicorrízicos se asocian en simbiosis con las raíces de los árboles y a menudo mejoran la absorción de nutrientes minerales del suelo. Son especialmente importantes en la absorción de N, aunque se ha reportado que mejoran la absorción de P de en las asociaciones con plantas, ya que poseen la propiedad de solubilizar P. Así mismo tienen la capacidad de utilizar el P a partir de los fosfatos de inositol y poseen actividad fosfatasa, lo cual puede afectar su aptitud para liberar P de la materia orgánica del suelo y solubilizar dicho elemento (Koide y Schreiner, 1992).

Según Selosse *et al.*, (2006) “una red de micorrizas común se forma cuando los micelios de hongos colonizan y conectan las raíces de dos o más plantas, a veces de diferentes especies. En condiciones naturales, estas redes pueden afectar la fisiología y la ecología de las plantas, facilitando el intercambio de nutrientes entre plantas y actuando como reservorios de inóculos para las plántulas alterando las aptitudes competitivas de la planta. Aunque los mecanismos para su evolución siguen sin estar claros, la investigación de estas redes modifica profundamente nuestro entendimiento de comunidades de plantas”.

Los hongos ectomicorrízicos producen ácidos orgánicos que pueden acelerar probablemente la solubilización de las rocas, mejorando así la disponibilidad de nutrientes para la absorción por las plantas. Las raíces de las plantas, también realizan la liberación de ácidos orgánicos en la rizósfera e inducen los procesos de meteorización de rocas



minerales. Así, los procesos combinados de meteorización o de las plantas y los microbios del suelo pueden ser importantes para la supervivencia y el establecimiento de estas plantas en suelos limitados de nutrientes del ecosistema, mejorando así la productividad de los bosques (Yamanaka *et al.*, 2003).

Los hongos ectomicorrízicos también están asociados simbióticamente con microorganismos cuya importancia ecológica ha sido demostrada repetidamente. Existe una cantidad considerable de investigaciones destinadas a evaluar la capacidad de los hongos ectomicorrízicos y ectomicorrizas que utilizan fuentes orgánicas de nitrógeno. El destino de las proteínas del suelo, péptidos y aminoácidos se ha estudiado desde varios puntos de vista. Se han detectado y caracterizado enzimas hidrolíticas exocelulares en una serie de hongos ectomicorrízicos y ericoides. Los estudios sobre el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática han demostrado la capacidad de los hongos ectomicorrízicos para emplear los productos de la actividad proteolítica. Las investigaciones sobre el metabolismo intracelular de aminoácidos, han permitido la identificación de las vías metabólicas implicadas. La inmunocitoquímica se emplea para examinar las posibles compartimentaciones intracelulares de aminoácidos. Además, la translocación de aminoácidos en los tejidos simbióticos se ha establecido mediante experimentos con trazadores isotópicos, aunque la naturaleza exacta de los compuestos nitrogenados transferidos en la interfaz simbiótica sigue sin estar clara. Uno de los principales retos a futuro en la fisiología de la adquisición de nitrógeno orgánico es determinar la naturaleza, regulación y ubicación de los transportadores de N-compuesto en el suelo-hongo y las interfaces de plantas a los hongos. El enfoque molecular que está surgiendo en este ámbito de investigación en particular mejorará en gran medida nuestro

conocimiento. Las investigaciones futuras también deberían abordar el alcance de la competencia por nitrógeno orgánico entre diferentes especies y entre las diferentes poblaciones microbianas y de hongos ectomicorrízicos (Chalot y Brun 1998).

### **3.3.4 Ectomicorrizas, morfotipos y especies**

Según (Conrado, 1964) “La anatomía y la morfología de las micorrizas de los pinos han sido bastante bien estudiadas. En los pinos las micorrizas se forman de preferencia sobre las raicillas o raíces cortas, presentándose en el caso de los pinos una peculiaridad, que es la ramificación dicotómica o bifurcación de la parte de las raicillas infectadas. Estas raicillas se observan principalmente en la parte media de las raíces largas. El aspecto exterior de las micorrizas, en pinos y en otras especies, suelen presentar variaciones marcadas. Se han elaborado varios sistemas de clasificación para distinguir estas variaciones, habiendo sido tradicionalmente aplicado hasta ahora a los pinos el formulado por Melin en 1927. Melin agrupa las ectomicorrizas en cinco categorías, las que designa mediante letras. Así las micorrizas del tipo A son las que muestran las raicillas simples o bifurcadas dispuestas regularmente a lo largo de las raíces largas y exhibiendo el manto y la red de Hartig característicos. El tipo B, que se suele confundir a menudo con el A incluye las micorrizas en las cuales sólo las raicillas de la zona apical de la raíz larga aparecen infectadas, mientras que en las zonas subyacentes permanecen sin infección o se forman en ellas pseudomicorrizas. Ambos tipos A y B habían sido incluidos previamente por Melin en una clase única que llamo “Gabelmikorhiza” (literalmente micorriza de horqueta). El tipo C comprende las micorrizas formadas por la reunión de numerosas raicillas infectadas, que se agrupan sobre las raíces largas en masas semejantes o tubérculos o nódulos, y que fueron

denominadas previamente por Melin “Knolloenmikorrhiza” (literalmente micorriza de nódulos). El tipo D reúne las micorrizas que se distinguen por su coloración oscura a diferencia de las anteriores, que son de coloración clara. Este tipo D incluye dos subtipos: DN.

Los términos coraloide, arbuscular o arbóreo aplicados a veces en la morfología de las ectomicorrizas se refieren al tipo de ramificación secundaria producida en las ramas de las raicillas dicotómicas. MacDonel ha propuesto un nuevo esquema de clasificación de ectomicorrizas, condensado de las ramificaciones existentes que puede resultar de manera práctica. En él da principal énfasis a las ectomicorrizas y ramificación coraloide que se divide en dos subtipos: simple y dicotómico, considerando además para el último dos formas: furcada y nodular. Solo mediante la formación microscópica de secciones convenientemente preparadas se podrá tener una seguridad acerca de la infección por los hongos”.

La apariencia estructural de las ectomicorrizas está en función tanto de los mismos hongos como de la planta hospedante. Miles de diferentes hongos forman ectomicorrizas, y muchos con más de una planta hospedante, por lo que la apariencia general de las diferentes combinaciones hongo hospedante puede variar considerablemente (Castellano y Molina, 1989).

En la ectomicorriza que se forma en las raíces, el manto puede cubrir completamente la raíz absorbente, y variar en espesor, color, y textura, dependiendo de la combinación hongo-planta. El manto incrementa la superficie del área superficial de las raíces absorbentes y afecta a menudo la morfología de las raíces finas dando origen a estructuras de forma dicotómicas, pinnada a irregular o coraloide (Halling, 2001).

Las características estructurales externas definen tipos y categorías de micorrizas de acuerdo a las características del hongo y el género de la especie de la planta huésped que participan en la asociación. Las ectomicorrizas se pueden reconocer mediante un examen visual del micelio interno y externo, las dimensiones de las micorrizas, cambios del patrón de ramificación radical junto con otras características (Halling, 2001).

### **3.3.5 Asociación simbiótica entre hongos ectomicorrízicos y *Pinus***

Se encuentran algunas familias específicas que integran un género o una familia, por ejemplo *Suillus* coloniza y forma simbiosis únicamente con plantas de la familia Pinaceae. Algunos estudios han revelado datos curiosos en ecosistemas forestales donde los *Pinus* se encuentran de manera abundante y se ha descubierto que algunos *Pinus* en estadio maduro, pueden estar asociados simultáneamente con hasta 19 especies de hongos ECM. Esta simbiosis se establece de manera obligada, en la absorción nutrimental en los arboles de zonas templadas, y este género no pueden sobrevivir de manera natural en ausencia de esta simbiosis ECM (Pérez,-Moreno y Read, 2007).

### **3. 4 Descripción del género *Pinus***

Según Rzedowski y Rzedowski (2001) “Son árboles siempre verdes, o rara vez arbustos, más o menos resinosos, de altura variable desde 1 hasta 50 m; tronco con la corteza generalmente lisa y delgada en los arboles jóvenes y gruesa y rugosa en los adultos; hojas aciculares, reunidas en número de 1 a 5 o 6, fascículos protegidos en la base por una vaina caediza o persistente, longitud de las hojas, grosor y consistencia, variables según la

especie; plantas monoicas, con las flores masculinas dispuestas en amentos formados por escamas membranosas que llevan los sacos polínicos y las femeninas dispuestas en conillos pedunculados subterminales, solitarios o agrupados; cono femenino maduro leñoso, más o menos pedunculado o sésil, de tamaño, forma y color variables, solitario o dispuesto en grupos, más o menos persistente, formado por un eje central en el que se insertan las escamas, cada una de las cuales lleva en la base dos semillas de color oscuro, provistas en la mayoría de los casos de una ala papirácea más o menos desarrollada, cuyo tamaño es variable. El género consta de unas 90 especies distribuidas casi en su totalidad en el Hemisferio Boreal. En México se les conoce con el nombre de “ocotes” o “pinos”.

De acuerdo con Farjos y Styles (2004) las hojas de pinos son de cuatro tipos, cuando se toma en cuenta todos los estadios de desarrollo de la planta: cotiledones, hojas primarias (juveniles), catafilos (hojas escamosas) y hojas secundarias (acículas). Las hojas primarias por lo general se producen solamente en la primera estación de crecimiento y solamente en el tallo principal en la mayor parte de las especies. Las hojas secundarias empiezan a aparecer hacia el final de la primera estación de crecimiento o al principio de la segunda en muchas especies.

#### **3.4.1 Descripción de *Pinus montezumae* Lamb.**

Según Rzedowski y Rzedowski (2001) “Es un árbol de 20 a 30 m de altura; tronco con un diámetro hasta de unos 90 cm, corteza moreno-rojiza, gruesa y áspera desde que el árbol es joven, ramillas con las bases de los catafilos persistentes, abultadas, cortas y muy próximas entre sí; hojas reunidas en número de 5, a veces 4 o 6 en cada fascículo, miden 15 a 45 cm de largo, gruesas, colgantes, vaina persistente, amentos masculinos de 2 cm de largo, de color café-rojizo; los conillos femeninos oblongos, de color púrpura o moreno-azulado,

glaucos, solitarios o en grupos de dos a tres; conos largamente ovoides, algo encorvados y semidecíduos, de 8.5 a 15 cm de largo, de color moreno opaco o levemente lustrosos, dispuestos por pares o en grupos de 3, casi sésiles; semillas de 6 a 7 mm de largo, de color oscuro, ala de unos 20 mm de largo por 7 mm de ancho, de color café. En el Valle crece entre 2300 y 3000 m de altitud. Se ha colectado de Villa N. Romero a Tlalpan, en Tlalmanalco y Amecameca. Fuera de la región de estudio se extiende de Nuevo León, Coahuila y Jalisco a Guatemala”.

### **3.4.2 Descripción de *Pinus greggii***

Según Farjos y Styles (2000), “*Pinus Engelmann* ex Parlatore in Candolle. Tipo. México Coahuila. San Antonio de las Alazanas, cerca de Saltillo. 31 de Agosto 1848, Gregg 402. Árbol pequeño a mediano altura de 15 a 25 m, tronco monopodial recto o curvo en la base. Corteza en la parte inferior del tronco de 3-5 cm de gruesa, áspera y escamosa, divididas en irregulares longitudinales, planchas de profundidad, fisuras longitudinales, de color marrón oscuro con fisuras negras, los árboles jóvenes con escamas, de color marrón rojizo o marrón gris. Ramas de primeros órdenes muy largas y gruesas.

Fascículo en vainas inicialmente ca. 100 mm de largo con amarillo marrón blanquecino cartáceas escamas de color café, persistentes, pero reducidas en fascículos "maduros" de 3 a 5 mm, con escamas, de color marrón oscuro, marrón negruzco. Por lo general son 3 acículas por fascículo, en general son rígidas y rectas 7-9-13-15 cm x 1.2 mm, largo de los bordes aserrados, puntas agudas, brillante, verde brillante. Estomas en todas las caras de las hojas, en 6-8 líneas en la cara convexa abaxial y 3-4 líneas en la cara adaxial cada uno. Anatomía de la hoja: transversal de sección triangular, con un lado abaxial convexa; hipodermis uniforme, con una doble capa de células, los conductos de resina 2-4-6, las dos

laterales siempre presente, estelas triangulares en sección transversal, las paredes de las células endodérmicas haces vasculares uniformes, el xilema filamentos conados.

Los conos de polen concurren cerca del extremo proximal de un nuevo brote, sostenidas por brácteas escamosas, oblonga ovoide cilíndrica 15-20 x 5-6 mm de color amarillento marrón. Conos de semillas que aparecen en árboles muy jóvenes, subterminales o laterales, en verticilos de 3-8, a veces más, a corto, grueso, que aparecen en la madurez sésiles, de larga persistencia. Conos en ca. restrictiva y oblicuamente ovoides a ovoide-atenuar, ligeramente curvo o recto cuando está cerrado, con una base oblicua a menudo deformados por la compresión de la rama en expansión y las escalas, 6-8-13-15 x 4-5-7 cm de ancho 3,5-5 cm cuando está cerrado).

Escala de semillas de 80-120, varias permanecen cerradas por muchos años, separándose finalmente o no, oblongo, recto o curvado, cuando se separaron, las escalas restantes proximal, púrpura marrón, con manchas marrones a la luz de las escalas de semillas adaxialmente. Ramas finales muy gruesas, hacia arriba, formando una copa ancha, irregular-piramidal y abierta. Los brotes multinodales, gruesos, rígidos, ásperos, con pulvínulos prominentes, decurrentes, luz de color naranja-marrón o marrón morado, a menudo glaucos. Catáfilos grandes, 15 a 20 mm de longitud, subuladas, recurvadas, los vértices y los márgenes ciliados erosos, color naranja-marrón oscuro con el ápice, caduco. Botones vegetativos grandes, las yemas terminales, de 15-30 mm de longitud, ovalados-agudos, los laterales ovalados, pequeños, resinosos, de color marrón rojizo, imbricados”.

Roman *et al.*, (2004) señalan que esta especie se ha convertido en una de las predilectas de los viveristas en México debido a sus características de crecimiento, variabilidad genética y adaptabilidad, tolerancia a la sequía y a otras condiciones adversas, además de que su tasa de crecimiento en altura, se mantiene en toda la amplitud de su distribución natural, aún al ser remplazada hacia sitios relativamente alejados de sus fuentes de producción de semilla. La obtención de plantas de buena calidad en vivero favorece la supervivencia de las plantas una vez trasplantadas en el campo. El manejo (sustrato, nutrición, agua, luz y otros), se puede mejorar mediante el empleo de las micorrizas y de los organismos rizosféricos.

### **3.5 Variables de crecimiento y su importancia**

A partir de la caracterización morfológica se generan índices o relaciones que estiman la calidad de la planta, mediante un valor numérico fácil de obtener, ejemplo de tales relaciones son la razón de parte aérea/raíz, el coeficiente de robustez y el Índice de calidad de Dickson (Roman *et al.*, 2004).

#### **3.5.1 Altura de planta y diámetro basal del tallo**

Según Zitácuaro y Aparicio (2004) la variación que ha sido registrada en los análisis de crecimiento de algunas familias de pinos es derivada específicamente de las diferencias genéticas, ya que de acuerdo con experimentos, se ha reportado la existencia de variaciones de crecimiento de algunas variables, como la altura de la planta. Aunque el crecimiento en variables como la altura y diámetro de la planta, esta fase es importante debido a que es cuando el sistema radical se establece en el medio de crecimiento y las plantas están listas para formar nuevos tejidos en las regiones meristemáticas e iniciar la fase crecimiento rápido (Prieto-Ruíz *et al.*, 2004).



Los factores ambientales modifican drásticamente la variabilidad en las plantas, especialmente en el crecimiento. La variación es originada por diferencias genéticas entre las especies de pinos, generalmente de mayor grado y originada por la mutación y recombinación genética (Rodríguez y Capo, 2005).

### **3.5.2 Peso seco de raíz y de vástago**

El incremento de peso seco de un órgano de la planta en un momento dado representa el crecimiento acumulado de dicho órgano en el lapso considerado y se puede expresar en  $g\ pl^{-1}$ . La materia seca se evalúa mediante su peso, que se denomina peso seco. Dicho peso generalmente se obtiene secando en una estufa a 70 u 80 °C hasta alcanzar un peso constante. Este material aún contiene un remanente de agua de alrededor de 4 a 6% (Kohashi-Shibata, 1990).

### **3.5.3 Número de acículas**

Las hojas de pinos son de cuatro tipos para todos los estadios de desarrollo en la planta: cotiledones, hojas primarias juveniles, catafilos, y hojas secundarias (acículas). Los cotiledones parecen epigeos en un espiral en el extremo apical del hipocótilo de las plántulas y son lineales, enteras, y epistomaticos. El número de acículas varía de 4 a 24 (*P.maximartinezii*), el número más alto observado en cualquier planta. Tienen de (0- )2-3 ductos de resina en los cotiledones y cada uno (haploxilo) o dos (diploxilo) paquetes vasculares. Algunos pinos en el estado maduro son diploxilos y haploxilos en la etapa juvenil (tanto cotiledones como hojas primarias) Farjos y Styles (2000).

### 3.5.4 Índice de esbeltez

El índice de esbeltez es una manera de referirse al coeficiente de robustez, llamado así porque a menores valores del índice, las plantas son más robustas (Thompson, 1985).

Es el cociente altura/diámetro, y se obtiene al dividir la medida de la altura (en cm) entre el diámetro (en mm) de la planta para evaluar su calidad. El índice de esbeltez, estima el grado de resistencia de las plantas a factores ambientales adversos (Alarcón, 1999).

### 3.5.5 Índice de Calidad de Dickson (ICD)

Este índice permite evaluar la calidad de las plantas, mediante algunas características morfológicas, por medio de atributos morfológicos y fisiológicos que proporcionan una evaluación más efectiva de la aptitud de las plantas para la reforestación. El índice de Dickson, que es una medida integral del vigor de la planta (Dickson 1960, citado por Barajas-Rodríguez *et al.*, 2004; Brunetta *et al.*, 2007)

$$\text{ICD} = \frac{\text{Peso seco total (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)} + \text{Peso seco aéreo (g)}}{\text{Diámetro (mm) Peso seco radical (g)}}}$$

### **3.5.6 Relación raíz-vástago**

La relación raíz vástago depende de la asignación relativa de la materia seca entre la raíz y el vástago y ésta a su vez, de su actividad relativa, la cual cambia por factores ambientales la fisiología de la propia planta. Existe una relación funcional entre la raíz y el vástago, ya que aquella proporciona al vástago agua, sales minerales y hormonas como la citocinina. La raíz depende del vástago para obtener los fotosintatos y algunas hormonas.

El vástago de las plantas verdes se encarga de sintetizar los fotosintatos, que se utilizan en su crecimiento y en el crecimiento de la raíz. Debido a la relación funcional de ambos órganos es importante determinar la asignación de la materia seca entre ambos órganos. (comentario personal Dr Kohashi).

La acumulación de peso seco en la planta es un resultado directo del balance entre la fotosíntesis, respiración y pérdidas causadas por senescencia y abscisión (White e Izquierdo, 1991). La relación raíz-vástago o su inversa vástago-raíz, es de interés para el entendimiento de los efectos del manejo de la planta, así como lo es el rendimiento absoluto de cualquiera de los dos (vástago o raíz). Los factores ambientales influyen en el valor de esta relación. Como un principio general el órgano o el complejo de órganos (vástago o raíz) que se encuentra más próximo al factor limitante del que se trate (Mitchell, 1970). El vástago, es como un factor limitante que contribuye a un crecimiento relativo. El crecimiento relativo de la raíz está más favorecido por debajo de los límites suministrados de agua o nutrientes minerales. El vástago esta favorecido relativamente por limitantes de la síntesis de carbohidratos o luz limitante (Mitchell, 1970). El conocimiento de la dinámica del crecimiento de plantas especialmente la relación raíz-vástago, puede darnos una idea de la potencialidad de establecimiento de las mismas cuando son trasplantadas en campo (Dalmaso y Salgado, 1994).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

Se evaluaron plantas dos especies de pinos; *Pinus montezumae* y *P. greggii*. Se esterilizaron las semillas con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30%. Se usaron tubetes de 140 mL los cuales, se lavaron y desinfectaron con alcohol etílico. Se utilizó una mezcla de arena, corteza de pino y suelo forestal como sustrato en una proporción de 2:2:1 la cual se esterilizó durante 24 horas con vapor de agua. Los tubetes se llenaron con este sustrato y se depositó el inóculo. Se sembró una semilla por tubete, a una profundidad de 0.5 cm, la cual se cubrió con tezontle molido.

Los hongos *Boletus edulis* s.l., *Laccaria laccata* s.l. y *Hebeloma mesophaeum* s.l. se obtuvieron en el mercado de Ozumba, estado de México. Dichas especies fueron seleccionadas en función de su abundancia, facilidad para preparar inóculo e importancia local como comestibles (Pérez-Moreno *et al.*, 2010).

### 4.2 Preparación del inóculo e inoculación

El inóculo se preparó, como sigue: se molieron los píleos de los hongos de los estípites, se deshidrataron a 35° C se molieron y se almacenaron en viales de 1.5 mL a 5 °C hasta su utilización. Se utilizaron cuatro plantas de cada tratamiento para hacer las evaluaciones de crecimiento.

Las evaluaciones se realizaron cuando las plantas tenían un año nueve meses de edad de haber sido inoculadas con 2 cm<sup>3</sup> equivalentes a 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> esporas por planta.

### 4.3 Evaluación de poblaciones microbianas en rizósfera

Para la evaluación de las comunidades microbianas en la rizósfera de *P. montezumae* y *P. greggii*, se tomaron al azar tres plantas de un año y nueve meses de edad, de cada especie de pino. Se tomaron 10 gramos de suelo rizosférico de cada planta y se depositaron en una bolsa de polietileno previamente esterilizada con alcohol etílico. Una vez obtenido el sustrato, se mezcló dentro de la bolsa con el fin de homogeneizarlo. También se pesaron 10 g de suelo rizosférico por separado y se secaron a 70 °C por 48 horas, para evaluar su peso seco.

Las poblaciones microbianas rizosféricas se cuantificaron por la técnica de diluciones y cuenta viable. Para esto, en 90 mL de agua destilada esterilizada se agregaron 10 g del sustrato rizosférico y se agitaron durante 20 minutos, siendo esta la primera dilución ( $10^{-1}$ ). De esta dilución se tomó con la ayuda de una pipeta 1 mL el cual se depositó en un tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril; luego se mezcló por varios segundos en un agitador rotatorio para homogeneizar la dilución. Esta fue la segunda dilución ( $10^{-2}$ ). El proceso se siguió de la misma forma para obtener las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ . Se tomó 0.1 mL de cada dilución y se depositó en cajas de Petri que contenían medio de cultivo específico para cada grupo microbiano, posteriormente se distribuyó homogéneamente con una varilla de vidrio en forma de “L”. En el caso de bacterias totales, bacterias fijadoras de nitrógeno, y actinomicetos se utilizaron las diluciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ; para el caso de hongos y microorganismos solubilizadores de fosfatos se utilizaron las diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Los medios de cultivo utilizados fueron: Agar nutritivo para bacterias totales, medio de Rennie para bacterias fijadoras de nitrógeno, Czapeck para actinomicetos, Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y rosa de Bengala para el caso de los hongos, y medio de

Picovskaya para los organismos solubilizadores de fosfatos. Una vez sembradas las alícuotas de cada dilución en los medios específicos para cada grupo microbiano, las placas se incubaron por 7 días a 28 °C. Los conteos de colonias se realizaron a partir de los 3 días y se prolongaron hasta 7 días después de la siembra, lo cual dependió del grupo microbiano. Por ejemplo, las bacterias crecen relativamente rápido, mientras que los actinomicetos crecen más lento.

#### **4.4 Evaluación de poblaciones microbianas en raíces endófitas**

Se lavaron las raíces de las plantas y se pesaron muestras de 0.50 g de raíz. Enseguida se sumergieron en alcohol a 90% por 10 segundos, y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril; luego las muestras de raíz se dejaron por 30 segundos en una solución de HgCl<sub>2</sub> a 0.1%, y finalmente se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril.

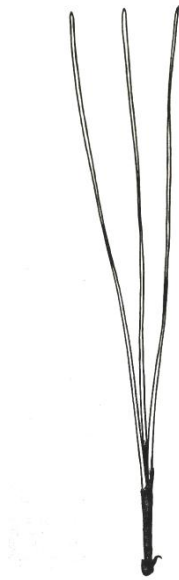
En un mortero esterilizado previamente con alcohol se depositó la muestra y se adicionaron 4.5 mL de agua destilada estéril, se trituraron las raíces finamente hasta obtener una suspensión y esta fue la primera dilución ( $10^{-1}$ ). Se realizaron dos diluciones decimales más ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente para las muestras de suelo. Se tomó una alícuota de cada dilución y se sembró en placas con Agar nutritivo para evaluar bacterias totales en placas con medio de Rennie para bacterias fijadoras de nitrógeno y medio de Picovskaya para los microorganismos solubilizadores de fosfatos. Los conteos de colonias se realizaron a partir de los dos días y hasta los siete días después de la siembra, dependiendo del grupo microbiano.

#### **4.5 Variables de crecimiento evaluadas**

La altura de la planta se registró a partir del nivel de la parte superior del tubete hasta la yema apical. El diámetro basal del tallo se determinó con un vernier, al nivel de la parte superior del tubete.

Los fascículos de cada planta se desprendieron individualmente y se contaron. Posteriormente, se procedió a la escisión de las acículas de cada fascículo y de aquellas que no estaban en fascículos sino implantadas directamente en el tallo. Se contaron y se determinó su peso fresco.

Una vez cortado el vástago, se extrajo el cepellón y se sumergió en agua para separar el sustrato de las raíces y eliminar de éstas los residuos del suelo. En una probeta, por desplazamiento de agua se determinó el volumen de las raíces. Enseguida, con toallas de papel absorbente, se secaron las raíces, se les determinó su peso fresco y se realizó el conteo del número de morfotipos ectomicorrízicos, los cuales se encuentran localizados en las raíces más finas. El agua procedente del lavado de las raíces se filtró en una malla de un mm de apertura para rescatar las raíces desprendidas. El peso fresco y seco de éstas se adicionó al del resto de las raíces. Enseguida, tallo, acículas verdes y raíz fueron deshidratados a 70 °C durante 72 h hasta peso constante para la determinación de su peso seco.



**Figura 4.1.**Fascículo con tres acículas.Tomado de Rost T. L.*et al.*,(1979).

Para cada especie de pino se evaluó el número de acículas secas desprendidas que no estaban en fascículos así como aquellas secas que se encontraban aún adheridas al tallo de la planta. No se encontraron acículas secas en fascículos. En el caso del tallo se procedió en forma similar al caso de las acículas. Se incluyó el tallo principal y las ramas ya desarrolladas. El peso seco del vástago se determinó con la suma del peso seco del tallo y de las acículas. Como en el caso de las acículas, las raíces se colocaron en bolsas de papel, se etiquetaron y se sometieron a secado en una estufa a 70 °C por 72 horas, tiempo necesario para alcanzar el peso constante. Dicho peso se determinó en una balanza digital.



#### 4.6 Índice de esbeltez

El índice de esbeltez fue calculado mediante la estimación de la relación entre la altura de la planta (cm) y diámetro del tallo (mm).

#### 4.7 Índice de calidad de Dickson (ICD)

Este índice integra la relación entre el peso seco total Se calculó el Índice de calidad de Dickson mediante la siguiente fórmula de la planta (g) y la suma del cociente de esbeltez y la relación peso seco aéreo/radical.

Dickson (1960) citado por Barajas-Rodríguez *et al.*,(2004).

$$\text{ICD} = \frac{\text{Peso seco total (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)} + \text{Peso seco aéreo (g)}}{\text{Diámetro (mm) Peso seco radical (g)}}$$

#### 4.8 Evaluación ectomicorrízica y caracterización morfológica de morfotipos

Se utilizaron 12 plantas de *Pinus greggii* y 12 de *Pinus montezumae* previamente inoculadas con *Boletus edulis*, *Laccaria laccata*, *Hebeloma mesophaeum* y plantas sin inocular las cuales se consideraron como testigo. Se extrajeron de los tubetes plantas de un año once meses de edad con la finalidad de evaluar la presencia de los diferentes morfotipos de las raíces, así como el porcentaje de colonización total. Las raíces fueron extraídas y lavadas con agua corriente, se procuró no dañar la raíz para evitar el desprendimiento de las raíces cortas. Se secaron con toallas secantes y se pesaron en una balanza granataria. Una vez obtenido el peso total de la raíz fresca se procedió a dividir la raíz en cuatro segmentos, dos de ellos se pesaron nuevamente en la balanza para así

corroborar que se tomaba la mitad de la raíz. Una vez que se tomaron dos cuartos de la raíz, es decir la mitad de la raíz, se conservaron en un frasco que contenía agua corriente.

Para realizar el conteo de los diferentes morfotipos, las raíces fueron colocadas en una caja de Petri con agua y se cortaron en fragmentos cortos para facilitar su observación. Las evaluaciones y conteos se realizaron con ayuda de un estereoscopio Konus en el objetivo de 10x. Se contabilizaron las raíces cortas vivas micorrizadas, así como las raíces vivas sin micorrización, las raíces micorrizadas muertas, y las raíces cortas no micorrizadas muertas. Se obtuvieron los valores promedios de tres repeticiones de cada tratamiento incluyendo el testigo.

#### **4.9 Análisis estadístico**

Se tomaron tres repeticiones de cada tratamiento para los análisis microbiológicos y el conteo de morfotipos, y cuatro para las variables de crecimiento. Un tratamiento consistió de la combinación de una especie de pino y una cepa del hongo ó una especie de pino no inoculada (testigo). Los datos obtenidos, se transformaron a logaritmo de base 10. Se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilk (1965) con el propósito de ajustar los datos a una distribución normal y verificar la hipótesis de normalidad necesaria, para que el resultado de los análisis fuera confiable. Una vez transformados, los datos se sometieron a un análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey en el programa SAS (Statistical Analysis System versión 1993).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Bacterias totales

Las plantas de *Pinus montezumae* inoculadas con *Boletus edulis* presentaron el mayor número de bacterias totales comparado con las plantas inoculadas con los otros hongos o el testigo. En contraste, en el caso de las plantas de *Pinus greggii* inoculadas con *Boletus edulis*, el número de bacterias totales fue igual al testigo (Cuadro 5.1). Estos resultados coinciden con los que reportan otras investigaciones como la de Izumi *et al.*, (2008) quienes encontraron comunidades de bacterias asociadas con raíces micorrizadas y no micorrizadas de *Pinus elliottii*. Dichos autores, registraron una gran heterogeneidad de comunidades bacterianas en la rizósfera. La distribución de las comunidades bacterianas que colonizan las raíces de las plantas es muy heterogénea en distancias pequeñas (de 20 a 30 mm) debido a la influencia de las condiciones microambientales. Por lo tanto es altamente probable que la distancia y la ubicación de las bacterias en relación a la superficie de la raíz desempeña un papel importante en la colonización de las raíces de las plantas. Además, dichos autores señalaron que las puntas de las raíces colonizadas por hongos ectomicorrízicos pueden proporcionar un lugar único más apropiado para el desarrollo de dichos microorganismos. Esto se debe a la disponibilidad de los compuestos orgánicos derivados de los hongos, que han demostrado ser preferentemente consumidos por determinados grupos bacterianos (Izumi *et al.*, 2008).

Se sabe que las bacterias afectan el funcionamiento de la simbiosis ectomicorrízica de muchas maneras, incluido el establecimiento, la movilización de los minerales, la fijación de nitrógeno, y el antagonismo de los agentes patógenos. Sin embargo, gran parte de lo que se conoce acerca de las bacterias asociadas con ectomicorrizas se basa en bacterias

cultivables, las cuales en algunos ambientes representan menos de 1% del total de la comunidad bacteriana (Frey-Klett *et al.*, 2005). En términos generales, existen relativamente pocos intentos para caracterizar las comunidades bacterianas asociadas con hongos ectomicorrízicos (Kretzer *et al.*, 2009).

Warmink *et al.*, (2009) identificaron grupos de bacterias asociados con los esporomas de *Laccaria proxima*, con análisis de PCR-DGGE. Dichos autores encontraron tanto bacterias de amplia distribución como *Pseudomonas poae*, *P. lini*, *P. umsongensis*, *P. corrugata*, *P. antarctica* y *Rahnella aquatilis*, así como también bacterias específicas, las cuales incluyeron *P. viridiflava*, *P. candidatu* y *Xiphinematobacter americanus*. Estas bacterias han sido definidas como “fungales” que son bacterias adaptadas a las micosferas de tres o más especies de hongos.

Hryniewicz *et al.*, (2009) evaluaron el efecto de la inoculación de una cepa bacteriana (*Sphingomonas sp.* 23L) asociada a ectomicorrizas para promover la colonización ectomicorrízica y el crecimiento de las plantas de tres clones de sauce (*Salix spp.*). La inoculación de los sauces con *Sphingomonas sp.* 23L incrementó la absorción de nitrógeno por las plantas, su crecimiento y estimuló la formación de una especie de hongo ectomicorrízico endémico (*Geopora sp.*). La inoculación incrementó significativamente el crecimiento de los brotes de dos clones de *Salix viminalis* y el crecimiento de las raíces de dicha especie. Dichos autores concluyeron que la inoculación con cepas bacterianas puede contribuir a incrementar la formación de micorrizas con hongos endémicos (*Geopora sp.*).

## 5.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno

Las plantas de *Pinus montezumae* inoculadas con *Boletus edulis* presentaron el mayor número de bacterias fijadoras de nitrógeno comparado con las plantas inoculadas con los otros hongos o el testigo. En contraste, en el caso de las plantas de *Pinus greggii* inoculadas con *Boletus edulis*, el número de bacterias fijadoras de nitrógeno fue igual al testigo (Cuadro 5.1).

Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto (2009) estudiaron el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas aisladas de la rizósfera de *Pinus patula* sobre diferentes variables de crecimiento, en condiciones de invernadero. Estos autores también examinaron la interacción entre el hongo ectomicorrízico *Suillus luteus* y los microorganismos aislados en *P. patula*, y la actividad de la nitrogenasa mediante el ensayo de reducción de acetileno. Las bacterias de vida libre fijadoras libres de nitrógeno *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus macerans*, *Enterobacter agglomerans* y *Pseudomonas* sp. fueron aisladas de la rizósfera de *P. patula*. Los valores máximos de reducción de acetileno presentados por estas bacterias fueron hasta de 120nmol etileno/tubo. Los resultados en el ensayo *in vivo* de *P. patula* con estos microorganismos y *S. luteus* mostraron que el mejor crecimiento de las plantas y la captura de nitrógeno se observaron con *A. chroococcum*. Al observar los cortes longitudinales de raíz de los tratamientos inoculados con *S. luteus* y con las diferentes bacterias (*A. chroococcum*, *B. macerans*, *E. agglomerans* y *Pseudomonas* sp.) sólo el tratamiento con *S. luteus* y *B. macerans* presentó bacterias aglutinadas alrededor de la superficie de la raíz micorrizada, sin embargo el porcentaje de micorrización fue bajo. Adicionalmente, la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno estimuló el crecimiento longitudinal de la raíz y el contenido de N de *P. patula*.

### 5.3 Microorganismos solubilizadores de fosfatos

Las plantas de *P. montezumae*, inoculadas con *Boletus edulis* y sin inocular presentaron un mayor número de bacterias solubilizadoras de fosfatos que las plantas no inoculadas o aquellas inoculadas con *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum*. En contraste, con el caso de las plantas de *Pinus greggii* no existen diferencias en el número de bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas con las plantas inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos (Cuadro 5.1). Calvaruso *et al.*, (2007) demostraron que la solubilización del fosfato y movilización de hierro en suelos forestales pobres en nutrientes se ve claramente favorecida por las bacterias que se encuentran en la ectomicorrizosfera de los horizontes del suelo que se encuentran más abajo en comparación con los horizontes del suelo superiores.

Ouahmane *et al.*, (2009) registraron que al inocular plantas de *Pinus halepensis* con el hongo ectomicorrízico *Pisolithus* sp. se observó un efecto positivo en su crecimiento. Estos autores demostraron también un impacto significativo en la solubilización de fosfato de roca contenido en el suelo sin desinfectar. Dichos autores hipotetizaron que el éxito del efecto de la inoculación con el hongo ectomicorrízicos, estuvo influenciado por las comunidades bacterianas de *Pseudomonas fluorescens*. Se confirmó que el micelio de los hongos ectomicorrízicos tiene una correlación con dichos microorganismos y estos a su vez se ven beneficiados por el hongo.

Frey-Klett *et al.*, (2005) demostraron que la mayoría de las *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la micosfera de plantas de *Pseudostuga menziesii* inoculadas con *Laccaria bicolor* fueron capaces de solubilizar fosfato inorgánico, a diferencia de la mayoría de otros aislamientos bacterianos del suelo. Se demostró que algunas de las cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato pueden interactuar de forma sinérgica con hongos ectomicorrízicos y promover el suministro sostenible de fósforo a las plantas.

#### **5.4 Actinomicetos**

Las plantas de *P. montezumae*, inoculadas con *Boletus edulis* y sin inocular presentaron un mayor número de bacterias solubilizadoras de fosfatos que las plantas no inoculadas o aquellas inoculadas con *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum*. En contraste, con el caso de las plantas de *Pinus greggii* no existen diferencias en el número de bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas con las plantas inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos (Cuadro 5.1).

Han existido algunas investigaciones que han demostrado los efectos sinérgicos entre actinomicetos y algunos tipos de micorriza como la micorriza arbuscular. Por ejemplo, Franco-Correa *et al.*, (2010) estudiaron treinta cepas de actinomicetos que fueron aislados de la rizósfera de plantas cultivadas en el campo (*Trifolium repens* L.) las cuales fueron identificados por características microscópicas, y pruebas técnicas bioquímicas y moleculares. El ADNr 16S en los análisis de la secuencia mostró que la mayoría de los aislamientos pertenecieron al género *Streptomyces*. Se evaluó en estos 30 aislamientos su capacidad de solubilizar y mineralizar fuentes de fosfato, fijar N<sub>2</sub> y / o producir sideróforos, las cuales características funcionales de las rizobacterias denominadas

promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés). La capacidad de solubilizar fosfato se mostró ampliamente establecida en algunos aislamientos evaluados. Esto puede ser explicado en función de que todos los aislamientos evaluados produjeron fosfatasa ácida y trece de ellos fosfatasa alcalina. Diez cepas crecieron en medios de N-libre. La inoculación de plantas de trébol con cualquiera de los actinomicetos seleccionados originó un mayor crecimiento de las plantas y una incrementada adquisición de nitrógeno. La co-inoculación de los actinomicetos y del hongo micorrízico arbuscular *Glomus mosseae* produjo beneficios sinérgicos en crecimiento de las plantas y también en la adquisición de P.

### **5.5 Hongos filamentosos**

Las plantas de *P. montezumae*, inoculadas con *Boletus edulis* y sin inocular presentaron un mayor número de hongos filamentosos que las plantas no inoculadas o aquellas inoculadas con *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum*. En el caso de las plantas de *Pinus greggii* no existieron diferencias en el número de hongos filamentosos asociados con las plantas inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos (Cuadro5 .1).



**Cuadro 5.1** Comparación de poblaciones de microorganismos aislados de la rizósfera de plantas de *Pinus montezumae* y *P. greggii* de 367 días de edad, inoculadas o no con tres hongos comestibles ectomicorrizicos.

| Tratamiento   | Bacterias Totales <sup>#</sup> | Bacterias fijadoras de nitrógeno <sup>Σ</sup> | Actinomicetos <sup>β</sup> | Bacterias Solubilizadoras de fosfatos <sup>ε</sup> | Hongos Filamentosos <sup>θ</sup> |
|---|--------------------------------|---|----------------------------|--|----------------------------------|
| Unidades Formadoras de Colonias (g suelo seco <sup>-1</sup> ) |                                |   |                            |  |                                  |
| -----10 <sup>5</sup> -----10 <sup>3</sup> -----               |                                |   |                            |  |                                  |
| <i>P. montezumae</i>  |                                |   |                            |  |                                  |
| inoculado con   |                                |   |                            |  |                                  |
| <i>Boletus edulis</i>   | 315.2 a                        | 27.5 a  | 16.9 ab                    | 429.7 a  | 154.9 a                          |
| <i>Laccaria laccata</i>                                       | 8.3 b                          | 11.2 ab                                       | 90.7 a                     | 1.5 b  | 2.9 b                            |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i>                                    | 5.1 b                          | 11.8 ab                                       | 10.4 ab                    | 19.1 b   | 20.8 b                           |
| Sin inocular  | 30.6 b                         | 10.3 b  | 2.3 b                      | 337.1 a  | 152.6 a                          |
| <i>P. greggii</i>   |                                |   |                            |  |                                  |
| inoculado con   |                                |   |                            |  |                                  |
| <i>Boletus edulis</i>   | 25.0 ab                        | 10.1 a  | 639.1 a                    | 129.4 a  | 69.9 a                           |
| <i>Laccaria laccata</i>                                       | 7.6 b                          | 5.9 a   | 2.6 a                      | 32.1 a   | 5.2 a                            |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i>                                    | 8.5 b                          | 37.0 a  | 15.4 a                     | 777.1 a  | 5.7 a                            |
| Sin inocular  | 178.8 a                        | 1.6 a   | 4.3 a                      | 7.7 a  | 10.6 a                           |

<sup>#</sup>Contabilizadas en medio de agar nutritivo; <sup>Σ</sup>Contabilizadas en medio de Renni; <sup>β</sup>Contabilizados en medio solido Czapeck; <sup>ε</sup>Contabilizados en medio solido de Picovskaya y <sup>θ</sup>Contabilizados en medio sólido de papa dextrosa agar con rosa de bengala. Los valores con letras diferentes dentro de cada columna, para cada especie vegetal, son distintos según Tukey(P=0.05),n=3

## 5.6 Bacterias endófitas

Para ambas especies de pino la especie de *Boletus edulis* fue la que originó valores más altos de bacterias endófitas, y presentó una diferencia significativa en comparación con el testigo. Pirttila *et al.*, (2004) registraron bacterias dentro de las raíces de los tejidos meristemáticos de yema del pino escocés (*Pinus sylvestris* L.) y encontraron que dichas bacterias participan en el crecimiento de la yema. Dos bacterias (*Methylobacterium extorquens* y *Pseudomonas synxantha*) y un hongo endófito (*Rhodotorula minuta*) produjeron fitohormonas. Por lo tanto, dichos autores concluyeron que la producción de fitohormonas producidos por bacterias endófitas desempeñó un papel en el efecto morfológico observada en los tejidos de esta particular especie de pino (Cuadro 5.2).

Li y Hung (1987) reportaron bacterias del genero *Clostridium* spp. y *Azospirillum*spp. aisladas de la superficie esterilizada de raíces ectomicorrizadas, estas pueden estar consideradas como bacterias fijadoras de nitrógeno y se encuentran dentro de las raíces ectomicorrizadas.

**Cuadro 5.2** Comparación de poblaciones de microorganismos aislados de las raíces endófitas de plantas de *Pinus montezumae* y *P. greggii* de 367 días de edad, inoculadas o no con tres hongos comestibles ectomicorrízicos.

| Tratamiento   | Bacterias<br>totales #      | Bacterias<br>fijadoras de<br>nitrógeno $\Sigma$ | Bacterias<br>solubilizadoras de<br>fosfatos $\epsilon$ |
|---|-----------------------------|---|--|
| Unidades Formadoras de Colonias (g suelo seco <sup>-1</sup> ) |                             |   |  |
| <i>P. montezumae</i>  |                             |   |  |
| inoculado con   | ----- 10 <sup>5</sup> ----- |   | ----- 10 <sup>4</sup> -----                            |
| <i>Boletus edulis</i>   | 168.5 a                     | 42.3 a  | 168.3a   |
| <i>Laccaria laccata</i>                                       | 7.4 b                       | 0 b   | 0 b  |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i>                                    | 27.0 b                      | 9.3 b   | 23.6 b   |
| <br><i>P. greggii</i>   |                             |   |  |
| inoculado con   |                             |   |  |
| <i>Boletus edulis</i>   | 18.3 a                      | 28a   | 1.9 a  |
| <i>Laccaria laccata</i>                                       | 29.3 a                      | 0 b   | 0 b  |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i>                                    | 22.0 a                      | 0 b   | 4.8 a  |

<sup>#</sup>Contabilizadas en medio de agar nutritivo.  <sup>$\Sigma$</sup> Contabilizadas en medio de Rennie.  <sup>$\epsilon$</sup> Contabilizadas en medio solido de Picovskaya. Los valores con letras diferentes dentro de cada columna, para cada especie vegetal, son distintas según Tukey (P=0.05) n=3

## **5.7 Variables de crecimiento de la planta**

### **5.7.1 Longitud y diámetro basal del tallo**

Para las dos especies de pino, el diámetro basal del tallo de las plantas inoculadas con las tres cepas de ECM, fue mayor que el del testigo. En cuanto a la longitud del tallo en *P.greggii* se presentó el mayor valor con respecto al testigo para las tres cepas. *P. montezumae* presentó el mayor valor solamente con *Boletus edulis*. (Cuadro 5.3). Duñabeitia *et al.*, (2004), Duponnois *et al.*,(2005) y Carrera y López (2004) encontraron efectos positivos como resultado de la inoculación con hongos ectomicorrízicos.

### **5.7.2 Número de fascículos y de acículas frescas y secas**

Existieron diferencias estadística en el número de fascículos en *P. montezumae* (con las tres especies de hongos) con respecto al testigo no inoculado y en *P. greggii* no se encontraron diferencias significativas entre las tres especies de hongos y el testigo (Cuadro 5.3). No se encontraron diferencias en relación al número de fascículos y de acículas de plantas en vivero. El número de acículas frescas en la especie de *P. montezumae* no presentó una diferencia significativa. *P. greggii* presentó una diferencia significativa entre tratamientos y el mayor valor lo presentaron las plantas inoculadas con *Boletus edulis*. El número de acículas secas para ambas especies no presentó diferencia significativa.

**Cuadro 5.3** Respuesta de la inoculación con los hongos ectomicorrízicos en las variables de crecimiento de *Pinus montezumae* y *Pinus greggii* de 365 días de edad.

| Tratamiento                         | Longitud del tallo (cm) | Diámetro del tallo (mm) | Número de fascículos | Número de acículas | Número de acículas secas |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------|
| <i>P. montezumae</i>                |                         |                         |                      |                    |                          |
| inoculado con <i>Boletus edulis</i> | 9.72 a                  | 8.00 b                  | 36.50 a              | 287.25 a           | 6.25 a                   |
| <i>Laccaria laccata</i>             | 6.20 ab                 | 8.00 b                  | 33.00 a              | 204.50 a           | 11.25 a                  |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i>          | 4.45 b                  | 10.75 a                 | 29.00 ab             | 186.0 a            | 8.75 a                   |
| Sin inocular                        | 3.25 b                  | 4.50 c                  | 3.50 b               | 158.0 a            | 13.50 a                  |
| <i>P. greggii</i>                   |                         |                         |                      |                    |                          |
| inoculado con <i>Boletus edulis</i> | 72.00 a                 | 4.75 a                  | 175.25 a             | 1387.0 a           | 22.00 a                  |
| <i>Laccaria laccata</i>             | 57.12 b                 | 4.25 a                  | 154.75 a             | 923.5 b            | 78.25 a                  |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i>          | 60.48 b                 | 4.25 a                  | 60.00 a              | 828.5 b            | 96.75 a                  |
| Sin inocular                        | 42.50 c                 | 3.00 b                  | 77.50 a              | 645.3 b            | 45.00 a                  |

<sup>Ω</sup> En *P. montezumae* y *P. greggii* los valores con letras diferentes dentro de cada columna para cada especie representan diferencia estadística según Tukey (P=0.05) n=4.

### 5.7.3 Peso seco de órganos

El peso seco de raíz en *Pinus montezumae* fue mayor en *Laccaria laccata* con respecto a su testigo y a los otros tratamientos. En *Pinus greggii*, *Laccaria laccata* también fue mayor con respecto a su testigo. Sin embargo, el peso seco de acículas para la especie de *P. montezumae* las plantas que fueron inoculadas con *Boletus edulis* y *Laccaria laccata* fue mayor que el de su testigo. La especie de *P. greggii* obtuvo el mayor valor con respecto a su testigo cuando fue inoculada con *Boletus edulis*. En cuanto al peso seco del tallo para *P. montezumae* todas las cepas superaron al testigo. En *P. greggii*, *Boletus edulis* y *Hebeloma mesophaeum* fueron superiores a su testigo. En ambas especies de *Pinus* el peso seco del vástago para todas las cepas fue superior a su testigo (Cuadro 5.4).

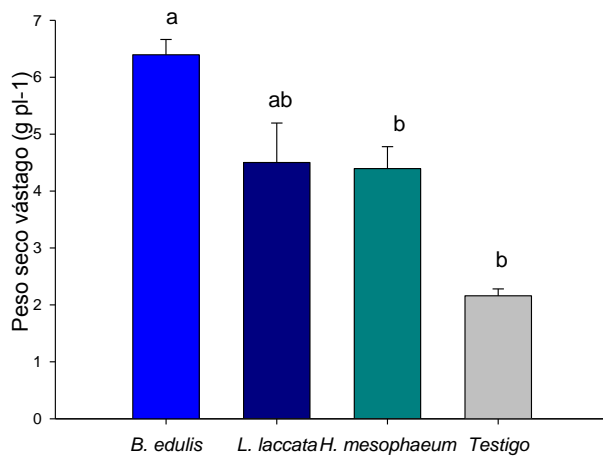
**Cuadro 5.4** Peso seco ( $\text{g pl}^{-1}$ ) de diferentes estructuras en plantas de dos especies de pino inoculadas con diferentes cepas de hongos ECM y su testigo no inoculado.

| Tratamiento                | Raíz    | Acículas | Tallo   |
|----------------------------|---------|----------|---------|
| <i>P. montezumae</i>       |         |          |         |
| inoculado con:             |         |          |         |
| <i>Boletus edulis</i>      | 1.25 b  | 3.50 a   | 1.06 a  |
| <i>Laccaria laccata</i>    | 1.70 a  | 2.69 a   | 0.63 a  |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i> | 1.44 b  | 1.81 ab  | 0.52 a  |
| Sin inocular               | 0.57 b  | 1.06 b   | 0.16 b  |
| <i>P. greggii</i>          |         |          |         |
| inoculado con:             |         |          |         |
| <i>Boletus edulis</i>      | 1.80 ab | 3.47 a   | 2.92 a  |
| <i>Laccaria laccata</i>    | 2.17 a  | 2.88 ab  | 1.62 ab |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i> | 1.58 ab | 2.12 ab  | 2.27 a  |
| Sin inocular               | 0.98 b  | 1.4 b    | 0.76 b  |

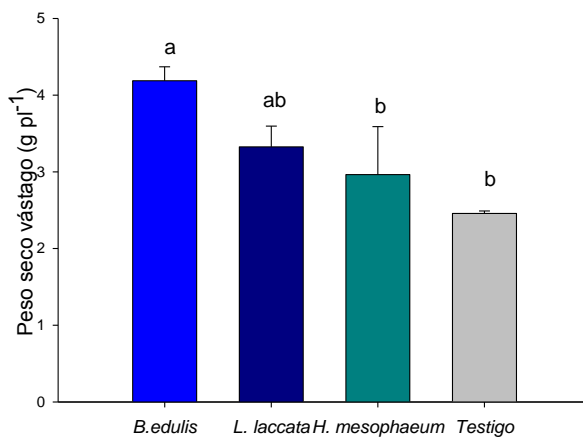
# El peso seco del vástago es la suma del peso seco de acículas y de tallo<sup>Ω</sup>. En *P. montezumae* y *P. greggii* los valores con letras diferentes dentro de cada columna para cada especie representan diferencia estadística según Tukey (P=0.05) n=4.

Los resultados del peso seco del vástago en ambas especies de pinos muestran que ambas especies inoculadas con *Boletus edulis*, fueron las que obtuvieron los mayores resultados. Y ambas presentaron diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos (Figuras 5.1 y 5.2). Estos resultados coinciden con lo reportado por Carrera y López (2004) al obtener un mayor peso seco del vástago en las especies de pinos que fueron inoculadas con

hongos ECM. La inoculación con micorrizas también se ha demostrado que aumenta en gran medida la altura y biomasa de pinos como lo comprueba (Rincón *et al.*, 2006). En términos generales, se estima que el efecto de las micorrizas en el crecimiento de las plantas se debe al incremento en la superficie de absorción, acumulo de nutrientes (en especial P), solubilización de ciertos compuestos minerales, prolongación de la vida útil de las raíces absorbentes y resistencia a patógenos de la raíz (Rivera, 2007).



**Figura 5.1** Peso seco del vástago de *P. montezumae*



**Figura 5.2** Peso seco del vástago de *P. greggii*



### **5.8 Relación Raíz-Vástago**

Para *P. montezumae*, *L. laccata* y *H. mesophaeum* son superiores a su testigo. Para *P. greggii* todos las cepas fueron iguales al testigo (Cuadro 5.5).

### **5.9 Índice de esbeltez**

Para *P. Montezumae* no hubo diferencias entre especies de hongos ectomicorrízicos y el testigo. En *P. greggii*, las cepas de *B. edulis* y *L. laccata* fueron superiores a su testigo (Cuadro 5.5).

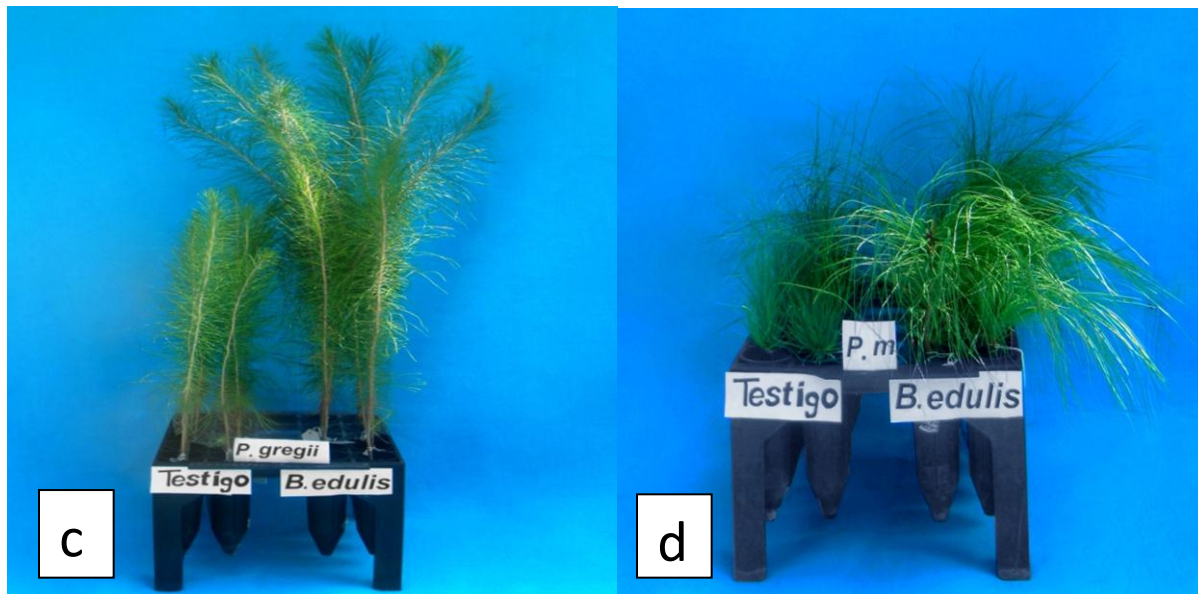
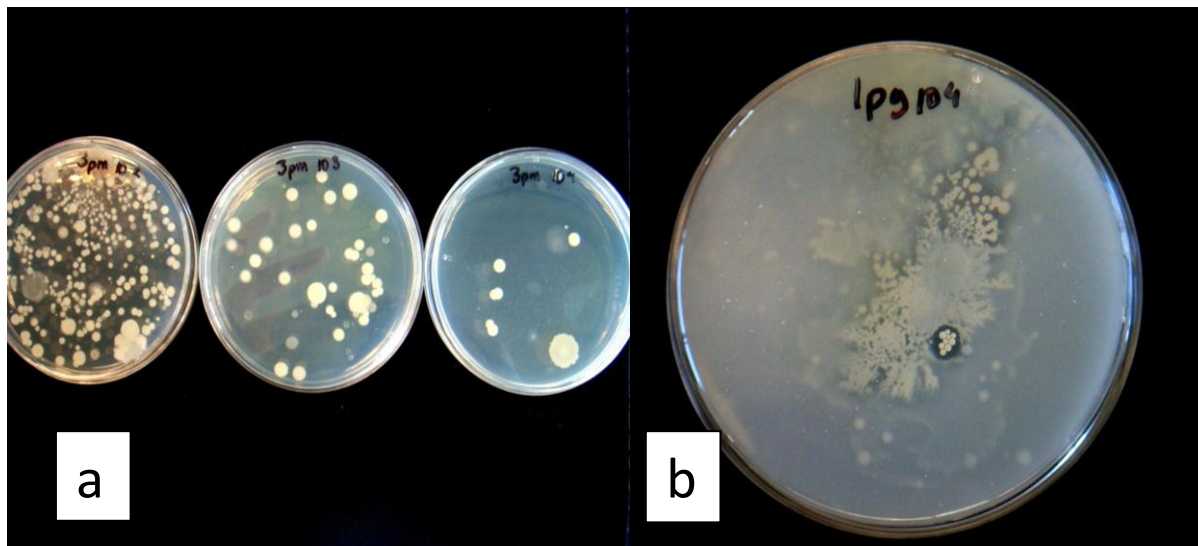
### **5. 10 Índice de Calidad de Dickson**

Para *P. montezumae*, *H. mesophaeum* se presentó el valor más alto con respecto a *L. laccata* y a su testigo. Para *P. greggii* sólo *H. mesophaeum* fue mayor con respecto a su testigo. (Cuadro 5.5).

**Cuadro 5.5** Relación raíz-vástago, Índice de Calidad de Dickson e Índice de esbeltez en *P. montezumae* y *P. greggii* inoculados con diferentes cepas de hongos ECM y su testigo no inoculado.

| Tratamiento                | Relación raíz-vástago | Índice de Calidad de Dickson | Índice de esbeltez |
|----------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------|
| <i>P. montezumae</i>       |                       |                              |                    |
| inoculado con              |                       |                              |                    |
| <i>Boletus edulis</i>      | 0.30 bc               | 3.81 ab                      | 1.28 a             |
| <i>Laccaria laccata</i>    | 0.51 a                | 2.33 b                       | 0.78 a             |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i> | 0.49 ab               | 4.83 a                       | 0.41 a             |
| Sin inocular               | 0.23 c                | 1.93 b                       | 0.89 a             |
| <i>P. greggii</i>          |                       |                              |                    |
| inoculado con              |                       |                              |                    |
| <i>Boletus edulis</i>      | 0.28 a                | 11.69 ab                     | 15.36 a            |
| <i>Laccaria laccata</i>    | 0.52 a                | 11.04 ab                     | 13.59 a            |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i> | 0.36 a                | 17.18 a                      | 14.29 ab           |
| Sin inocular               | 0.46 a                | 6.19 b                       | 14.16 b            |

<sup>Ω</sup> En *P. montezumae* y *P. greggii* los valores con letras diferentes dentro de cada columna para cada especie representan diferencia estadística según Tukey (P=0.05) n=4.



**Figura 5.3** (a) Colonias de bacterias en Agar nutritivo procedentes de la rizósfera de *Pinus montezumae* ectomicorrizado;(b) Bacterias solubilizadoras de fosfatos, en medio de Picovskaya, procedentes de la rizósfera de *Pinus greggii* ectomicorrizado (c) y (d) Efecto de la micorrización con *Boletus edulis* en *Pinus montezumae*(c) y *Pinus greggii* (d); (e) Raíz ectomicorrizada de *P. montezumae* inoculada con *H. mesophaeum* f) Raíz ectomicorrizada de *P.greggii* inoculado con *L. laccata*.

**Cuadro 5.6** Porcentaje de colonización micorrízica de *P. montezumae* y *P. greggii* inoculados con diferentes cepas de hongos ECM y su testigo no inoculado.

| Tratamiento                | %de raíces micorrizadas |         | % raíces no micorrizadas |         |
|----------------------------|-------------------------|---------|--------------------------|---------|
|                            | Vivas                   | Muertas | Vivas                    | Muertas |
| <i>P. montezumae</i>       |                         |         |                          |         |
| inoculado con              |                         |         |                          |         |
| <i>Boletus edulis</i>      | 87.05 a                 | 0.99 a  | 10.69 b                  | 1.26 a  |
| <i>Laccaria laccata</i>    | 88.43 a                 | 1.51 a  | 9.29 b                   | 0.78 a  |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i> | 86.22 a                 | 1.78 a  | 11.19 b                  | 0.81 a  |
| Sin inocular               | 0 b                     | 0 b     | 88.2 a                   | 11.8 a  |
| <i>P. greggii</i>          |                         |         |                          |         |
| inoculado con              |                         |         |                          |         |
| <i>Boletus edulis</i>      | 70.15 a                 | 2.17 a  | 24.23 ab                 | 3.45 a  |
| <i>Laccaria laccata</i>    | 74.81 a                 | 1.86 ab | 21.31 b                  | 2.01 a  |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i> | 76.11 a                 | 2.45 a  | 2.45 b                   | 1.97 a  |
| Sin inocular               | 0 b                     | 0 b     | 98.3 a                   | 1.70 a  |

<sup>Ω</sup> En *P. montezumae* y *P. greggii* los valores con letras diferentes dentro de cada columna para cada especie representan diferencia estadística según Tukey (P=0.05) n=4.

### **5. 11 Porcentaje de colonización micorrízica**

En *P. montezumae* la colonización de las raíces vivas y muertas presentaron diferencias significativas, en las plantas inoculadas en relación a las plantas sin inocular, independientemente del hongo inoculado. En el caso de *Pinus montezumae*, el mayor porcentaje registrado de raíces muertas (11.8%) lo presentó el testigo, lo cual no ocurrió para el caso de *Pinus greggii*.

Las características morfológicas y anatómicas de la ectomicorrizas proporcionan información muy valiosa relacionada con los micobiontes involucrados (Izumi *et al.*, 2008). El color de las micorrizas puede ser blanco, café, amarillo o negro dependiendo del hongo asociado (Rivera, 2007). La asociación ectomicorrízica se produce en las raíces más finas de la planta, ápices radicales, y son difíciles de apreciar a simple vista ya que las raicillas micorrizadas no suelen superar 2 ó 3 mm de longitud y 0.3 a 0.4 mm de diámetro. Externamente las ectomicorrizas producen un engrosamiento de las raicillas terminales, debido al recubrimiento del manto fúngico, y a la vez provocan intensa división radical que confiere a las raíces un aspecto a veces coraloide muy particular u otro tipo de formaciones más o menos complicadas (dicotómicas, pinnadas o tuberosas). En algunos casos se forman glomérulos o apelotonamientos.

## 6. CONCLUSIONES

- El hospedero influyó en la presencia de los grupos bacterianos evaluados, especialmente en el caso de las bacterias solubilizadoras de fosfatos y fijadoras de Nitrógeno, asociadas con su rizósfera. Se observaron mayores efectos, en términos de asociación con dichos grupos bacterianos en plantas micorrizadas en el caso de *P. greggii*, que con *Pinus montezumae*.
- En las raíces endófitas de ambas especies de pinos se encontraron, bacterias totales, solubilizadoras de fosfatos y fijadoras de nitrógeno. Este es un hallazgo importante debido a que se ha demostrado que en especies forestales estos microorganismos pueden favorecer la colonización ectomicorrízica.
- En ambas especies de pino, la inoculación con la ectomicorriza incrementó algunas variables de crecimiento con respecto al testigo. Por ejemplo en *Pinus montezumae*, la inoculación con *Boletus edulis* originó el mayor volumen de la raíz y, en *Pinus greggii* dicho efecto se observó con la inoculación con *Laccaria laccata*. En ambas especies, la inoculación con *Boletus edulis* originó el mayor valor para la longitud del tallo.
- El método de inoculación empleado fue eficiente en todas las combinaciones de especies evaluadas, dado que siempre se observaron mayores porcentajes de colonización ectomicorrízica en plantas inoculadas en relación plantas sin inocular.

- En términos general la utilización de bioinoculantes como los hongos ECM, es una herramienta biotecnológica viable para mejorar el crecimiento y desarrollo de especies forestales como *Pinus montezumae* y *P. greggii*. Sin embargo, el estudio de cómo las poblaciones bacterianas influyen la colonización ectomicorrízica en plantas nativas de México, a pesar de la gran relevancia que tiene esta simbiosis tripartita, se encuentra en su infancia.

## 7. LITERATURA CITADA

- Alarcón, B. M. 1999. Crecimiento inicial y calidad de planta de *Pinus greggii* Engelm. bajo diferentes condiciones de fertilidad en invernadero. Tesis Montecillo, Texcoco, Edo. de México.123
- Almaraz, S. J.J. y Ferrera-Cerrato, R. 2007. Fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas. *In* Ferrera-Cerrato R. y Alarcón. pp 225-238. Microbiología Agrícola. (eds) Trillas.
- Barajas-Rodríguez, J. E.; Aldrete, A.; Vargas-Hernández, J.J.; y López-Upton, J. 2004. La poda química en vivero incrementa la densidad de raíces en árboles jóvenes de *Pinus greggii*. *Agrociencia* 38: 545-553.
- Barbieri, E.; Guidi, C.; Bertaux, J.; Frey-Klett, P.; Garbaye, J.; Ceccaroli, P.; Saltarelli, R.; Zambonelli, A. and Stocchi, V.2007. Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environmental Microbiology*.9: 2234–2246.
- Barriuso, J.; Pereyra, M.; Lucas G. J.; Megías, A.; Mañero, M.y Ramos, B. 2005. Screening for Putative PGPR to Improve Establishment of the Symbiosis *Lactarius deliciosus-Pinus* sp. *Microbial Ecology*. 50: 82–89.



- Barriuso, J.; Solano, R.; Santamaría, C.; Daza, A. y Mañero, G. 2008. Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *Journal of Applied Microbiology*. 105:1298–1309.
- Bashan, Luz, E.; Holguin, G.; Glick, B. y Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In* Ferrera-Cerrato R. y Alarcón, A. pp 170-224. *Microbiología Agrícola*. (eds) Trillas.
- Brunetta, F.; Alfenas, A; Gonçalves, R.; Gomes, J.; Breda, D. y De Pádua. É. 2007. Avaliação da especificidade de rizobactérias isoladas de diferentes espécies de *Pinus* sp. *Árvore*, Viçosa-MG. 31: 1027-1033.
- Burke, D.; Kretzer, J.; Rygiewicz, P. and Topa, M. 2006. Soil bacterial diversity in a loblolly pine plantation: influence A., of ectomycorrhizas and fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*. 57: 409–419.
- Buscot, F.; Munch, J.; Charcosset, J.; Gardes, Y.; Nehls, M. and Hampp, R. 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 24:601-614.

- Calvaruso, C.; Turpaul, M.; Leclerc, E. and Frey-Klett, P. 2007. Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microbial Ecology*.54: 567–577.
- Carrera-Nieva A. y López-Ríos. G. 2004. Manejo y Evaluación de Ectomicorrizas en Especies Forestales. *Revista Chapingo. Series Forestales y del Ambiente*. 10: 93-98.
- Castellano, M.; and Molina, R. 1989. “Mycorrhizae”. En: Landis, T., R. Tinus, S. McDonald, J. Barnett. *The Container Tree Nursery Manual Agric. Handbook*. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 5: 101-167.
- Chalot, M. and Brun, A. 1998. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews*. 22:21-44.
- Chalot, M.; Javelle, A.; Blaudez, D.; Lambilliotte, R.; Cooke, R.; Sentenac, H.; Wipf, D. and Botton, B. 2002. An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant and Soil*. 244: 165–175.
- Conrado, M. W. 1964. Formación de micorrizas en pinos centroamericanos bajo condiciones controladas. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Centro de Enseñanza e investigación. Turrialba Costa Rica.

- Dalmaso, A.; Masuelli, R. y Salgado, O.1994. Relación vástago-raíz durante el crecimiento en vivero de tres especies nativas del monte *Prosopis chilensis*, *Prosopis flexuosa* y *Bulnesia retuana*. *Multequina*.3:35-43.
- D'Haese, W.; Verplancke, C.; Mironov, V. and Holsters, M. 2002. pMH11, a tool for gene disruption and expression analysis in *Azorhizobium caulinodans*. *Plasmid*. 47:88–93.
- Duñabeitia, M.; Rodríguez, N.; Salcedo, I. and Sarrionandia, E. 2004. Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broad leaf plantation in the Basque Country. *Forest Ecology and Management*. 195: 129–139.
- Duponnois, R.; Founoune, H.; Masse, D. and Pontanier, R. 2004. Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semiarid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation *Forest Ecology and Management* 207: 351–362.
- Estrada, T. A. 2007. Ecología de los hongos ectomicorrízicos. En: Ferrera-Cerrato, R, y Alarcón, A. (Eds) *Trillas. Microbiología Agrícola*. pp 134-168.
- Estrada-Martínez, E.; Guzmán, G.; Cibrián, T. y Ortega, P. 2009. Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunidades de la Sierra Nevada (México). *Interciencia* 34: 25-33.

- Farjos, A. and Styles, B. 2004. *Pinus* (Pinaceae). Flora neotrópica monografía 75. New York Botanical Garden, New York.
- Founoune, H.; Duponnois, R.; Meyer, J.; Thioulouse, M.; Masse, J.; Chotte, D. and Neyra, M. 2002. Interaction between ectomycorrhizal symbiosis and fluorescent pseudomonads on *Acacia holosericeae*: isolation of micorrhiza helper bacteria (MHB) from a Soudano-Sahelian soil. FEMS Microbiology Ecology. 1370: 1–10.
- Franco-Correa, M.; Quintana, C.; Duque, C.; Suarez, M.; Rodríguez, J. y Barea, J.2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. Applied Soil Ecology 45: 209–217.
- Frey-Klett, P.; Chavatte, M.; Clause, M.; Courier, S. and Le Roux, C.2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. New Phytologist.165 :317-328.
- Futai, K.; Taniguchi, T. and Kataoka R.2008.Ectomycorrhizae and their importance in forest ecosystems. (eds.), Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. 241–285.
- Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytol. 128: 197-210.

- Gómez, C. y Corlay, L. 2007. Microbiota edáfica y su importancia en la agricultura. *In: Ferrera-Cerrato R. y Alarcón, A.* pp 39-55. *Microbiología Agrícola.* (eds) Trillas.
- Glick, B.; Patten, C.; Holguin, G. and Penrose, D. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. pp 1-267. Imperial College Press. London. England.
- Gyaneshwar, P.; Naresh, G.; Parekh, J. and Poole, P. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil.* 245: 83–93.
- Halling, E. 2001. Ectomycorrhizae, Co-evolution, Significance and Biogeography. *Annals of Missouri Botanical Garden.* 88:5-13.
- Hawkes, C. 2003. Nitrogen cycling mediated by biological soil crusts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology.* 84:1553–1562.
- Hryniewicz, K.; Baum, C.; Niedojado, J. and Dahm, H. 2009. Promotion of mycorrhiza formation and growth of willows by the bacterial strain *Sphingomonas* sp. 23L on fly ash. *Biol Fertil Soils.* 45:385–394.
- Izumi, H.; Cairney, J.; Killham, K.; Moore, E.; Alexander, I. and Anderson I. 2008. Bacteria associated with ectomycorrhizas of slash pine (*Pinus elliottii*) in south-eastern Queensland, Australia. *FEMS Microbiol Lett.* 282: 196–204.

- Jordan, M. 2004. The encyclopedia of fungi of Britain and Europe. Royal Botanical Garden. Edinburgh. 384 pp.
- Khetmalas, M.; Egger, K.; Massicotte, H.; Tackaberry, L. and Clapperton M. 2002. Bacterial diversity associated with subalpine fir (*Abies lasiocarpa*) ectomycorrhizae following wildfire and salvage-logging in central British Columbia. Journal Microbiol. 48: 611–625.
- Kohashi-Shibata, J. 1990. Aspectos de la morfología y fisiología del frijol *Phaseolus vulgaris* L. y su relación con el rendimiento. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. México. México. 44 p.
- Koide, T. and Schreiner P. 1992. Regulation of vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 557–581.
- Kretzer, A.; Kretzer, M.; Zachary, R.; King, S.; and Bai. 2009. Bacterial communities associated with tuberculate ectomycorrhizae of *Rhizopogon* spp. Mycorrhiza 19:277-282.
- Li, C. and Hung, L. 1987. Nitrogen-fixing (acetylene-reducing) bacteria associated with ectomycorrhizae of Douglas-fir. Plant and Soil. 98: 425-428.

- Lucas García, J.; Domenech, J.; Santamaría, C.; Camacho, M.; Daza, A. and Gutiérrez Mañero, J. 2004. Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environmental and Experimental Botany*. 52:239–251.
- Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 2001. *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall Iberia, España. 984 p.
- Marmeisse, R.; Guidot, G.; Gayl, R.; Lambilliotte, H.; Sentenac, J.; Combierl, D.; Melayah, L.; Fraissinet-Tachet, J. and Debaud', C. 2004. *Hebeloma cylindrosporum* a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytologist*. 163: 481-498.
- Miller, O.; and Miller, H. 2006. *North American mushrooms: a field guide to edible and inedible fungi*. Falcon and falcon guide Book Publishing. 583pp.
- Mitchell, L. 1970. *Crop growth and culture*. Iowa State University Press. 349 pp.
- Neroni, R.; Jurandy, E. and Nogueira, B. 2007. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. *Scientia Agricola*. 64 :3.
- Ouahmane, L.; Revel, J.; Hafidi, M.; Thioulouse, J.; Prin, Y.; Galiana, A.; Dreyfus, B. and Duponnois, R. 2009. Responses of *Pinus halepensis* growth, soil microbial catabolic functions and phosphate-solubilizing bacteria after rock phosphate amendment and ectomycorrhizal inoculation. *Plant and Soil*. 320: 169-179.

- Orozco-Jaramillo, C. y Martínez-Nieto, P. 2009. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque*. 30:70-77.
- Pérez-Moreno, R. y Read, D. 2004 Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29:239-247.
- Pérez-Moreno, J y Read, D. 2007. Ecología fisiológica y simbiosis ectomicorrizica. *In* Ferrera-Cerrato R. y Alarcón. pp 134-168. *Microbiología Agrícola*. (eds) Trillas.
- Pérez-Moreno, J.; Lorenzan, A.; Carrasco, V. y Yescas-Pérez, A. 2010. Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. Colegios de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 167p.
- Prieto, R.; Domínguez, A.; Navar, J. y Cornejo, E. 2004. Factores que influyen en la producción de plantas de *Pinus Cooperi blanco* en vivero. *Revista Chapingo*. Serie ciencias forestales y del ambiente. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 63-70.
- Pirttilä, A.; Päivi, J.; Pospiech, H.; Jalonen, J. and Hohtola, A. 2004. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiologia Plantarum* 121: 305–312.



- Requena, N.; Pérez, E.; Azcon, C.; Jeffries, P. and Barea, J. 2001. Management of indigenous plant microbiology symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:495-498.
- Rincón, A.; Ruíz-Díez, M.; Fernández-Pascual, A.; Probanza, J. and Pozuelo, J. 2006. Afforestation of degraded soil with *Pinus halepensis* Mill.: Effects of inoculation with selected microorganisms and soil amendment on plant growth, rhizospheric microbial activity and ectomycorrhizal formation. *Applied Soil Ecology.* 34:42-51.
- Rivera, G. 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología. Ed. Universidad estatal a distancia. San Jose Costa Rica. 308 p.
- Rodríguez, R. y Capó, M. 2005. Morfología de acículas y conos en poblaciones naturales de *Pinus arizonica* Engelm. *Ra Ximhai.* 001:131-152.
- Rodríguez, R.; Hofmann, G.; Espinosa, M. and Ríos, D. 2003. Biomass partitioning and leaf area of *Pinus radiata* trees subject to silvopastoral and conventional forestry in the VI region, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural.* 76:437-449.
- Roman, J.; Vargas, A.; Baca, H.; Trinidad, C. y Alarcón, B. 2001. Crecimiento de plántulas de *Pinus greggii* Engelm. en respuesta a la fertilización. *Rev. Ciencia Forestal en México.*

- Rost, T.; Barbour, M.; Thornton, R.; Weier, T. and Stocking, C. 1979. Botany. A brief introduction to plant biology. John Wiley and Sons. 344 pp.
- Rzedowski, G. y Rzedowski, J. 2001. Flora fanerógamica del Valle México. 2ª ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro (Michoacán). 1406 pp.
- Selossé, M.; Frank, A.; He, X. and Simard, S. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? Ecology and Evolution. Vol. 21 No. 11.
- Silva, L.; Abrahão, A.; Barberi, N.; Da Silva, K.; Furtado, F. and De Souza, F. 2009. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Plant Soil. 319:127–145.
- Smith, S. and Read, D. 1997. Mycorrhizal symbiosis. San Diego: Academic Press. 605 pp.
- Sprent, J. 2005. Biological nitrogen fixation associated with angiosperms in terrestrial ecosystems. In: H. BassiriRad (Ed.) Nutrient acquisition by plants an ecological perspective Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Ecological Studies. 181: 89-116.
- Tablada, J. 1983. Hongos mexicanos comestibles. Micología económica. México, Fondo de Cultura Económica-Academia Mexicana.

- Thompson, B. 1985. Seedling morphological evaluation: What you can tell by looking. *In:* Duryea, M. L (eds.).Evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major test. *For. Ecol. Manage.* 2:123-132.
- Warmink, J.; Nazir, R. and Van Elsas, J. 2009.Universal and species-specific bacterial ‘fungiphiles’ in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environmental Microbiology.*11:300–312.
- White, J. and Izquierdo, J. 1991. Physiology of yield potential and stress tolerance. *In:* A. Van Schoonhoven and Voyset, O. *Research for Crop Improvement.*
- Yamakana, T.; Ching-Y, L.; Bormann, B. and Okabe, H. 2003. Tripartite associations in an alder: effects of *Frankia* and *Alpova diplophloeus* on the growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of *Alnus tenuifolia*. *Plant and Soil.* 254:179–186.
- Zitácuaro, C.y Rentería, A. 2004. Variación de altura y diámetro de plántulas de pinos Oaxaca mirov de tres poblaciones de México. *Foresta Veracruzana.* Universidad Veracruzana Jalapa México. 6: 21-26.
- Zhang, H.; Tang, M.; Chen, H.and Zheng, C. 2010. Effects of inoculation with ectomycorrhizal fungi on microbial biomass and bacterial functional diversity in the rhizosphere of *Pinus tabulaeformis* seedlings. *European Journal of Soil Biology* 46:55-61.

## 8. ANEXOS

Anexo 1

| <b>Medio de Picovskaya</b>         |        |
|------------------------------------|--------|
| Glucosa                            | 10g    |
| Fosfato de calcio                  | 5g     |
| Cloruro de sodio                   | 0.2g   |
| Sulfato de amonio                  | 0.5g   |
| Sulfato de magnesio heptahidratado | 0.1 g  |
| Extracto de levadura               | 0.5g   |
| Sulfato de manganeso               | 0.1g   |
| Agar-Agar                          | 20g    |
| Agua                               | 1000mL |

Anexo 2

| <b>Agar Nutritivo</b> |        |
|-----------------------|--------|
| Extracto de carne     | 3g     |
| Peptona               | 5g     |
| Agar-Agar             | 15g    |
| Agua destilada        | 1000mL |

### Anexo 3

| <b>Medio de Rennie</b>                             |         |
|--|---------|
| <b>Solución A</b>                                  |         |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 0.8 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0                  | 0.2 g   |
| NaCl <sub>2</sub>                                  | 0.1 g   |
| NaFeEDTA   | 0.028 g |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0.025 g |
| Extracto de levadura                               | 0.025 g |
| Manitol  | 5.0 g   |
| Sacarosa   | 5.0 g   |
| Lactato de sodio (60% v/v)                         | 0.5 mL  |
| Agua destilada                                     | 900 mL  |
| Agar   | 15 g    |
| <b>Solución B</b>                                  |         |
| MgSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O                 | 0.2 g   |
| CaCl <sub>2</sub>                                  | 0.06 g  |
| Agua destilada                                     | 100 mL  |
| pH del medio de cultivo                            | 7.0     |

#### Anexo 4

Respuesta de la inoculación con los hongos ectomicorrízicos en el peso fresco de *Pinus montezumae* y *Pinus greggii*.

| Peso fresco                |         |          |        |          |
|----------------------------|---------|----------|--------|----------|
| Tratamiento                | Raíz    | Acículas | Tallo  | *Vástago |
| <i>Pinus montezumae</i>    |         |          |        |          |
| <i>Boletus edulis</i>      | 7.07 b  | 10.45 a  | 2.71 a | 13.20 b  |
| <i>Laccaria laccata</i>    | 9.08 a  | 9.84 a   | 2.74 a | 12.60 a  |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i> | 7.77 b  | 4.31 ab  | 1.76 a | 4.88 a   |
| Testigo                    | 4.47 ab | 3.17 b   | 0.45 a | 3.66 a   |

Los valores son los promedios  $\pm$  error estándar de la media n=4. Una misma letra dentro de la columna significa que los tratamientos no fueron significativos de acuerdo a la prueba de Tukey (P<0.05).

#### Anexo 5

| Peso fresco                |         |          |         |          |
|----------------------------|---------|----------|---------|----------|
| Tratamiento                | Raíz    | Acículas | Tallo   | *Vástago |
| <i>Pinus greggii</i>       |         |          |         |          |
| <i>Boletus edulis</i>      | 6.95 ab | 9.46 ab  | 5.60 a  | 15.08 a  |
| <i>Laccaria laccata</i>    | 8.55 a  | 9.93 a   | 5.02 a  | 15.05 a  |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i> | 6.36 ab | 10.68 ab | 4.77 ab | 15.56 a  |
| Testigo                    | 4.69 b  | 3.64 b   | 1.39 b  | 5.06 b   |

Valores son los promedios  $\pm$  error estándar de la media n=4. Misma letra significa que los tratamientos no fueron significativos de acuerdo a la prueba de Tukey (P<0.05).

\*El peso fresco del vástago es la suma del peso fresco de acículas y de tallo.