



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

## EFECTO DE *Lupinus montanus* Kunth EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE UN PINO NEOTROPICAL

SONIA SIERRA BALBUENA

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2023



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **EFFECTO DE *Lupinus montanus* Kunth EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE UN PINO NEOTROPICAL**, realizada por la estudiante: **Sonia Sierra Balbuena**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)

  
DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUAREZ

ASESOR (A)

  
DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR (A)

  
DR. FAUSTINO HERNÁNDEZ SANTIAGO

ASESOR (A)

  
DR. MARCO POLO CARBALLO SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2023

# EFFECTO DE *Lupinus montanus* Kunth EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE UN PINO NEOTROPICAL

Sonia Sierra Balbuena, M.C  
Colegio de Postgraduados, 2023

## RESUMEN

En los bosques, el crecimiento y supervivencia de muchas especies arbóreas depende de la simbiosis ectomicorrízica. Asimismo, la presencia de especies fijadoras de nitrógeno como *Lupinus* puede proveer de este nutriente vital para otras especies, incluidas las que establecen simbiosis con hongos ectomicorrízicos. En el presente trabajo se evaluó el efecto de *Lupinus montanus* y de *Laccaria laccata* en el crecimiento de plantas de *Pinus ayacahuite*. De manera inicial se aislaron cuatro cepas de rizobios a partir de nódulos radicales de *Lupinus*, las cepas se evaluaron y se seleccionó la que presentaba mayor número de nódulos y efecto en biomasa y contenido de nitrógeno (N) en plantas de *Lupinus*. Las cepas se identificaron mediante biología molecular. Posteriormente, se estableció un experimento con cuatro tratamientos: *Pinus ayacahuite* sin inocular (testigo); *P. ayacahuite* asociado a *Lupinus montanus*; *P. ayacahuite* inoculado con *L. laccata* y sin *L. montanus* y *P. ayacahuite* inoculado con *L. laccata* y asociado con *L. montanus*. Además, todas las plantas de *Lupinus* se inocularon con una cepa de rizobios. Los tratamientos se establecieron en un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones. Se adecuaron macetas de 5 kg que tenían en el centro un tubete de 250 ml. Las macetas se llenaron con sustrato a base de arena de río, corteza de pino y suelo forestal (2:2:1). Las plántulas de pino se trasplantaron en los tubetes y se inocularon dos veces a razón de 3 y 1.5 g con *L. laccata*, respectivamente. Posteriormente, a los 30 días después del trasplante, en las macetas y alrededor del tubete, se sembraron semillas de *Lupinus*, que una vez germinadas, se inocularon con 2 mL de la cepa de rizobios seleccionada. Las plantas de *P. ayacahuite* se evaluaron a los 300 días después del trasplante, en términos de biomasa, diámetro de tallo, altura, contenido de macro y micronutrientes y colonización ectomicorrízica. El resultado del primer experimento determinó que la mejor cepa de rizobios fue la S1, la cual presentó mayor nodulación y fue identificada como *Bradyrhizobium japonicum*. En el segundo experimento, se encontraron diferencias significativas en altura y diámetro en los tratamientos inoculados con *L. laccata* y *L. laccata* asociado con *Lupinus montanus*. Asimismo, los tratamientos con *L. laccata* y *L. laccata* asociado con *Lupinus montanus* presentaron incrementos conspicuos en biomasa aérea y raíz, y en el contenido de macro y micronutrientes, respecto a las plantas testigo. Se observó un mayor porcentaje de colonización en el tratamiento de *L. laccata* (96.07 %) y *L. laccata* asociado con *L. montanus* (88.5 %). Debido al efecto benéfico registrado, los microorganismos evaluados tienen potencial biotecnológico en la producción de plantas de especies forestales de relevancia económica.

**Palabras claves:** Hongos ectomicorrízicos, *Pinus ayacahuite*, *Bradyrhizobium japonicum*, simbiosis, *Laccaria laccata*.

# EFFECT OF *Lupinus montanus* Kunth ON SEEDLING GROWTH OF A NEOTROPICAL PINE

Sonia Sierra Balbuena, M.C  
Colegio de Postgraduados, 2023

## ABSTRACT

In forests, the growth and survival of many tree species depends on ectomycorrhizal symbiosis. In addition, the presence of nitrogen-fixing species such as *Lupinus* can provide this vital nutrient for other species, including those that establish symbiosis with ectomycorrhizal fungi. In the present work, the effect of *Lupinus montanus* and *Laccaria laccata* on the growth of *Pinus ayacahuite* plants was evaluated. Initially, four rhizobia strains were isolated from root nodules of *Lupinus*, the strains were evaluated and the one with the highest number of nodules and effect on biomass and nitrogen (N) content in *Lupinus* plants was selected. The strains were identified by molecular biology. Subsequently, an experiment was established with four treatments: *Pinus ayacahuite* without inoculation (control); *P. ayacahuite* associated with *Lupinus montanus*; *P. ayacahuite* inoculated with *L. laccata* and without *L. montanus* and *P. ayacahuite* inoculated with *L. laccata* and associated with *L. montanus*. Furthermore, all the *Lupinus* plants were inoculated with a bradyrhizobia strain. The treatments were established in a completely randomized experimental design with 10 replicates. 5 kg pots with a 250 ml tube in the center were designed. The pots were filled with a substrate based on river sand, pine bark and forest soil (2:2:1). The pine seedlings were transplanted into the tubes and inoculated twice at a rate of 3 and 1.5 g with *L. laccata*, respectively. Subsequently, 30 days after the transplant, *Lupinus* seeds were sown in the pots and around the tube, which, once germinated, were inoculated with 2 mL of the selected bradyrhizobia strain. *P. ayacahuite* plants were evaluated 300 days after transplanting, in terms of biomass, stem diameter, height, macro and micronutrient content, and ectomycorrhizal colonization. The result of the first experiment determined that the best bradyrhizobia strain was S1, which presented the highest nodulation and was identified as *Bradyrhizobium japonicum*. In the second experiment, significant differences in height and diameter were found in the treatments inoculated with *L. laccata* and *L. laccata* associated with *Lupinus montanus*. Likewise, the treatments with *L. laccata* and *L. laccata* associated with *Lupinus montanus* presented conspicuous increases in aerial and root biomass, and in the content of macro and micronutrients, with respect to the control plants. A higher percentage of colonization was observed in the treatment of *L. laccata* (96.07 %) and *L. laccata* associated with *L. montanus* (88.5 %). Due to the registered beneficial effect, the evaluated microorganisms have biotechnological potential in the production of plants of economically relevant forest species.

**Keywords:** ectomycorrhizal fungi, *Pinus ayacahuite*, *Bradyrhizobium japonicum*, symbiosis, *Laccaria laccata*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios académicos.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS) campus Montecillos por permitirme realizar el trabajo de investigación.

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

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez por el apoyo y las atenciones prestadas durante la realización del trabajo, por compartir sus conocimientos y guiarme durante mi formación académica. Porque sin su apoyo este proyecto no sería posible.

Al Dr. Faustino Hernández Santiago por el tiempo brindado y sus acertadas sugerencias para mejorar el trabajo realizado, por todas las facilidades proporcionadas a mi persona para la culminación del trabajo y por brindarme su confianza y paciencia.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno por el apoyo y las atenciones prestadas durante la realización del trabajo, por compartir su conocimiento sobre el gran mundo de los hongos ectomicorrízicos.

Al Dr. Marco Polo Carballo Sánchez por la confianza, apoyo para que este trabajo se realizara, por sus sugerencias en el desarrollo del trabajo de investigación y siempre atento a mis avances.

A la Mtra. María E. Lara Hernández por aceptar ser mi sinodal en esta investigación, por las facilidades brindadas para la culminación de este trabajo, por su revisión y disposición incondicional del escrito, muchas gracias.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por compartir sus conocimientos y permitirme realizar la extracción de DNA de mis cepas bacterianas en su laboratorio.

A los compañeros del Colegio de Postgraduados, por intercambiar conocimientos y el apoyo brindado durante mi estadía en el Laboratorio de Microbiología del Postgrado de Edafología (Ivette, Sigrid, Mario, Jorge, Vivian, Luz, Orlando, Ángel, Amayrani). A todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta investigación. Muchas gracias.

## DEDICATORIA

Con amor y cariño dedico este trabajo a la Familia Sierra Balbuena, quienes depositaron su confianza en mí, porque siempre me motivaron a continuar mis estudios y brindarme el apoyo económico y moral.

A mi mamá Herlinda Fidelina Balbuena Balbuena por brindarme la vida y por darme lo que nunca nadie me podrá dar jamás su amor incondicional y sus palabras sinceras. Porque siempre luchaste contra viento y marea para que no me hiciera falta nada. Hoy te doy gracias porque mis logros me pertenecen y mis sueños no tienen caducidad. Eres mi mayor privilegio y mi mayor regalo, te lo mereces todo porque me has entregado a la vida. Hoy sé que soy tu anhelo, así como tu mayor felicidad y tu gran orgullo. ¡Gracias Mamá!

A mi papá Herón Salomón Sierra Rodríguez por cuidarme siempre, por preocuparse por mis necesidades y anhelos. Porque siempre me apoyaste a continuar con mis estudios. Por estar conmigo en las buenas y las malas. Gracias por tus llamadas cuando me encontraba lejos de casa, las cuales me alentaban y me llenaban de fuerza. Por todo lo que me enseñaste con tu ejemplo de persona honesta. Gracias por todo eso padre, porque ahora he comprendido que el amor verdadero es ese que se entrega sin esperar nada a cambio. Hoy valoro y comprendo lo difícil que es ser padre y por eso más te recuerdo y te quiero. ¡Gracias por siempre Papá!

A mi hermano Reynaldo Sierra Balbuena, por su confianza, para poder superarme como persona, además de su apoyo incondicional. Porque siempre me motivo a salir adelante y enfrentar todos los obstáculos a mi medio. Además, siempre estuvo pendiente de que nada me faltara. Sin él, este éxito no sería posible.

A mi hermano Jaciel Sierra Balbuena, porque siempre me inculcó que todo en esta vida se puede realizar, siempre me motivo a ser una persona valiente y fuerte para que fuera capaz de realizar cualquier cosa a mi medio. Por sus pláticas de motivación para salir adelante. Gracias hermano tenemos este gran éxito.

A mi hermana Xóchitl Sierra Balbuena, por su confianza y apoyo moral. Porque siempre me impulso a hacer y conocer cosas nuevas en la vida. Por inculcarme a luchar e indicarme la valoración de lo que tengo.

A mi hermana Angélica Sierra Balbuena porque a pesar de todas las adversidades siempre estuvo conmigo en las buenas y las malas. Porque me apoyó económica y moralmente. Además de que siempre estuvo atenta conmigo. Gracias hermanita ahora sé que todo se puede lograr con esfuerzo y dedicación.

A mi hermana Rubí Jazmín Sierra Balbuena, aunque ahora ya no estás conmigo, siempre estuviste atenta para que no me faltara nada en la vida. Por tus pláticas de motivación, por brindarme tu amor y cariño. Ahora entiendo lo difícil que fue para ti educarme desde pequeña. Gracias a ti me convertí en una gran persona. Hermanita hoy este logro no solo es mío es de las dos. Te quiero y extraño mucho. ¡Gracias hermanita!

## CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
LISTAS DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.1.1 Objetivos específicos.....	4
2.2 Hipótesis.....	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1 Género <i>Lupinus</i> .....	5
3.1.1 <i>Lupinus montanus</i> Kunth.....	7
3.2 Importancia de la simbiosis rizobio-leguminosa.....	8
3.3 Importancia de <i>Lupinus</i> en ecosistemas y agroecosistemas.....	11
3.4 Ciclo del Nitrógeno (N).....	13
3.4.1 Fijación de nitrógeno.....	13
3.4.2 Nitrificación.....	13
3.4.3 Asimilación.....	14
3.4.4 Amonificación o mineralización.....	14
3.4.5 Inmovilización.....	14
3.4.6 Desnitrificación.....	14
3.5 Nitrógeno en el suelo.....	14
3.6 <i>Pinus ayacahuite</i> Ehren.....	17
3.7 Micorrizas.....	17
3.7.1 Tipos de micorriza.....	18
3.8 Interacción molecular de hongos ectomicorrízicos y raíz de especies forestales.....	20
3.9 Simbiosis de hongos ectomicorrízicos con especies forestales.....	22
3.10 Género <i>Laccaria</i> .....	23



3.11 <i>Laccaria laccata</i> (Scop.) Cooke.....	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1 Localización .....	25
4.2 Material biológico.....	25
4.3 Establecimiento del experimento 1 .....	26
4.3.1 Aislamiento de rizobios y confirmación de nodulación.....	26
4.3.2 Identificación molecular de las cepas de rizobios aisladas .....	27
4.4 Establecimiento del experimento 2 .....	28
4.4.1 Esterilización del sustrato y adecuación del contenedor (prototipo).....	28
4.4.2 Inóculo de hongo ectomicorrízico .....	29
4.4.3 Siembra de semillas de <i>Pinus ayacahuite</i> .....	30
4.4.4 Trasplante e inoculación de <i>Pinus ayacahuite</i> y <i>Lupinus montanus</i> .....	30
4.4.5 Diseño experimental .....	30
4.4.6 Determinación de la colonización ectomicorrízica y descripción morfoanatómica de los morfotipos presentes.....	31
4.4.7 Evaluación de variables de crecimiento y determinación de análisis nutrimental.....	31
4.4.8 Relación nutrimental parte aérea: raíz .....	32
4.4.9 Análisis estadístico.....	32
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL .....	33
5.1. Nodulación de <i>Lupinus montanus</i> .....	33
5.2 Identificación molecular de las cepas de rizobios.....	33
5.3 Colonización ectomicorrízica .....	34
5.4 Crecimiento vegetal.....	38
5.5 Caracterización macro y micromorfológica de la ectomicorriza <i>Laccaria laccata</i> ....	40
5.6 Contenido de nutrientes en el tejido vegetal .....	42
5.7 Relación parte aérea/raíz.....	46
VI. CONCLUSIONES .....	49
VII. VI. LITERATURA CITADA.....	50

## LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1. Peso seco aéreo y radical, número de nódulos y nitrógeno (N) de la parte aérea de plantas de <i>Lupinus montanus</i> inoculadas o no con cuatro cepas de <i>Bradyrhizobium</i> , cosechadas a los 90 días después de la siembra.....	33
Cuadro 2. Identificación molecular de las cepas de rizobios aisladas de nódulos radicales de plantas de <i>Lupinus montanus</i> colectadas en el monte Tlálloc, Texcoco, México.....	34
Cuadro 3. Raíces cortas vivas y muertas en plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> inoculadas o no con <i>L. laccata</i> con y sin asociación de <i>Lupinus montanus</i> , 300 días después de la inoculación. ....	35
Cuadro 4. Altura, diámetro del tallo y peso seco en plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> inoculadas o no con <i>L. laccata</i> con y sin asociación de <i>Lupinus montanus</i> , 300 días después de la inoculación .....	39
Cuadro 5. Contenido de macronutrientes en el tejido vegetal de <i>Pinus ayacahuite</i> inoculadas o no con <i>L. laccata</i> con y sin asociación de <i>L. montanus</i> , 300 días después de la inoculación. ....	44
Cuadro 6. Contenido de micronutrientes en el tejido vegetal de <i>Pinus ayacahuite</i> inoculadas o no con <i>L. laccata</i> con y sin asociación de <i>L. montanus</i> , 300 días después de la inoculación. ....	45
Cuadro 7. Relaciones parte aérea: raíz de macronutrientes y micronutrientes en <i>Pinus ayacahuite</i> inoculado o no con <i>L. laccata</i> , con y sin asociación de <i>L. montanus</i> , a los 300 días después de la inoculación.....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Lupinus</i> en México (Bermúdez Torres et al., 2000). .....	6
Figura 2. A) Primordio pequeño de <i>Laccaria laccata</i> , B), esporas a 40X., C) Esporoma maduro. ....	24
Figura 3. Adecuación del prototipo (contenedor y tubete) con plantas de <i>Lupinus montanus</i> y <i>Pinus ayacahuite</i> .....	29
Figura 4. A) Prototipo utilizado (maceta y tubete); B) Inoculación con <i>Laccaria laccata</i> a plántulas de <i>Pinus ayacahuite</i> ; C) Primordio asociado con raíces; D y E) Esporomas presentes en plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> inoculado con <i>Laccaria laccata</i> ; F) Comparación de plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> inoculadas o no con <i>Laccaria laccata</i> con y sin asociación de <i>Lupinus montanus</i> . .....	37
Figura 5. Efecto de la inoculación en la biomasa foliar de <i>Pinus ayacahuite</i> inoculado o no con <i>Laccaria laccata</i> y con y sin asociación con <i>Lupinus montanus</i> . Lm= <i>Lupinus montanus</i> ; Ll= <i>Laccaria laccata</i> ; Psi= Plantas sin inocular. ....	38
Figura 6. Características micromorfológicas de los morfotipos y esporomas de <i>Laccaria laccata</i> . A y B) esporomas presentes en plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> inoculado con <i>Laccaria laccata</i> ; C y D) ectomicorrizas monopodiales y dicotómicas en estadio joven de <i>L. laccata</i> , barra negra (1 mm); E) corte transversal de la ectomicorriza mostrando red de Hartig (rH), manto (m), y micelio externo (me); F) manto fúngico externo (m) .....	41

## I. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Lupinus* son leguminosas anuales o bianuales que crecen en bosques de coníferas, en orillas de caminos, laderas de montañas, en zonas de cultivo, en bosques degradados y en ecosistemas naturales desde el nivel del mar y hasta 4,000 metros de altitud; se destacan por ser resistentes a condiciones adversas como sequías, heladas, enfermedades y plagas (Ortega-David *et al.*, 2010; Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012). Conocidos por su nombre común como lupines, lupinis, chochos o altramuces, algunas especies se han cultivado desde la antigüedad como mejoradores de suelos y para alimentación humana y animal en la región andina y en Europa (Prusinski, 2017; Lina y Planchuelo, 2018; Mellal *et al.*, 2019; Zamora *et al.*, 2019).

En la Faja Volcánica Transversal Mexicana abundan diversas especies del género *Lupinus*, cuyas semillas pudieran ser utilizadas como alimento para los seres humanos y animales, debido a que presentan alto contenido de proteínas. Sin embargo, la principal limitante de *Lupinus* silvestre, es su alto contenido de alcaloides quinolizidínicos que son tóxicos para la alimentación humana. La presencia de estos compuestos en las semillas son un mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros (Pablo-Pérez *et al.*, 2015; Mellal *et al.*, 2019). El género *Lupinus* cuenta con más de 300 especies, la mayoría crece en América Central. En México no se cultivan especies del género *Lupinus*, pero se tienen aproximadamente 110 especies nativas distribuidas en varios estados, desde baja california hasta Chiapas, concentrados principalmente en la Sierra Madre Occidental y Eje Neovolcánico Transversal (Pablo-Pérez *et al.*, 2015; Zamora *et al.*, 2019).

Algunas especies como *Lupinus montanus* Kunth, *L. elegans* Kunth y *Lupinus* sp. fueron utilizadas en programas forestales del Estado de México y Michoacán para la rehabilitación de suelos y como abono verde (Zamora *et al.*, 2019). Las especies del género *Lupinus* son valiosas, por la alta cantidad de proteínas en sus semillas y la capacidad de obtener nitrógeno atmosférico por medio del proceso de fijación biológica de nitrógeno en simbiosis con bacterias conocidas como rizobios, las cuales toman el N atmosférico y lo convierten en amonio (Zamora *et al.*, 2019; Mellal *et al.*, 2019). Muy pocas especies de este género se han estudiado para conocer su potencial nutricional y la mayoría de ellas no han sido domesticadas. Además, las especies crecen en condiciones poco favorables, como en suelos ácidos y son capaces de fijar altas cantidades de nitrógeno atmosférico (Pablo-Pérez *et al.*, 2015).

En la actualidad los estudios que se han realizado sobre las especies del género *Lupinus* se enfocan en el mejoramiento genético, composición química de plantas y semillas, aspectos agronómicos, y nutrición humana y animal (Hernández *et al.*, 2008; Soto-Correa *et al.*, 2012; Pablo-Pérez *et al.*, 2015).

*Pinus ayacahuite* es una especie forestal mexicana de importancia económica y ecológica. Se distribuye de México hasta Centroamérica, crece entre los 2,200 y 3,000 metros de altitud, principalmente se encuentra en lomas y cañadas, el clima donde se desarrolla es templado cálido con temperaturas medias anuales de 13°C con precipitación de 700 a 1,200 mm anuales (Ortiz-Medrano *et al.*, 2008; López *et al.*, 2018). Además, es la principal especie que se utiliza para la producción de árboles de navidad (Arteaga-León *et al.*, 2018).

En los bosques de coníferas existen asociaciones mutualistas, en específico la relación entre hongos ectomicorrízicos y los árboles, mediante el cual la planta le proporciona carbohidratos y un microhábitat para el hongo, mientras que éste le permite a la planta una mejor captación de agua y nutrientes (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

Las plantas gimnospermas, principalmente, se asocian con los hongos ectomicorrízicos, los cuales les proporcionan nutrientes, protegen contra patógenos y permiten resistencia a condiciones extremas de sequía, incluyendo tolerancia a metales pesados, salinidad y altas temperaturas (Rentería-Chávez *et al.*, 2017). La producción de bioinoculantes elaborados a base de hongos ectomicorrízicos ha cobrado gran importancia a nivel mundial por diferentes razones, una de ellas es la búsqueda de tecnologías que disminuyan el deterioro del ambiente, como el utilizar organismos benéficos en el crecimiento vegetal y así evitar el uso excesivo de agroquímicos (Pérez-Moreno *et al.*, 2010; Rentería-Chávez *et al.*, 2017).

Existe escasa información sobre la importancia que tienen las poblaciones de *Lupinus* en ecosistemas naturales y, en particular en los bosques de pinos, dada su capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis con bacterias conocidas colectivamente como rizobios. De acuerdo a esto, es transcendental estudiar el impacto que puede tener las simbiosis *Lupinus*-rizobios en el crecimiento de pinos (*Pinus* spp). Estos últimos establecen simbiosis mutualista obligada con hongos ectomicorrízicos, los cuales les permiten obtener nutrientes y agua con mayor eficiencia.

Aun cuando se conoce poco sobre la contribución de *Lupinus* en el crecimiento de los pinos en ecosistemas naturales se asume que esta leguminosa juega un papel importante en las entradas de nitrógeno en los bosques. Diversos estudios han encontrado que la inoculación de plantas forestales con hongos ectomicorrízicos presenta efectos positivos en el crecimiento, por lo que estos hongos pueden ser empleados en programas de restauración y conservación de áreas naturales. Es por ello que es importante tomar acciones que incrementen los efectos en el ámbito de supervivencia de plantas y rehabilitación de ecosistemas con reforestaciones exitosas. Con la presente investigación se generó información y se aporta conocimiento sobre como la simbiosis *Lupinus*-rizobio coadyuva en el crecimiento y desarrollo de los pinos en simbiosis con hongos ectomicorrízicos, lo que pueda generar una biotecnología basada en hongos ectomicorrízicos y el uso de *Lupinus montanus* para lograr con mayor éxito el establecimiento y supervivencia de pinos en programas de reforestación.

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de *Lupinus montanus* inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* y *Laccaria laccata* en el crecimiento de plantas de *Pinus ayacahuite*.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Aislar e identificar mediante biología molecular bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de nódulos radicales de plantas de *Lupinus montanus* colectadas en el Monte Tláloc.
- Evaluar la colonización ectomicorrízica, contenido nutrimental, crecimiento y peso seco de *Pinus ayacahuite* inoculado con *Laccaria laccata* con y sin asociación de *Lupinus montanus* inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno.
- Realizar una caracterización morfológica de las micorrizas presentes en el sistema radical de plantas de *Pinus ayacahuite* inoculadas con el hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria laccata*.

### 2.2 Hipótesis

Las plantas de *Pinus ayacahuite* inoculadas con *Laccaria laccata* con y sin asociación de *Lupinus montanus* presentan un mayor crecimiento y contenido nutrimental en comparación con las plantas sin inocular.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Género *Lupinus*

El género *Lupinus* comprende más de 200 especies (Vázquez *et al.*, 2019; Zamora *et al.*, 2019), conocidos con los nombres de lupinos, chochos o altramuces. Se cultivan desde la antigüedad (Seisdedos y Planchuelo, 2018), presentan altas cantidades de proteínas en semillas y pueden usarse para regenerar el suelo (Lagunes *et al.*, 2012).

De acuerdo a Kurlovich *et al.* (2002), el género *Lupinus* se ubica en la siguiente categoría sistemática:

- **División:** *Magnoliophyta* (Angiospermae)
- **Subclase:** *Magnoliatae* (Dicotyledonea)
- **Orden:** *Fabales*
- **Familia:** *Fabaceae*
- **Tribu:** *Genisteae*
- **Género:** *Lupinus*

Las especies de *Lupinus* varían de anual a perenne, con distintos hábitos de crecimiento desde acaulescentes o pequeños postrados hasta arbustos y árboles, que llegan a medir entre 4.5 a 8 m de altura con troncos leñosos de 30 cm de diámetro como *Lupinus jaimehintoniana* B.L Turner presente en México. Las principales características que distinguen al género *Lupinus* son flores grandes en racimos terminales; flores con cáliz profundamente hendido, pétalo estándar erecto; alas connadas en el ápice; quilla curvada, picuda y encerrada dentro de las alas; con 10 estambres, alternativamente largos y basifijos, cortos y versátiles; ovario sésil; estilo curvado, glabro; estigma terminal; vaina oblonga, más o menos comprimida, septada entre las semillas, valvas gruesas y coriáceas, dehiscentes; cotiledones gruesos y carnosos (Wolko *et al.*, 2011). Se distribuyen en el Norte y Sur de América (Ainouche *et al.*, 2004; Zamora *et al.*, 2019). Desde el año 2,000 A.C. algunas especies fueron domesticadas para consumo humano y como forraje para los animales de forma independiente. En Sudamérica, la especie *Lupinus mutabilis*, conocido comúnmente como choco, tarwi o tarhui, fue utilizada como uno de los ingredientes para las dietas de los incas y otras



civilizaciones de las altiplanicies andinas de Perú, Bolivia y Ecuador (Seisdedos y Planchuelo, 2018).

La mayoría de especies domesticadas y económicamente aprovechadas en Europa son utilizadas como fuente de proteína y aceite. En el mundo se han identificado cuatro especies que son cultivadas (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. luteus* y *L. mutabilis*), las cuales han sido modificadas en sus características morfológicas de vaina y semilla, resistencia a condiciones de estrés por sequías y patógenos (Vázquez *et al.*, 2019). Se encuentran en países como: Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina (Jacobsen y Mujica, 2006; Luna *et al.*, 2019). Asimismo, se ha cultivado en rotaciones con cereales durante al menos 200 años y se distribuye ampliamente en el viejo y nuevo mundo (Wolko *et al.*, 2011).

En México las poblaciones de *Lupinus* crecen en caminos, laderas de cerros, en bosques degradados y en ecosistemas naturales a altitudes hasta los 4,000 m. Se reportan 111 especies, de las cuales 60 son endémicas, se distribuyen desde Baja California hasta Tamaulipas y al sur hasta Chiapas. La mayor concentración de especies se encuentra en la Sierra Madre Occidental y la Faja Volcánica Transversal. Entre las especies más abundantes se encuentra *Lupinus elegans*, *L. campestris*, *L. montanus*, *L. stipulatus*, *L. splendens*, *L. hartwegii* y *L. polyllus* (Bermúdez *et al.*, 2000; Lagunes *et al.*, 2012). En zonas de alta montaña, *L. montanus* es una de las especies dominantes del estrato herbáceo (Figura 1).

Especies como *L. leptophyllus* y *L. campestris* son consideradas como malezas en diferentes estados como la Ciudad de México, Hidalgo, Jalisco, Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Luna *et al.*, 2019).



Figura 1. Distribución del género *Lupinus* en México (Bermúdez Torres *et al.*, 2000).

Las especies del género *Lupinus* presentan potencial en la nutrición humana, al contener ácidos grasos, minerales, carbohidratos, fibra cruda y aceite comestible (Pablo-Pérez *et al.*, 2015). Además, varias especies de *Lupinus* son usadas en la medicina tradicional para tratar infecciones de la piel y vías urinarias; extractos de la planta tienen actividad anticancerígena, antidiabéticos, antihipertensivo y antimicrobiano, entre otras (Ishaq *et al.*, 2022). También las flores por ser coloridas incentivan a su comercialización para adorno (Dunn, 2005). En el ámbito agronómico *Lupinus* es utilizado como abono verde favoreciendo a la fertilización y optimización de la estructura del suelo, principalmente para aéreas de baja productividad agrícola (Zapata, 2015). El género *Lupinus* desempeña un papel activo en el ciclo del N, debido a que fija el N atmosférico y lo transforma en forma asimilable (nitratos) (Whitford, 2002). Se estima que puede fijar hasta el 95 % del N que requiere de la atmósfera (Barrientos *et al.*, 2001).

De acuerdo con Rodas *et al.* (2001) la asociación *Lupinus*- maíz tiene un impacto positivo en las plantas, ya que estas crecen vigorosas, alcanzan tallas comerciales y mejoran significativamente la productividad. Asimismo, es aprovechado para el establecimiento de sistemas forestales con especies de coníferas (Gómez-Romero *et al.*, 2013).

*Lupinus* desempeña una función ecológica ya que es pionera en la recuperación de suelos erosionados y en la regeneración de zonas destruidas por actividades antropogénicas. Las raíces tienen la capacidad de ser fitorremediadoras, ya que pueden absorber metales pesados (Pb, Hg, Zn, Cr, Cd) (De la Cruz-Landero *et al.*, 2010). Su raíz es pivotante, profunda y ramificada, lo cual permite aprovechar los nutrientes en forma más eficiente. Estas especies de *Lupinus* son conocidas como indicadores de disturbio al establecerse en lugares perturbados por incendios, tala, pastoreo de ganado y campos cultivados (Kaye y Kuykendall, 2001; López-Bellido y Fuentes, 1986).

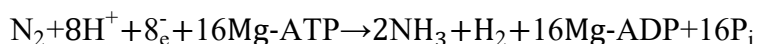
### **3.1.1 *Lupinus montanus* Kunth**

*Lupinus montanus* es una especie mexicana con alto contenido proteico y tiene una importante función ecológica. Las mayores poblaciones naturales de esta especie se localizan en el Cinturón Volcánico Transmexicano, en altitudes de 2,500 a 4,100 m, asociadas a bosques de pino (*Pinus hartwegii* Lindl.), encino (*Quercus* spp) y oyamel (*Abies religiosa* Kunt Schldl & Cham.) (Dunn, 2001).

### 3.2 Importancia de la simbiosis rizobio-leguminosa

En la década de los 80, las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas con leguminosas se clasificaron como pertenecientes al género *Rhizobium* con seis especies nombradas: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* y *R. japonicum* (Shamseldin *et al.*, 2016). Posteriormente, los rizobios fueron reclasificados en dos grupos: el grupo productor de ácido de crecimiento rápido (las cepas de *Rhizobium*) y un grupo productor alcalino de lento crecimiento (*Bradyrhizobium*), de acuerdo con su tiempo de regeneración y reacción de pH en el medio de manitol de extracto de levadura, con azul de bromofenol. Además, una de las características principales para diferenciar las especies de *Rhizobium*, es la nodulación que realizan con sus plantas hospederas específicas (Shamseldin *et al.*, 2016). En los últimos 40 años la taxonomía de rizobios ha cambiado substancialmente, de tal forma que actualmente el grupo está compuesto por 12 géneros y un total de 81 especies (Rivas *et al.*, 2009).

En específico, *Lupinus montanus* establece simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium*, bacteria de lento crecimiento (De Felipe *et al.*, 2006). El proceso de fijación de nitrógeno atmosférico se lleva a cabo dentro del nódulo radical, las bacterias (bacteroides) reducen el nitrógeno a amonio, que se secreta a la planta a cambio de una fuente de carbono y energía (Herridge y Doyle, 1988). La ecuación global de la fijación biológica de nitrógeno es la siguiente.



La fijación de nitrógeno de la simbiosis rizobio-leguminosa presenta alta relevancia en los ecosistemas naturales y agrícolas y depende mucho de la adecuada relación de los socios simbióticos (Peix *et al.*, 2015). Los nódulos son estructuras radicales que proporcionan un ambiente adecuado con baja tensión de oxígeno y alto acceso a fuentes de carbono y energía de origen vegetal que son indispensables para la fijación de nitrógeno y que es llevado a cabo por la enzima nitrogenasa bacteriana. Dentro de los nódulos las bacterias (bacteroides) reducen el nitrógeno a amonio, que liberan hacia las células de la planta a cambio de una fuente de carbono y energía (Peix *et al.*, 2015).

La mayoría de las bacterias que establecen simbiosis con lupinos se han clasificado dentro del género *Bradyrhizobium*, con excepción de *Microvirga lupini*, la cual se encontró que nodulaba a *Lupinus texensis*. Las especies del género *Bradyrhizobium* se asocian comúnmente con

leguminosas tropicales y subtropicales. En el caso de *Lupinus montanus* es la única leguminosa de zonas climáticas de tipo mediterráneo y templado (Revee *et al.*, 2013).

Se han descrito dos tipos de nódulos (determinados e indeterminados) en leguminosas según la presencia o no de un meristemo apical. Los nódulos determinados son de forma esférica, mientras tanto los indeterminados tienen forma cilíndrica y a menudo con ramificaciones. La estructura y función del nódulo están diseñadas para proporcionar un ambiente microaeróbico para la bacteria (Mylona *et al.*, 1995). La corteza externa del nódulo es aeróbica, pero hacia dentro de la estructura nodular hay baja concentración de oxígeno ( $O_2$ ), lo cual es esencial porque la enzima nitrogenasa es lábil al  $O_2$ . Sin embargo, el microsimbionte necesita  $O_2$  para generar ATP (Mylona *et al.*, 1995). Las células corticales infectadas de la planta producen una proteína portadora de  $O_2$  llamada leghemoglobina, que facilita la transferencia de  $O_2$  al bacteroide. A su vez, el bacteroide produce un citocromo oxidasa terminal especializado que le permite respirar bajo condiciones mínimas de  $O_2$  (Mylona *et al.* 1995).

Los rizobios son bacterias que viven libres en el suelo y el área rizosférica, sin embargo, una vez que están en los nódulos radicales, cambian de formas pleomórficas y son llamados bacteroides. Asimismo, su metabolismo se modifica para proveer energía para la fijación biológica de nitrógeno (FBN). El malato y/o el succinato son las fuentes de C transportadas al bacteroide y utilizadas en la producción de energía y como esqueletos de C para los procesos biosintéticos del bacteroide (Nápoles-García *et al.*, 2016). El aprovechamiento de la fijación de nitrógeno por leguminosas reduce parcialmente el uso de abonos o fertilizantes nitrogenados para las plantas que establecen esta simbiosis, disminuyendo algunos problemas de contaminación ambiental e inversión económica (Quinto y Cárdenas, 2007).

En el caso de las leguminosas de clima templado suelen desarrollar nódulos indeterminados de forma cilíndrica, que están unidos a la corteza radical interna y mantienen un meristemo apical persistente del que se originan todos los tejidos del nódulo. En estos nódulos se pueden observar zonas de desarrollo consecutivas en el tejido central infectado, que corresponde a un gradiente de diferenciación simbiótica desde el meristemo apical hasta los tejidos basales adheridos a la raíz. Los nódulos determinados son característicos de las leguminosas (sub) tropicales, estos se originan a partir de la división celular en la corteza externa (hipodermis) de la raíz y no tienen un meristemo persistente. La actividad meristemática cesa en una etapa temprana de desarrollo y el crecimiento

subsiguiente es causado por la expansión celular, lo que resulta en nódulos de forma esférica (Quinto y Cárdenas, 2007).

El inicio de la nodulación en las leguminosas se diferencia de muchas otras simbiosis en donde las células bacterianas ingresan a la raíz del huésped a través de los espacios intercelulares en la raíz y entran en las células de la corteza sin evidencia de un hilo de infección. En leguminosas los mecanismos de infección involucran rutas intracelulares como intercelulares. El proceso de infección más común es a través de los pelos radicales, en los cuales se forma una estructura de tubo intercelular delimitada por una membrana vegetal, el hilo de infección. En los hilos de infección entran las bacterias y proliferan incrustadas en una matriz de infección que crece hacia adentro hasta alcanzar el primordio nodular donde se liberan las bacterias. Este proceso celular es una endocitosis que conduce a la liberación de las bacterias en las células del primordio nodular. Dentro de estas células del huésped, las bacterias están encerradas por una membrana originada por la planta llamada membrana del peribacteroide (Nápoles-García *et al.*, 2016).

Los rizobios también pueden invadir la corteza de la raíz a través de una ruta intercelular mediante heridas naturales causadas por la división de la epidermis y la aparición de raíces laterales jóvenes (Harridge *et al.*, 1998). La infección es conocida como entrada a través de grietas, se ha descrito en leguminosas (sub) tropicales, como *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes* y *Aeschynomene*, donde no se observan hilos de infección y los rizobios invaden las células corticales a través de paredes celulares estructuralmente alteradas. En el tercer mecanismo, los rizobios penetran directamente entre las células epidérmicas no dañadas mediante la disolución de la laminilla media de las paredes celulares e invaden las células huésped a través de estructuras similares a hilos de infección (Bianco, 2020).

Gonzales-Sama *et al.* (2004) caracterizaron a detalle el proceso de infección de las raíces de *Lupinus albus* y las primeras etapas de organogénesis del nódulo lupinoide. A través de dos cepas de *Bradyrhizobium*, monitorearon el proceso de infección y morfogénesis. Los rizobios penetraron la raíz intercelularmente en la unión entre la base del pelo radical y una célula epidérmica adyacente. Las bacterias entraron en la célula cortical epidérmica inmediatamente debajo del pelo de la raíz a través de regiones de la pared celular estructuralmente alterada. La célula recién infectada se dividió repetidamente para formar la zona central infectada del nódulo joven. Las bacterias estaban distribuidas por igual entre las células.

### 3.3 Importancia de *Lupinus* en ecosistemas y agroecosistemas

El lupino o altramuza, es una de las leguminosas con mayor interés ecológico y agronómico, por ser fijadora de N, resultando benéfico para la agricultura y el ambiente. La capacidad de *Lupinus* por adaptarse a suelos contaminados con metales pesados permite considerarla como planta potencialmente fitorremediadora (De Felipe *et al.*, 2006). Generalmente estas especies prefieren hábitats abiertos y bien iluminados, suelos bien drenados, con pH ácido o neutro con una distribución limitada en el rango alcalino, las especies de semillas rugosas muestran cierta tolerancia a un pH por encima del neutro (Wolko *et al.*, 2011).

Las leguminosas son fuentes importantes de aceite vegetal, proteínas y minerales renovables para la producción de bioenergía. Los lupinos son leguminosas de gran relevancia agronómica y ecológica, dada la capacidad de fijar N atmosférico, repercutiendo positivamente sobre la agricultura y el medio ambiente, constituyendo un elemento de la agricultura sustentable (De Felipe *et al.*, 2006).

Lagunes *et al.* (2012) caracterizaron la diversidad morfológica y determinaron la concentración de proteína en semillas del *Lupinus*, en ecosistemas agrícolas y forestales de la región centro oriental del estado Puebla. Encontraron que las poblaciones tienen variabilidad morfológica, resultado de la diversidad. Cuatro especies fueron identificadas con base a las características morfológicas e intervalo altitudinal: *L. campestris* (2,600 y 3,052 m de altitud) en bordes de cultivo de maíz y haba o en áreas con bosque de *Juniperus deppeana*, *Pinus* sp. y *Abies religiosa*; *L. exaltatus* (2,778 y 2,865 msnm) en bosques de *P. montezumae*; *L. hintonii* (3,080 msnm), en bosques de *P. hartwegii*, *P. montezumae*, *P. rudis* y *A. religiosa*. Estos autores encontraron que las concentraciones de proteína de semilla en *L. campestris* varió de 328 a 387 g kg<sup>-1</sup> de materia seca. En *L. exaltatus* fue de 317 g kg<sup>-1</sup> y en *L. campestris* fue de 481 g kg<sup>-1</sup> MS.

Bianco *et al.* (2018) realizaron una revisión donde describieron sobre la situación actual de las áreas degradadas y las principales alternativas de uso de las leguminosas nativas para restauración en zonas áridas y semiáridas, además, analizaron la diversidad de microorganismos que nodulan las leguminosas y su importancia en la fijación de nitrógeno. Estos investigadores citan que las leguminosas nativas y sus simbiontes representan un germoplasma único que puede adaptarse para la restauración de ecosistemas degradados, para mantener la biodiversidad y mitigar los efectos

del cambio climático. Además, mencionaron que diversas leguminosas muestran tolerancia a distintos factores de estrés, salinidad, suelos con pH alcalino y suelo con baja fertilidad, entre las más conocidas se encuentran *Lupinus albus*, *L. consentinii* y *L. luteus*.

Vázquez *et al.* (2019) evaluaron las diferencias entre tres especies (*Lupinus montanus* Kunth, *L. campestris* Schltl & Cham y *L. exaltatus* Zucc), además, sus poblaciones, considerando las variables de supervivencia y características agronómicas tales como altura de la planta, inflorescencias, vainas, semillas y rendimiento de la biomasa. Sus resultados mostraron una supervivencia de 29, 54 y 61 % para *Lupinus montanus*, *Lupinus campestris* y *Lupinus exaltatus*, respectivamente. En cuanto a biomasa fue de 2.12 t ha<sup>-1</sup>, 2.08 t ha<sup>-1</sup> y 2.05 t ha<sup>-1</sup>, para cada una de esas especies. Las especies con mejor comportamiento en características agronómicas (tamaño de vaina, peso de semillas, número de inflorescencias, altura de planta) fueron *L. exaltatus* y *L. campestris*, haciéndolas promisorias para su aprovechamiento.

Zamora *et al.* (2019) cuantificaron la acumulación de biomasa y nitrógeno en tres especies silvestres de lupinos del Estado de Jalisco, México (*Lupinus exaltatus*, *L. rotundiflorus* y *L. mexicanus*), además, evaluaron la fijación biológica de nitrógeno en términos de cantidad de N fijado (kg ha<sup>-1</sup>) y proporción de N derivado de la atmósfera (% N<sub>dda</sub>). Los resultados mostraron que *L. exaltatus* fijó 187 kg ha<sup>-1</sup> a los 122 días después de la siembra, lo cual equivale a 83.8 % de N<sub>dda</sub>. Las especies de *L. rotundiflorus* y *L. mexicanus* mostraron valores significativos más bajos de N fijado a los 122 Dds (días después de la siembra). Los autores concluyen que *Lupinus exaltatus* fue la especie más eficiente en la fijación de nitrógeno atmosférico, debido a la asociación simbiótica entre la raíz y los rizobios nativos del suelo.

Luna *et al.* (2019) realizaron un estudio en el cual establecieron un cultivo de lupino (*Lupinus angustifolius*) para determinar la composición química y el costo de la semilla. El rendimiento del cultivo fue de 1,080 kg ha<sup>-1</sup>. El contenido de proteína cruda fue 27 % y 38 %. En cuanto al costo de producción por kilogramo de semilla fue de \$11.66 pesos que contrastó a lo anteriormente reportado y que fue de \$ 6.00 pesos. Entonces sus resultados sugieren que es factible cultivar lupino y con base a su contenido de proteína cruda, puede ser una estrategia en la alimentación animal o humana en México.

### 3.4 Ciclo del Nitrógeno (N)

El ciclo del N es dinámico y complejo, es conjunto de procesos naturales mediante el cual el nitrógeno se transforma en distintos estados de oxidación y reducción:  $N_2$ ,  $NH_4^+$ , N-orgánico,  $NO_2$ ,  $NO_3^-$  (Elizondo, 2006). El ciclo del nitrógeno tiene cinco etapas, de las cuales sólo la asimilación no es realizada por bacterias.

#### 3.4.1 Fijación de nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno consiste en la incorporación del nitrógeno atmosférico, a las plantas, este proceso se lleva a cabo principalmente por bacterias y cianobacterias presentes en el suelo y ambientes acuáticos (Delgadillo *et al.*, 2005).

La fijación es la conversión del nitrógeno atmosférico en amoníaco (fijación biológica) o en óxidos de nitrógeno (fijación abiótica). La fijación biológica de nitrógeno es llevada a cabo por microorganismos, y solo aquellos que poseen la enzima nitrogenasa son capaces de realizar el proceso. Sin embargo, la nitrogenasa únicamente funciona en ausencia de oxígeno, las bacterias deben aislar la enzima de su contacto. Algunas estrategias utilizadas por las bacterias son: vivir debajo de las capas que cubren a las raíces de ciertas plantas o vivir dentro de engrosamientos especiales de las raíces, llamados nódulos, en leguminosas como por ejemplo frijol, chícharo y mezquite. La relación entre *Rhizobium* y sus plantas huéspedes es una simbiosis mutualista. La cantidad de nitrógeno fijado por las bacterias es de 200 millones de toneladas anuales (Delgadillo *et al.*, 2005).

#### 3.4.2 Nitrificación

Las formas de nitrógeno que las plantas pueden asimilar son dos: el nitrato ( $NO_3^-$ ) y el amonio ( $NH_4^+$ ). El amonio es convertido a nitrato por los microorganismos a través de la nitrificación. El cambio de  $NH_4^+$  a  $NO_3^-$  depende de la temperatura del suelo. La conversión se da más rápido en temperaturas arriba de  $10^\circ C$  y pH de 5.5 a 6.5. Esta etapa es realizada en dos pasos por diferentes bacterias: primeramente, las bacterias del suelo *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus* convierten el amonio en nitrito ( $NO_2$ ) y posteriormente actúa *Nitrobacter* que oxida el nitrito a nitrato. La nitrificación les entrega energía a las bacterias (Hernán-Celaya *et al.*, 2011).



### **3.4.3 Asimilación**

Este proceso ocurre cuando las plantas absorben a través de sus raíces, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), elementos formados por la fijación de nitrógeno o por la nitrificación. Luego estas moléculas son incorporadas tanto a las proteínas, como los ácidos nucleicos de las plantas. Cuando los animales consumen los tejidos de las plantas, también asimilan nitrógeno y lo convierten en compuestos (Strock, 2008).

### **3.4.4 Amonificación o mineralización**

Los compuestos proteicos y otros similares constituyen en mayor medida de la materia nitrogenada apostada al suelo, son de poco valor para las plantas cuando se añaden de manera directa. Es así como los organismos producen desechos que contienen nitrógeno como la orina (urea), los desechos de aves (ácido úrico), y organismos muertos, son degradados por microorganismos presentes en el suelo y agua, liberando el nitrógeno en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). En este proceso, los microorganismos llevan a cabo la descomposición de los residuos orgánicos. La amonificación de los compuestos proteicos, peptonas y aminoácidos se produce bioquímicamente por medio de procesos de desaminación y descarboxilación y conduce a la formación de amonio (Strock, 2008).

### **3.4.5 Inmovilización**

Este proceso es contrario al de mineralización, a través del cual las formas inorgánicas ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ) son convertidas a nitrógeno orgánico no asimilable (Araujo y Toth, 2006).

### **3.4.6 Desnitrificación**

La reducción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), se le conoce como desnitrificación, este proceso se realiza por bacterias desnitrificantes que revierten la acción de las fijadoras de nitrógeno, regresando el nitrógeno a la atmósfera en forma gaseosa. En este proceso hay pérdida de nitrógeno para el ecosistema; ocurre donde existe un exceso de humedad (Ferraris *et al.*, 2008).

## **3.5 Nitrógeno en el suelo**

La dinámica de los ecosistemas terrestres está limitada a la disponibilidad de nutrientes. Estudiar el nitrógeno es indispensable porque es uno de los elementos más importantes para la vida en nuestro planeta después del agua (Lehninger, 1978). Es esencial en el crecimiento de las plantas,

además, es el elemento constituyente más abundante de varios compuestos principales que intervienen en el funcionamiento de múltiples organismos (Binkley y Hart, 1989; Troncoso *et al.*, 2013), ejemplo de ello son las proteínas de las plantas, clorofila, aminoácidos y ácidos nucleicos (Baca *et al.*, 2000; Valles *et al.*, 2003; Santi *et al.*, 2013). El nitrógeno en forma natural, es uno de los elementos más extensamente distribuidos en la naturaleza, el mayor reservorio se encuentra en la atmósfera en forma de gas ( $N_2$ ), con una abundancia del 78 % el cual es la fuente primaria principal de entrada para los ecosistemas. Sin embargo, metabólicamente no está disponible para su asimilación por las plantas debido a que la molécula de nitrógeno atmosférico presenta un triple enlace lo que la hace estable e inerte (Baca *et al.*, 2000; Valles *et al.*, 2003; Mays, 2004; Fernández *et al.*, 2006). Así que el nitrógeno juega un papel importante en la fertilización, composición y diversidad de especies vegetales (Chapin *et al.*, 2002).

Este elemento es limitado en el suelo, sin embargo, es indispensable para el desarrollo de las plantas, animales y microorganismos. Las plantas fijan el N en sus estructuras, a través de la asimilación. Asimismo, una vez que las hojas o raíces se mueren también reincorporan el N al suelo, a otros microorganismos y plantas (Celaya-Michel y Castellanos-Villegas, 2011).

El N en el suelo se encuentra en forma orgánica (90 %) y con poca presencia en forma inorgánica (10 %). En forma orgánica se encuentra como aminas, azúcares, purinas y proteínas; en forma inorgánica se encuentra como  $NH_4^+$  y  $NO_3^-$  (Binkley & Vitousek, 1989). En los ecosistemas el N solo se puede utilizar combinado, esto quiere decir en la formación de iones de N con otros elementos ( $NO_3^-$  y  $NH_4^+$ ) y macromoléculas pequeñas orgánicas de bajo peso molecular.

El  $NO_3^-$  es el que más utilizan las plantas debido a que tienen mayor accesibilidad. Sin embargo, depende de la especie y los factores ambientales como pH, temperatura y concentración de N en el suelo (Unkovich *et al.*, 1997). El amonio ( $NH_4^+$ ) es absorbido en condiciones específicas casi siempre anaerobias, así como en etapa temprana de crecimiento, al avanzar el crecimiento de la planta la absorción de  $NO_3^-$  aumenta (Perdomo & Barbazán, 1994), así es que el  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  y compuestos orgánicos son una limitante para los procesos biológicos del suelo (Barajas, 2008).

El N entra en el suelo a través de la mineralización de la materia orgánica o la fijación del N atmosférico (Fernández *et al.*, 2006). La mineralización es la transformación de nutrientes

orgánicos por microorganismos del suelo a formas asimilables para las plantas (Binkley y Hart, 1989).

La mineralización bruta es el recambio total del N liberado por la materia orgánica y la mineralización neta es la que resulta de la eliminación del N de la inmovilización microbiana con respecto a la mineralización bruta. La tasa de mineralización depende de los siguientes factores: temperatura, humedad, pH, aireación, tipo de N orgánico, propiedades físicas y químicas del suelo, también de la presencia de otros nutrientes e incluso de las prácticas de manejo (Binkley y Vitousek, 1989).

El N que contienen los compuestos orgánicos de organismos muertos (plantas, animales, hongos y bacterias), está disponible en un periodo a largo plazo. La descomposición de esta materia afecta las propiedades del suelo, aumentado la agregación y estabilidad de los agregados. Además, incrementa la capacidad de intercambio catiónico y aporta nutrientes como el N durante el proceso de descomposición (Guerrero-Ortiz *et al.*, 2012). La transformación de materia orgánica es regulada por la actividad microbiana en el suelo, entre otros (Binkley y Hart, 1989). Los microorganismos del suelo descomponen la materia orgánica más recalcitrante y son indicadores de cuantificación de la dinámica de N al controlar la disponibilidad y la pérdida de los ecosistemas (Atlas y Bartha, 2002).

Las tasas de descomposición y liberación de nutrientes también están determinadas por el contenido de nutrientes que contienen los residuos orgánicos, las especies que distinguen el ecosistema y las condiciones físicas y químicas del suelo (Swift *et al.*, 1979). Los residuos de leguminosas se degradan más rápido por la alta calidad de materia orgánica (Guerrero-Ortiz, *et al.*, 2012). Dentro de la mineralización primero se forma el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ). El cual puede adquirir un hidrógeno y formar amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), es fijado por las arcillas del suelo o por materia orgánica, volatilizado como amoníaco (Philippot & Germon, 2005).

La amonificación se lleva a cabo por microorganismos heterótrofos (Philippot & Germon, 2005). El  $\text{NH}_4^+$  puede ser fijado por la materia orgánica, por arcillas o asimilado por las plantas y microorganismos. A través de la volatilización se puede volver  $\text{NH}_3$ , además, puede perder átomos de hidrógeno por la nitrificación de bacterias autótrofas, ser oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2$ ) y posteriormente a  $\text{NO}_3$ , o bien puede ser lixiviado a los mantos acuíferos (Barajas, 2008). El  $\text{NO}_3$

se puede desnitrificar al oxidarse a  $\text{NO}_3$  o regresar a la atmósfera como N elemental ( $\text{N}_2$ ) (Binkley & Vitousek, 1989).

El N es uno de los elementos más dinámicos en el suelo y se puede perder de manera acelerada por lixiviación, nitrificación, desnitrificación, volatilización de  $\text{NH}_4^+$  o erosión del suelo (Philippot & Germon, 2005). Sin embargo, se puede mantener un equilibrio si hay una relación C/N estrecha a 10:1 (Fernández *et al.*, 2006).

### **3.6 *Pinus ayacahuite* Ehren**

Árbol de 35 a 40 m de altura y tronco de 2 m de diámetro, con copa cónica y crecimiento moderado, vive alrededor de 100 años. Se caracteriza por sus escamas delgadas, frágiles, largas y angostas, gradualmente atenuadas hacia la base y por el ala de sus semillas larga y estrecha (CONAFOR, 2001).

Se distribuye desde Guatemala, Honduras y El Salvador hasta la región central de México. Crece en suelos profundos y bien drenados. Se desarrolla entre los 2,200 y 3,000 metros de altitud, principalmente se encuentra en lomas y cañadas; el clima donde se desarrolla es templado cálido con temperaturas medias anuales de  $13^\circ\text{C}$  con precipitación de 700 a 1,200 mm anuales (Ortiz-Medrano *et al.*, 2008; López *et al.*, 2018). Es la principal especie empleada para la producción de árboles de navidad (Arteaga-León *et al.*, 2018).

Esta especie tiene importancia ecológica y económica, se utiliza en plantaciones comerciales y para reforestaciones en zonas urbanas y suburbanas en la construcción; dado a la buena calidad en la madera y la resistencia a plagas y enfermedades. Tiene amplia demanda y mayor precio que las otras especies de pino. Algunos subproductos generados con esta especie son: pasta para papel y como madera aserrada, en elaboración de lápices, muebles y marcos para ventanas y puertas, útil en la artesanía, triplay. Su resina es otro subproducto empleado para la elaboración de diversos productos. Por su belleza escénica se recomienda en parques y jardines deportivos (CONAFOR, 2001).

### **3.7 Micorrizas**

Son asociaciones entre hongos micobiontes y las raíces de plantas conocidas como fitobiontes (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012). Trappe (1994) menciona a las micorrizas en términos funcionales

y estructurales, como “órganos de absorción dobles que se forman cuando los hongos simbiotes viven dentro de los órganos de absorción sanos (raíces, rizomas) de las plantas terrestres, acuáticas o epífitas” (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012). Las micorrizas son fundamentales para la supervivencia de las plantas (Moreno *et al.*, 2010). Las especies resultan mutuamente beneficiadas esto indica una asociación mutualista, la planta le proporciona al hongo carbohidratos y un microhábitat para completar su ciclo de vida, mientras que el hongo permite a la planta una mejor captación de agua y nutrimentos minerales con baja disponibilidad en el suelo (Moreno *et al.*, 2010; Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

Esta asociación se presenta en el 90% de las plantas terrestres, se ubica en todos los ecosistemas del planeta y por lo tanto en diferentes gradientes altitudinales. Es importante destacar que existen hongos que pueden encontrarse en diferentes tipos de suelo y climas, esto indica que están adaptados a diversos hábitats, no obstante, los factores físicos y químicos del suelo pueden restringir su distribución (Read, 1991).

### 3.7.1 Tipos de micorriza

Smith y Read. (1997), mencionan que existen siete diferentes tipos de micorriza, considerando sus características estructurales grupo taxonómico del hongo o la planta involucrada y las alteraciones morfológicas que experimentan las partes en el desarrollo de la nueva estructura:

**a) Ectomicorrizas:** Son consideradas de gran importancia porque representan el segundo tipo de micorrizas más abundantes, micorrizan a pinos y algunas hojosas. La característica que la hace diferente de la ectomicorriza, es que carece de gruesas y abundantes hifas, a menudo presentan mantos coloridos. En el corte transversal de las raíces cortas, el hongo puede verse en el interior de las células corticales, presentado la red de Hartig entre estas (Kumar *et al.*, 2015); los efectos de los hongos que establecen este tipo de micorrización en el crecimiento y desarrollo de plantas en vivero, han sido benéficos (Landis *et al.*, 1989; Andrade-Torres, 2010; Roth-Bejerano, 2014).

**b) Micorrizas arbusculares:** Generalmente penetran por completo a células radicales de sus hospedantes, sin presencia de manto fúngico (Pérez-Moreno y Read, 2004). Smith y Read (1997) define que la simbiosis es indispensable en el desarrollo de los hongos formadores de micorrizas arbusculares que dependen totalmente de la planta fotosintética. Este tipo de micorrizas son completamente diferentes a las ectomicorrizas, no modifican las estructuras, ni la morfología

radical, los componentes del hongo son invisibles a simple vista. Para verificar las estructuras, así como el grado de colonización, las raíces deben ser teñidas y observadas bajo el microscopio. Además, presentan vesículas en forma de balón, de ahí su nombre, estas están compuestas por lípidos que, sirven como órganos almacenadores de energía, así como estructuras reproductivas. Los arbusculos son estructuras finamente ramificadas, intracelulares de vida corta, que sirven para el intercambio de nutrientes entre el hongo y el hospedante. El abundante micelio se ramifica a través de la corteza de la raíz, esta se extiende hasta el suelo.

**c) Micorriza orquideoide:** Se describió hace más de 100 años, representa un subtipo de la endomicorriza, ya que el hongo penetra las células radicales (Andrade-Torres, 2010). Además, se presentan únicamente en orquídeas, y los hongos que la forman son del grupo Basidiomycota en donde la orquídea depende del hongo, dado que estimula la germinación de sus semillas y el crecimiento inicial de las plántulas son aclorófilas y por lo tanto son dependientes, es decir que no presentan clorofila ni producen su propio alimento, sobreviviendo únicamente de las aportaciones de compuestos de carbono y nutrimentos que el hongo proporciona. Esta dependencia no solo ocurre en etapas de plántula, sino que también en etapa adulta. A través de los estudios morfológicos y moleculares se han identificado los hongos que establecen simbiosis con orquídeas, los cuales están incluidos dentro del grupo género-forma *Rhizoctonia* que incluye la fase asexual y sexual (anamorfa-telemorfo) los géneros *Cerotorhiza-Ceratobasidium*, *Epulorhiza-Tulasnella*, *Sebacina-Monilliopsis* y *Rhizoctonia-Thanatephorus* (Mosquera *et al.*, 2010).

**d) Micorriza ericoide:** Forma asociaciones con varias familias del orden Ericales. El hongo penetra a las células radicales. La familia Ericaceae con excepción del género *Arbutus*, realizan simbiosis de tipo ericoide, con hongos del género *Scytalidium*, *Oidiodendron*, *Myxotrichum* y *Byssosascus* (Andrade-Torres, 2010; Kumar *et al.*, 2015).

**e) Micorriza arbutoide:** Son un tipo de ectendomicorriza, el hongo penetra las células radicales y desarrolla la Red de Hartig en el fitobionte, la asociación se presenta principalmente en plantas del género *Arbutus*, perteneciente al orden Ericales haciéndose presente en zonas templadas (Andrade-Torres, 2010; Roth-Bejerano, 2014; Kumar *et al.*, 2015).

**f) Micorriza monotropoide:** es otro tipo de ectendomicorriza que se caracteriza por establecerse solamente entre plantas de la subfamilia *Monotropoideae* la cual pertenece a la familia Ericaceae,

del orden Ericales, con 10 géneros de plantas aclorófilas es decir sin clorofila, por lo que dependen mucho del hongo asociado para obtener nutrimentos. Andrade-Torres (2010) y Carmargo-Ricalde *et al.* (2012), mencionan que la asociación se presenta entre hongos endófitos; ascomicetos y basidiomicetos, y plantas del género *Pinus*, y del género *Monotropa* de la familia Ericaceae, que distribuyen en zonas templadas (Kumar *et al.*, 2015).

**g) Ectomicorriza:** En esta asociación el hongo forma estructuras a través del apoplasto del córtex de la raíz, denominada red de Hartig, donde se realiza la transferencia de nutrientes del hongo a la planta. La ectomicorriza se establece entre hongos de las clases Basidiomycetes y Ascomycetes y diversos grupos de angiospermas y gimnospermas. Este órgano resulta de una interacción favorable entre la planta y hongo (Smith y Read, 1997).

### **3.8 Interacción molecular de hongos ectomicorrízicos y raíz de especies forestales**

Las ectomicorrizas (ECM) son abundantes principalmente en climas templado, tropical y boreales, es una simbiosis entre especies arbóreas y hongos filamentosos del suelo (ascomicetos y basidiomicetos) (Smith y Read, 1997).

El micelio externo del hongo crece en el suelo y se conecta con el hospedero formando una simbiosis mutualista que beneficia a ambos organismos. Los carbohidratos que genera del proceso, fotosintético se trasladan de la planta al hongo heterotrófico, el cual necesita esta fuente rica en carbono para desarrollarse. Las hifas exploran el suelo y absorben minerales y agua que son en parte transferidos a la raíz (Smith y Read, 1997). El intercambio de metabolitos es indispensable para la persistencia tanto del árbol como del micelio, principalmente en condiciones ambientales perturbadas. Esta simbiosis juega un papel importante en la estabilidad de los ecosistemas forestales y protege los sistemas radiculares de ataques de patógenos y de condiciones adversas del suelo abiótico como estrés hídrico (Smith y Read, 1997). Las hifas pueden agregarse para formar estructuras múltiples (rizomorfos, cordones), particularmente adaptadas a transporte de solutos a larga distancia. El manto ectomicorrízico es un compartimento de almacenamiento, es una zona de amortiguación de hifas externas (red extraradical) y las hifas de “intercambio” (red intraradical). La red de Hartig es el lugar donde se realiza el intercambio de metabolitos entre células de la raíz y células fúngicas. Está conformado principalmente por hifas en la membrana que amplifican la zona de contacto con las células de la raíz. Las paredes celulares se alteran en

composición y estructura en comparación con las condiciones de vida libre y su plasticidad refleja su papel en la comunicación intra e intercelular. El tejido simbiótico final es el resultado de una integración física de raíces y células fúngicas (Smith y Read, 1997).

Los hongos ectomicorrízicos realizan simbiosis con especies de pinos y encinos. Se caracterizan principalmente por presentar manto fúngico, presenta una interacción directa con las hifas y las raíces secundarias de las plantas para formar estructuras (red de Hartig), donde se lleva a cabo la transferencia de nutrientes entre las células fúngicas y vegetales. En este tipo de micorrizas se encuentran hongos de la clase basidiomicetes y ascomicetes. Comúnmente crecen en suelos ácidos ricos en materia orgánica en regiones templadas como tropicales (Galindo-Flores *et al.*, 2015). Los primeros pasos en la señalización entre las plantas hospedantes y los hongos micorrízicos comienzan con el reconocimiento de las moléculas de señal liberadas por ambos socios.

Las plantas exudan muchos metabolitos primarios y secundarios en la rizósfera, incluidos azúcares, hormonas y enzimas que afectan el microbioma de la raíz. En las asociaciones de ECM, el efecto de estos exudados de raíces sobre el crecimiento de hongos ECM se describió por primera vez en la década de 1950 (Melin, 1954). Las cinco fitohormonas clásicas es la auxina, etileno, giberelinas, ácido abscísico y citoquininas, hoy en día otras moléculas como el ácido salicílico, brasinoesteroides y ácido jasmónico se han asignado como fitohormonas y otras sustancias que modifican el crecimiento (por ejemplo, estrigolactonas) (Gómez-Roldán *et al.*, 2008), por lo cual las fitohormonas debido a su naturaleza versátil y su producción por plantas y hongos son candidatas interesantes para mediar la señalización planta-hongo durante el desarrollo de ECM. Fries *et al.* (1987) observaron la germinación de esporas de *Suillus* spp. en respuesta al ácido abiético presente en los exudados de las raíces de *Pinus sylvestris*. En otro estudio se encontró un flavonoide vegetal (rutina) en las raíces de la planta *Eucalyptus globulus* spp. *bicostata* en interacción con *Pisolithus* spp. en este se encontró que mejoró el crecimiento de las hifas de dos cepas de *Pisolithus*, lo que sugiere un papel de los flavonoides en la especificidad de la simbiosis ECM.

Por otra parte, Kikuchi *et al.* (2007) demostraron que siete flavonoides que se encuentran en los exudados de las raíces de *Pinus densiflora* estimulan fuertemente la germinación de las esporas del hongo ECM *Suillus bovinus*. Así también se demostró que los flavonoides estimulan la ramificación, el crecimiento y la producción de esporas, así como el aumento en los grados de



colonización de los hongos, aunque la función aun no es muy clara (Abdel-Lateif *et al.*, 2012). Otro exudado es la estrigolactona que es bien conocida en la asociación con hongos arbusculares, hasta ahora no se ha encontrado en gimnospermas y tampoco parece afectar la ramificación de las hifas de hongos ECM como *L. bicolor* y *Paxillus involutus*, sin embargo, para la biosíntesis de estrigolactona se requiere de dos enzimas involucradas en la escisión de carotenoides, CCD7 y CCD8, por lo cual el hallazgo de ortólogos CCD7 y CCD8 en genomas y transcriptomas disponibles de gimnospermas sugieren fuertemente su presencia en estos linajes (Delaux *et al.*, 2014).

Tagu *et al.* (2001) mencionan que la diversidad es extremadamente importante en la rizósfera, en el cual se encuentran diferentes microorganismos. Por lo tanto, los socios de la micorriza tienen que reconocerse y lo hacen mediante el uso de moléculas difusibles. Las raíces y los exudados ectomicorrízicos son probablemente la fuente de señales específicas. Se sabe que los exudados de las raíces estimulan la germinación de las esporas y crecimiento de hifas de varios hongos ectomicorrízicos (Duplessis *et al.*, 2001). Una de estas moléculas son los flavonoides, que son abundantes en el metabolismo secundario y exudados por las raíces, las cuales están involucradas en numerosas interacciones planta-microorganismo (Broughton *et al.*, 2000; Paiva, 2000). Estos compuestos liberados por la raíz son capaces de iniciar la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas del hongo hacia la raíz.

### **3.9 Simbiosis de hongos ectomicorrízicos con especies forestales**

La simbiosis pino-hongo ectomicorrízico tiene importancia ecológica debido a la interacción microbiana establecida en la micorrizósfera y a las condiciones edáficas favorables creadas por la descomposición de la materia orgánica (Aguirre-Zamora *et al.*, 2021).

Arteaga-León *et al.* (2018) evaluaron el efecto de la inoculación con dos hongos nativos ectomicorrízicos en el crecimiento y nutrición de *P. ayacahuite*. La inoculación presentó efectos positivos en cuanto a incremento de peso seco y contenido de macronutrientes (N y P) y micronutrientes (Fe y Mg) en la especie de estudio. El porcentaje de la micorrización varió entre 41% y 59 %

Martínez *et al.* (2016) determinaron el efecto de la inoculación de *Russula delica* sobre plántulas de *Pinus engelmannii* en vivero. Evaluaron dos métodos de aplicación en sustrato y en riego y

cuatro dosis de inoculante (0, 0.75, 1.50 y 2.25 g por charola) las variables medidas fueron el diámetro del cuello de la raíz, índice de Dickson y el porcentaje de micorrización. Sus resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Los mejores resultados en las variables morfológicas fueron con la inoculación en riego en dosis baja. El mayor porcentaje de micorrización se presentó en el tratamiento de inoculación en sustrato con una dosis alta (82.2 y 38.2 %), con diferencias altamente significativas sobre el testigo.

### **3.10 Género *Laccaria***

El género *Laccaria* fue descrito por Berkeley y Broome (1883), al reconocer un grupo de especies con características distintivas (láminas gruesas y espaciadas y esporas equinuladas) a las de los géneros en los cuales se encontraban ubicadas. Actualmente, el género *Laccaria* es aceptado como autónomo, por tener características bien definidas, siendo de los más fácilmente reconocibles en la familia Tricholomataceae del orden Agaricales. Además, este género se ha considerado de gran importancia ecológica, debido a que es ectomicorrízico y algunas de sus especies son comestibles. Asimismo, se ha detectado en los esporomas la presencia de compuestos antimicrobianos de amplio espectro (Melik-Khachatryan *et al.*, 1970). El género *Laccaria* ha sido objeto de diversas investigaciones en diferentes partes del mundo, destacando principalmente las relacionadas con aspectos taxonómicos y silviculturales. Es considerado un género cosmopolita con un buen número de especies descritas (aproximadamente 40), de las cuales muchas presentan una distribución muy amplia, por lo que parece ser muy común la sinonimia en estos hongos, no sabiéndose con certeza el número de especies válidas que existen (Menéndez-Valderre, 2016).

### **3.11 *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke**

Es un hongo comestible cosmopolita que se encuentra en los cinco continentes, en México es conocido comúnmente como “xocoyol”, “cholete” o “chuleta”, con píleo convexo, diámetro de 15 a 50 mm, de coloración tendiendo a vino, laminas libres de color rosa pálido, de estípites cilíndricos de 30 a 35 mm de ancho y 20 a 50 mm de longitud, esporas de forma globosa, de 6.5 x 5.3  $\mu\text{m}$  y ornamentación nodulosa. Forman ectomicorrizas con un amplio número de fitobiontes como *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*, *Abies*, *Fagaceae*, *Quercus*, *Myrtaceae* y *Salix*, entre otros (Figura 2). Los esporomas se encuentran a partir del mes de julio a noviembre, es una especie pionera ectomicorrízica al colonizar a la planta en las primeras etapas fenológicas y asociarse con

una amplia gama de especies arbóreas especialmente pinos, muchas de las cuales son de importancia económica (Pérez *et al.*, 2010; Carrasco, 2011; Haselwandter *et al.*, 2013).



Figura 2. A) Primordio pequeño de *Laccaria laccata*, B), esporas a 40X., C) Esporoma maduro.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Localización

El experimento se llevó a cabo en el invernadero y laboratorio del Área de Microbiología, postgrado en Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, el cual se localiza en Texcoco, Estado de México. El campus está ubicado en una transición entre clima templado semiseco y subhúmedo, con una precipitación media anual de 700 mm (García, 1968).

### 4.2 Material biológico

Se colectaron semillas de *Lupinus montanus* en el Monte Tláloc, el cual se localiza en la región fisiográfica conocida como Sierra Nevada, al oriente del Estado de México. Sánchez-González y López-Mata (2003) reportan seis tipos de vegetación en el Monte Tláloc: encinar arbustivo, bosque de encino, bosque mixto, bosque de oyamel, bosque de pino y pastizal alpino.

A lo largo del declive occidental del Monte Tláloc, se distinguen tres subtipos climáticos: en las áreas planas más cercanas a los lomeríos el clima es C (w<sub>0</sub>) (w) b (i'); templado subhúmedo, con una precipitación media anual de 700 mm. Con régimen de lluvias en verano, temperatura media anual entre 12 y 18°C y con una oscilación térmica entre 5 y 7°C. En la zona de lomeríos, hacia las estribaciones del Monte Tláloc el clima es C (w<sub>1</sub>) (w) b(i'); templado subhúmedo, con una precipitación media anual entre 800 y 900 mm, régimen de lluvias en verano. La temperatura media anual es entre 12 y 18°C y con una oscilación térmica entre 5 y 7°C. En las laderas montañosas el clima es de tipo C (w<sub>2</sub>) (w) b(i'); templado subhúmedo, con una precipitación media anual entre 900 y 1,200 mm, régimen de lluvias en verano, temperatura media anual entre 10 y 14°C y con una oscilación térmica entre 5 y 7°C (Ortiz y Cuanalo, 1977). Las fluctuaciones climáticas se deben principalmente a la influencia de la orografía. La niebla y el rocío son frecuentes y persistentes y en ocasiones se presentan nevadas en las partes altas (García, 1968). A medida que se asciende por las laderas la temperatura disminuye en una proporción promedio de 0.49°C por cada 100 m de aumento en altitud, por esta razón los climas varían de templados a fríos. Los suelos son incipientes, de textura gruesa en las proximidades del cono cinerítico del Tláloc y en el resto del área son negros, profundos, muy ricos en materia orgánica (García, 1968; Ortiz y Cuanalo, 1977).

Debido a que las semillas de *Lupinus* tienen una testa impermeable, se sumergieron en ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) al 95 % por 1 h. Posteriormente, el exceso fue eliminado y las semillas se enjuagaron con agua corriente tres veces para eliminar las trazas de ácido residuales.

Las semillas de *Pinus ayacahuite* fueron adquiridas en el Estado de México. Previo a la siembra, las semillas se colocaron en 1 L de agua destilada estéril y permanecieron durante 24 horas para identificar las semillas vanas (prueba de viabilidad). Después estas se esterilizaron con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30 %, durante 20 minutos y en movimiento constante, y, por último, se enjuagaron con agua estéril bajo condiciones asépticas hasta eliminar el residuo del  $H_2O_2$ .

### **4.3 Establecimiento del experimento 1**

#### **4.3.1 Aislamiento de rizobios y confirmación de nodulación**

Las bacterias de rizobios se aislaron tomando nódulos activos de las raíces de *Lupinus montanus* colectadas en el Monte Tláloc. Los nódulos se separaron de la raíz y se lavaron con agua corriente y, posteriormente, se colocaron en una gasa para ser desinfectados. En condiciones estériles, en una campana de flujo laminar, los nódulos se sumergieron en alcohol al 95% durante 20 segundos y se hicieron dos enjuagues con agua destilada estéril. Después, se sumergieron en bicloruro de mercurio acidificado ( $HgCl_2$ ) por un minuto y se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, los nódulos se colocaron en una microplaca con 1 ml de agua destilada estéril y se maceraron con pinzas hasta obtener una suspensión bacteriana. Alícuotas de cada suspensión se sembraron por estría cruzada en cajas de Petri con medio de cultivo de extracto de levadura manitol agar rojo Congo (Ferrera *et al.*, 1993). Estas se incubaron por 8 días a 28 °C hasta obtener colonias aisladas, a las cuales se le realizaron pruebas bioquímicas: crecimiento en medio de glucosa peptona agar y prueba leche tornasolada para determinar pureza y crecimiento (Ferrera *et al.*, 1993).

Debido que fue necesario confirmar la capacidad nodular de todas las cepas aisladas, estas se sembraron en botellas con extracto de levadura (Ferrera *et al.*, 1993). Las botellas se colocaron en una incubadora orbital a 28 °C y 180 rpm, durante 8 días, hasta generar una concentración de  $10^8$  UFC  $mL^{-1}$ . Plántulas de *Lupinus montanus* previamente germinadas en macetas con tezontle esteril (500 g) se inocularon con 2 mL de la suspensión de rizobios de cada cepa. A los tres meses las plantas se cosecharon y se separaron las raíces y la parte aérea. Del sistema radical se

contabilizaron los nódulos por planta. Posteriormente, la parte aérea y radical se depositaron en bolsas de papel y secadas en un horno a 70 °C hasta peso constante para determinar biomasa seca de cada una de ellas. La parte aérea fue molida y se envió al laboratorio de Fertilidad de suelos (Fertilab) para determinar el contenido de N, mediante la metodología de Kjeldahl.

#### **4.3.2 Identificación molecular de las cepas de rizobios aisladas**

Las cepas de rizobios previamente aisladas y cuya capacidad de nodular fue confirmada, se procesaron para su identificación molecular. Para ello se siguió el protocolo de extracción de ADN para bacterias del laboratorio de biotecnología de semillas del Colegio de postgraduados usando CTAB al 2 % (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; EDTA 2H<sub>2</sub>O mM; NaCl 1.4 M). Para ello se tomó una asada por cepa y se colocó en tubos de Eppendorf con 250 µL de agua grado de filtro milli Q, se le agregó 100 µL de CTAB al 2 % previamente precalentado a 95 °C, se mezcló vigorosamente y se incubó a 95°C por 90 min mezclando con un vortex cada 10 min. Posteriormente, a cada tubo se adicionó 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 vv) y se mezcló por 10 min a temperatura ambiente. Cada tubo se centrifugó a 11,500 revoluciones por minuto (rpm) por 10 min, para formar la fase acuosa y la fase orgánica. A partir de la fase acuosa se recuperaron aproximadamente 600 µL y se colocaron en un nuevo tubo de Eppendorf estéril de 1.5 mL. Posteriormente, en cada tubo nuevo se colocaron 950 µL de etanol al 100 % frío, se mezcló suavemente para favorecer la precipitación y se incubó a 20°C por toda la noche. A continuación, se centrifugó a 11,500 rpm por 30 minutos, posteriormente, se le agregó a cada tubo 400 µL de agua de filtro milli Q y se incubó a 65 °C por 15 min. Después, se añadió 34 µL de NaOAC 3 M y 1 mL de etanol al 95 % almacenado a -20 °C durante 1 h, se centrifugó por 10 min y se decantó evitando perder la pastilla. La pastilla se lavó con 600 µL de isopropanol al 70 % centrifugando por 10 min a las mismas condiciones (2 lavados). Después del segundo lavado se decantó y se dejó secar al menos 2-3 horas, pasado ese tiempo y con pastilla seca, se resuspendió en 100 µL de agua HPLC y se colocó en baño María a 65 y 70 °C por 15 min y se dio un spin con una microcentrifuga (marca biosan ®).

Las concentraciones del ADN se verificaron mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA), que los valores de las relaciones estuvieran en el rango A 260/A 280 y A260/230 estuvieran en un Rango de 1.8 a 2.0. Para amplificar el fragmento ribosomal 16S ADN<sub>r</sub> se usaron los indicadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-

GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). La mezcla de reacción consistió en: buffer 5X, dNTP's 2.5 Mm, *vaya* Taq ADN polimerasa (5U), ADN 100 ng. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C100 Touch (Bio-Rad, USA) con las siguientes condiciones de amplificación: una desnaturalización inicial de 95 °C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 59 °C por 30 min y la extensión a 72 °C por 2 min, finalmente, una extensión de un ciclo a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se verificó en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con colorante verde de ADN (Green-DNA dye Bio Basic Inc., Canadá). El producto final de PCR se purificó con un kit de purificación ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en ambas direcciones con el Genetic Analyzer modelo 3130 (AppliedBiosystem, EE. UU). Las secuencias correspondientes a la región 16S ADN<sub>r</sub> se ensamblaron y editaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1 (Hall, 1999) para la creación de las secuencias de cada uno de los aislamientos. Con la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLAST) del Centro Nacional de Biotecnología Information (NCBI) se encuentran regiones de similitud local entre secuencias con alineamientos significantes, las secuencias consensuadas de cada aislamiento obtenido para la región 16S ADN<sub>r</sub> se compararon con la opción BLAS\_nucleotide 2.2.19 (Zhan *et al.*, 2000). Las secuencias de las bacterias se depositaron en la base de datos de GenBank del Centro Nacional de información Biotecnológica (NCBI).

## **4.4 Establecimiento del experimento 2**

### **4.4.1 Esterilización del sustrato y adecuación del contenedor (prototipo)**

El sustrato utilizado consistió en una mezcla de arena, corteza composteada y suelo forestal en una proporción de 2:2:1, el cual se esterilizó tres veces con vapor de agua el cual fue esterilizado con vapor de agua a 1.3 kg·cm<sup>-2</sup> y 125 °C durante 5 h. en una olla de presión.

Para establecer el experimento se adecuó un prototipo a base de dos contenedores, el primero una maceta con capacidad de 5 kg para el crecimiento de la planta de *Lupinus montanus* y el cual contenía un tubete forestal con capacidad de 250 mL para el crecimiento de la planta de *Pinus ayacahuite*. A cada tubete se le hicieron cortes de 3 cm de largo por 3 cm de ancho en cada lado y, cada uno de los orificios fue cubierto con tela tipo organza lisa y una malla sombra;

posteriormente dicho tubete fue ensamblado y adherido en una maceta previamente perforada en el centro de su base (Figura 3).

La adecuación del prototipo tiene como finalidad permitir a través de la malla, el libre paso del micelio del hongo ectomicorrízico para explorar y/o interactuar la rizósfera de las plantas de *Lupinus montanus*.



Figura 3. Adecuación del prototipo (contenedor y tubete) con plantas de *Lupinus montanus* y *Pinus ayacahuite*

#### **4.4.2 Inóculo de hongo ectomicorrízico**

Los esporomas de *Laccaria laccata* utilizados como fuente de inóculo fueron adquiridos del mercado de Ozumba, Estado de México. La preparación del inóculo consistió en separar los estípites de los esporomas de *Laccaria laccata*; los píleos se secaron a 35 °C en una estufa y molidos utilizando un molino eléctrico (Osterizer clásica, modelo 465-42, Sumbeam, México). El producto obtenido se pasó a través de un tamiz de abertura con 1 mm para obtener un tamaño de partícula homogéneo y se almacenó en refrigeración hasta su uso.



#### **4.4.3 Siembra de semillas de *Pinus ayacahuite***

La siembra del material vegetativo se efectuó de forma directa y se realizó a una profundidad de 2 cm. Se utilizó contenedores tipo tubete de plástico negro de 130 cm<sup>3</sup>. Las plantas se mantuvieron por un mes con riegos con agua destilada y con fungicida (Captan), en proporción de 2 g·L<sup>-1</sup> a fin de evitar enfermedades como el “damping off” hasta que el tallo estuvo lignificado.

#### **4.4.4 Trasplante e inoculación de *Pinus ayacahuite* y *Lupinus montanus***

Antes de realizar el trasplante de la planta de *P. ayacahuite* en el tubete del prototipo, esta fue inoculada con 3 g de inóculo deshidratado de *L. laccata* en todo el cepellón para tener mayor contacto con el sistema radical y se rellenó con el sustrato estéril. Después de cuatro meses se realizó una segunda inoculación con 1.5 g del hongo ectomicorrízico a las plantas de *Pinus ayacahuite*, esto con la finalidad de asegurar la colonización del hongo al pino.

Asimismo, la maceta del prototipo se rellenó con el mismo sustrato estéril y en cada punto cardinal se colocaron tres semillas de *L. montanus*, y una vez germinadas se inocularon con 2 mL de una suspensión bacteriana que contenía  $4.3 \times 10^8$  rizobios mL<sup>-1</sup> de la cepa S1 (*Bradyrhizobium japonicum*) seleccionada en el experimento uno. La adecuación del prototipo tiene como finalidad permitir a través de la malla, el libre paso del micelio del hongo ectomicorrízico para explorar y/o interactuar la rizósfera de las plantas de *Lupinus montanus*.

Una vez que las plantas de *Lupinus* alcanzaron una altura de 25 cm, estas fueron cosechadas, se llevaron a laboratorio y se depositaron en bolsas de papel y se colocaron en la estufa de secado a 70°C durante tres días, hasta peso constante. Posteriormente, las plantas se pulverizaron y se adicionaron al sustrato de la maceta de los tratamientos que incluían *Lupinus*, con la finalidad de incorporar el nitrógeno fijado a la planta de *Pinus ayacahuite* y fuera aprovechado por las plantas de *Pinus ayacahuite*.

#### **4.4.5 Diseño experimental**

El experimento para evaluar el efecto de *Lupinus montanus* y *Laccaria laccata* en plantas de *Pinus ayacahuite* se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar, compuesto por cuatro tratamientos: *Pinus ayacahuite* sin inocular (testigo); *P. ayacahuite* asociadas a *Lupinus montanus* (*P. ayacahuite* + *L. montanus*); *P. ayacahuite* inoculadas con *L. laccata* y sin asociación de *L.*

*montanus* (*P. ayacahuite* + *L. laccata*) y *P. ayacahuite* inoculadas con *L. laccata* y asociadas con *L. montanus* (*P. ayacahuite* + *L. laccata* + *L. montanus*). Cada tratamiento tuvo diez repeticiones y un total de 40 unidades experimentales. Las variables evaluadas fueron crecimiento en altura y diámetro, contenido de nutrientes, porcentaje de colonización y biomasa.

#### **4.4.6 Determinación de la colonización ectomicorrízica y descripción morfoanatómica de los morfotipos presentes**

A los 300 días después del trasplante, se cosecharon las plantas para la evaluación ectomicorrízica. Se tomaron ocho plantas al azar de cada tratamiento, las cuales fueron retiradas de la maceta colocando el cepellón en un tamiz que después se sumergió en un recipiente con agua, para que el sustrato se desprendiera de la raíz. La parte aérea se separó de la parte radical y las raíces se colocaron en una caja Petri para la contabilización de las raíces cortas. Con un microscopio estereoscópico marca LEICA, se realizó el conteo de las raíces cortas vivas micorrizadas, vivas no micorrizadas y raíces muertas para estimar el porcentaje de colonización ectomicorrízica siguiendo las técnicas propuestas por Marx *et al.* (1991). El porcentaje de colonización se obtuvo mediante la fórmula: Raíces cortas vivas micorrizadas / (Raíces cortas vivas micorrizadas + Raíces cortas vivas no micorrizadas) \* 100 (Martínez-Reyes *et al* 2012; Hernández, 2016).

#### **4.4.7 Evaluación de variables de crecimiento y determinación de análisis nutrimental**

En las plantas de pino se midió la altura (cm) y diámetro (mm) del tallo (con un vernier digital marca Truper ©). Se cosecharon ocho plantas de *Pinus ayacahuite*, se separaron las raíces y la parte aérea, se eliminó el sustrato de la raíz con ayuda de un tamiz y agua corriente. La parte aérea y raíces se colocaron en bolsas de papel y se secaron en un horno a 70 °C hasta peso constante. Se determinó biomasa seca de la raíz y parte aérea en una balanza analítica (Marca Sartorius). La parte aérea fue molida y enviada al laboratorio de Fertilidad de suelos (Fertilab) para determinar el contenido de macro y micronutrientes. El Nitrógeno (N) se determinó mediante la metodología de Kjeldahl; el Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (Fe), Zinc (Zn), Manganeseo (Mn), Cobre (Cu), Boro (B) se determinaron a través del método de digestión ácida multielemental en microondas preparado de acuerdo al método AOAD 2006.03.

#### **4.4.8 Relación nutrimental parte aérea: raíz**

Se calculó en cada tratamiento la relación nutrimental parte aérea y raíz de las plantas inoculadas y no inoculadas. Realizando una división entre el total de la raíz de cada tratamiento por cada nutriente y el total de la parte aérea, lo obtenido fue la diferencia, lo que nos indica la eficiencia de translocación de cada nutriente por parte de la especie fúngica y asociadas con *Lupinus montanus*, no solo en la parte radical si no también hacia la parte aérea.

#### **4.4.9 Análisis estadístico**

Para las variables de crecimiento se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se utilizó el paquete estadístico “Statistical Analysis System” (SAS) versión 9.0.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

### 5.1. Nodulación de *Lupinus montanus*

Las plantas de *Lupinus montanus* inoculadas con las cuatro cepas aisladas presentaron mayor peso seco aéreo y radical en comparación con las no inoculadas. En la nodulación de las plantas, se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos inoculados y las plantas no inoculadas. La cepa S1 presentó mayor peso seco y aéreo (0.1 y 0.16 g, respectivamente), número de nódulos (20) y mayor contenido de nitrógeno (N) en la parte aérea (8.12 mg) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Peso seco aéreo y radical, número de nódulos y nitrógeno (N) de la parte aérea de plantas de *Lupinus montanus* inoculadas o no con cuatro cepas de *Bradyrhizobium*, cosechadas a los 90 días después de la siembra.

Claves	Peso seco (g)		Número de nódulos	Parte aérea N (mg)
	Aérea	Raíz		
Testigo	0.16± 0.03 a	0.1±0.02 a	0±0.00 c	4.72±0.69 a
S1	0.24±0.04 a	0.08±0.02 a	20.7±3.07 a	8.12±1.28 a
S2	0.08±0.01 b	0.02±0.01 b	6.2±1.65 bc	2.69±0.47 a
S3	0.19±0.05 ba	0.05±0.05 ba	11.2±3.57 ba	6.89±1.83 a
S4	0.06±0.03 b	0.04±0.01 ba	6.2±2.32 bc	2.38±1.18 a

Los datos son promedios ± desviación estándar de la media (n=4) para peso seco, número de nódulos y nitrógeno (N). Valores con la misma letra en la misma columna no son diferentes según Tukey (P≤0.05).

### 5.2 Identificación molecular de las cepas de rizobios

El análisis de las secuencias del ADNr 16S amplificadas demostró alta similitud de las secuencias de las cepas aisladas S1, S2, S3 y S4 con las secuencias de ADN 16S de *Bradyrhizobium japonicum* (99 %) (Cuadro 2). Mellal *et al.* (2019) aislaron e identificaron bacterias de nódulos de raíces de *Lupinus angustifolius* cultivadas en forma silvestre en la región del Tarf en el Norte de Argelia y encontraron que las bacterias aisladas estaban estrechamente relacionadas con miembros

del género *Bradyrhizobium*. Asimismo, Bourebaba *et al.* (2016) identificaron en *Lupinus micranthus* que la mayoría de las bacterias aisladas correspondían taxonómicamente al género *Bradyrhizobium*.

Cuadro 2. Identificación molecular de las cepas de rizobios aisladas de nódulos radicales de plantas de *Lupinus montanus* colectadas en el monte Tláloc, Texcoco, México.

Claves	Identificación <sup>†</sup>	Secuencia cercana	Pares de bases	Cobertura (%)	Máxima identidad (+/+)
S1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CP088100 9625657	1484	99	100
S2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CP088100 9625657	1484	99	100
S3	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CP088100 9625657	1481	99	100
S4	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CP088100 9625657	1484	99	100

<sup>†</sup>*Bradyrhizobium japonicum* strain CC829 chromosome, complete genome. Las secuencias de las bacterias se depositaron en la base de datos de GenBank del Centro Nacional de información Biotecnológica (NCBI).

### 5.3 Colonización ectomicorrízica

Se presentó un efecto benéfico en el crecimiento y contenido de nutrientes en la especie Neotropical *Pinus ayacahuite* inoculado con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata*. Los resultados muestran el potencial que podría tener la inoculación con la especie fúngica en la producción de plantas forestales de pinos (*Pinus* spp.).

Se observó una colonización micorrízica alta en las plantas de *Pinus ayacahuite* inoculado únicamente con *Laccaria laccata* con 96.1 % y en las plantas de *P. ayacahuite* inoculado con *Laccaria laccata* y asociado a *Lupinus montanus* inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* (88.48 %). En el caso estos dos tratamientos, no existieron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), con respecto a las raíces cortas micorrizadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Raíces cortas vivas y muertas en plantas de *Pinus ayacahuite* inoculadas o no con *L. laccata* con y sin asociación de *Lupinus montanus*, 300 días después de la inoculación.

Tratamientos	Raíces Cortas Vivas		Raíces Cortas Muertas		Total de raíces cortas	Colonización (%)
	Micorrizadas	No micorrizadas	Micorrizadas	No micorrizadas		
<i>P. ayacahuite</i> sin inocular	0 b	1223.38±154 a	0 b	439.37±78 a	1662.75±215 c	0 c
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. montanus</i>	0 b	1601.88±181 a	0 b	256.50±43 a	1858±185b c	0 c
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i>	2852±429.15 a	112.25±25.94 b	158.75±35.89 b	0 c	3123.25±461 bc	96.07 a
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i> + <i>L. montanus</i>	2535±394.33 a	420±95.11 b	352.12±94.77 a	0 c	3307.50±449 a	88.48 b

Los datos son promedios ± desviación estándar de la media (n=8). Valores con la misma letra en la misma columna no son diferentes según Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Se han reportado colonizaciones micorrízicas altas con valores de 80 y 97 % en especies forestales empleando hongos silvestres comestibles como fuente de inóculo (Chávez *et al.*, 2009; Carrasco *et al.*, 2011). Rodríguez-Gutiérrez *et al.* (2019) registraron porcentajes de micorrización en *Pinus montezumae* de 93.5 a 98.5 %, similares a lo reportado en la presente investigación. En otros estudios han encontrado que la inoculación de plantas forestales con hongos ectomicorrízicos presenta efectos positivos, tanto en términos de crecimiento y supervivencia en plantas de vivero como en el establecimiento de plantaciones experimentales (Smith & Read, 2008). Carrasco-Carrasco-Hernández *et al.* (2011) reportaron que plantas de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* inoculados con *Laccaria* y *Hebeloma* presentaron efecto benéfico en el crecimiento en términos de peso seco en parte aérea y radical, así como un mayor contenido de N, P y K, y con porcentajes de micorrización de 57 % a 90 %.

Es relevante mencionar que durante el desarrollo del experimento se registró la formación de 30 esporomas maduros (con láminas completamente expuestas) de la especie inoculada (*Laccaria laccata*). La mayoría de estos esporomas se presentaron en los tratamientos inoculados con el hongo ectomicorrízico con y sin asociación de *Lupinus montanus*. Los primeros esporomas se registraron a los 300 días después de la inoculación. La mayoría de las plantas presentaron tres esporomas, sin embargo, en tres de ellas se encontraron cinco esporomas de *L. laccata* de diferentes tamaños. Lo anterior, confirma la simbiosis entre el hongo ectomicorrízico inoculado y la especie forestal bajo estudio (Figura 4).



Figura 4. A) Prototipo utilizado (maceta y tubete); B) Inoculación con *Laccaria laccata* a plántulas de *Pinus ayacahuite*; C) Primordio asociado con raíces; D y E) Esporomas presentes en plantas de *Pinus ayacahuite* inoculado con *Laccaria laccata*; F) Comparación de plantas de *Pinus ayacahuite* inoculadas o no con *Laccaria laccata* con y sin asociación de *Lupinus montanus*.



#### 5.4 Crecimiento vegetal

Las plantas de los tratamientos inoculados con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* con y sin asociación de *Lupinus montanus* presentaron mayor altura (32.43 y 31.15 cm, respectivamente), mayor diámetro del tallo (5.59 y 2.06 mm, respectivamente) y mayor peso seco total (8.87 y 13.72 g, respectivamente) (Figura 5), en comparación con las plantas no inoculadas (Cuadro 4). Se ha demostrado que la inoculación con hongos ectomicorrízicos incrementa el crecimiento en términos de la producción de biomasa en Pináceas.

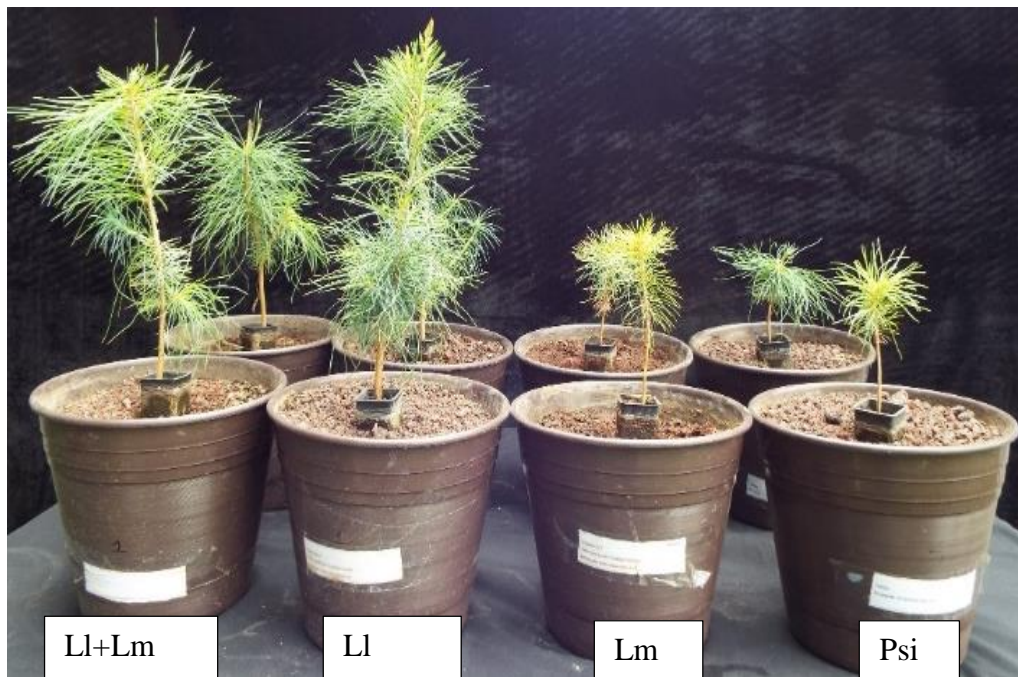


Figura 5. Efecto de la inoculación en la biomasa foliar de *Pinus ayacahuite* inoculado o no con *Laccaria laccata* y con y sin asociación con *Lupinus montanus*. Lm= *Lupinus montanus*; Ll= *Laccaria laccata*; Psi= Plantas sin inocular.

Cuadro 4. Altura, diámetro del tallo y peso seco en plantas de *Pinus ayacahuite* inoculadas o no con *L. laccata* con y sin asociación de *Lupinus montanus*, 300 días después de la inoculación

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Peso seco (g)		
			Parte aérea	Raíz	Total
<i>P. ayacahuite</i> sin inocular	13.59 ± 0.59 b	3.39 ± 0.11 b	1.44 ± 0.24 b	1.14 ± 0.21 b	2.58 ± 0.45 bc
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. montanus</i>	15.15 ± 0.80 b	2.79 ± 0.08 b	0.88 ± 0.17 b	0.88 ± 0.10 b	1.77 ± 0.26 c
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i>	31.15 ± 5.50 a	2.06 ± 0.73 a	7.23 ± 1.99 a	6.50 ± 1.33 a	13.72 ± 3.12 a
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i> + <i>L. montanus</i>	32.43 ± 5.25 a	5.59 ± 0.48 a	4.40 ± 0.80 ba	4.46 ± 0.92 a	8.87 ± 1.70 ba

Los datos son promedios ± desviación estándar de la media (n=8). Valores con la misma letra en la misma columna no son diferentes según Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Méndez-Neri *et al.* (2011) registraron que plantas de *P. greggii* inoculadas con *Hebeloma mesophaeum*, *Laccaria laccata* y *Suillus aff. pseudobrevipes* fueron superiores a las plantas no inoculadas, en términos de producción de biomasa, porcentaje de colonización y contenido de nitrógeno (N). Carrasco-Hernández *et al.* (2011) encontraron que al inocular *Pinus patula* con seis especies de hongos ectomicorrízicos solos o en combinación presentaron efectos positivos en el crecimiento y absorción de nutrientes y agua. Asimismo, estos autores demostraron que las plantas micorrizadas presentaron mayor supervivencia en campo a diferencia de las plantas testigo.

Martínez-Reyes *et al.* (2012) observaron incrementos en peso seco aéreo y total, en altura y diámetro del tallo en plantas de *Pinus greggii* inoculadas con *Hebeloma mesophaeum*, en comparación a las plantas testigo. De igual manera, Sousa *et al.* (2012) inocularon *Suillus bovinus*, *Laccaria laccata* y *Lactarius deterrimus* en plantas de *Pinus pinaster*, y observaron efectos benéficos en la altura de planta y biomasa total. Asimismo, Rentería-Chávez *et al.* (2017) reportaron que plantas de *P. greggii* inoculadas con *Hebeloma leucosarx*, *Laccaria bicolor* y *Laccaria laccata* presentaron incrementos significativos de peso seco aéreo, radical y total, así como de altura y diámetro del tallo, en comparación con plantas no inoculadas.

## 5.5 Caracterización macro y micromorfológica de la ectomicorriza *Laccaria laccata*

Las raíces cortas ectomicorrizadas presentaron morfotipos característicos de *Laccaria laccata* y sus estructuras diagnósticas como red de Hartig, manto fúngico y micelio externo fueron observados con microscopía estereoscópica y óptica de campo claro. Se presentaron morfotipos monopodiales y dicotómicos, color café claro en estado juvenil y de color café oscuro en etapa madura con ápices redondeados de tonos claros, de 1 a 2 mm de longitud en promedio y 0.5 mm de diámetro. El manto presentó buena visibilidad. Presencia de hifas emanantes. La anatomía externa e interna del manto de tipo plectenquimatoso, característico de la especie de *Laccaria laccata*. Asimismo, se observó que las hifas penetran dos o tres capas de espacios intersticiales de las células corticales, características de la especie del género *Laccaria* (Figura 6) (Rentería-Chávez *et al.*, 2017; Carrera-Nieva y López-Ríos, 2004).

*Laccaria laccata* es un hongo que es conocido por ser pionero en las primeras etapas de colonización, forma ectomicorrizas con una gran variedad de especies de árboles de *Pinus*, entre otros, debido a la habilidad que tienen para crecer vegetativamente y/o germinar a partir de basidiosporas en medio de cultivo (Osmundson *et al.*, 2005).

La descripción de las ectomicorrizas obtenidas en la presente investigación, coincide con otras investigaciones reportadas en diferentes especies de árboles. Por ejemplo, Carrasco *et al.* (2011) caracterizaron la ectomicorriza de *L. laccata* con *Pinus patula*, en donde mencionan una coloración café oscuro en la base de la micorriza y ápices cremas e hifas gelatinosas, claro amarillentas. Asimismo, Rodríguez-Gutiérrez *et al.* (2019) describieron la misma especie fúngica en *P. montezumae* y en combinación con *P. fluorescens* siendo dicotómicas con ramas laterales de la misma longitud de color amarillo dorado-anaranjado y manto plectenquimatoso.

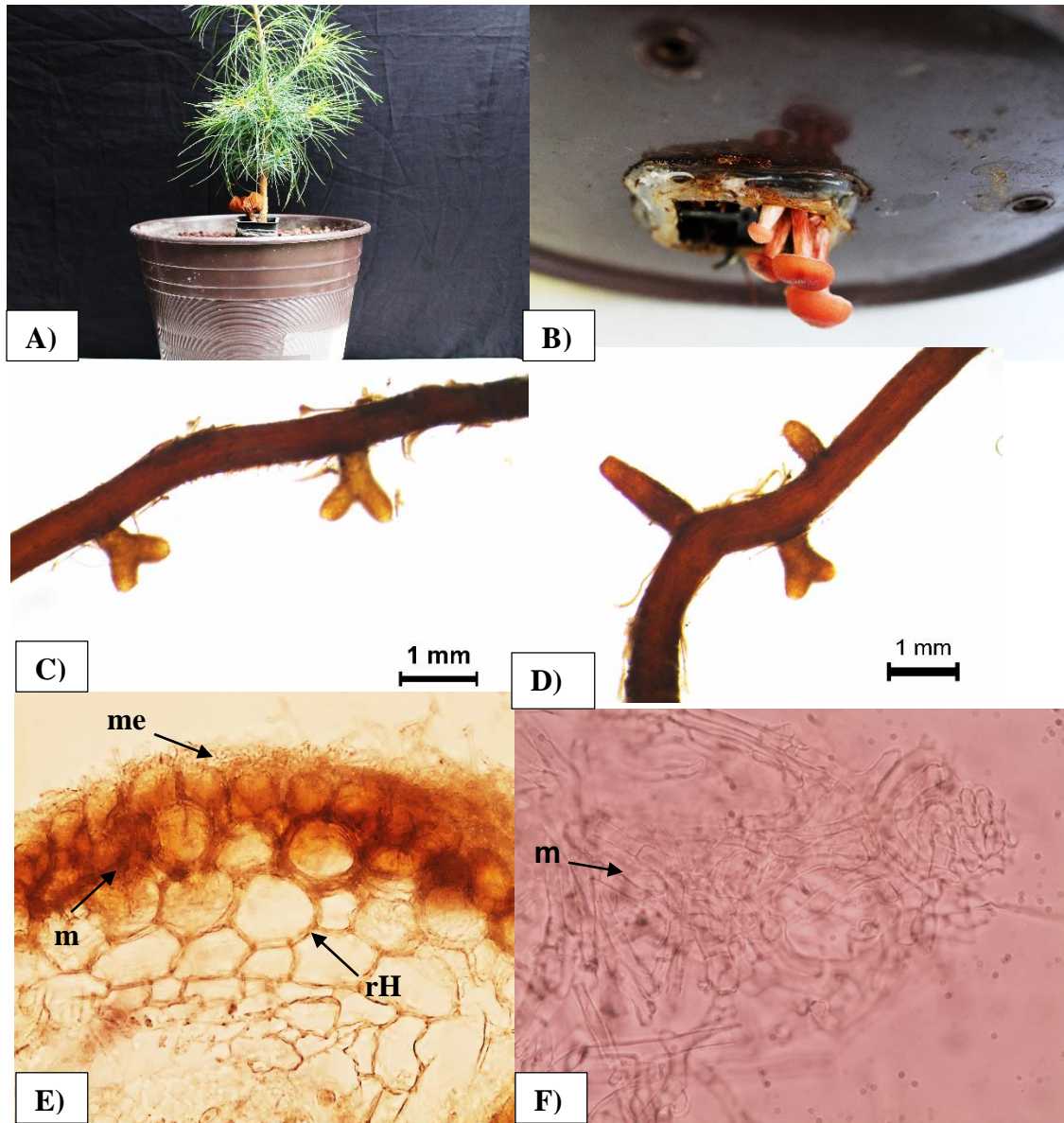


Figura 6. Características micromorfológicas de los morfotipos y esporomas de *Laccaria laccata*. A y B) esporomas presentes en plantas de *Pinus ayacahuite* inoculado con *Laccaria laccata*; C y D) ectomicorrizas monopodiales y dicotómicas en estadio joven de *L. laccata*, barra negra (1 mm); E) corte transversal de la ectomicorriza mostrando red de Hartig (rH), manto (m), y micelio externo (me); F) manto fúngico externo (m)

## 5.6 Contenido de nutrientes en el tejido vegetal

El contenido de los macronutrientes fue mayor en las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* con y sin asociación de *Lupinus montanus*, en comparación a las plantas no inoculadas y con asociación con *Lupinus montanus*. El mejor tratamiento con respecto a biomasa aérea y total se observó en plantas inoculadas únicamente con *Laccaria laccata*, encontrándose la mayor concentración de macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg). Con respecto a la parte radical, las plantas inoculadas con *L. laccata* y plantas inoculadas con *L. laccata* y con asociación de *Lupinus montanus* fueron estadísticamente iguales (Cuadro 5).

Por otra parte, de forma general los contenidos totales de Fe, Zn, Mn, Cu y B fueron mayores en plantas inoculadas con *Laccaria laccata*. En biomasa aérea, las plantas inoculadas con *L. laccata* presentaron mayores concentraciones de Fe, Mn y B, y fueron similares con respecto al Zn y Cu, con el tratamiento de plantas inoculadas con *L. laccata* y con asociación de *L. montanus*. En la parte radical y biomasa total, las plantas inoculadas con *L. laccata* y plantas inoculadas con *L. laccata* y con asociación de *L. montanus* presentaron similares concentraciones de Fe, Zn, Cu y B, y con respecto al Mn fue mayor en el tratamiento de plantas inoculadas con *L. laccata* (Cuadro 6).

Los hongos ectomicorrízicos establecen redes miceliales que incrementan la absorción de agua y son capaces de movilizar y transportar nutrientes minerales como N, P y K. Asimismo, nutrientes poco accesibles, tales como formas orgánicas de N y P, a las plantas econ las que establecen simbiosis mutualistas y pueden llegar a constituir a un importante factor de control de patógenos vegetales (Smith y Read, 1997). Además, presentan alta relevancia ecológica debido a su importancia en la estructura y funcionamiento de ecosistemas boreales, templados y tropicales (Pérez-Moreno y Read, 2004; Smith y Read, 2008). Diversos estudios han encontrado que la inoculación con hongos ectomicorrízicos presenta efectos positivos en cuanto a biomasa y contenido de macro y micronutrientes en especies forestales (Turjaman *et al.*, 2006; Tibbet y Sander, 2002; Arteaga-León *et al.*, 2018; López-Gutiérrez *et al.*, 2018).

De acuerdo con Haines *et al.* (1978), las leguminosas incrementan la cantidad de N que puede estar asimilable para especies que se encuentran creciendo junto a ellas. Los árboles plantados junto a una planta nodriza como *Lupinus arboreus* se benefician del nitrógeno fijado de esta especie, gracias a la simbiosis que establece con *Rhizobium lupini*; mantener a *Lupinus* implica

una entrada continua de nitrógeno en los ecosistemas forestales (Mattson, 2007). Por otro lado, Van Sambeek *et al.* (1986) reportaron mayor cantidad de N foliar en *Junglans regia*, cuando la especie creció junto a algunas leguminosas y en *Pinus radiata* cuando creció junto a *Lupinus arboreus*.

Otros autores encontraron que el uso de plantas nodrizas como *Lupinus montanus* en el crecimiento de *Pinus hartwegii* presenta efectos positivos en cuanto a altura y reservas de nutrientes (N, P, y K) (Ramírez y Rodríguez, 2009). Sin embargo, en la presente investigación se encontró que el tratamiento que únicamente tenía la asociación con *Lupinus montanus*, presentó resultados opuestos, lo cual puede deberse al tiempo corto que transcurrió desde que se incorporó la biomasa seca molida de *Lupinus* hasta que se cosecharon las plantas de pino. Las plantas de *Lupinus* se cosecharon a los ocho meses de establecido el experimento, se deshidrataron, se molió y se mezcló con el sustrato del contenedor o maceta de 5 kg. El tiempo o periodo efectivo para la descomposición del material orgánico incorporado fue de solo dos meses y medio, ya que después los pinos fueron cosechados para su evaluación. De acuerdo a esto, posiblemente el tiempo no fue suficiente para la liberación total de los nutrientes del material vegetal y estuviera disponible para su uso para las plantas de *P. ayacahuite*. Por esta razón, sería recomendable realizar investigaciones posteriores en el cual se consideren incorporar material vegetal de *Lupinus* al sustrato en diferentes etapas fenológicas, forma de incorporación y tiempo de descomposición del material orgánico, y evaluar su efecto en la disponibilidad del nitrógeno (N) para las plantas asociadas.

Estudios previos mencionan que la incorporación de residuos de leguminosas como abonos verdes al suelo el periodo de liberación de los nutrientes es de 3 a 4 meses posteriores a la adición de biomasa (Amanto *et al.*, 1987; Zamora *et al.*, 2022).

Cuadro 5. Contenido de macronutrientes en el tejido vegetal de *Pinus ayacahuite* inoculadas o no con *L. laccata* con y sin asociación de *L. montanus*, 300 días después de la inoculación.

Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg
	mg planta <sup>-1</sup>				
<b>Parte aérea</b>					
<i>P. ayacahuite</i> sin inocular	10.14± 1.6 b	0.86±0.1 b	8.37±1.4 b	6.49±1.0 b	3.32±0.5 b
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. montanus</i>	5.57±1.2 b	0.35±0.0 b	5.39±1.0 b	4.50±0.9 b	2.38±0.4 b
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i>	84.60±23 a	9.40±2.5 a	57.12±15.7 a	36.15±9.9 a	19.52±5.39 a
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i> + <i>L. montanus</i>	46.72±8.5 ba	5.73±1.0 ba	43.63±7.9 a	18.51±3.3 ba	19.52±1.6 ba
<b>Raíz</b>					
<i>P. ayacahuite</i> sin inocular	7.90±1.4 b	0.65±0.1 b	4.69±0.8 b	8.12±1.5 b	3.20±0.6 b
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. montanus</i>	5.33±0.63 b	0.46±0.0 b	2.48±0.2 b	8.08±0.9 b	2.66±0.3 b
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i>	37.05±7.5 a	5.20±1.0 a	27.30±5.5 a	35.75±7.3 a	14.30±2.9 a
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i> + <i>L. montanus</i>	32.13±6.6 a	4.0±0.81 a	18.29±3.8 a	20.78±4.3 ba	13.22±2.4 a
<b>Total</b>					
<i>P. ayacahuite</i> sin inocular	18.04±2.9 bc	1.52±0.2 b	13.07±2.2 b	14.63±2.5 b	6.52±1.1 b
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. montanus</i>	10.90±1.6 c	0.81±0.1 b	7.88±1.3 b	12.59±1.7 6b	5.05±0.7 b
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i>	121.65±29 a	14.60±3.4 a	84.42±20 a	71.90±16 a	33.82±7.8 a
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i> + <i>L. montanus</i>	78.858±14 ba	9.74±1.8 a	61.93±11 a	39.29±7.3 ba	22.03±4.0 ba

Los datos son promedios ± error estándar de la media (n=8). Valores con la misma letra en la misma columna no son diferentes según Tukey (P≤0.05).

Cuadro 6. Contenido de micronutrientes en el tejido vegetal de *Pinus ayacahuite* inoculadas o no con *L. laccata* con y sin asociación de *L. montanus*, 300 días después de la inoculación.

Tratamiento	Fe	Zn	Mn	Cu	B
	mg planta <sup>-1</sup>				
<b>Parte aérea</b>					
<i>P. ayacahuite</i> sin inocular	0.15±0.0 bc	0.03±0.0 b	0.33±0.0 b	0.00±0.0 b	0.08±0.0 bc
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. montanus</i>	0.09±0.0 c	0.01±0.0 b	0.28±0.0 b	0.00±0.0 b	0.04±0.0 c
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i>	0.75±0.2 a	0.20±0.0 a	1.95±0.005 a	0.02±0.0 a	0.48±0.0 a
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i> + <i>L. montanus</i>	0.57±0.1 ba	0.21±0.0 a	1.28±0.05 ba	0.01±0.0 a	0.35±0.0 ba
<b>Raíz</b>					
<i>P. ayacahuite</i> sin inocular	1.25±0.2 b	0.06±0.0b	0.12±0.0 bc	0.00±0.0 b	0.03±0.0 b
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. montanus</i>	1.08±0.1 b	0.05±0.0b	0.08±0.0 c	0.00±0.0 b	0.03±0.0 b
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i>	9.20±1.8 a	0.35±0.0a	0.46±0.0 a	0.06±0.0 a	0.18±0.0 a
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i> + <i>L. montanus</i>	5.75±1.1 a	0.25±0.0a	0.34±0.0 ba	0.04±0.0 a	0.15±0.0 a
<b>Total</b>					
<i>P. ayacahuite</i> sin inocular	1.40±0.2 b	0.10±0.0 b	0.45±0.0 b	0.01±0.0 b	0.11±0.0 b
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. montanus</i>	1.18±0.1 b	0.07±0.0 b	0.360.0 b	0.00±0.0 b	0.08±0.0 bc
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i>	9.95±2.0 a	0.56±0.1 a	2.42±0.6 a	0.08±0.0 a	0.67±0.1 a
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i> + <i>L. montanus</i>	6.33±1.2 a	0.047±0.0 a	1.62±0.3 ba	0.05±0.0 a	0.50±0.0 a

Los datos son promedios ± error estándar de la media (n=8). Valores con la misma letra en la misma columna no son diferentes según Tukey (P≤0.05).



## 5.7 Relación parte aérea/raíz

Las relaciones entre el contenido de nutrientes en la parte aérea y raíz de las plantas inoculadas con y sin asociación de *Lupinus montanus* permiten comparar la eficiencia de la traslocación de nutrientes de las plantas inoculadas con respecto las plantas no inoculadas. La mayor translocación de macronutrientes N, P, Ca y Mg fue en el tratamiento de las plantas inoculadas únicamente con *Laccaria laccata* con respecto a las plantas no inoculadas, siendo 1.81, 1.81, 1.01 y 1.37 veces mayor, respectivamente. Para el caso del K, fue mayor la translocación en el tratamiento de las plantas inoculadas con *L. laccata* con asociación de *L. montanus*; la cual fue 2.39 veces mayor con respecto a las plantas no inoculadas. Con respecto a los micronutrientes se observó una mayor traslocación Fe (0.10) y Zn (0.84) en el tratamiento de las plantas inoculadas con *L. laccata* con asociación de *L. montanus*. En el caso de Mn (4.24) y Cu (0.33) fue mayor en el tratamiento de las plantas inoculadas únicamente con *L. laccata* con respecto a las plantas no inoculadas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Relaciones parte aérea: raíz de macronutrientes y micronutrientes en *Pinus ayacahuite* inoculado o no con *L. laccata*, con y sin asociación de *L. montanus*, a los 300 días después de la inoculación.

Tratamiento	Macronutrientes					Micronutrientes			
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
<i>P. ayacahuite</i> sin inocular	1.32	1.32	1.78	0.8	1.04	0.12	0.5	2.75	0
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. montanus</i>	0.76	0.76	2.17	0.56	0.89	0.08	0.2	3.5	0
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i>	1.81	1.81	2.09	1.01	1.37	0.08	0.57	4.24	0.33
<i>P. ayacahuite</i> + <i>L. laccata</i> + <i>L. montanus</i>	1.45	1.43	2.39	0.89	0.67	0.10	0.84	3.76	0.25

Los hongos ectomicorrízicos son fundamentales en el funcionamiento de los bosques, porque favorecen la adsorción de nutrientes, principalmente N y P en suelos con baja fertilidad y contribuyen al ciclo del carbono por medio de la descomposición de la materia orgánica del suelo. La inoculación con hongos ectomicorrízicos presenta incrementos en la concentración o contenido de nutrientes de árboles de clima templado y tropical, principalmente N (Turjaman *et al*, 2006; Tibbett y Sanders, 2002).

El N es un nutriente fundamental para la mayoría de seres vivos, forma parte de los aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas y proteínas. Normalmente del 97 a 99 % del N total de suelo se encuentra

en forma orgánica, como péptidos o aminoácidos de la materia vegetal o animal en descomposición y en forma inorgánica mediante la fijación de N, precipitación o escorrentía (Becquer *et al.*, 2019). Además, es un macronutriente limitado en la dinámica y funcionamiento de los ecosistemas. Es un elemento que juega un papel importante en la fertilización, composición y diversidad de especies vegetales (Chapin *et al.*, 2002). Las raíces de las plantas absorben este elemento en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Rodríguez y Flores, 2004).

En los ecosistemas templados, el N es un factor limitante para el desarrollo y crecimiento de las plantas leñosas, en cuanto a la formación de propágulos ectomicorrízicos, permite que las plantas leñosas compitan con mayor eficiencia contra microorganismos al obtener, asimilar y transportar este nutriente hacia la planta huésped (Pérez-Moreno y Read, 2004). Los hongos ectomicorrízicos absorben este elemento en forma de  $\text{NH}_4^+$  dado sus menores costos de asimilación en contraste con la reducción  $\text{NO}_3^+$  (Becquer *et al.*, 2018).

El P al igual que el N se encuentra en formas orgánicas e inorgánicas en el suelo: como constituyente de minerales fosfatados, adsorbido a la fracción mineral u orgánica del suelo y en solución. Es así que limita la productividad de las plantas en los ecosistemas, específicamente en los bosques (Rodríguez y Flores, 2004). Los hongos ectomicorrízicos pueden incrementar la solubilidad de complejos inorgánicos que contienen P debido a que excretan ácidos oxálico y cítrico, y tienen relación con bacterias que se encuentran en la rizósfera.

El K es el séptimo elemento más abundante de la Tierra, también es indispensable en el crecimiento de las plantas y con mayor abundancia en el citoplasma, también desempeña en el metabolismo de los carbohidratos y proteínas. Además, regula la apertura de estomas para la absorción de  $\text{CO}_2$  y el control de la transpiración (Anschütz *et al.*, 2014; Alcántar-González *et al.*, 2016). Los hongos ectomicorrízicos pueden adquirir el K que se encuentra a mayor distancia y de forma mineral al producir ácido cítrico, para después trasportarlo a la planta (Tibbett y Sanders, 2002).

El calcio (Ca) es otro elemento fundamental en el metabolismo fisiológico ya que es componente de la pared celular y regula la actividad de la membrana y sus transportadores, está correlacionado con la diferenciación de la endodermis. La deficiencia de Ca ocasiona la disminución del crecimiento de la planta y del sistema radical, debilitando los tejidos foliares (clorosis) y haciéndolos más susceptibles al ataque de patógenos (Alcántar-González *et al.*, 2016). Cuando se

establece la simbiosis entre la planta con los hongos ectomicorrízicos se beneficia en la obtención de Ca, debido a que las hifas de éstos al producir ácido oxálico y oxalato son capaces de liberar dicho elemento (Tibbett y Sanders, 2002).

El magnesio (Mg) se encarga en la regulación de diversas funciones en la planta. Se ha comprobado que del total de Mg que se deposita en la planta sólo de 15 al 20% es utilizado en la clorofila, el resto se utiliza como cofactor de enzimas en procesos tales como la fosforilación de ADP para formar ATP. Asimismo, regula la actividad de la membrana, las estomas y la osmoregulación (Alcántar-González *et al.*, 2016). Los hongos ectomicorrízicos incrementan con sus hifas el área de absorción de magnesio en el suelo.

El Fe es el cuarto elemento más abundante de la litosfera y representa 5% de la corteza terrestre. En el suelo se encuentra presente en forma de minerales primarios y secundarios; absorbido al complejo de intercambio, en compuestos orgánicos y en la solución del suelo (Alcántar-González *et al.*, 2016). Es un elemento necesario para la síntesis de clorofila y forma parte esencial del citocromo, al actuar como portador de electrones en la fotosíntesis y respiración (Briat *et al.*, 2007; Haselwandter *et al.*, 2011).

El manganeso (Mn) es fundamental para el metabolismo y desarrollo de las plantas, es absorbido en concentraciones relativamente bajas como catión manganeso ( $Mn^{2+}$ ) (Alcántar-González *et al.*, 2016). En el proceso fotosintético, el Mg es importante y junto al Cl participa en la fotólisis del agua. Inclusive la presencia de este elemento en el fotosistema II favorece la fotofosforilación, la reducción del  $CO_2$  y, la reducción del nitrito y sulfato (Rodríguez y Flores, 2004). Promueve el crecimiento y alargamiento celular en las raíces de las plantas, el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de enzimas. A concentraciones altas, este elemento resulta particularmente tóxico para el aparato fotosintético de la planta (Millaleo *et al.*, 2010; Karki *et al.*, 2013).

## VI. CONCLUSIONES

1. Las cuatro cepas bacterianas aisladas de nódulos de *Lupinus montanus* corresponden a la bacteria *Bradyrhizobium japonicum*.
2. Las plantas inoculadas con el HEC y en asociación con *Lupinus montanus* presentaron incrementos conspicuos en altura, diámetro del tallo y biomasa de parte aérea y raíz respecto a las plantas no inoculadas.
3. Se observó una mayor traslocación de macronutrientes, principalmente en N, P, K, Ca y de micronutrientes, principalmente Mn y Cu, en plantas inoculadas únicamente con *L. laccata*. Para el caso del K, Fe y Zn fue mayor la translocación en el tratamiento de las plantas inoculadas con *Laccaria laccata* en asociación de *L. montanus*. Se recomienda ampliar el tiempo del experimento para observar el efecto de *Lupinus montanus* sobre *Pinus ayacahuite*.
4. El porcentaje de colonización en plantas de *P. ayacahuite* inoculadas con *L. laccata* fue alto (96.1 y 88.5%).
5. La caracterización morfológica de los morfotipos de la ectomicorriza presente en las raíces de *P. ayacahuite* inoculados y la formación de esporomas de *L. laccata*, 300 días después de la inoculación, corrobora la colonización de la especie inoculada.
6. Debido al efecto benéfico registrado, el hongo ectomicorrízico evaluado y *L. montanus* inoculado con *Bradyrhizobium japonicum* tienen un potencial biotecnológico que pueden usarse asociado con especies forestales de relevancia económica.

## VII. VI. LITERATURA CITADA

- Abdel-Lateif, K., Bogusz, D., Hocher, V. (2012). The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. *Plant Signaling & Behavior* 7: 636– 641.
- Agerer, R. y Rambold, G. (2014). DEEMY–An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. <http://www.deemy.de> – München, Germany (Consulta: Septiembre de 2022).
- Aguirre-Zamora, M., Pérez-Moreno, J., López-Lozano, N. E., Barragan, J.L. y Delgadillo-Martínez J. (2021). La inoculación de *Pinus greggii* con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* favorece a las comunidades nativas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* 23: 5-10
- Ainouche, A., Bayer, R.J., Misset, M.T. (2004). Molecular phylogeny, diversification and character evolution in *Lupinus* (Fabaceae) with special attention to Mediterranean and African lupines. *Plant Systematics and Evolution* 246: 211-222.
- Alcántar-González, G, Trejo-Téllez, L. I y Gómez-Merino F. C. (2016). Nutrición de cultivos. 2ª Edición. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México.
- Amato, M., Ladd, J.N., Ellington, A., Ford, G., Mahoney, J.E., Taylor, A.C., Walscott, D. (1987). Decomposition of plant material in Australian soils. IV. Decomposition in situ of <sup>14</sup>C-and <sup>15</sup>N-labelled legume and wheat materials in a range of southern Australian soils. *Australian Journal of Soil Research* 25: 95-105.
- Andrade-Torres, A. (2010). “Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos”. *Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias* 80-90 pp.
- Araujo, C y Toth, S. 2006. El ciclo del nitrógeno: la nitrificación. *Microbiología Ambiental*. 26-30 pp.
- Arteaga-León, C., Pérez-Moreno, J., Espinoza-Victoria, D., Almaraz-Suárez J.J., Silva-Rojas H., Delgado-Alvarado A. (2018). Ectomycorrhizal inoculation with edible fungi increases plant growth and nutrient contents of *Pinus ayacahuite*. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 89: 1089-1099.
- Atlas, R. M. & Bartha, R. 2002. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Benjamin, Cummings, Redwood City.
- Baca, E., Soto, U y Pardo, R. (2000). Fijación Biológica de Nitrógeno. *Elementos* 38:43-49.
- Barajas, M. (2008). Ensayos de metabolismo microbiano en suelo: actividad deshidrogenasa y tasa de mineralización del nitrógeno. *Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático* 19: 291– 303.

- Barrientos, D., Montenegro, A., y Pino, I. (2001). Evaluación de la fijación simbiótica de nitrógeno de *Lupinus albus* y *L. angustifolius* en un andosol vilcun del sur de Chile. *Terra* 20:39-44.
- Bécquer, C. J y Prévost, D. (2019). Potencial de formación de nódulos en leguminosas forrajeras y de granos de rizobios, nativos de Sancti Spíritus, Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48:301-307.
- Berkeley, M. J y Broome, C. E. (1883). Notices of British fungi. *Annls of Natural History Biodiversity Heritage* 5:370-3.
- Bermúdez, T. K., Robledo, Q. N., Martínez, H. J., Andreas T. y Wink, M. (2000). Biodiversity of the genus *Lupinus* in Mexico. In: Van Santen, E., M. Wink, S. Weissmann y P. Römer (eds.). *Proceedings 9th International Lupin Conference*. International Lupin Association. Klink/Müriz, Germany.294-296.
- Bianco L. y Cenzano, A.M. (2018). Leguminosas nativas: estrategias adaptativas y capacidad para la fijación biológica de nitrógeno. Implicancia ecológica. *IDESIA* 1-10.
- Bianco, L. (2020). Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. *IDESIA* 38: 21-29.
- Binkley, D. & Vitousek, P. (1989). Soil nutrient availability. In: Pearcy, R. W., Ehleringer, J. R., Mooney, H. A. & Rundel, P. W. (eds.). *Plant physiological ecology. Field methods and instrumentation*. Chapman and Hall. London, 75-96.
- Binkley, D y Hart, S. C. (1989). The components of nitrogen availability assessments in forest soils. *Springer*, 57-112.
- Bourebaba, Y., Duran, D., Boulila, F, Hadjira, A., Abdelghani B., Temprano, F., Palacios, J., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, L., Rey, B. (2016). *Systematic and Applied Microbiology* 39: 266–274.
- Briat, J. F, Curie C, Gaymard F. (2007). Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 276–282.
- Broughton, W. J., Jabbouri, S y Perret, X. (2000). Keys to symbiotic harmony. *Journal of Bacteriology* 182:5641–5652.
- Camargo-Ricalde, S. L., Montaña, N. M., De la Rosa, C. J. y Montaña, S. A. (2012). Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria* 13: 3-19.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J.J., Quintero-Lizaola, R, Torres-Aquino, M. (2011). Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural* 84:83-96.
- Carrera-Nieva, A., y López-Ríos, G.F. (2004). Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10:93-98.

- Celaya-Michel, H y Castellanos-Villegas, A. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana* 29:343-356.
- Chapin, F. S., Matson, P. A. and Mooney, H. A. (2002). Principles of terrestrial ecosystem ecology. *Springer*. New York, NY, USA.
- Chávez, M. D., Pereira C.G, Machuca, H. 2009. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque* 30:4-9.
- CONAFOR. Comisión Nacional Forestal. (2001). *Pinus ayacahuite* Ehren. Enciclovida. Gob.mx; En línea: <https://enciclovida.mx/especies/155250-pinus-ayacahuite>.
- De Felipe, M. R., Fernández-Pascual, M., Lucas, M. M., Fedorova, E., Golvano, M. P., González, A., Guasch, L., De Lorenzo, C., De María, N., Pozuelo J. M., Pueyo, J.J., Vivo, A. (2006). Factores estructurales, bioquímicos y moleculares de la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 72: 423-442.
- De la Cruz-Landero, N., Espinosa-Hernández, V., Guevara, E., López-López, M. A., Santos, A., Ojeda-Trejo, E. y Alderete-Chávez, A. (2010). *Lupinus* versicolor response in soils contaminated heavy metals from a petroleum extraction field. *Journal of Applied Science* 10:694-698.
- Delaux P.M., Varala K., Edger P.P., Coruzzi G.M., Pires J.C., Ané J.M. (2014). Comparative phylogenomics uncovers the impact of symbiotic associations on host genome evolution. *Plos Genetics* 10: e1004487.
- Delgadillo, J., Ferrera, R., Galvis, A., Hernández, A y Cobos, M. (2005). Fijación biológica de nitrógeno en una pradera de trébol hubba/basillico de corte o de pastoreo. *Terra Latinoamericana* 23:73-79.
- Dunn, D. B. (2001). *Lupinus*. In: Calderon de R., G.R y J. Rzedowski. Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A.C. CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán, México. 983p.
- Dunn, D., (2005). *Lupinus* L. In: Calderón, G., & Rzedowski, J. (Eds.) Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2:290-300.
- Duplessis S, Sorin C, Voiblet C, Palin B, Martin F and Tagu, D. (2001). Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*. *Current Genetics*. 39: 335–339.
- Elizondo, J. (2006). El nitrógeno en los sistemas ganaderos de leche. *Agronomía Mesoamericana*. 17:70-76.
- Fernández-Pascual, M., Lucas, M. M., de Felipe, M. R., Boscá, L., Hirt, H., Golvado, M. P. (2006). Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium* - *Lupinus*. *Journal of Experimental Botany* 57: 2735–2742.

- Ferraris, G. N., Couretot, L. A y Toribio, M. (2009). Perdidas de nitrógeno por volatilización y su implicación en el rendimiento de cultivo de maíz en pergamino (bs as). Efectos de fuente, dosis y uso de inbidore. *Agrofutura. Informaciones Agronómicas* 43:19-22.
- Ferrera, R., González, M y Rodríguez, M. (1993). Manual de Agromicrobiología. México. Trillas. 11-22 pp.
- Folorunso, O., Rolston, D., Prichard, P y Louie, D. (1992). Cover crops lower soil surface strength, may improve soil permeability. *Regents of the University of California*.46:26-27.
- Fries, N., Serck-Hanssen, K., Dimberg, L. H., Theander, O. (1987). Abietic acid, and activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). *Experimental Mycology* 11: 360-363.
- Galindo-Flores G, Castillo-Guevara C, Campo-López A, Lara C. (2015). Caracterización de las ectomicorizas formadas por *laccaria trichodermophora* y *suillus tomentosus* en *Pinus montezumae* *Botanical Sciences* 93: 855-863
- García, E. (1968). Los climas del Valle de México. Serie de sobretiros. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 63 p.
- Gardner, W. K., Boundy, K. A. (1983). The acquisition of Phosphorus by *Lupinus albus* L. IV. The efectct of the interplanting wheat and white lupin on the growth and mineral composition of the two species. *Plant and Soil* 70: 391- 402.
- Gomez-Roldan, V., Femas, S., Brewer, P. B., Puech-Pages, V., Dun E.A., Pillot, J.P., Letisse F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J. C., Bouwmeester, H., Becard, G., Beveridge C.A, Rameau, C., Rochange, S. F. (2008). Inhibición por estrigolactona de la ramificación de los brotes. *Naturaleza* 455: 189-194.
- Gómez-Romero, M., De la Barrera, E., Villegas, J. y Lindig-Cisenros, R. (2013). Fertilización y asociación con especies pioneras herbáceas en el crecimiento de *Pinus pseudostrobus*. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 82:135-143.
- González-Sama, A., Coba, T., Redondo, F., Guasch, M., Fedorova, E., de Lorenzo, C., Hernández-Jiménez, M., Golvano, M, de Felipe, M., Pueyo, J., Fernández-Pascual, M., Lucas, M. (2004). Características especiales de la simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). *Centro de Ciencias Medioambientales* 182-194.
- Guerrero-Ortiz, P., Quintero-Lizaola, R., Espinoza-Hernández, V., Benedicto-Valdés, G. y Sánchez-Colín, M. (2012). Respiración de CO<sub>2</sub> como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de *Lupinus*. *Terra Latinoamericana* 30:355-362.
- Haines, S. G. Haines, L. W.; White, G. 1978. Leguminous plant increase sycamore growth in Northern Alabama. *Soil Science Society of America Journal* 42: 130-132.
- Haselwandter, K., Häninger, G., Ganzera, M., Haas, H., Nicholson, G., y Winkelmann, G. 2013. Linear fusigen as the major hydroxamate siderophore of the ectomycorrhizal Basidiomycota *Laccaria laccata* and *Laccaria bicolor*. *Biometals*, 26: 969-979.



- Hernán-Celaya, M., Castellanos-Villegas, A.E. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana* 29: 343-356.
- Hernández F. E., Rivera, R. K., Ramos, O. J., Salinas, F. C., Rodríguez M. y Bermúdez, K. (2008). Effect of scarification treatments on germination of *Lupinus montanus* HBK seeds. In: Lupins for Health and Wealth. J. A. Palta and J. B. Berger (eds.). Lupins for Health and Wealth, Proceedings of the 12th International Lupin Conference. Fremantle, Western Australia. International Lupin Association. Canterbury, New Zealand.405-409 pp.
- Hernández, S. F. (2016). Biotecnología, etnomicología y mesofauna asociada con hongos ectomicorrízicos comestibles en la Mixteca Oaxaqueña. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. México. 217 p.
- Herridge, D. F., y Doyle, A. D. (1988). The narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) as a nitrogen-fixing rotation crop for cereal production. II estimates of fixation by fieldgrown crops. *Australian Journal of Agricultural Research* 39:1017-1028.
- Ishaq, A. R., El-Nashar, H. A., Haq, A. S., El-Shazly, M. (2022). Genus *Lupinus* (Fabaceae): a review of ethnobotanical, phytochemical and biological studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 74:1700-17.
- Jacobsen, S.E. y Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. 458-482 pp
- Karki, P, Lee, E, Aschner M. (2013). Manganese neurotoxicity: a focus on glutamate transporters. *Annals of Occupational and Environmental Medicine* 25: 4.
- Kaye, T. N y Kuykendall, K. (2001). Effects of scarification, cold stratification on germination of *Lupinus sulphureus* ssp. Kincaidii. *Seed Science Technology*. 29:663-668.
- Kikuchi, K., Matsushita N., Suzuki K., Hogetsu T. 2007. Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus. *Suillus bovinus*. *Mycorrhiza* 17: 563-570.
- Kumar, V., Gopal, K. S y Poulouse, L. (2015). Types, importance and factors affecting mycorrhiza production for sustainable plant growth. *Van Sangyan* 2:37-40.
- Kurlovich, B. S. (2002). The history of lupin domestication. In: Kurlovich, B. S. ed. *Lupins* (Geography, classification, genetic resources and breeding). OY International North Express. St. Petersburg, Russia-Pellosniemi, Finland. 147-164. Pp
- Lagrange, H y Lapeyrie, F. (2001). Zeatin, a cytokinin from *Eucalyptus* seedling root exudates, controls hyphal branching and hypaphorine accumulation by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. Submitted
- Lagunes-Espinoza, L., López-Upton, J., García-López, E., Jasso-Mata, J., Delgado-Alvarado, A., García, G. (2012). Diversidad morfológica y concentración de proteína de *lupinus* spp. En la región centro-oriental del estado de Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 99: 73-90.

- Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. McDONALD y Barnett, J. P. 1989. The Biological Component: Nursey Pest And Mycorrhizae. The Container Tree Nursey Manual. Agric. Handbk. 674. Whashington, Dc: U.S. Departamento of Agricultura, Forest Service. 5: 159 p.
- Lehninger, A. L. (1978). Biochemistry (Segunda ed.). New York: Worth Publishers.
- Lina, S y Planchuelo, A. M. (2018). Morfoanatomía de las plántulas de dos especies de lupinos graníferos: *Lupinus albus* y *L. angustifolius* (Fabaceae, Faboideae). *Lilloa* 55: 67-80.
- López-Bellido, L. y Fuentes, M. 1986. Lupin Crop as an alternative source of protein. *Advances in Agronomy*. 40:239-295.
- López-Gutiérrez, A, Pérez-Moreno, J., Hernández-Santiago, F., Uscanga-Mortera, E., García-Esteva, A., Cetina-Alcalá, V.M., Xoconostle-Cázares, B. (2018). Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Botanical Sciences* 96: 286-304.
- Luna-Zamora, Pro-Martínez, G. A., Mendoza-Pedroza, S., González-Cerón, F., Sosa-Montes, E., Rodríguez-Ortega, L.T., Rodríguez-Ortega, A., Luna-Botello, A. (2019). Lupino (*Lupinus angustifolius* L.): A protein alternative for animal and human consumption in Mexico. *Agroproductividad*. 12: 53-57.
- Martínez, L.E., Sarmiento-López, H., Sigala-Rodríguez, J.A, Rosales-Mata, S.S y Montoya-Ayón, J.B. (2016). Respuesta a la inoculación inducida de *Russula delica* Fr. en plantas de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 7: 108-117.
- Martínez-Reyes, M, Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J.J y Honrubia-García, M. (2012). Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente* 18: 183-192
- Mattson, S. (2007). *Pinus contorta* growth in boreal Sweden as affected by combined lupin treatment and soil scarification. *Silva Fennica* 41: 649-659.
- Mays, F. J. (2004). Fijación biológica del nitrógeno. UDO Agrícola, 1:1-20.
- Melik-Khachatryan, D. G., Abramyan, D. G. y Gasparyan, M. L. (1970). Effect of the aqueous extract of fruiting bodies of pileate fungí on the microflora of surgical wounds in humans. *Biol. Zh. Arm.* 25:45-50.
- Melin, E. (1954). Growth factor requirements of mycorrhizal fungi of forest trees. *Svensk Bot Tidskr* 48: 86-94.
- Mellal, H., Yacine, B., Boukaous, L., Khouni, S., Benguerdouar, A., Castellano-Hinojosa, A y Bedmar E. (2019). Phylogenetic diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from rootnodules of *Lupinus angustifolius* grown wild in the North East. *Systematic and Applied Microbiology* 42: 397-402.

- Méndez-Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero-Lizaola, R., Hernández-Acosta, E y Lara-Herrera, A. (2011). Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana* 29:73-81
- Menéndez-Valderrey, J. L. *Laccaria laccata*. En *asturnatura.com* [en línea] Num. 573, 21/03/2016 [consultado el 12/12/2022]. Disponible en *asturnatura.com*.ISSN 1887-5068.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A.G., Mora, M.L., Alberdi, M. (2010). Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10: 470-481.
- Moreno, G. Esteve-Raventós F, C., Llana, B. Ma. Natividad. y J. Rejos. (2010). Hongos del campus y sus alrededores. Cuadernos del campus. *Naturaleza y medio ambiente* (7): 67p
- Mosquera-Espinosa, A., Bayman, P., Túpac, J. (2010). *Ceratobasidium* como hongos micorrízicos de orquídeas en Colombia. *ACTA AGRONÓMICA* 59: 316-326
- Mylona, P., Pawloswski, K., Bisseling, T. (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* 7:869-885.
- Nápoles-García, M., Cabrera-Pino, G., Onderwater. R., Wattiez., R, Hernández-Forte. I, Martínez-González L y M Núñez-Vázquez. (2016). Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales* 37: 37-44.
- Ortega-David, E.A., Rodríguez., A y Zamora-Burmano A. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *ACTA AGRONOMICA* 59:111-118.
- Ortiz S, C. A. y Cuanalo de la C, H. E. (1977). Levantamiento fisiográfico del área de influencia de Chapingo. (Para la cartografía de tierras erosionadas). Colegio de Postgraduados. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Méx.
- Ortiz-Medrano, A., Moreno-Letelier, A y Piñero, D. (2008). Fragmentación y expansión demográfica en las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 83:25-36.
- Osmundson, T. W., Cripps, C. L y Mueller, G. M. (2005). Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. *Mycologia* 97: 949-972.
- Pablo-Pérez, M., Lagunes-Espinoza, L., López-Upton, J., Aranda-Ibáñez, E. M., Ramos-Juárez, J. 2015. Composición química de especies silvestres del género *lupinus* del estado de Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 38: 49 -55.
- Paiva, N. L. (2000). An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant– microbe communication. *J. Plant Growth Regulation* 19, 131–143.
- Peix, A, Ramirez –Bahena, M.H., Velázquez, E., Bedmar, E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34: 17–42.

- Perdomo, C., Barbazán, M. y Duran, J. (1994). Nitrógeno. Cátedra de Fertilidad. Facultad de Agronomía. Universidad de la Republica. Montevideo. Uruguay.
- Pérez-Moreno, J y Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.
- Pérez-Moreno, J., Lorenzana-Fernández, A., Carrasco-Hernández, V y Yesca-Pérez, A. (2010). Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. Colegio de postgraduados. SEMARNAT, CONACYT, Montecillo, Texcoco, Edo de México. 167 p.
- Philippot, L. y Germon, J. (2005). Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. In: Buscot, F. & Varmav A. (Eds.). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Soil Biology. Springer-Verlag 1:59-176.
- Prusinski, J. (2017). White Lupin (*Lupinus albus* L.)- Nutritional and Health Values in Human Nutrition – a Review. *Czech J. Food Science* 35: 95–105.
- Quinto, C y Cárdenas, L. (2007). Diálogo para ganar: Interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol. *Bioteχνología* 14: 273-279
- Ramírez-Contreras, A y Rodríguez-Trejo D.A. (2009). Plantas nodriza en la reforestación de *Pinus hatrweggi* Lindl. *Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 15:43-48.
- Read D.J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47:376-391.
- Rentería-Chávez, M. C., Pérez-Moreno, J., Cetina-Alcalá, V. M, Ferrera-Cerrato, R y Xoconostle-Cázares, B. (2017). Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología* 49: 93-104.
- Revee, W., De Meyer, S., Terpolilli, J., Melino, V., Ardley, J., Tian, R., Tiwari, R., Howieson, J., Yates, R., O'Hara, G., Ninawi, M., Lu, M., Bruce, D., Detter, C., Tapia, R., Han, C., Wei, C., Huntemann, M., Han, J., Chen, I., Mavromatis, K., Markowitz, V., Ivanova, N., Pagani, I., Pati, A., Goodwin, I., Woyke y Kyrpidez, N. (2013). Genome sequence of the *Ornithopus/Lupinus*-nodulating *Bradyrhizobium* sp. strain WSM471. *Standards in Genomic Sciences*. 9:254-263
- Rivas, R., Garcia-Fraile, P y Velázquez, E. (2009). Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. *Microbiology Insights* 51-69
- Rodas, A., Núñez, R., Espinosa, V y Alcántar, G. 2001. Asociación Lupino-Maíz en la nutrición fosfatada en un andosol. *Terra* 19:141-154.
- Rodríguez, M y Flores, V. (2004). Elementos Esenciales y Beneficiosos. Consultado en: <https://core.ac.uk/download/pdf/143458034.pdf> (15 de diciembre de 2022).
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes V., Pérez-Moreno, J., Ortega-Larrocea, M. y Arellano-Torres, E. (2019). Sympatric species develop

- more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 90: e902868.
- Roth-Bejerano, N., Navarro-Ródenas, A. y Gutiérrez, A. (2014). Types Mycorrhizal Association. Desert Truffles. *Springer Nature* 69-80.
- Sánchez, J. y Sanabria, J. (2009). Metabolismos microbianos involucrados en procesos avanzados para remoción de nitrógeno, una revisión prospectiva. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11:114-124.
- Sánchez-González, A. y López-Mata, L. (2003). Clasificación y ordenación de la vegetación del norte de la Sierra Nevada, a lo largo de un gradiente altitudinal. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica* 74: 47-71.
- Santi, C., Bogusz, D. y Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany* 5:743-767.
- Seisdedos, L. y Planchuelo, A.M. (2018). Morfoanatomía de las plántulas de dos especies de lupinos graníferos: *Lupinus albus* y *L. angustifolius* (Fabaceae, Faboideae). *Lilloa* 55: 67–80.
- Shamseldin, A., Abdelkhalek y Sadowsky, M.J. (2016). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis* 71:91–109
- Smith, S. E. y Read, D. J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. London, UK.
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. 3rd. ed. Academic Press. New York, USA. 787 pp.
- Smith, S. y Read, D. (1997). Mycorrhizal symbiosis (2nd. edition). *Annals of Botany* 80 (5): 701.
- Soto-Correa J. C., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R., Sánchez-Vargas, N. y Cruz-de León, J. (2012). Variación genética entre procedencias de *Lupinus elegans* Kunth, zonificación altitudinal y migración asistida. *Agrociencia*. 46:593-608.
- Sousa, R.N., Franco, R.A., Oliveira, S.R., Castro M, L.P. (2012). Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. *Revista de Gestión Ambiental* 95:269-274.
- Strock, J.S. (2008). Ecological Processes. Ammonification. *Elservier* 162-165
- Swift, M. J., Heal, O. W. & Anderson, J. M. (1979). Decomposition in terrestrial ecosystems. Blackwell Scientific Publications. Witham, Essex, UK.
- Tagu, D., Faivre., Rampant, P., Lapeyrie F, Frey–Klett, P., Vion, P and Villar, M (2001). Variation in the ability to form ectomycorrhizas in the F1 progeny of an interspecific poplar (*Populus* spp.) cross. *Mycorrhiza* 10. 237–240
- Tibbett, M y Sanders, F. (2002). Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany* 89: 783-789.

- Trappe J.M. (1994). What is a mycorrhiza? Proceedings of the fourth European Symposium on mycorrhizae. Granada, España. En: Johnson N.C., Graham J.H. y Smith F.A. 1997. Functioning of mycorrhizal association along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135: 575-585.
- Troncoso, P. A., Pérez, C. A., Larrain, J. y Ardiles, V. (2013). Desarrollo de la fijación simbiótica de nitrógeno en una cronosecuencia primaria en la Isla Santa Inés, Región Magallanes, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 86:345-355.
- Turjaman M, Tamai, Y., Segah, H., Limin, S.H., Osaki, M y Tawaraya, K. (2006). Increase in early growth and nutrient uptake of *Shorea* seminseedlings inoculated with two ectomycorrhizal fungi. *Journal of Tropical Forest Science*. 18: 243- 249.
- Unkovich, M. J., Pate, J. S., y Sanford, P. (1997). Nitrogen fixation by annual legumes in Australian Mediterranean agriculture. *Australian Journal of Agricultural Research* 48:267-293.
- Valles, M., Cadisch, G y Aluja, S. (2003). Comparación de metodologías de isotopos para evaluar fijación de nitrógeno atmosférico y su destino en suelos y plantas. *Agrociencia* 37:117-128.
- Van-Sambeek, J. W., Ponder, F., Rietveld, W. J. (1986). Legumes increase growth and alter foliar nutrient levels of black walnut saplings. *Forest Ecology and Management*. 17: 159- 167.
- Vázquez-Cuecuecha, O.G., López-Upton, J., Lagunes-Espinoza, L.C., Ramirez-Herrera, C., López, P.A., Martínez, J.L. (2019). Variación morfológica y productiva de tres especies de *Lupinus* en un ensayo de campo *Revista Fitotecnia. Mexicana*. 42: 281–288.
- Whitford, W. 2002. Ecology of desert systems. Academic Press. London.
- Wolko, B., Clements, J. C., Naganowska, B., Nelson, M. & Yang, H. 2011. *Lupinus*. In: Cole, C. (Ed.) Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Legume crops and forages. *Springer* 153-206.
- Zamora, F., Garcia, P., Aguilar, C., Martinez, F., Vazquez, H., Zapata, I. (2022). Decomposition and nitrogen mineralisation of two wild lupins (Leguminosae) species with potential as green manures. *Journal of Central European Agriculture*. 23:384-390
- Zamora, J. F., Zapata, I. y Villalvazo, A. (2019). Fijación biológica del nitrógeno en tres especies silvestres del género *Lupinus* (Leguminosae, Papilionoideae) en México. *Acta Botánica Mexicana* 126: 1- 6.
- Zapata, I. (2015). Acumulación de materia seca y fijación biológica de Nitrógeno en diferentes especies del género *Lupinus* cultivadas en suelos de Zapopan, Jalisco. (Tesis de maestría). Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput Biology* 7: 203-214.