

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**Cambio climático global y
comunidades de microorganismos
rizosféricos de fresa silvestre
(*Fragaria mexicana* Schldl.)**

ADRIANA PATRICIA GAMBOA MENDOZA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: **Cambio climático global y comunidades de microorganismos rizosféricos de fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schltdl.)** realizada por la alumna Adriana Patricia Gamboa Mendoza bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

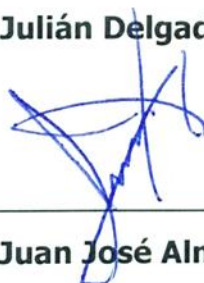
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Julián Delgadillo Martínez

ASESOR



Dr. Juan José Almaraz Suárez

ASESOR



Dra. Alejandrina Robledo Paz

ASESOR



Dr. Alejandro Alarcón

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre de 2017.

La presente tesis: **“CAMBIO CLIMÁTICO GLOBAL Y COMUNIDADES DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE FRESA SILVESTRE (*Fragaria mexicana* Schldl.)”**, fue financiada por el proyecto de desarrollo científico para atender problemas nacionales CONACYT 213059 **“IMPACTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO Y LA ACTIVIDAD AGRÍCOLA EN LA EMISION DE GASES DE EFECTO DE INVERNADERO Y EN LOS RECURSOS MICROBIANOS DE LA SIERRA NEVADA, MÉXICO.**

CONACYT

**CAMBIO CLIMÁTICO GLOBAL Y COMUNIDADES DE
MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE FRESA SILVESTRE
(*Fragaria mexicana* Schlttdl.)**

Adriana Patricia Gamboa Mendoza, M. en C. Posgrado de Edafología

RESUMEN

El cambio climático global es un fenómeno que ha cobrado gran importancia en los últimos años, debido al impacto que causa en los ecosistemas naturales, la agricultura y las condiciones de vida del ser humano. Para los próximos 100 años, se pronostica un incremento en la temperatura de casi 4°C, lo cual pondrá en riesgo especies que no logren adaptarse. En este estudio se sometieron plantas de fresa silvestre (*Fragaria mexicana*) a un incremento de temperatura con el fin de evaluar su impacto en la fisiología de la planta y en las comunidades microbianas de la rizósfera. La investigación se realizó en dos etapas. En la primera etapa se generó un protocolo de propagación *in vitro* de fresa silvestre, para obtener plantas homogéneas y con baja variabilidad genética, de gran utilidad para futuros experimentos. La fresa silvestre mostró ser un excelente candidato para estudios de propagación *in vitro* ya que presentó un rápido desarrollo y crecimiento de nuevos individuos. Asimismo, se logró establecer el mejor medio y tipo de explante vinculado a un protocolo de propagación *in vitro* el cual puede ser replicado en otros estudios. En la segunda etapa se evaluaron los efectos de un incremento de temperatura en 5.1°C en plantas de fresa silvestre y en las comunidades rizosféricas asociadas a ésta. Al incrementar la temperatura, las plantas de fresa silvestre presentaron mayor crecimiento en la parte aérea y menor desarrollo en la raíz. Las comunidades de microorganismos rizosféricos, las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN) y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), se vieron afectadas negativamente con el incremento de temperatura. La diversidad de las comunidades disminuyó, mientras que la dominancia aumentó al incrementar la temperatura, lo que sugiere que el cambio climático puede favorecer grupos metabólicos como el de los ácidos carboxílicos.

Palabras claves: propagación, temperatura, diversidad, bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos micorrízicos arbusculares, respiración del suelo, biomasa microbiana.

GLOBAL CLIMATE CHANGE AND MICROBIAL COMMUNITIES IN THE RHIZOSPHERE OF WILD STRAWBERRY (*Fragaria mexicana* Schlttdl.)

Adriana Patricia Gamboa Mendoza, M. en C. Posgrado de Edafología

ABSTRACT

Global climate change is a phenomenon that has become more important in recent years. It has a negative impact on natural ecosystems, agriculture and human wellness. One of the most important effects is the projected increase in temperature by almost 4°C during the next 100 years, thereby the escalation of extreme weather events. In this study two experiments were performed. First, an *in vitro* propagation protocol of wild strawberry was generated to obtain homogenous plants with low genetic variability, useful for future experiments. The wild strawberry has proved to be an excellent candidate for *in vitro* propagation studies because presented a rapid development and growth of new individuals. Also, it was found the best medium and type of explant linked to an *in vitro* propagation protocol which can be replicated in other studies. In the second experiment the effects of increasing temperature in 5.1°C on wild strawberry plants and their associated rhizospheric communities were evaluated. Wild strawberry plants presented a different response in the aerial part and root with increasing temperature, which is related to the changes observed in the soil, such as an increase in respiration and the rate of mineralization of soil organic matter. Rhizospheric microorganisms communities, free-living nitrogen fixing bacteria (NFB) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were negatively affected by warming. The microbial diversity decreased, while dominance increased with increasing temperature, suggesting that climate change may be beneficial for metabolics groups as carboxylic acids.

Key words: Propagation, temperature, diversity, nitrogen fixing bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, soil respiration, microbial biomass.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, la naturaleza y el universo, que me dieron la fortaleza y energía necesaria para soñar, creer y confiar, para saber que no hay límite alguno en la vida sino el que uno mismo se pone.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS) por permitirme ser parte de tan prestigiosa institución.

Al Doctor Juan José Almaraz, por su apoyo incondicional en todos los aspectos, como maestro, amigo y guía, por aconsejarme y enseñarme con cariño y paciencia.

Al Doctor Julián Delgadillo, por su apoyo y motivación ante las adversidades, por no limitar nunca mi desarrollo científico y por siempre enseñarme.

A la Doctora Alejandrina Robledo, por su paciencia y constante ayuda, por enseñarme con dedicación y entrega.

Al Doctor Alejandro Alarcón por sus sugerencias en el trabajo de investigación, por su constante entusiasmo y alegría para trabajar.

Al grupo de Microbiología del Suelo del Posgrado en Edafología, del Colegio de Postgraduados, porque todos de alguna u otra forma contribuyeron en mi formación científica.

Al Doctor Ronald Ferrera-Cerrato, por enseñar con amor la importancia de la familia en un grupo de investigación, por creer en mí y por aconsejarme cuando lo necesite.

Al Doctor Santos Carballar, por enseñarme y guiarme durante la finalización de mi investigación, por su paciencia y compañía en todo momento.

A mis amigos Miriam, Carlos, Juan, Jessi, Dani, Ale, Rene, Andrés, Lupita, Azarel, Tucuch, Mariana, Héctor, Marye, Susi, Ángel, Orlando, Tania, Deysi, Don Pedro, Don Mario y Patrick, que lograron hacer de este hermoso lugar mi segundo hogar, se convirtieron en mi familia y en mis cómplices de tristezas y alegrías, compañeros de vida, amigos que llevaré siempre en mi corazón.

A mis mejores amigos de toda la vida Andrea, Briyith, Camilo, Juan, Jaimito, Caro y Nubia, que siempre han estado conmigo desde la distancia, nunca me dejaron sola y siempre me han escuchado y aconsejado.

A todos los doctores del COLPOS que contribuyeron en mi formación académica, profesional y personal: Dra. Libia Trejo Téllez, Dr. Jesús Pérez Moreno, Dr. Prometeo Sánchez, Dr. Jorge D. Etchevers, Dr. Víctor Manuel Ordaz Chaparro y Dr. Arturo Gálvis.

DEDICATORIA

.... A ti... no hay palabras que expliquen la gratitud y el amor que tengo, amigo, compañero, cómplice, “maestro”, pero sobre todo familia... este logro es parte de una serie de eventos inesperados en el mundo de dos personas desconocidas... gracias por estar presente hoy en mi vida....

A mi padre, Alirio Gamboa, que aunque hoy no está presente para ver este nuevo logro de mi vida ... estés donde estés, este logró también es tuyo, por hacer que amaré esta profesión con el corazón.

A mi madre, Vitalia Mendoza, que con su esfuerzo y dedicación permitieron que esto fuera posible hoy... porque siempre me dejaste soñar, volar y nunca me limitaste, porque siempre me apoyaste ante cualquier decisión.

A mis hermanos Julián y Paola Gamboa Mendoza, porque siempre han estado junto a mí apoyando y acompañándome.

A mis sobrinos Juan Diego y Lucia Suarez Gamboa, por ser la alegría más bella de la casa, por esperarme todos los días desde que me marche y por hacer de mi vida siempre felicidad.

A mi primita y hermanita menor Andrea Melo... por siempre estar conmigo.

A mis mascotas Wendy y Sasha, quienes siempre han sido una alegría y compañía incondicional.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO 2	4
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	4
2.1. OBJETIVOS.....	4
2.1.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2.2. HIPÓTESIS.....	5
2.2.1. HIPÓTESIS GENERAL	5
2.2.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	5
CAPÍTULO 3	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
3.1. Cambio climático	6
3.2. Gases efecto invernadero y fuentes	9
3.3. Los bosques y su rol en el cambio climático.....	11
3.4. Impacto del cambio climático en los bosques.....	13
3.6. Importancia de los microorganismos del suelo	15
3.6.1. Bacterias Fijadoras de Nitrógeno de Vida libre	16
3.6.2. Hongos formadores de micorriza arbuscular.....	18
3.6. Impacto del cambio climático en los microorganismos del suelo.....	19
3.7. Fresa silvestre (<i>Fragaria mexicana</i> Schltdl.).....	20
3.8. Justificación	22
3.9. Literatura citada	23
CAPÍTULO 4	28

Propagación <i>in vitro</i> de fresa silvestre (<i>Fragaria mexicana</i> Schltdl.)	28
4.1. RESUMEN.....	28
CHAPTER 4	29
<i>In vitro</i> propagation of wild strawberry (<i>Fragaria mexicana</i> Schltdl.)	29
4.1. ABSTRACT.....	29
4.3. INTRODUCCIÓN.....	30
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
4.4.1. Material Vegetal	34
4.4.2. Medios de cultivo	34
4.4.3. Desinfestación del material vegetal	34
4.4.4. Siembra de los explantes	35
4.4.5. Variables evaluadas	35
4.4.6. Diseño experimental y análisis estadístico	35
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.5.1. Supervivencia.....	36
4.5.2. Tamaño del brote, número de hojas y presencia de raíz	38
4.6. CONCLUSIONES	43
4.7. LITERATURA CITADA	43
CAPÍTULO 5	48
Adaptaciones ante el calentamiento global de fresa silvestre (<i>Fragaria mexicana</i> Schltdl.) del estrato herbáceo en bosque de oyamel (<i>Abies religiosa</i>) de la Sierra Nevada, México.	48
5.1. RESUMEN.....	48
CHAPTER 5	49
Adaptations to global warming of wild strawberry (<i>Fragaria mexicana</i> Schltdl.) in a herbaceous stratum of oyamel forest (<i>Abies religiosa</i>) in the Sierra Nevada, México...	49

5.1. ABSTRACT.....	49
5.3. INTRODUCCIÓN.....	50
5.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
5.4.1. Material Vegetal.....	52
5.4.2. Microorganismos rizosféricos	53
5.4.3. Transformación genética del material microbiológico	53
Células competentes por el método Sambrook <i>et al.</i> (1989)	53
5.4.4. Transformación genética	55
5.4.5. Preparación del inóculo	56
5.4.6. Análisis de suelo.....	56
5.4.7. Tratamientos.....	56
5.4.8. Variables de crecimiento vegetal	57
5.4.9. Fotosíntesis y contenido y fluorescencia de clorofila	57
5.4.10. Variables relacionadas con las comunidades rizosféricas de fresa silvestre .	58
5.4.11. Variables ecológicas.....	61
5.4.12. Análisis Estadístico.....	62
5.5. RESULTADOS	62
5.5.1. Analisis de Suelos	64
5.5.2. Variables de Crecimiento Vegetal.....	64
5.5.3. Fotosíntesis y contenido y fluorescencia de clorofila	69
5.5.4. Variables relacionadas con las comunidades rizosféricas de <i>F. mexicana</i>	74
Temperatura y respiración del Suelo	74
Porcentaje de colonización micorrízica y número de esporas	76
Población de BFN recuperada	80
5.5.5. Diversidad Metabólica	81

5.5.6. Variables ecológicas.....	84
5.6. DISCUSIÓN.....	87
5.7. CONCLUSIONES.....	95
5.8. LITERATURA CITADA	96
CAPÍTULO 6	108
CONCLUSIONES GENERALES.....	108

LISTA DE CUADROS

Cuadro 4.1. Análisis de varianza para los efectos del medio, tipo de explante y su interacción sobre la propagación <i>in vitro</i> de <i>F. mexicana</i>	36
Cuadro 5.1. Concentración celular pre-cultivo bacteriano.....	54
Cuadro 5.2. Concentración celular células competentes.....	54
Cuadro 5.3. Diferencia entre las propiedades químicas finales del suelo de fresa silvestre inoculada sometidas a dos condiciones de temperatura.....	64
Cuadro 5.4. Efecto de los factores BFN, temperatura y su interacción sobre las variables de crecimiento de la planta (ANOVA). Probabilidad de significancia <0.05.	65
Cuadro 5.5. Efecto de los factores: BFN, temperatura y su interacción, sobre la fotosíntesis, el contenido de clorofila y la fluorescencia de clorofila (ANOVA). Probabilidad de significancia <0.05.....	70
Cuadro 5.6. Efecto de los factores: BFN, temperatura y su interacción, sobre el porcentaje de colonización micorrízica y el número de esporas por 10 gramos de suelo seco (ANOVA). Probabilidad de significancia <0.05.	77
Cuadro 5.7. Actividad metabólica (AWCD) para el tiempo inicial y final.....	82
Cuadro 5.8. Efecto de los factores: BFN, temperatura y su interacción, sobre la actividad metabólica (AWCD) para los grupos metabólicos: Ácidos Carboxílicos, Aminas/Amidas, Aminoácidos, Carbohidratos, Misceláneos y Polímeros (ANOVA). Probabilidad de significancia <0.05*.....	83
Cuadro 5.9. Diversidad metabólica {Índice Shannon-Weaver (H')}, equidad (E) y Dominancia {Índice Simpson (D)} para el tiempo inicial y final.....	85
Cuadro 5.10. Diversidad metabólica (Índice Shannon-Weaver (H')), equidad (E) y Dominancia (Índice Simpson (D)) para los sitios de baja y alta temperatura.	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** Esquema del sistema climático, procesos e interacciones. Tomado de IPCC, (2007)..... 7
- Figura 3.2.** Distribución de *Fragaria mexicana* Schltdl. Tomado de Southwest Environmental Information Network (2016). 22
- Figura 4.1.** Porcentaje de supervivencia de explantes de *F. mexicana* cultivados *in vitro* para tres medios de cultivo (a); y dos tipos de explantes (b). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). Media \pm el error estándar (n=89). M1: bencilaminopurina (BAP) 0.5 mg L⁻¹ y ácido indolbutírico (AIB) 0.1 mg L⁻¹; M2: BAP 0.1 mg L⁻¹, AIB 0.1 mg L⁻¹ y ácido giberélico (AG3) 0.1 mg L⁻¹; M3: BAP 1 mg L⁻¹ y ácido indolacético (AIA) 0.2 mg L⁻¹. HC: yemas apicales con hojas jóvenes cerradas y HA: yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes abiertas. 38
- Figura 4.2.** Número de hojas y porcentaje de brotes con raíz de *F. mexicana* cultivados *in vitro*. a) número de hojas por efecto del medio; b) número de hojas por efecto del tipo de explante; c) porcentaje de enraizamiento por efecto del medio; d) porcentaje de enraizamiento por efecto del tipo de explante. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). Media \pm el error estándar (n = 29). M1: bencilaminopurina (BAP) 0.5 mg L⁻¹ y ácido indolbutírico (AIB) 0.1 mg L⁻¹; M2: BAP 0.1 mg L⁻¹, AIB 0.1 mg L⁻¹ y ácido giberélico (AG3) 0.1 mg L⁻¹; M3: BAP 1 mg L⁻¹ y ácido indolacético (AIA) 0.2 mg L⁻¹. HC: yemas apicales con hojas jóvenes cerradas y HA: yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes abiertas. 40
- Figura 4.3.** Tamaño de las plántulas de *Fragaria mexicana* propagadas *in vitro* a) Efecto del medio de cultivo; b) efecto del tipo de explante. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). Media \pm el error estándar (n = 29). M1: bencilaminopurina (BAP) 0.5 mg L⁻¹ y ácido indolbutírico (AIB) 0.1 mg L⁻¹; M2: BAP 0.1 mg L⁻¹, AIB 0.1 mg L⁻¹ y ácido giberélico (AG₃) 0.1 mg L⁻¹; M3: BAP 1 mg L⁻¹ y ácido indolacético (AIA) 0.2 mg L⁻¹. HC: yemas apicales con hojas jóvenes cerradas y HA: yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes abiertas. 42
- Figura 5.1.** Temperatura promedio mensual en las dos condiciones en las que se condujo el experimento de fresa silvestre. Temperatura alta = bajo invernadero,

Temperatura baja = en cielo abierto, Diferencia = diferencia de temperatura entre las dos condiciones. 62

Figura 5.2. Intensidad lumínica durante el día (a) (Media \pm error estándar (n=27)) y en diferentes fechas (b) (Media \pm error estándar (n=28)), en el experimento de fresa silvestre conducido en dos condiciones ambientales. Temperatura alta = bajo invernadero, Temperatura baja = en cielo abierto..... 63

Figura 5.3. Altura de la planta y longitud de raíz con inoculación de BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo (T) para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7). . 66

Figura 5.4. Biomasa seca de la parte aérea y la raíz con inoculación de BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo (T) para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).. 67

Figura 5.5. Área foliar de plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo (T) para alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7). 67

Figura 5.6. Numero de flores (a, b) y frutos (c, d) acumulados en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). 68

Figura 5.7. Peso seco de frutos cosechados en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).. 69

Figura 5.8. Tasa de fotosíntesis de las plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C) (CIRAS 3). M1 = 132, M2 = 136, M3 = 140 y M4 =144 ddi. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dada por la inoculación de BFN (Tukey $\alpha=0.05$). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7). . 71

Figura 5.9. Fotosíntesis en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C) (CIRAS 2). M1 = 62, M2 = 113 y M3 = 130 ddi. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7)..... 71

Figura 5.10. Contenido de Clorofila en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura a) alta (19.6 °C) y b) baja (14.6°C).....	72
Figura 5.11. Contenido de Clorofila en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).....	73
Figura 5.12. Fluorescencia de la clorofila en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C): fluorescencia mínima (Fo) (a), fluorescencia variable (Fv) (b), fluorescencia máxima (Fm) (c) y eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm) (d). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).	74
Figura 5.13. Temperatura promedio del suelo a) 153 (M1), 160 (M2), 165 (M3) y 170 (M4) días después de establecido el experimento y b) para los sitios de temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Media \pm error estándar (n=7).	75
Figura 5.14. Respiración del suelo para a) temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C), y b) en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).....	76
Figura 5.15. Colonización micorrízica para a) temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C), y b) en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Letras minúsculas en cada columna corresponden al tiempo inicial y letras mayúsculas al tiempo final. Media \pm error estándar (n=7).....	78
Figura 5.16. Número de esporas en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo (T) para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Letras minúsculas en cada columna corresponden al tiempo inicial y letras mayúsculas al tiempo final. Media \pm error estándar (n=7).....	79
Figura 5.17. Población microbiana recuperada en suelo de rizósfera de <i>F. mexicana</i> inoculada con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Media \pm error estándar (n=3).	80

Figura 5.18. Promedio del color desarrollado en el pozo (AWCD) por las comunidades de microorganismos rizosféricos de plantas de *F. mexicana* inoculadas. Tiempo cero (O) y tiempo final (F). Media \pm error estándar (n=3). 81

Figura 5.19. Promedio de color desarrollado en el pozo (AWCD) para a) temperatura a) alta (19.6 °C) y b) baja (14.6°C) en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo..... 83

Figura 5.20. Actividad metabólica de las comunidades de microorganismos rizosféricas de *F. mexicana* en los diferentes sustratos para a) temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C), y b) en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.5$). Media \pm error estándar (n=3). 84

Figura 5.21. Promedio del color desarrollado en el pozo (AWCD) por comunidades de microorganismos rizosféricos de plantas de *F. mexicana* a temperatura alta (19.6 °C) (para seis fuentes de sustrato. Media \pm error estándar (n=3)..... 86

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cambio climático es un tema de importancia científica, política y ambiental (Dong *et al.*, 2015), que está determinado por factores externos e internos de la tierra (Florides *et al.*, 2013). Durante el siglo XX, como consecuencia de la actividad humana se observó un incremento acelerado de la concentración de algunos de los gases que componen la atmósfera, tales como: el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O), los cuales han aumentado progresivamente la temperatura del planeta (Schneider *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2015; Florides *et al.*, 2013; IPCC, 2007). En la actualidad, estos gases, junto con otros de origen antropogénico (p.e. compuestos halocarbonados) son considerados como gases efecto invernadero (GEI). El incremento en las concentraciones de estos en la atmósfera, son resultado de la dinámica entre las emisiones antropogénicas y la perturbación en los procesos naturales (Schneider *et al.*, 2015; Liebig *et al.*, 2012; IPCC, 2013).

Antes de la revolución industrial la concentración de CO₂ en la atmósfera se encontraba en un rango de 250 a 280 ppm, mientras que hoy estos valores están cercanos a las 390 ppm (Kutilek, 2011). Esto se debe principalmente al uso de combustibles fósiles, procesos industriales, cambios en el uso de la tierra, la agricultura y la deforestación (IPCC, 2014). De acuerdo con el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre Cambio Climático (2007) (IPCC por sus siglas en inglés) al duplicar la cantidad de CO₂ en la atmósfera, la temperatura de la tierra aumentará entre 2 a 4.5 °C. Por tanto, los esfuerzos de la comunidad mundial están dirigidos a prevenir que el alza de la temperatura del planeta no sobrepase los 2°C (Rossi, 2015).

Sin embargo, de continuar el incremento de los GEI en la atmósfera, el calentamiento del planeta continuaría y el sistema climático global experimentaría diversos cambios como: cambios en la cantidad y distribución de las precipitaciones, cambio en el nivel del

mar, cambios en la dinámica del viento, aumento en la temperatura del mar, acidificación del mar, condiciones climáticas extremas por periodos más largos y cambios en la dinámica de los ciclos biogeoquímicos (IPCC, 2007; McCubbin *et al.*, 2015; Leng *et al.*, 2015; Guenet *et al.*, 2012).

El efecto del cambio climático en los bosques ha sido estudiado durante los últimos años debido a que estos son importantes reservas de carbono y se reconocen como ecosistemas capaces de mitigar el cambio climático. Es de vital importancia conocer el impacto en los ecosistemas forestales dado que pueden ser vulnerables y poco adaptables a las variaciones de las condiciones climáticas (Lidner *et al.*, 2010).

En México, estudios realizados con diferentes especies arbóreas y en bosques templados, han propuesto diferentes escenarios de cambio climático, que incluyen aumento de los gases efecto invernadero, aumento en la temperatura y cambio en la precipitación. Estos sugieren que la distribución y el área ocupada por especies arbóreas podría disminuir considerablemente para 2060, hasta en 87,6% en bosques templados y el área ocupada por *Pinus hartwegii* en 86 % (Gutiérrez y Trejo, 2014; Sáenz-Romero *et al.*, 2012).

Los escenarios de cambio climático con aumento de CO₂ y temperatura, sugieren pérdidas en la diversidad y extinción de algunas especies; pérdidas en las poblaciones y distribución de las especies arbóreas forestales, en diferente grado; disminución de los bosques y por tanto de los nichos para la fauna; migración de las especies a otros lugares. Sumado a esto, las condiciones ambientales cambiarán rápidamente, por lo que la permanencia y establecimiento de muchas especies se verían afectadas (Gutiérrez y Trejo, 2014; Sáenz-Romero *et al.*, 2012).

La íntima relación que existe entre las plantas y los microorganismos del suelo puede ser afectada ampliamente por el cambio climático en modos diferenciales. El impacto generado en el ambiente alterará las condiciones de la planta y con ello, el microbioma de la raíz (Macdonald *et al.*, 2011). Uno de los efectos más observados es el cambio en

la composición y diversidad de las comunidades de microorganismos (McFarland *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2011). Por tanto, es importante seguir estudiando la dinámica de las comunidades microbianas y su relación con las plantas. El objetivo de este estudio fue identificar los cambios en la fisiología de la planta y en las comunidades de microorganismos asociados a la rizósfera de fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schltdl.) en diferentes condiciones de temperatura y radiación solar.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los cambios en la fisiología de la planta, diversidad metabólica, colonización de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre y hongos micorrízicos arbusculares en la rizósfera de fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schldl.) sometidas a diferentes condiciones de temperatura y radiación solar.

2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los cambios fisiológicos ocurridos en las plantas de fresa silvestre (*F. mexicana*) sometida a diferentes condiciones de temperatura y radiación solar.
- Conocer las variaciones en la diversidad metabólica en la rizósfera de fresa silvestre (*F. mexicana*) sometida a diferentes condiciones de temperatura y radiación solar.
- Cuantificar la colonización y el número de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la rizósfera de fresa silvestre (*F. mexicana*) sometida a diferentes condiciones de temperatura y radiación solar.
- Evaluar la colonización de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN) en la rizósfera de fresa silvestre (*F. mexicana*) sometida a diferentes condiciones de temperatura y radiación solar.

2.2. HIPÓTESIS

2.2.1. HIPÓTESIS GENERAL

Se presentan cambios en la fisiología de la planta, diversidad metabólica, colonización de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre y hongos micorrízicos arbusculares en la rizósfera de fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schltl.) al someterla a diferentes condiciones de temperatura y radiación solar.

2.2.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- La fisiología de la planta de fresa silvestre (*F. mexicana*) puede verse afectada por las diferentes condiciones de temperatura y radiación solar.
- La diversidad metabólica en la rizósfera de fresa silvestre puede verse afectada al modificar las condiciones de temperatura y radiación solar.
- La temperatura y radiación solar impactan los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados a la rizósfera de fresa silvestre.
- La colonización de la endorrizósfera por BFN se ve alterada por la temperatura y radiación solar.

CAPÍTULO 3

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Cambio climático

El clima de la tierra ha presentado variaciones drásticas a través del tiempo, fenómeno que ha sucedido naturalmente; alteraciones climáticas como calentamiento y enfriamiento de la superficie terrestre han ocurrido a lo largo de la historia del planeta. El cambio climático puede ser considerado como un fenómeno natural, el cual es causado por factores astronómicos vinculados a los ciclos solares o por procesos naturales internos o externos de la tierra, como erupciones volcánicas (Florides, *et al.*, 2013; IPCC, 2014).

La atmósfera es una capa protectora que hace posible la vida en la tierra y la protege del ambiente hostil del espacio exterior; está constituida por nitrógeno, oxígeno, argón, dióxido de carbono, neón, helio, metano, Kriptón, óxido nitroso, hidrógeno, dióxido de azufre, ozono, dióxido de nitrógeno, amoníaco, monóxido de carbono y xenón, que en conjunto estabilizan la temperatura del planeta (Manahan, 2007). Sin embargo, en la actualidad el cambio climático, se ha visto influenciado ampliamente por las actividades humanas llevados a cabo dentro del planeta, generando un desequilibrio en la composición de los gases de la atmósfera, lo que afecta directamente las condiciones climáticas y meteorológicas (Rajkumar, *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2015).

El IPCC, (2014b), define el cambio climático como el cambio en el estado del clima, el cual ha sido reconocido a través de modelos estadísticos, donde variaciones en la media y/o variabilidad de las de las propiedades de este son observadas, las cuales han persistido por un periodo de tiempo prolongado. En el artículo 1 de la Convención Marco sobre el Cambio Climático (CMCC) de las Naciones Unidas, se define como “cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición

de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante períodos de tiempo comparable” (Figura 3.1).

Las emisiones antropogénicas, vinculadas a los procesos industriales, la agricultura y la deforestación, han incrementado la concentración de algunos gases en la atmósfera como: el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4), el óxido nitroso (NO_2), los cuales han generado un incremento en la temperatura del planeta (Schneider *et al.*, 2015; Liebig *et al.*, 2012; IPCC, 2013). Según el IPCC (2013), existe una correlación positiva entre el incremento en las concentraciones de los GEI y el calentamiento global del planeta.

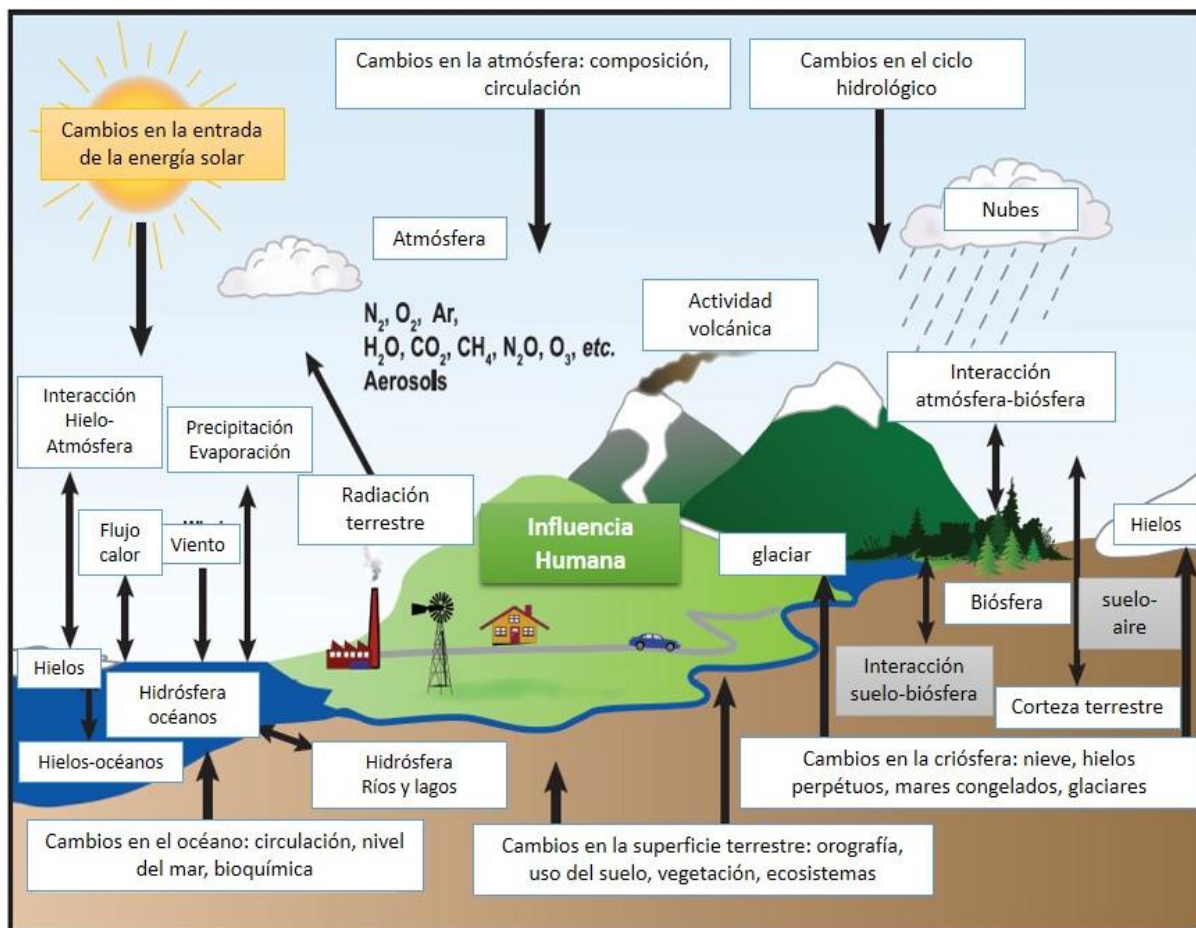


Figura 3.1. Esquema del sistema climático, procesos e interacciones. Tomado de IPCC, (2007).

El calentamiento global derivado de estas alteraciones, ha producido diferentes cambios en las condiciones meteorológicas y climáticas de la tierra. En general, se ha observado un aumento en la temperatura de la superficie terrestre y el océano, los volúmenes de hielo y nieve han disminuido, el pH del océano ha disminuido (acidificación), la variabilidad global en las precipitaciones, el nivel del mar han aumentado (Figura 3.1) (IPCC, 2007; IPCC, 2013; Leng *et al.*, 2015; Guenet *et al.*, 2012). Estas variaciones a nivel meteorológico y climático, están afectando directamente el medio ambiente y han generado grandes modificaciones en las actividades, condiciones y calidad de vida de las poblaciones humanas (McCubbin *et al.*, 2015; Leng *et al.*, 2015).

El cambio en el clima del planeta ha generado que numerosos fenómenos meteorológicos y climáticos sean cada vez más extremos y frecuentes. Por ejemplo, en gran parte de Europa, Asia y Australia se ha visto un aumento en la frecuencia de olas de calor o temporadas extremadamente calientes. A nivel mundial, se puede decir que el número de días y noches frías han disminuido, y de días y noches cálidas han aumentado (IPCC, 2013).

Las proyecciones a futuro según el IPCC, 2014 y el IPCC, 2013, debido al constante aumento de dióxido de carbono dará como resultado un mayor calentamiento global y cambios en todo el sistema climático. Los impactos negativos sobre todos los ecosistemas y las condiciones de vida de los seres humanos, incluyendo la posible desaparición de algunas regiones del planeta por la elevación del mar y la extinción de algunas especies de animales, requiere acciones inmediatas sobre las emisiones de gases efecto invernadero.

Para el periodo 2016 - 2035, el IPCC prevé cambios en la temperatura media de la superficie de la tierra entre 0.3-0.7°C; y para el 2100 el aumento en la temperatura oscilará entre 1.5-4 °C. Mientras que la precipitación será cambiante y más intensa a lo largo del planeta. Además, se observarán con mayor frecuencia condiciones extremas de temperatura (IPCC, 2014a; IPCC, 2007). Para México, según Sáenz – Romero *et al.*, (2010) se estima que para 2030, 2060 y 2090, se podrían esperar aumentos en la

temperatura en 1.5, 2.3 y 3.7 °C y una disminución en la precipitación en 6.7%, 9.0% y 18.2%, respectivamente.

Los riesgos vinculados a estos cambios en algunas ocasiones serán específicos para determinadas regiones, pero a nivel global existirá más riesgo de extinción y desaparición de especies, la biodiversidad será afectada, los ecosistemas tendrán cambios irreversibles. Habrá impactos negativos sobre todos los ecosistemas y las condiciones de vida de los seres humanos, la producción de alimentos y la calidad del agua. Existirá una gran pérdida de carbono almacenado en la tierra, vinculado con altas temperaturas, sequía y tormentas de viento, aumentando con ello el riesgo a incendios, enfermedades y plagas (IPCC, 2014a).

El cambio climático debe observarse desde los puntos de vista más holísticos, que contemplen el impacto no solo en el medio ambiente y la agricultura, sino otras dimensiones como el bienestar humano, la economía mundial, las relaciones sociales y ecológicas, que son esenciales para iniciar programas de adaptación y mitigación (Rossi *et al.*, 2015).

3.2. Gases efecto invernadero y fuentes

La íntima relación tierra – atmósfera, ha logrado mantener condiciones estrechas para que la vida pueda existir. La atmósfera es un escudo, que tiene como papel esencial absorber la mayoría de rayos cósmicos del espacio exterior, entre ellos la radiación electromagnética del sol, permitiendo solo el paso de las cantidades necesarias (ultravioleta e infrarrojo cercano) no dañina para los seres vivos (Manahan, 2007).

La atmósfera reabsorbe grandes cantidades de radiación infrarroja proveniente del sol, la cual es reemitida al espacio (30% de la luz solar). La fracción de energía solar restante, pasa a través de la atmósfera, donde se absorbe una pequeña cantidad y luego sigue hacia la superficie terrestre donde es finalmente absorbida. Para lograr un equilibrio energético en la Tierra, esta debe irradiar la misma cantidad de energía al espacio. Por

tanto, la superficie terrestre reemite la energía absorbida en forma de radiación de onda larga, energía térmica, la cual queda “atrapada” en la atmósfera por los gases efecto invernadero, y las nubes. Los GEI son similares a un manto, por lo cual se evita la pérdida de calor, con lo que se logra estabilizar la temperatura del planeta a un nivel adecuado para la vida, esto es conocido como efecto invernadero natural (IPCC, 2007; Manahan, 2007).

En la actualidad, este efecto invernadero natural se ha visto intensificado por las emisiones de gases efecto invernadero derivados de las actividades antropogénicas, las cuales han causado un desequilibrio en la composición atmosférica y con ello un incremento en la temperatura del planeta. Según el IPCC, (2013), la temperatura promedio global de la superficie terrestre y oceánica, ha mostrado un calentamiento de 0.85°C durante el período de 1880 a 2012.

Los GEI más importantes son el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nitroso (NO₂) (Schneider *et al.*, 2015; Liebig *et al.*, 2012). Las emisiones de gases efecto invernadero (GEI) han incrementado 2.2 % por año para el periodo 2000 - 2010, observándose un aumento más pronunciado respecto al periodo 1970-2000. Dentro de las emisiones de GEI el CO₂ representa 76%, el CH₄ 16% y el N₂O 6.2% (IPCC, 2014). El CO₂ ha aumentado 40% (278 ppm en 1975 a 390,5 ppm en 2011); así mismo el CH₄ y el N₂O en el mismo intervalo de tiempo han aumentado 150% (de 722 ppb a 1803 ppb) y 20% (de 271 ppb a 324,2 ppb), respectivamente (IPCC, 2013). El incremento de estos gases se debe a las emisiones antropogénicas, principalmente el consumo de energía derivado de fuentes fósiles y el cambio en el uso del suelo, en particular de áreas naturales a agrícolas (IPCC, 2013).

El total de emisiones de GEI derivados de las actividades antropogénicas está relacionado con el sector eléctrico y de calefacción (25%), el sector transporte (14%), el sector de la construcción (6,4), el sector industria (21%), el sector de otras fuentes de energía (9,6%) y el sector “AFOLU” (que incluye la agricultura, el sector forestal y otros usos de tierra, 24%) (IPCC, 2014). Según Huang *et al.* (2011), la agricultura contribuye

con 14% de los GEI, mientras que los cambios en el uso del suelo de bosque y la deforestación para tierras agrícolas aporta un 17% de estos, lo que implica que una tercera parte de los GEI, son atribuidos a la agricultura.

3.3. Los bosques y su rol en el cambio climático

El término bosque está referido a un conjunto de árboles que crecen en altas densidades, con diferente tamaño y composición. En la actualidad los bosques cubren 30% de la superficie terrestre, aproximadamente 3,8 billones de hectáreas globalmente (Pawar y Rothkar, 2015; Houghton, 2014; Pan *et al.*, 2011). Para finales del siglo XX se estimó 1,700 millones de ha de bosque tropical y 1,600 millones de ha de bosques templados en todo el mundo (Ghazoul, 2013).

Las mayores reservas de carbono terrestre en el mundo se encuentran en la vegetación y suelos de bosques; y las otras se encuentran distribuidas en praderas, humedales y tierras agrícolas. Estos representan el 75% del carbono total del planeta y albergan cerca de 90% de la biodiversidad terrestre (Pawar y Rothkar, 2015), tanto en la parte aérea como en el suelo. En términos generales, el carbono se halla básicamente en la vegetación, mientras que los animales (incluyendo los humanos), representan menos de 0,1% de carbono de los organismos vivos (Houghton, 2014).

Dentro de las funciones de los bosques se encuentran entre muchas otras, el ser un soporte como hábitat para muchos organismos vivos proveyendo protección y comida para estos. Es importante en el balance de los ciclos hidrológicos y de carbono, preservador de suelos, purifica el agua, regula el clima del planeta, produce oxígeno, captura y almacena CO₂ tanto en la biomasa aérea, como debajo esta (la hojarasca, la madera muerta y los suelos); y mitiga el cambio climático (Pawar y Rothkar, 2015; Wani *et al.*, 2015; Schoene y Bernier, 2012). Además, los bosques brindan servicios ambientales relacionados con la reserva y conservación de la biodiversidad, turismo, papel, madera, recreación, entre muchos otros, por lo que se han convertido en un importante recurso (Wani *et al.*, 2015; Schoene y Bernier, 2012).

Es por esto, que los bosques son objeto de estudio como una alternativa para la mitigación del cambio climático. Con el protocolo de Kyoto (año 2000 y sus proyectos de reforestación posteriores del 2008) firmado por los países industrializados, los bosques cobraron gran importancia económica y se convirtieron en un producto comercializable a nivel mundial (Schoene y Bernier, 2012). Sin embargo, en muchos lugares se desconoce el valor monetario de la contribución de cada país en emisiones y captura de carbono. Según Carrasco y Papworth (2014) el mercado internacional debería cuantificar los servicios ambientales, principalmente la captura de carbono; de tal forma que se pueda identificar de manera tangible el pago y la deuda de cada parte del mundo por este producto.

Para entender el uso del bosque en la mitigación del cambio climático, se debe comprender el funcionamiento del C en la tierra. El dióxido de carbono (CO_2) es químicamente estable y tiene residencia media en la atmósfera cercana a los 4 años antes de entrar a los ecosistemas oceánicos o terrestres (Houghton, 2014).

La fijación de CO_2 se lleva a cabo principalmente por las plantas en la fotosíntesis. Estas convierten el CO_2 usando la energía del sol en compuestos de C, los cuales son adicionados como materia orgánica dentro de la estructura vegetal. La reducción de CO_2 a diferentes compuestos de C por el proceso de fotosíntesis, finaliza en diferentes formas de materia orgánica tales como: glucosa, celulosa, carbohidratos, proteínas y ácidos grasos. El C orgánico en los ecosistemas terrestres existe en diferentes formas incluyendo hojas, raíces, animales, microorganismos, madera, hojarasca y humus del suelo. Estos materiales pueden tener una residencia en la superficie terrestre menor a un año o mayor a mil años (Houghton, 2014).

Según Wani *et al.* (2015) en un estudio realizado en el Himalaya, en diferentes tipos de bosques de coníferas, encontró que la captura total de C en la biomasa de dos tipos de abeto (*Abies pindrow* y *Picea smithiana*) con dosel cerrado fue mayor que para pino azul (*Pinus wallichiana*) y cedro del Himalaya (*Cedrus deodara*) con dosel abierto. Este

estudio logra demostrar cómo varía la captura de C en las diferentes especies de árboles forestales a diferentes densidades.

Según Colombo *et al.* (2012) se puede buscar una mitigación de cambio climático sostenible en el tiempo realizando diferentes formas de extracción forestal. Un estudio realizado en 3,4 millones de hectáreas de bosque en el noreste de Ontario, Canadá; encontraron que estos almacenan 558 Tg de C, de los cuales el 40,5% se encuentra en árboles vivos de diferentes especies y el sotobosque, el 37,5% se encuentra en el suelo y el 22% se encuentra en materia orgánica muerta (árboles muertos en pie, madera muerta, etc.).

3.4. Impacto del cambio climático en los bosques

En general, los cambios en las condiciones climáticas tienen un impacto sobre la biodiversidad de la tierra, produciendo la emergencia o extinción de las especies (Dawson y Spannagle, 2009). Asimismo, estos cambios generan cambios en la distribución y abundancia de las especies en los ecosistemas, esto incluye a aves, mamíferos, insectos, plantas, etc. Cada especie dentro de un ecosistema tiene un límite de tolerancia y adaptación al cambio. Sin embargo, este último proceso ocurre lentamente, siendo distinto para todas las especies dada su plasticidad fenotípica, por lo que el cambio en las condiciones climáticas será mucho más rápido que la adaptación en algunas especies (Hughes, 2000; Parmesan, 2006; Ledig *et al.*, 2010; Sáenz-Romero *et al.*, 2012; Gutiérrez y Trejo, 2014).

Por lo general, las especies pertenecientes a ecosistemas restringidos tienden a desaparecer dado que no pueden ir a otro lugar, mientras que otras especies podrían expandirse y colonizar nuevos ecosistemas, en forma vertical elevando su hábitat de crecimiento en altitud (Hughes, 2000; Parmesan, 2006; Ledig *et al.*, 2010; Sáenz-Romero *et al.*, 2012; Gutiérrez y Trejo, 2014).

El calentamiento de la tierra en este siglo podría acelerar la pérdida de biodiversidad trayendo como resultado una gran extinción de especies para 2100. Otro de los resultados probables del cambio climático, dado los episodios climáticos extremos, son los cambios en los ciclos de vida, la fenología, ovoposición y eclosión, nacimientos, épocas de emergencia de insectos, época de floración y patrones de migración. Asimismo, puede influenciar de gran manera las tasas de mortalidad, desarrollo y la producción de semillas (Dawson y Spannagle, 2009).

Algunas especies confinadas a nichos ecológicos muy específicos, los cuales presentan una distribución fragmentada y con poblaciones relativamente pequeñas pueden verse ampliamente afectados (Dawson y Spannagle, 2009; Ledig *et al.*, 2010). Un estudio realizado en bosques de pinos mexicanos con diferentes escenarios de cambio climático para 2030, 2060 y 2090, encontraron que el nicho climático adecuado se vería drásticamente reducido, en algunos casos desapareciendo donde se encuentran actualmente, trasladándose hacia el sur del país en el cinturón volcánico transmexicano, elevándose entre 600 a 700 m de altitud. En el caso de los bosques de pinos de Chihuahua, también se prevé una drástica reducción y fragmentación del nicho ecológico, desapareciendo para 2090 en el centro y norte de la Sierra Madre Occidental y trasladándose hacia el sur del estado (Ledig *et al.*, 2010).

En México para 2050, un escenario pesimista pronostica alta probabilidad de pérdida de las áreas de distribución de 5 especies de árboles presentes en bosques templados, siendo más susceptible *Pinus hartwegii* reduciendo su área en un 80%. *Abies hickelii*, *Quercus laurina*, *Q. ocoteifolia* y *Pinus ayacahuite*, 79, 48, 69 y 46%, respectivamente. Por lo que se podría prever una probable reducción en la población de las especies (Gutiérrez y Trejo, 2014). Asimismo, Saenz-Romero *et al.* 2012, encontraron que *P. hartwegii* en el estado de Michoacán es bastante susceptible al cambio climático, debido a que su hábitat se encuentra por encima de los 3,500 msnm, por lo que su ecosistema es restringido en este estado dado que los picos más altos se encuentran a 3,800 msnm, por lo que este podría ser sustituido por *P. pseudostrobus*.

Por otro lado, independiente del escenario de cambio climático, se espera que para México la migración de las plantas se haga hacia latitudes más altas, ya que existen algunas regiones semiáridas funcionando como barrera, lo cual impediría la migración hacia el norte. Asimismo, se espera que exista una expansión de las especies xerófitas y pastos hacia al norte y sur dada la ampliación del clima semiárido; invadiendo las zonas actualmente ocupadas por bosque tropical seco con pinos (Saenz-Romero *et al.*, 2012).

3.6. Importancia de los microorganismos del suelo

El suelo es un cuerpo natural, formado a partir de material parental a lo largo de millones de años, este ha sido alterado por las interacciones del clima, el relieve y los organismos vivos. El suelo comprende tres estados: sólido, referido a los minerales y la materia orgánica; el líquido y el gaseoso; los cuales soportan y proporcionan un hábitat para la evolución y existencia de la vida en el planeta (USDA, 2010; Voroney y Heck, 2015). El suelo es un recurso natural esencial para los organismos vivos y la productividad de los ecosistemas terrestres, dado que interviene en el almacenamiento e intercambio de energía, agua y nutrientes (Voroney y Heck, 2015). Por tanto, no es un cuerpo estático, se encuentra en constante transformación dada la actividad y relaciones entre el pH, las sales solubles, el contenido de materia orgánica, la relación C/N, los microorganismos, la fauna, la temperatura y la humedad (USDA, 2010).

El ambiente del suelo, es un hábitat complejo que involucra las plantas, animales y microorganismos; y la interacción con el entorno abiótico. El funcionamiento de este, está determinado por una compleja interrelación entre la geología, el clima y la vegetación. El suelo como hábitat, es caracterizado por su heterogeneidad a escala macro y micro. A nivel micro, los microorganismos están influenciados por las propiedades físicas y químicas del suelo, pero a su vez estos influyen en el crecimiento y supervivencia de otros organismos presentes en este espacio (Voroney y Heck, 2015).

Los microorganismos del suelo regulan gran cantidad de procesos en el suelo tales como formación de suelo, ciclo de nutrientes, disponibilidad de nutrimentos para la planta como

C y N, disponibilidad y calidad de materia orgánica, descomposición de la hojarasca, relaciones antagónicas con otros microorganismos, entre otros (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2015). Los cambios en las condiciones químicas y físicas del suelo, en las estaciones climáticas, en el uso de suelo, en el manejo e intensidad de los cultivos influyen en la actividad y estructura de las poblaciones microbianas del suelo. Cualquier cambio dentro de las poblaciones microbianas del suelo pueden alterar la disponibilidad de los nutrientes, la fertilidad y con ello, la productividad de los cultivos en los agro-ecosistemas (Dong *et al.*, 2014).

3.6.1. Bacterias Fijadoras de Nitrógeno de Vida libre

La atmósfera está compuesta por diferentes gases que le permiten ser una capa ideal para la vida de la tierra. Uno de esos gases es N atmosférico (N_2) el cual representa el 79% de la composición atmosférica, siendo la forma más abundante de N en la biosfera. Esta forma de N no está disponible para casi ningún organismo vivo, excepto para un acotado grupo de bacterias (Bottomley y Myrold, 2015; Robertson y Groffman, 2015).

La fijación biológica de N atmosférico (FBN) permite que el N esté disponible para los organismos vivos, ya que transforma el N_2 a nitrógeno orgánico. Este es un proceso energéticamente caro, ya que requiere romper el triple enlace del N_2 , de manera que este puede formar compuestos con el C, H y O. La FBN está mediada por la actividad de la enzima nitrogenasa, la cual rompe el triple enlace del N atmosférico. Esta enzima está compuesta por dos unidades de proteína denominadas dinitrogenasa y nitrogenasa reductasa (Bottomley y Myrold, 2015; Robertson y Groffman, 2015).

La FBN se lleva a cabo por microorganismos de vida libre o por procariotas simbióticos de los dominios Archae y Bacteria, estableciendo asociaciones mutualistas con eucariotas (Robertson y Groffman, 2015; Coleman y Wall, 2015; Bottomley y Myrold, 2015). Las bacterias que utilizan el nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno son denominadas diazotróficas. Estas son diversas y se desarrollan en diferentes ambientes utilizando diversas fuentes de energía tales como la luz (fotótrofos), la reducción de compuestos inorgánicos (litótrofos), y los consumidores de diferentes sustratos

(heterótrofos), además pueden ser aerobias obligadas o facultativas, o anaerobias obligadas (Bottomley y Myrold, 2015).

Las bacterias diazotróficas que no establecen asociaciones simbióticas mutualistas con eucariotas, son llamadas bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Sin embargo, las bacterias de vida libre son menos eficientes en fijar nitrógeno, que las que establecen simbiosis con eucariotas, relacionado con el gran gasto energético que requiere la fijación de nitrógeno atmosférico e impedir que la enzima nitrogenasa sea inactivada por O₂. En el caso de las bacterias de vida libre el C es tomado a partir de residuos orgánicos y de la descomposición de plantas herbáceas y madera, además del C lábil que se encuentra en el suelo (Bottomley y Myrold, 2015).

Existe una alta competencia entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y otros microorganismos del suelo, en cuanto a los recursos fuente de energía, principalmente compuestos carbonados y de amonio. La competencia por C, entre los microorganismos del suelo, es menor cuando este elemento se encuentra en abundancia, mientras que a altas cantidades de amonio, las bacterias fijadoras de nitrógeno pierden su ventaja contra otros competidores y no pueden sobrevivir en el sistema. Sin embargo, si estas son capaces de establecer asociaciones de amensalismo pueden sobrevivir (Kavadia *et al.*, 2007).

La fijación biológica de N realizada por bacterias de vida libre se produce principalmente en suelos con concentraciones de O₂ bajas, así como en hábitats marinos y de agua dulce (Kavadia *et al.*, 2007). Algunos géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre y que establecen asociaciones con raíces de las plantas son *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Bulkholderia*, entre otros (Kavadia *et al.*, 2007; Bottomley y Myrold, 2015).

Los diferentes problemas ambientales de la actualidad y el cambio climático, pueden generar alteraciones en la supervivencia de las comunidades de las bacterias fijadoras de N atmosférico de vida libre y, en general, de todos los microorganismos. Los

microorganismos fijadores de N de vida libre son indispensables para el ciclo del N, pudiendo así mantener la productividad y fertilidad de los ecosistemas (Kavadia *et al.*, 2007).

3.6.2. Hongos formadores de micorriza arbuscular

La micorriza arbuscular (MA) es una asociación simbiótica mutualista obligada que se establece entre los hongos del phylum Glomeromycota y las raíces de las plantas, la cual es típica de muchas plantas en los diferentes ecosistemas terrestres (Parniske, 2008; Moora y Zobel, 2010; Horton, 2015), y es la simbiosis más antigua conocida. Esta asociación mutualista es clave en los ecosistemas terrestres ya que permite la unión de los componentes bióticos y abióticos, permitiendo el flujo de nutrientes y C, entre el suelo y las plantas (Moora y Zobel, 2010).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) penetran la corteza de la raíz, creciendo intercelularmente, formando una estructura altamente especializada denominada arbusculo (del latín *arbusculum* que significa pequeño árbol). En esta estructura ocurre el intercambio de P y otros minerales, transportados a través de las hifas del hongo desde el suelo. En la interfase intercelular ocurre el traslado de los fotoasimilados para el micobionte. La formación de arbusculos, hace que este tipo de micorriza se denomine “micorriza arbuscular” (MA). Aproximadamente 90% del P y 80% del N que es absorbido por la planta proviene de la asociación con HMA (Parniske, 2008; van der Heijden y Horton, 2009; Moora y Zobel, 2010).

La asociación simbiótica entre HMA y raíces de las plantas en especial aumenta el área superficial de la raíz, permitiendo que la planta absorba más eficientemente agua y minerales del suelo como P y N, además de hacer disponibles varios nutrientes y proteger a la planta contra diferentes tipos de estrés abiótico, como la compactación (Nadeem *et al.*, 2014; Miransari *et al.*, 2009).

3.6. Impacto del cambio climático en los microorganismos del suelo

La biomasa microbiana depende de condiciones ambientales tales como temperatura, humedad y sustrato. La diversidad y actividad de los microorganismos es diferente en relación con el tipo de suelo, el ambiente y las especies vegetales. Además, está fuertemente influenciada por el tipo de sustrato en el que se encuentra, principalmente la relación C:N:P. Las relaciones C:N:P varían ampliamente en el suelo y a su vez esto puede determinar que elemento en esta relación es el limitante en el crecimiento microbiano (Spohn y Chodak, 2015; Qin *et al.*, 2014).). Por lo tanto, es evidente que alteraciones de las condiciones actuales en el clima del planeta podrían influenciar ampliamente las comunidades microbianas en el suelo.

El impacto del cambio climático en los microorganismos del suelo ha sido objeto de estudio dada la importancia que estos tienen en procesos biogeoquímicos, el reciclaje, movilización, descomposición y flujo de nutrientes, y en la interacción con los ecosistemas terrestres a través de las plantas (Urbanová *et al.*, 2015; Wen *et al.*, 2014). Por otro lado, las comunidades microbianas están relacionadas estrechamente con la fertilidad y calidad del suelo (Wen *et al.*, 2014; Pezolla *et al.*, 2015).

Al elevar las concentraciones de CO₂ de 370 ppm a 572 ppm para el periodo de 2001 a 2009 se ve un aumento en la biomasa microbiana para los años de 2003 y 2005 en 15 y 13%, respectivamente. Para el periodo 2007 a 2009 esta tendencia desapareció totalmente. Lo mismo se observa en cuanto al comportamiento de la respiración del suelo la cual aumenta hasta el año 2005 y luego disminuye, esto se atribuye a una disminución en la reserva de N en el suelo con mayor biomasa vegetal por encima de esta (Hagedom *et al.*, 2013).

Un estudio realizado en concentraciones elevadas de CO₂, encontró un incremento significativo (26%) en la abundancia de hongos y en especial Basidiomycota comparado con Ascomycota, después de 11 años. Esta tendencia puede explicarse porque muchos hongos saprófitos y descomponedores de materia orgánica como la lignina son del filo Basidiomycota, además de servir como formador de ectomicorrizas (Dunbar *et al.*, 2014).

Este aumento en las poblaciones de hongos bajo ambientes elevados de CO₂ en la rizósfera se ha relacionado con una mayor producción de compuestos de C por parte de las plantas, los cuales son transferidos hacia la raíz y de ésta a las comunidades de hongos saprofitos, estimulando su crecimiento (Nguyen *et al.*, 2011).

Algunos microorganismos patógenos de plantas como *Fusarium spp.* se pueden ver favorecidos por el cambio climático, al aumentar la temperatura y disminuir la precipitación, generando condiciones de estrés hídrico que afectan su hospedante volviéndolo más apetecido para el hongo, esto se observó en la palma de aceite. Por lo contrario, para la enfermedad causada por *Ganoderma sp.* el impacto fue desfavorable dado que altas temperaturas y bajas precipitaciones crean un ambiente menos eficiente para este hongo y para la descomposición de la lignina vegetal (Paterson *et al.*, 2013).

Las comunidades de microorganismos relacionadas con el ciclo de N podrían verse afectadas con un incremento en la temperatura y dependiendo de la fuente de N aplicada en el suelo podrían contribuir a las emisiones de NO₂ a la atmósfera. Las comunidades oxidadoras de amoníaco y las comunidades de microorganismos desnitrificantes se ven afectadas por el aumento en la temperatura. La abundancia del gen *amoA* en bacterias disminuyó cuando aumentó la temperatura de 30 a 40 °C. Sin embargo, se observó una disminución aún más drástica en la abundancia del gen *amoA* en archeas. Asimismo, disminuyó significativamente la abundancia en los genes *nirK* con el aumento en la temperatura. En el caso de hongos, se encontró que estos crecieron en los tres tipos de temperatura (20, 30 y 40 °C) y los mayormente encontrados fueron *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* (Xu *et al.*, 2017).

3.7. Fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schltld.)

La fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schltld.), pertenece a la familia Rosaceae, fue descrita en 1839, por Diederich Franz Leonhard von Schlechtendal en Jalapa, Mineral del Monte y Atotonilco el Chico, hoy Mineral el Chico. Actualmente, dentro de su

clasificación botánica es aceptada como sinónimo de *Fragaria vesca* L. (Barrie, 2015) y *Fragaria vesca* subsp. *bracteata* (Staudt, 1999; Rzedowski y Calderón, 2005).

La fresa silvestre se encuentra distribuida en 12 de los 31 estados de México, que son: Baja California, Sonora, Chihuahua, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo, Michoacán, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas; y en la Ciudad de México (Figura 3.2) (Rzedowski y Calderón, 2005; Missouri Botanical Garden, 2016; Southwest Environmental Information Network, 2016).

En general, las fresas silvestres son plantas herbáceas perennes, estoloníferas, rizomatosas, pubescentes, con láminas foliares trifoliadas, hojas cartáceas con margen aserrado, flores y frutos por encima de las hojas. Puede presentar flores solitarias o inflorescencias con varias flores, con 5 pétalos y 5 sépalos. Presenta flores perfectas de color blanco. Los frutos son globosos a ovoides, rojos o blanquecinos, formado por numerosos aquenios (Barrie, 2015; Rzedowski y Calderón, 2005).

Esta planta se encuentra en bosques templados (bosque de *Abies*, *Pinus*, de pino-encino y encino), donde existen condiciones climáticas y edafológicas especiales, que permiten el crecimiento adecuado de esta. En general la fresa silvestre crece en lugares con poca intensidad lumínica (Rzedowski y Calderón, 2005; Villaseñor y Ortiz, 2014).

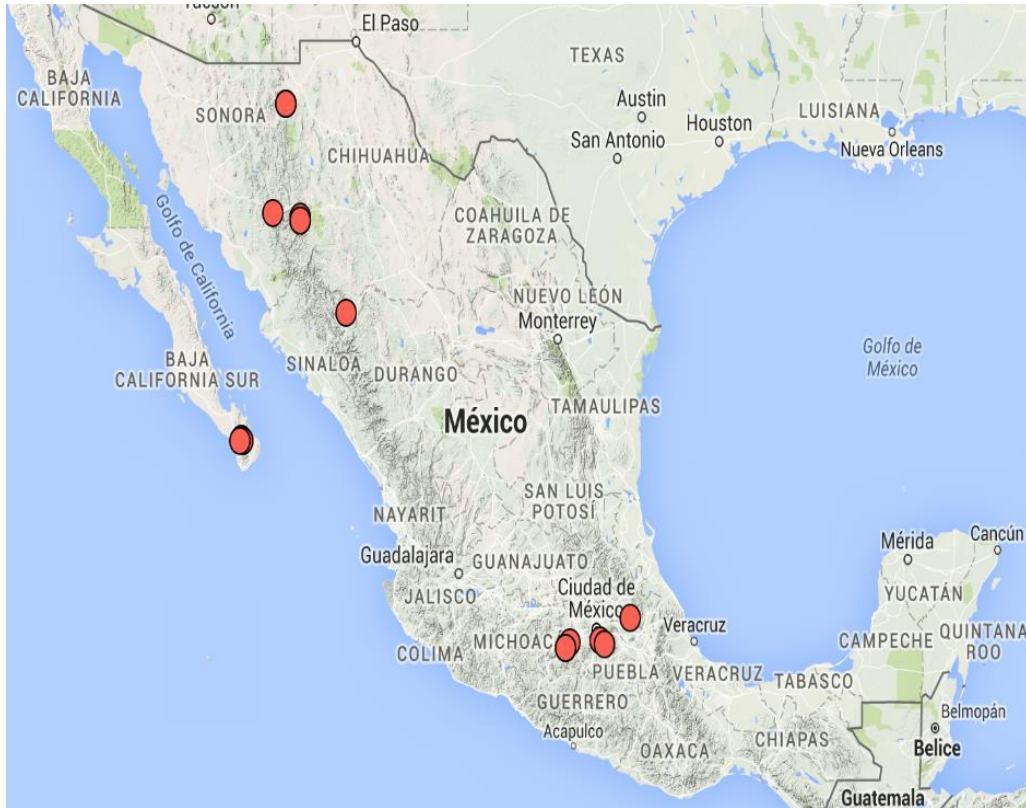


Figura 3.2. Distribución de *Fragaria mexicana* Schldl. Tomado de Southwest Environmental Information Network (2016).

3.8. Justificación

El cambio climático ha ocurrido en nuestro planeta a través de su historia como un fenómeno natural mediado por diferentes factores; sin embargo, en la actualidad se ha visto influenciado por fuerzas antropogénicas, acelerándolo en un período de tiempo relativamente corto con respecto a la edad de la tierra. Las investigaciones sobre cambio climático incluyen uso de ambientes con aumento en el CO₂ y en la temperatura; variaciones entre altas y bajas precipitaciones. Estas se han encaminado al impacto sobre los ciclos geoquímicos, el ciclo del agua, los océanos, ecosistemas, agricultura, sistemas urbanos, salud, bienestar y seguridad de los seres humanos. Los posibles escenarios de cambio climático publicados por el IPCC, 2014, también ha sido objeto de estudio y modelación.

Dentro del cambio climático los bosques juegan un papel muy importante debido a que podrían ser parte del proceso de mitigación, siendo grandes reservas y almacenes de C. El cambio climático, a futuro, podría estar limitando el hábitat de miles de especies vegetales pertenecientes a ecosistemas específicos y con nichos climáticos, por lo que un aumento en la temperatura, puede disminuir el área de tales ecosistemas o llevar a su desaparición.

Por otro lado, la relación suelo-planta-atmósfera, vinculada a los microorganismos del suelo también podrá verse afectada tanto por la dinámica en la fisiología de la planta como por el cambio en la temperatura del suelo, cambiando las condiciones físicas para los microorganismos del suelo, de tal forma que se genere un impacto sobre las comunidades microbianas del suelo.

Por ello, es importante indagar sobre los posibles impactos del aumento de temperatura en las comunidades de microorganismos del suelo y la fisiología de la planta, de tal forma que se pueda lograr un acercamiento al cambio en la composición de estas y su relación con la planta y de esta manera actuar a favor de los ecosistemas naturales.

3.9. Literatura citada

- Barrie, F. R. 2015. Rosaceae. En: Davidse, G., M. Sousa Sánchez, S. Knapp y F. Chiang Cabrera. (Eds). 2015. Flora Mesoamericana. Missouri Botanical Garden, St. Louis. Volumen 2 (3), v–xvii. 1-347.
- Bottomley, P. y D. Myrold, 2015. Chapter 15: Biological N Inputs. En: Eldor, P. (Ed.). 2015. Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. Pp. 447 -470.
- Carrasco, L.R. y S.K. Papworth. 2014. A ranking of net national contributions to climate change mitigation through tropical forest conservation. *Journal of Environmental Management* 146, 575-581.
- Coleman, D.C. y D. Wall, 2015. Chapter 5: Soil Fauna: Occurrence, Biodiversity, and Roles in Ecosystem Function. En: Eldor, P. (Ed.). 2015. Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. Pp. 111-149.

- Dunbar, J., L.V. Gallegos-Graves, B. Steven, R. Mueller, C. Hesse, D. R. Zak y C. R. Kuske. 2014. Surface soil fungal and bacterial communities in aspen stands are resilient to eleven years of elevated CO₂ and O₃. *Soil Biology & Biochemistry* 76, 227-234.
- Florides, G. A., P. Christodoulides y V. Messaritis. 2013. Reviewing the effect of CO₂ and the sun on global climate. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 26, 639–665.
- Guenet, B., K. Lenhart, J. Leloup, S. Giusti-Miller, V. Pouteau, P. Mora, N. Nunan y L. Abbadie. 2012. The impact of long-term CO₂ enrichment and moisture levels on soil microbial community structure and enzyme activities. *Geoderma* 170, 331–336
- Guitérrez, E. e I. Trejo. 2014. Efecto del cambio climático en la distribución potencial de cinco especies arbóreas de bosque templado en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85, 179-188.
- Hagedorn, F., D. Hiltbrunner, K. Streit, A. Ekblad, B. Lindahl, A. Miltner, B. Frey, I. T. Handa y S. Hättenschwiler. 2013. Nine years of CO₂ enrichment at the alpine treeline stimulates soil respiration but does not alter soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 57, 390-400.
- Houghton, R.A. 2014. 10.10. The Contemporary Carbon Cycle. En: Holland, H. D. y K. K. Turekian. 2014. (Eds.). *Treatise on Geochemistry. Second Edition. Volumen 10*. Pp. 399 -435.
- Huang, H., M. von Lampe, F. van Tongeren. 2011. Climate change and trade in agricultura. *Food Policy* 36, S9–S13.
- Hughes, L. 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already apparent?. *Trends in Ecology & Evolution*, 15 (2), 56 – 61.
- IPCC, 2007. Historical Overview of Climate Change. Le Treut, H., R. Somerville, U. Cubasch, Y. Ding, C. Mauritzen, A. Mokssit, T. Peterson and M. Prather. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (Eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

- IPCC, 2014a. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (Eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- IPCC, 2014b. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1132 pp.
- IPCC. 2013. The Physical Science Basis. In: Stocker TF, DQ, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM, editors. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Leng, G., Q. Tang y S. Rayburg. 2015. Climate change impacts on meteorological, agricultural and hydrological droughts in China. *Global and Planetary Change* 126, 23–34.
- Liebig, M. A., A. Franzluebbbers y R. F. Follett. 2012. Chapter 1: Agriculture and Climate Change: Mitigation Opportunities and Adaptation Imperatives. Liebig, M. A., A. Franzluebbbers y R. F. Follett. (Eds.). 2012. En: *Managing Agricultural Greenhouse Gases*. Published by Elsevier Inc. Pp. 3 -11.
- Manahan, S.E. 2007. *Introducción a la química ambiental*. Reverté Ediciones. España. Pp. 725.
- McCubbin, S., B. Smit y T. Pearce. 2015. Where does climate fit? Vulnerability to climate change in the context of multiple stressors in Funafuti, Tuvalu. *Global Environmental Change* 30, 43–55.
- Missouri Botanical Garden, 2016. *Fragaria mexicana* Schldl. Specimens. En: <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=50004241&tab=specimens>. Visitada febrero de 2016.

- Nguyen, L.M., M.P. Buttner, P. Cruz, S.D. Smith y E.A. Robleto. 2011. Effects of elevated atmospheric CO₂ on rhizosphere soil microbial communities in a Mojave Desert ecosystem. *Journal of Arid Environments* 75, 917-925.
- Paterson, R.R.M., M. Sariah, N. Lima. 2013. Review: How will climate change affect oil palm fungal diseases? *Crop Protection* 46, 113 -120.
- Pezzolla, D., G. Marconi, B. Turchetti, C. Zadra, A. Agnelli, F. Veronesi, A. Onofri, G.M. N. Benucci, P. Buzzini, E. Albertini y G. Gigliotti. 2015. Influence of exogenous organic matter on prokaryotic and eukaryotic microbiota in an agricultural soil. A multidisciplinary approach. *Soil Biology & Biochemistry* 82, 9-20
- Qin, S., W. Zhou¹, D. Lyu y L. Liu. 2014. Effects of soil sterilization and biological agent inoculation on the root respiratory metabolism and plant growth of *Cerasus sachalinensis* Kom. *Scientia Horticultura* 170, 189–195
- Rajkumar, M., M. N. V. Prasad, S. Swaminathan y H. Freitas. 2013. Climate change driven plant–metal–microbe interactions. Review. *Environment International* 53, 74–86.
- Robertson, G.P. y P.M. Groffman, 2015. Chapter 14: Nitrogen Transformations. En: Eldor, P. (Ed.). 2015. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Pp. 421-446.
- Rossi, F., E. J. Olguín, L. Diels y R. de Philippis. 2015. Microbial fixation of CO₂ in water bodies and in drylands to combat climate change, soil loss and desertification. *New Biotechnology* 32, 109 - 120.
- Rzedowski, J. y G. Calderón, 2005. Rosaceae. *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Fascículo 135.
- Sáenz-Romero, C., G. E. Rehfeldt, N. L. Crookston, P. Duval y J. Beaulieu. 2012. Modelos “Spline” de Climas Contemporáneo, 2030, 2060 y 2090 para Michoacán, México. Impactos en la Vegetación. Ensayo Científico. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 35 (4). Pp. 333-345.
- Schiede, G. y C. Ehrenbergio. 1839. *De Plantis Mexicanis*. En: von Schlechtendal, D. F. L. 1839. *Ein Journal für die Botanik in ihrem ganzen Umfange*. Berlín & Halle. *Linnaea* 13, 265–266.

- Schneider, A., A. Townsend-Small y D. Rosso. 2015. Impact of direct greenhouse gas emissions on the carbon footprint of water reclamation processes employing nitrification–denitrification. *Science of the Total Environment* 505, 1166–1173
- Schoene, D.H.F. y P. Y. Bernier. 2012. Adapting forestry and forests to climate change: A challenge to change the paradigm. *Forest Policy and Economics* 24, 12–19.
- Southwest Environmental Information Network, SEINet – Arizona Chapter, 2016. *Fragaria mexicana* Schltl. En: <http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php>. Visitada febrero de 2016.
- Spohn, M. y M. Chodak. 2015. Microbial respiration per unit biomass increases with carbon-to-nutrient ratios in forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 81, 128-133
- Thuiller, W., S. Lavergne, C. Roquet, I. Boulangeat, B. Lafourcade y M. B. Araujo. 2011. Consequences of climate change on the tree of life in Europe. *Letter. Nature*. Vol. 470, 531 – 534.
- Urbanová, M., J. Snajdr y P. Baldrian. 2015. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology & Biochemistry* 84, 53-64.
- Wani, A. A., P. K. Joshi y O. Singha. 2015. Estimating biomass and carbon mitigation of temperate coniferous forests using spectral modeling and field inventory data. *Ecological Informatics* 25, 63–70.
- Wen, L., P. Lei, W. Xiang, W. Yan y S. Liu. 2014. Soil microbial biomass carbon and nitrogen in pure and mixed stands of *Pinus massoniana* and *Cinnamomum camphora* differing in stand age. *Forest Ecology and Management* 328, 150–158.
- Xu, X., X. Liu, Y. Li, Y. Ran, Y. Liu, Q. Zhang, Y. He, J. Xu y H. Di. 2017. High temperatures inhibited the growth of soil bacteria and archaea but not that of fungi and altered nitrous oxide production mechanisms from different nitrogen sources in an acidic soil. *Soil Biology & Biochemistry* 107, 168 – 179.

CAPÍTULO 4

Propagación *in vitro* de fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schldl.)

4.1. RESUMEN

Los bosques templados mexicanos albergan gran cantidad de especies de flora y fauna las cuales son componentes esenciales de estos ecosistemas. La biodiversidad en plantas silvestres y endémicas es amplia y representan fuentes genéticas importantes que deben ser conocidas y estudiadas. La fresa silvestre, *Fragaria mexicana* Schldl., es un taxón restringido a bosques templados de Norte América. En México se encuentra distribuida en varios estados del país, en bosques de encino, pino y oyamel y por ende, con una variación genética amplia en ambientes naturales. Con la propagación *in vitro* de fresa silvestre se pretende obtener plantas sanas y homogéneas, con el fin de que estas puedan ser objeto de estudio en trabajos de investigación como aquellos relacionados con el efecto del cambio climático en las comunidades rizósfericas de *F. mexicana*. En el presente estudio se evaluaron tres medios de cultivo y dos tipos de explantes: 1.- yemas apicales y entrenudos con hojas jóvenes abiertas (HA) y 2.- yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes cerradas (HC); con el fin de observar el comportamiento de estos en la propagación *in vitro*. Se evaluó el porcentaje de supervivencia, el tamaño de la planta, el porcentaje de plantas con raíz y el número de hojas. Los resultados mostraron que las plántulas formadas *in vitro* fueron influenciadas por el tipo de explante más que por el medio utilizado. Las plántulas derivadas de explantes HA presentaron mejor desarrollo para todas las variables. El tamaño promedio de las plantas obtenidas a partir de explantes HA fue mayor en 0.66 cm y presentaron una hoja más con respecto a las plántulas derivadas de explantes HC. Asimismo, el porcentaje de supervivencia de plántulas fue del 66% en explantes HA. Finalmente, el 87% de las plántulas regeneradas a partir de explantes tipo HA desarrollaron raíz.

Palabras claves: propagación *in vitro*, fresa silvestre, medios de cultivo, explantes, bosques templados.

CHAPTER 4

***In vitro* propagation of wild strawberry (*Fragaria mexicana* Schtdl.)**

4.1. ABSTRACT

Mexican temperate forests keep a lot off number of species of flora and fauna which are essential components of these ecosystems. Biodiversity in wild and endemic plants is wide and represents important genetic sources that must be known and studied. Wild strawberry, *Fragaria mexicana* Schtdl., is a taxon restricted to temperate forests of North America. In Mexico it is distributed in several states of the country, in forests of oak, pine and oyamel, with a great genetic variation in natural environments. With the *in vitro* propagation of the wild strawberry, we want to obtain healthy and homogeneous plants, so that they can be studied in research projects as the related to the effect of climate change on the rhizosphere communities of *F. mexicana*. In present study, three culture media and two types of explants were evaluated: 1.- apical and internodes buds with open young leaves (LO) and 2.- apical or internodes buds with closed young leaves (LC); with purpose to observe the behavior of these in an *in vitro* propagation. The percentage of survival, the size of the plant, the percentage of plants with roots and the number of leaves were evaluated. The results showed that the seedlings formed *in vitro* were influenced by the explant type rather than by the medium used. Seedlings derived from LO explants showed better development for all variables. The mean size of the plants obtained from LO explants was greater in 0.66 cm and presented one leaf more with respect to the seedlings derived from LC explants. Also, the percentage of seedling survival was 66% in LO explants. Finally, 87% of seedlings regenerated from LO explants developed root.

Key words: *in vitro* propagation, wild strawberry, culture media, explants, temperate forests.

4.3. INTRODUCCIÓN

México es un país considerado como megadiverso, representando 12% de la biodiversidad del planeta (Toledo y Ordoñez, 1998; Villaseñor 2004; Villaseñor y Ortiz, 2014). En la actualidad, México ocupa el quinto lugar a nivel mundial respecto a la diversidad florística, con 22,259 especies, después de Brasil, Colombia, China y Sudáfrica (Villaseñor, 2004; Villaseñor y Ortiz, 2014).

En los bosques templados (bosque de *Abies*, *Pinus*, pino-encino y encino) se registra el mayor número de especies vegetales (8,824 especies) y endemismos en el país (4,534 son endémicas de México); se estima que el 85% de pinos y un 70% de encinos, presentes en estos bosques, son endémicos de México (Mittermeier y Goettsh, 1992; Villaseñor y Ortiz, 2014).

La Familia Rosaceae es componente importante de la vegetación en los bosques templados debido a su riqueza en géneros y especies (Sánchez *et al.*, 2006). Para México se han reportado 30 géneros dentro de esta familia, en los cuales el género *Fragaria* L., se encuentra representado por tres especies (*Fragaria californica* Cham. & Schltld.; *Fragaria mexicana* Schltld. y *Fragaria virginiana* Duchesne) (Villaseñor, 2016; Villaseñor y Ortiz, 2014). *Fragaria mexicana* Schltld. (fresa silvestre), es un taxón restringido a bosques templados de América del Norte (Stanley *et al.*, 2015) y considerada como endémica de México (Villaseñor, 2016).

En México *Fragaria mexicana* Schltld. se encuentra asociada principalmente a bosques templados de *Abies*, pino, pino-encino y encino, los cuales son ecosistemas importantes para el país debido a que albergan gran cantidad de plantas endémicas y biodiversidad (Rzedowski y Calderón, 2005; Villaseñor y Ortiz, 2014; Villaseñor, 2016).

F. mexicana es una planta herbácea perenne distribuida en bosques templados de México desde los 1,750 a 3,200 msnm (Rzedowski y Calderón, 2005), en los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Chihuahua, Colima, Durango, Hidalgo, Jalisco,

Oaxaca, Nuevo León, Tlaxcala, Estado de México, Michoacán, Sinaloa, Tamaulipas, Nayarit, Morelos, Querétaro, Zacatecas, San Luis Potosí, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas; y la Ciudad de México (Rzedowski y Calderón, 2005; Missouri Botanical Garden, 2016; Southwest Environmental Information Network, 2016; Villaseñor, 2016).

Los estudios en plantas silvestres como *F. mexicana* son importantes dado que son un reservorio de genes de resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a diferentes tipos de estrés, mejoramiento en la calidad del fruto, eficiencia en la absorción de nutrientes, entre otros (Vincent *et al.*, 2013; Yokoya *et al.*, 2017; Reeve *et al.*, 2008; Maxted *et al.*, 2006).

Lamentablemente esta especie, al igual que la vegetación asociada a los bosques templados, está en peligro permanente debido a los fenómenos naturales y a presiones antropogénicas, ya sea por el cambio en el uso del suelo para la agricultura, la ganadería, la explotación forestal no sustentable, o por la presión demográfica ejercida por la urbanización, el crecimiento de la población y la expansión en áreas industriales.

Aunado a lo anterior, cambios ambientales asociados al calentamiento global también ejercen efectos a los que tienen que adaptarse especies vegetales como esta (FAO, 2010; Torres, 2004; Pawar y Rothkar, 2015; CONAFOR, 2013). Lo anterior resulta en la degradación y transformación de los bosques mexicanos (Torres, 2004; CONAFOR, 2013), principal hábitat de esta especie, por lo que es importante implementar estrategias que permitan mantenerla y propagarla.

El cultivo de tejidos es una biotecnología que incluye técnicas y métodos que permiten manipular células, órganos, o tejidos derivados de una planta madre, los cuales crecen sobre un medio nutritivo artificial para generar nuevas plantas con características iguales a la que le dio origen. Las plantas regeneradas por este tipo de técnica están libres de microorganismos, ya que crecen en ambientes asépticos con medios de cultivo esterilizados (George, 2008; Taji *et al.*, 2002), por lo que son de gran utilidad para el

estudio y la propagación rápida y masiva de las especies vegetales que presentan problemas de conservación.

La propagación *in vitro* de fresa comercial (*Fragaria x ananasa*) se ha basado en el protocolo desarrollado por Boxus (1974). Este puede utilizar como macronutrientes la solución nutritiva de Knop, o la solución de Murashige y Skoog (MS); asimismo, usa soluciones de micronutrientes, vitaminas y aminoácidos de Murashige y Skoog (MS) (Boxus, 1974, Boxus, 1987; Boxus, 1999).

Por otro lado, diferentes estudios han probado el uso reguladores de crecimiento vegetal como bencilaminopurina (BAP), ácido indol-butírico (AIB), ácido giberélico (AG₃), prolina, cinetina, zeatina, thidiazuron (TDZ) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4-D), en diferentes concentraciones para hacer más eficiente la propagación y regeneración de diferentes tipo de explantes derivados de plantas de fresa silvestre y comercial (Kaushal *et al.*, 2004; Yonghua *et al.*, 2005a; Yonghua *et al.*, 2005b; Hanhineva *et al.*, 2005; Ashrafuzzaman *et al.*, 2013; Yildirim y Turker, 2014; Capelleti, 2016).

Yildirim y Turker (2014) encontraron que el TDZ y el AIB, de manera independiente, no permiten la producción de brotes *en Fragaria vesca* L. La mejor combinación de TDZ y AIB, se encontró en las concentraciones de 1.5 y 0.5 mg L⁻¹, respectivamente; logrando que 54% de los explantes formaran brotes (13.5 brotes por explante). Resultados similares, encontró Hanhineva 2005, quien obtuvo el número más alto de plantas regeneradas en cinco cultivares de *F. x ananassa* (Bounty, Jonsok, Korona, Polka y Zephyr) con 9 µM de TDZ y 2.5 µM de AIB.

Igualmente, Yonghua *et al.* (2005a) encontraron que en *F. x ananassa* cultivar Toyonoka, el medio MS con TDZ (1.5 mg L⁻¹) y AIB (0.4 mg L⁻¹) indujo el mayor porcentaje de explantes con brotes (76.67%) y número de brotes por explante (5.8); asimismo, la capacidad de regeneración de los explantes se redujo conforme aumentó la concentración de 2-4-D (0.2-1 mg L⁻¹).

Por otro lado, la adición de AgNO_3 (1.0 mg L^{-1}) incrementó el porcentaje de regeneración de brotes (87.38%) y el número de brotes por explante (11.67), cuando la concentración de este compuesto no sobrepasaba los 2.0 mg L^{-1} (Yonghua *et al.*, 2005b).

Por otro lado, Ashrafuzzaman *et al.* (2013) encontraron que el uso de BAP en una concentración de 0.5 mg L^{-1} , favoreció en *F. x ananassa* el número y altura del brote; y una mayor producción de hojas en los brotes; mientras que el uso de AIB a una concentración de 0.5 mg L^{-1} , indujo eficientemente la formación de raíces.

Capelleti (2016) encontró respuestas diferentes en dos variedades de fresa *Fragaria x ananassa* por efecto de distintas combinaciones de reguladores de crecimiento. En la variedad Calypso se obtuvieron los porcentajes más altos de explantes con brotes, con callos y número de brotes con TDZ (0.5 mg L^{-1}), y 2-4-D (0.02 mg L^{-1}); mientras que en la variedad Sveva la mayor producción de brotes se obtuvo con 3 mg L^{-1} de BAP) y 0.2 mg L^{-1} de AIB. De acuerdo con Biswas *et al.* (2009) las plantas de *F. x ananassa* regeneradas *in vitro* produjeron más flores y frutos que aquellas obtenidas por el método convencional.

Aunque se ha generado información sobre la propagación *in vitro* de la fresa comercial, se sabe poco sobre la propagación de las fresas silvestres como *F. mexicana*. Estudios ecológicos y biotecnológicos en especies silvestres, como *F. mexicana* son necesarios para aumentar el conocimiento sobre las características ecológicas y fisiológicas, que permitan proponer programas de conservación, preservación, mejoramiento genético y desarrollo biotecnológico.

El uso de la propagación *in vitro* en plantas silvestres permite reducir la variabilidad genética, ya que se obtienen clones con la misma constitución genética que la madre (George, 2008). Al disminuir esta variabilidad se consigue material vegetal similar con características deseables según el objetivo científico o agronómico, y a su vez se reduce la respuesta de la planta dada por el genotipo, garantizando que los resultados obtenidos

en los diferentes estudios no provengan de la variación genética, sino de la respuesta de la planta a los factores evaluados. Por tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de plantas de fresa silvestre (*F. mexicana*).

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1. Material Vegetal

Se emplearon plantas de *Fragaria mexicana* colectadas durante la primavera de 2015 en el Monte Tláloc perteneciente a la Sierra Nevada del municipio de Texcoco, Estado de México. Dichas plantas se colocaron en macetas con suelo del Monte Tláloc, con un pH de 5.89, 0.77 dSm⁻¹, 16.5% de materia orgánica, 3 ppm de fósforo extractable, 31 ppm de N-NO₃ y 31 ppm de N-NH₄. Las plantas se crecieron en uno de los invernaderos del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados durante cinco meses.

4.4.2. Medios de cultivo

La preparación de medios de cultivo se llevó a cabo utilizando las sales basales de Murashige y Skoog (MS, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2.3 de phytigel. Los medios fueron suplementados con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento para tener tres medios diferentes: M1): bencilaminopurina (BAP) 0.5 mg L⁻¹ y ácido indolbutírico (AIB) 0.1 mg L⁻¹; M2): BAP 0.1 mg L⁻¹, AIB 0.1 mg L⁻¹ y ácido giberélico (AG₃) 0.1 mg L⁻¹; M3): BAP 1 mg L⁻¹ y ácido indolacético (AIA) 0.2 mg L⁻¹.

4.4.3. Desinfestación del material vegetal

Secciones de tallo de tres cm de longitud que incluían yemas axilares y apicales se enjuagaron en agua con detergente, luego se les agregó alcohol al 70% por un min, seguido de una solución de cloro al 20% (v/v) y 0.4 mL L⁻¹ jabón líquido durante 15 min. En una campana de flujo laminar, se desechó el cloro y se agregó agua estéril con 45 mL L⁻¹ de nanopartículas de plata (Agrovit®) durante una hora.

4.4.4. Siembra de los explantes

Los tallos una vez desinfectados se cortaron en segmentos de un cm de largo (explantes); los cuales consistían de yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes abiertas, y explantes derivados de yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes cerradas. Se colocó un explante por frasco que contenía alguno de los tres medios de cultivo descritos anteriormente. Los cultivos se colocaron en una cámara de ambiente controlado a 26 ± 2 °C con 16 h de luz y una intensidad lumínica de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.4.5. Variables evaluadas

Dos meses después de haber establecido los cultivos, se evaluó el porcentaje de supervivencia; el tamaño de la planta, el número de hojas y el porcentaje de plantas con raíz en cada uno de los tratamientos.

4.4.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un experimento factorial 2×3 que incluyó dos tipos de explantes y tres medios de cultivo, para un total de seis tratamientos con 30 réplicas cada uno (frascos con un explante), distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza factorial y comparación de medias con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System).

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza factorial indica que la interacción entre el tipo de explante y los medios de cultivo no causó diferencias significativas para ninguna de las variables de crecimiento determinadas. En contraste, cuando se analizó cada factor por separado se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de supervivencia, porcentaje de brotes con raíz, número de hojas y tamaño de las plantas (Cuadro 4.1).

Esto sugiere que la propagación *in vitro* de *F. mexicana*, es afectada en mayor medida por el tipo de explante y no por el medio de cultivo. Resultados similares fueron reportados por Ling y Wetten (2017), en *F. vesca f. vesca* y *F. vesca f. semperfloren*, quienes encontraron una gran dependencia en la propagación de estas dos variedades al tipo de explante.

Cuadro 4.1. Análisis de varianza para los efectos del medio, tipo de explante y su interacción sobre la propagación *in vitro* de *F. mexicana*.

FACTOR	VARIABLE			
	SUPERVIVENCIA (%)	TAMAÑO	NÚMERO DE HOJAS	BROTOS CON RAÍZ (%)
Medio	0.0113*	0.2830	0.4742	0.0889
Tipo de explante	<0.0001*	0.0413*	0.0335*	0.0416*
Medio x tipo de explante	0.1270	0.3737	0.4874	0.9757

* indica diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

4.5.1. Supervivencia

Independientemente del tipo de explante, el medio de cultivo 2 (sales MS con BAP: 0.1 mg L⁻¹, AIB: 0.1 mg L⁻¹ y GA₃: 0.1 mg L⁻¹) promovió el mayor porcentaje de supervivencia (52%) de los explantes; mientras que en el medio de cultivo 3 se observó el menor porcentaje de supervivencia (38%), mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figura 4.1a).

Estos resultados difieren de lo encontrado por Rama *et al.* (2012) al reportar menores porcentajes de supervivencia (10% a 40%) en explantes de *F. x ananassa* var. Chandler cultivados en presencia de BAP (1 a 1.5 mg L⁻¹) y GA₃ (0.1 a 0.5 mg L⁻¹) en diferentes

mezclas. Sin embargo, Quiroz *et al.* (2017) reportó que la presencia de BAP (0.5 mg L⁻¹) en el medio de cultivo, reduce la muerte de los explantes en *Fragaria chiloensis*.

Algunos autores han encontrado que concentraciones altas de citocininas {mayores a 1.25 mg L⁻¹ (BAP); 0.9 mg L⁻¹ (BA) y 0.48 mg L⁻¹ (TDZ)}, disminuyen el número de brotes por explante en *F. x ananassa* cv. Chandler (Jatoi y Hussain, 1999), *Fragaria indica* (Bhatt y Dhar, 2006), *F. x ananassa* (Sakila *et al.*, 2007), GxN15 (hibrido entre almendra y melocotón) (Arab *et al.*, 2014) y *Fragaria viridis* Duch. (Ghasemi *et al.*, 2015); mientras que concentraciones de 2 mg L⁻¹ inhiben la producción de brotes en *F. x ananassa* (Ashrafuzzaman *et al.*, 2013).

Para el tipo de explante se encontró que las plántulas derivadas de yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes abiertas (HA) presentaron un porcentaje de supervivencia significativamente mayor (66%) que los explantes con yemas apicales con hojas jóvenes cerradas (HC) (Figura 4.1b).

Diferentes estudios indican que el tipo y edad del explante utilizado puede afectar los resultados obtenidos en el proceso de propagación *in vitro* en *Solanum trilobatum* L. y *F. x ananassa* cv. Sweet Charlie (Chakravarthi *et al.*, 2009; Abboud, 2014). Sin embargo, otros autores reportan no haber encontrado efecto del tipo de explante en *F. vesca* (Yildirim y Turker, 2014). Chakravarthi *et al.* (2009) sugiere que el tipo de explante, podría ser el primer paso para la estandarización de los protocolos de propagación *in vitro* y para garantizar el éxito de la regeneración (George, 2008).

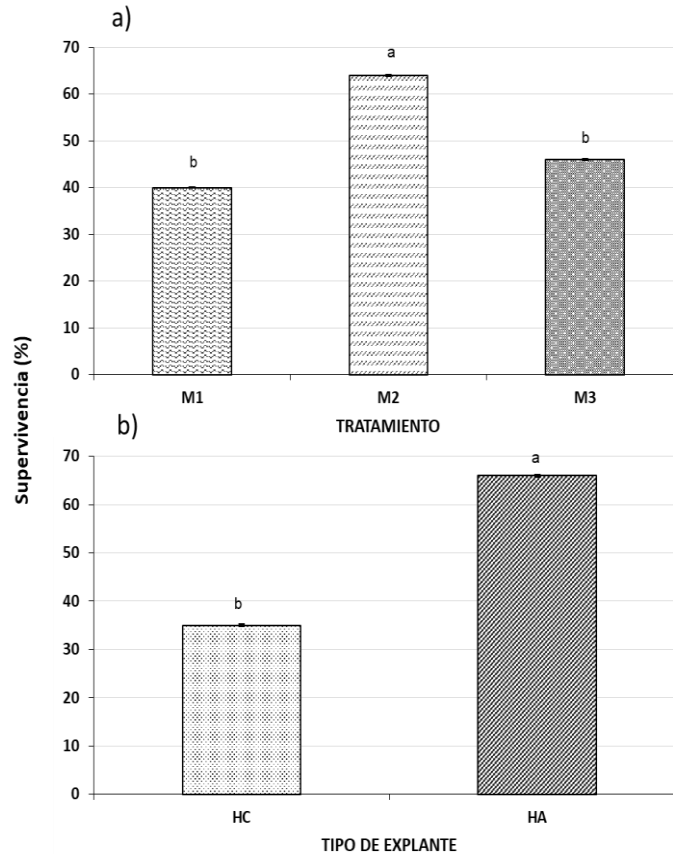


Figura 4.1. Porcentaje de supervivencia de explantes de *F. mexicana* cultivados *in vitro* para tres medios de cultivo (a); y dos tipos de explantes (b). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). Media \pm el error estándar (n=89). M1: bencilaminopurina (BAP) 0.5 mg L⁻¹ y ácido indolbutírico (AIB) 0.1 mg L⁻¹; M2: BAP 0.1 mg L⁻¹, AIB 0.1 mg L⁻¹ y ácido giberélico (AG3) 0.1 mg L⁻¹; M3: BAP 1 mg L⁻¹ y ácido indolacético (AIA) 0.2 mg L⁻¹. HC: yemas apicales con hojas jóvenes cerradas y HA: yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes abiertas.

4.5.2. Tamaño del brote, número de hojas y presencia de raíz

La composición del medio de cultivo no causó diferencias significativas en el tamaño de los brotes, el número de hojas, ni en el porcentaje de brotes con raíz (Cuadro 4.1; Figuras 4.3a, 4.2a y 4.2c). Para los medios M1 y M3, la concentración de auxinas utilizada corresponde a niveles bajos (0.1 a 0.2 mg L⁻¹), combinado con altas concentraciones de citoquininas (0.5 a 1 mg L⁻¹), estableciendo una combinación equilibrada de los reguladores de crecimiento. De la misma forma, la composición del medio M2, estuvo

dada por una baja concentración de los tres reguladores de crecimiento. En general, los tres medios no permitieron un desarrollo estadísticamente significativo de ninguna de las variables dado el equilibrio que se mantuvo entre las concentraciones de los reguladores de crecimiento, evitando efectos antagónicos entre auxinas y citoquininas, promoviendo la morfogénesis y manteniendo la dominancia apical de los explantes. Asimismo, la tasa auxina: citoquinina fue la adecuada, de tal forma que se mantuvo el desarrollo de la planta, los procesos de división celular y la regulación de la organogénesis dentro de la planta (Machakova *et al.*, 2008; van Staden *et al.*, 2008; Moshkov *et al.*, 2008).

Por otro lado, Ling y Wetten (2017), no encontraron un efecto de la combinación entre auxinas (AIB: 0.1, 0.2 y 0.4 mg L⁻¹) y citoquininas (BAP: 1, 2, 3 y 4 mg L⁻¹) en el medio de cultivo, sobre la regeneración de plántulas de *F. vesca f. vesca* y *F. vesca f. semperfloren*, observando solo un efecto individual de los reguladores de crecimiento.

Ashrafuzzaman *et al.* (2013), encontraron que al utilizar 0.5 mg L⁻¹ de BAP los brotes de *F. x ananassa* alcanzaron la mayor longitud (3.34 cm) y el mayor número de hojas (5). Datos similares se obtuvieron en la presente investigación con concentraciones de 0.1 mg L⁻¹ de BAP y AIB, con un tamaño de brote de 4.52 cm y un promedio de hojas de 4.81. Por otro lado, al aumentar la concentración de BAP a 1 mg L⁻¹, el tamaño de brote y número de hojas disminuyó, resultados que coinciden con los observados en *F. x ananassa* (Sakila *et al.*, 2007), GxN15 (híbrido entre almendra y melocotón) (Arab *et al.*, 2014), *Malus domestica* (Dobránszki y Teixeira da Silva, 2010) y *Fragaria indica* (Bhatt y Dhar, 2006).

La formación de raíces en los brotes fue afectada significativamente por el tipo de explante. Se observó que 87% de los brotes derivados de yemas apicales con hojas jóvenes abiertas (HA) presentaban raíz; mientras que sólo el 69% de los brotes obtenidos de explantes de yemas apicales con hojas jóvenes cerradas (HC) enraizaron (Figura 4.2d).

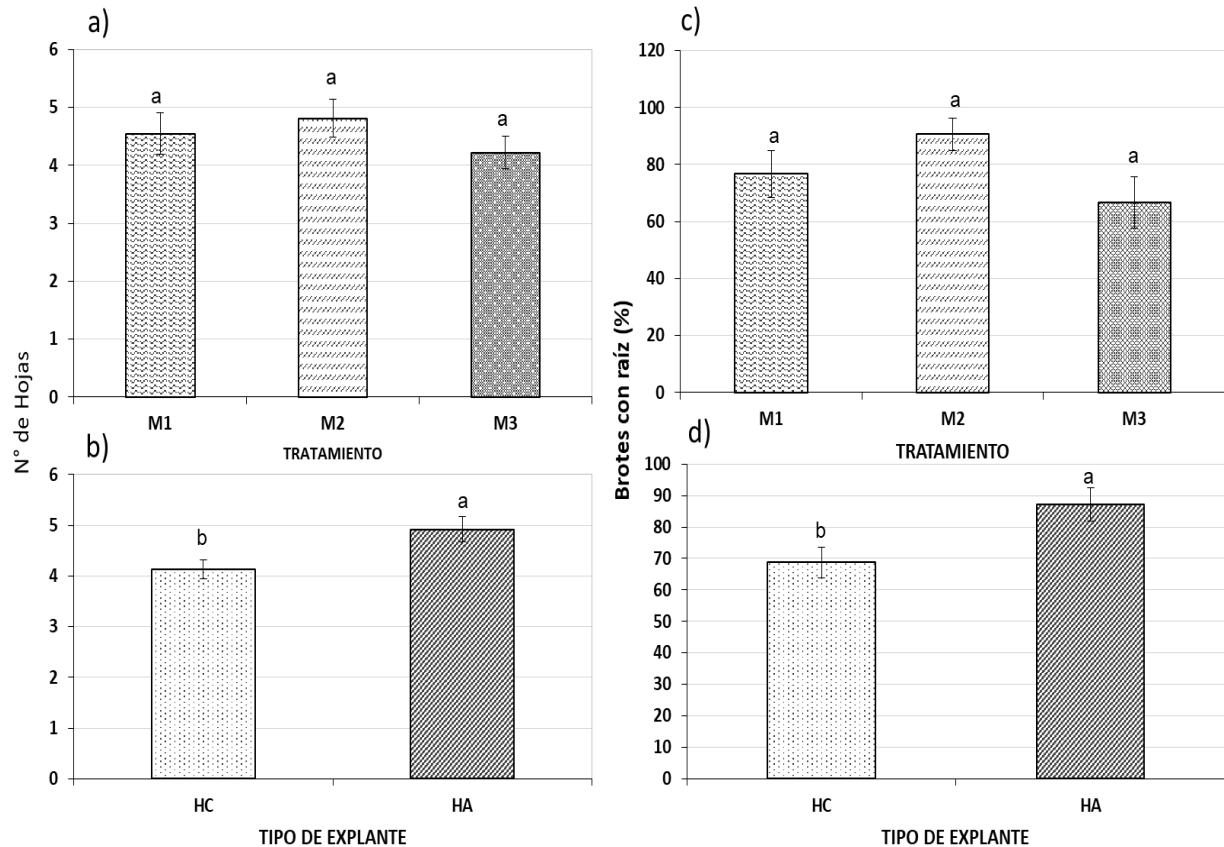


Figura 4.2. Número de hojas y porcentaje de brotes con raíz de *F. mexicana* cultivados *in vitro*. a) número de hojas por efecto del medio; b) número de hojas por efecto del tipo de explante; c) porcentaje de enraizamiento por efecto del medio; d) porcentaje de enraizamiento por efecto del tipo de explante. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). Media \pm el error estándar ($n = 29$). M1: bencilaminopurina (BAP) 0.5 mg L⁻¹ y ácido indolbutírico (AIB) 0.1 mg L⁻¹; M2: BAP 0.1 mg L⁻¹, AIB 0.1 mg L⁻¹ y ácido giberélico (AG3) 0.1 mg L⁻¹; M3: BAP 1 mg L⁻¹ y ácido indolacético (AIA) 0.2 mg L⁻¹. HC: yemas apicales con hojas jóvenes cerradas y HA: yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes abiertas.

El tipo de explante causó diferencias significativas en el tamaño del brote y el número de hojas (Figuras 4.3a y 4.2b). Los brotes derivados de explantes que consistían de yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes abiertas (HA) presentaron un tamaño significativamente mayor que el de los obtenidos a partir de explantes HC (Figura 4.3b).

Asimismo, el número de hojas aumentó de manera significativa en los brotes provenientes de explantes HA (Figura 4.3b).

Los dos tipos de explantes usados en esta investigación, provienen de entrenudos de estolones con órganos determinados y crecimiento organizado. En este tipo de explante se espera que las células sigan desarrollándose y creciendo hasta la madurez, debido a que mantienen la información de diferenciación, por lo que pueden preservar la estructura en el medio de cultivo (George, 2008).

La diferencia encontrada entre los dos tipos de explantes para las variables medidas, radica en el hecho que el explante con hoja cerrada requerirá un mayor gasto de energía para la formación completa de la hoja a partir del primordio presente, enfocado hacia la división y elongación celular, así como a la formación de órganos y tejidos (Burgess, 1985). Mientras que el explante con hoja abierta, al presentar un órgano fotosintéticamente activo, puede llegar a producir los fotosintatos que contribuyan al mejor desarrollo, mantenimiento y crecimiento de las nuevas hojas dentro del brote (Yue *et al.*, 1992).

Asimismo, la posición del explante dentro del estolón podría estar, generando la respuesta encontrada en este estudio, probablemente su ubicación pueda estar relacionada con una mayor tasa citoquinina:auxina, que se traduciría en características fenotípicas y mayor color verde en la hoja como lo encontrado por Jemmali *et al.*, 2002, al utilizar dos tipos de explantes en *F. x ananassa* cv. Elsanta ubicados en diferentes partes de la planta.

En los explantes con hoja abierta es posible que la concentración de BAP del medio haya modificado la concentración de auxinas y citoquininas, de tal forma que se haya logrado un mejor comportamiento para todas las variables en este. Algunos estudios han encontrado que el tipo de explante, puede tener una respuesta diferencial a la exposición de BAP en el medio de cultivo, variando el contenido endógeno de reguladores de

crecimiento y mostrando una mejor respuesta morfogénica (Charrière *et al.*, 1999; Ling y Wetten, 2017).

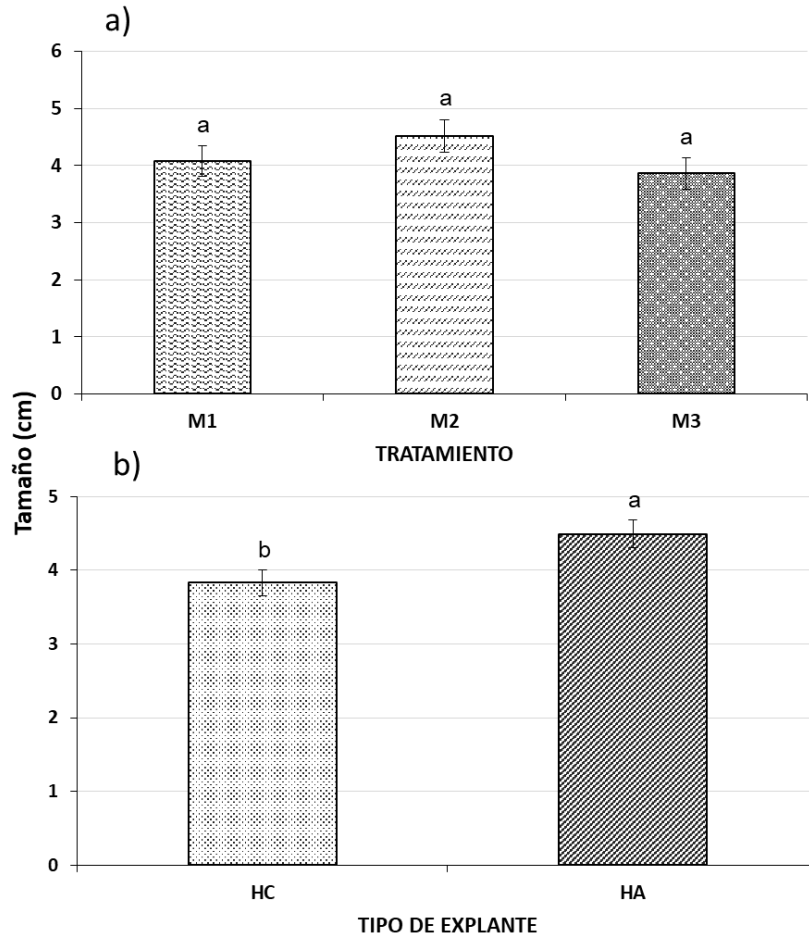


Figura 4.3. Tamaño de las plántulas de *Fragaria mexicana* propagadas *in vitro* a) Efecto del medio de cultivo; b) efecto del tipo de explante. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). Media \pm el error estándar (n = 29). M1: bencilaminopurina (BAP) 0.5 mg L⁻¹ y ácido indolbutírico (AIB) 0.1 mg L⁻¹; M2: BAP 0.1 mg L⁻¹, AIB 0.1 mg L⁻¹ y ácido giberélico (AG₃) 0.1 mg L⁻¹; M3: BAP 1 mg L⁻¹ y ácido indolacético (AIA) 0.2 mg L⁻¹. HC: yemas apicales con hojas jóvenes cerradas y HA: yemas apicales o entrenudos con hojas jóvenes abiertas.

4.6. CONCLUSIONES

- El tipo de explante es un factor clave propagación *in vitro* de *Fragaria mexicana* Schltld.
- Los explantes derivados de yemas apicales y entrenudos con hojas jóvenes abiertas (HA), presentaron el mejor comportamiento en cuanto a supervivencia, tamaño de brote, número de hojas y desarrollo de raíces
- La composición del medio de cultivo sólo afectó significativamente la supervivencia de los explantes. El medio de cultivo 2 (M2), promovió el mayor porcentaje de supervivencia de los explantes.

4.7. LITERATURA CITADA

- Abboud, Y. E. 2014. *In vitro*, propagation of strawberry (*Fragaria x annanasa* Duch.) through organogenesis via runner tips. *Annals of Plant Sciences* 3 (03), 619 – 627.
- Arab, M.M., A. Yadollahi, A. Shojaeiyan, S. Shokri y S. M. Ghojah. 2014. Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G X N15 (hybrid of almond · peach) vegetative rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 12, 81 – 87.
- Ashrafuzzaman, M., S. M. Faisal, D. Yadav, D. Khanam y F. Raihan. 2013. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 38(3), 467-472.
- Bhatt I. D. y U. Dhar. 2006. Micropropagation of Indian wild strawberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60, 83–88.
- Biswas, M.K., M. Dutt, U.K. Roy, R. Islam y M. Hossain. 2009. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Scientia Horticulturae* 122, 409–416.
- Boxus, G. 1987. Introductory lecture. *In vitro* culture of strawberry plants. In: Boxus, G. y P. Laver (Eds.). 1987. Commission of the European Communities. *Biological Sciences*. Bélgica. p. 100.

- Chakravarthi, V.N., Tejeswara D. R., Yechuri V. R. y K. Prabavathi. 2009. Effect of explant age, hormones on somatic embryogenesis and production of multiple shoot from cotyledonary leaf explants of *Solanum trilobatum* L. African Journal of Biotechnology 8 (4), 630-634.
- Charrière, F., B. Sotta, É. Miginiac, y G. Hahne. 1999. Induction of adventitious shoots or somatic embryos on in vitro cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. Plant Physiology and Biochemistry 37: 751 – 757.
- Coordinación General de Producción y Productividad de la Comisión Nacional Forestal, CONAFOR. 2013. Bosques, cambio climático y REDD+ en México. Guía básica. Área de Proyectos y Mercados Forestales de Carbono, Coordinación General de Producción y Productividad de la Comisión Nacional Forestal, CONAFOR. Jalisco, México. 88 p.
- Dobránszki, J. y J. A. Teixeira da Silva. 2010. Micropropagation of apple — A review. Research review paper. Biotechnology Advances 28, 462–488.
- George, E.F. 2008. Chapter 1: Plant tissue culture procedure – Background. En: George, E.F., M.A. Hall y G.J. de Klerk (Eds). 2008. Plant propagation by tissue culture. The Background. 3rd Edición. Volumen 1. Springer. Netherlands. 501 p.
- Hanhineva, K., H. Kokko y S. Renlampi. 2005. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria X Ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 41. pp. 826–831.
- Jatoi, S. A. y I. Hussain. Shoot proliferation studies in strawberry. Pakistan Journal of Biological Sciences 2(3), 838 – 839.
- Jemmali, A., N. Elloumi, C. Kevers y J. Dommes. 2002. Morphological and hormonal characterisation of strawberry vitroplants raised through axillary or stipular adventitious shooting. Plant Growth Regulation 38: 273–278.
- Kaushal, K., A.K. Nath, P. Kaundal y D.R. Sharma. 2004. Studies on somaclonal variation in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) cultivars. Acta Horticulturae (International Society for Horticultural Science (ISHS)) 662, 269-275.

- Ling, A.C.K. y A. Wetten, 2017. In vitro regeneration of *Fragaria vesca* L. Journal of Tropical Agriculture and Food Science 45(1): 77 – 88.
- Machakova, I., E. Zazimalova y E.F. George. 2008. Chapter 5: Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. . En: George, E.F., M.A. Hall y G.J. de Klerk (Eds). 2008. Plant propagation by tissue culture. The Background.3rd Edición. Volumen 1. Springer. Netherlands. 501 p.
- Mathews, H. 1987 Morphogenetic responses from in vitro cultured seedling explants of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 11, 233-240.
- Maxted, N., B. V. Ford-Lloyd y S. Jury. 2006. Towards a definition of a crop wild relative. Biodiversity and Conservation 15, 2673–2685.
- Missouri Botanical Garden, 2016. *Fragaria mexicana* Schldl. Specimens. En: <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=50004241&tab=specimens>. Visitada febrero de 2016.
- Moshkov, I.E., G.V. Novikova, M.A. Hall y E.F. George. 2008. Chapter 7: Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds. En: George, E.F., M.A. Hall y G.J. de Klerk (Eds). 2008. Plant propagation by tissue culture. The Background.3rd Edición. Volumen 1. Springer. Netherlands. 501 p.
- Murashige y Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473–497.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. 2010. Global Forest Resources Assessment 2010. Main Report. FAO Forestry Paper 163. Roma, Italia. p. 378.
- Pawar K.V. y R.V. Rothkar, 2015. Forest conservation & Environmental awareness. Procedia Earth and Planetary Science 11, 212 -215.
- Plíhalova, L., H. Vylícilová, K. Dolez, L. Zahajska, M. Zatloukal y M. Strnad. 2016. Review: Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. New Biotechnology. 33 (5), 614 -624.
- Quiroz, K. A., M. Berríos, B. Carrasco, J.B. Retamales, P. D. S. Caligari y R. García-González. 2017. Meristem culture and subsequent micropropagation

- of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). SHORT REPORT. Biological Research 50:20.
- Reeve, J. R., J. L. Smith, L. Carpenter-Boggs, J. P. Reganold. 2008. Soil-based cycling and differential uptake of amino acids by three species of strawberry (*Fragaria spp.*) plants. Soil Biology & Biochemistry 40, 2547–2552
- Rzedowski, J. y G. Calderón, 2005. Rosaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 135.
- Sakila, S., M.B. Ahmed, U.K. Roy, M.K. Biswas, R. Karim, M.A. Razvy, M. Hossain, R. Islam y A. Hoque. 2007. Micropropagation of Strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) A newly introduced crop in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research 2 (2), 151-154.
- Southwest Environmental Information Network, SEINet – Arizona Chapter, 2016. *Fragaria mexicana* Schldl. En: <http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php>. Visitada febrero de 2016.
- Taji, A., P. Kummar y P. Lakshumanan. 2002. *In vitro* Plant Breeding. Food Products Press. The Haworth Press, Inc. New York. Estados Unidos de América. p. 167.
- Toledo, V.M. y M.J.H. Ordoñez, 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. Capítulo 26. En: Ramamoorthy, T.P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (Eds.). Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, México. p. 757.
- Torres, J. M. 2004. Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina, Documento de trabajo. Informe Nacional México. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales de México, SEMARNAT. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Roma, Italia. p. 104.
- van Staden J., E. Zazilova y E.F. George. 2008. Chapter 6: Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. En: George, E.F., M.A. Hall y G.J. de Klerk (Eds). 2008. Plant propagation by tissue culture. The Background. 3rd Edición. Volumen 1. Springer. Netherlands. 501 p.
- Villaseñor, J.L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. Sociedad Botánica de México. 75, 105-135.

- Villaseñor, J.L. y E. Ortiz. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Supl. 85, S134-S142.
- Vincent, H., J. Wiersema, S. Kell, H. Fielder, S. Dobbie, N. P. Castañeda-Álvarez y L. Guarino. 2013. A prioritized crop wild relative inventory to help underpin global food security. *Biological Conservation* 167, 265–275.
- Yildirim, A.B. y A. U. Turker. 2014. Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and in vitro-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC–ESI-MS/MS). *Scientia Horticulturae* 169, 169 –178.
- Yokoya, K., S. Postel, R. Fang y V. Sarasan. 2017. Endophytic fungal diversity of *Fragaria vesca*, a crop wild relative of strawberry, along environmental gradients within a small geographical area. *PeerJ* 5, 1-21.
- Yonghua Q., Z. Shanglong, S. Asghar, Z. Lingxiao, Q. Qiaoping, C. Kunsong y C. Xu. a. 2005. Regeneration mechanism of Toyonoka strawberry under different color plastic films. *Plant Science* 168, 1425-1431.
- Yonghua, Q., Z. Shanglong, Z. Lingxiao, D. Zu, y A. Syed. b. 2005. Response of in vitro strawberry to silver nitrate (AgNO_3). *Hort Science* 40 (3), 745- 751.
- Yue, D., Y. Desjardins, M. Lamarre y A. Gosselin. 1992. Photosynthesis and transpiration of in vitro cultured asparagus plantlets. *Scientia Horticulturae* 49, 9-16.

CAPÍTULO 5

Adaptaciones ante el calentamiento global de fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schltdl.) del estrato herbáceo en bosque de oyamel (*Abies religiosa*) de la Sierra Nevada, México.

5.1. RESUMEN

El incremento de la temperatura del planeta vinculado a un efecto de cambio climático global, puede generar variabilidad en la respuesta tanto de las plantas como de las comunidades microbianas asociadas a ellas, así como en los procesos ecosistémicos del suelo. El objetivo de esta investigación fue determinar la respuesta de *F. mexicana* y sus comunidades microbianas a un incremento de temperatura de 5.1°C. Las plantas sometidas a alta temperatura presentaron mayor acumulación de biomasa seca de la parte aérea (14.89 g), área foliar (653.17 cm²) y tasa de asimilación neta (2.80 μmol m⁻² s⁻¹). Sin embargo, el aumento de la temperatura tuvo un efecto negativo en la biomasa seca de la raíz, el contenido de clorofila, en el número de flores y frutos; y en el peso seco de los frutos. Por otro lado, las plantas con baja temperatura presentaron un inicio más temprano de la floración y la fructificación en comparación con las plantas sometidas a alta temperatura. Al incrementar la temperatura, se observó una disminución en la diversidad y equidad de las comunidades microbianas. El porcentaje de micorrización de las plantas de fresa silvestre se vió afectada negativamente con el aumento de temperatura, observándose una disminución del 18.54%. No se encontraron diferencias significativas en el número de esporas de HMA para los dos sitios. El número de UFC de las BFN de vida libre recuperadas, fue menor en el sitio de alta temperatura.

Palabras claves: temperatura, diversidad microbiana, biomasa aérea, biomasa radical, respiración del suelo, micorrizas, bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

CHAPTER 5

Adaptations to global warming of wild strawberry (*Fragaria mexicana* Schltld.) in a herbaceous stratum of oyamel forest (*Abies religiosa*) in the Sierra Nevada, México.

5.1. ABSTRACT

Increasing temperature of earth linked to the effect change global climate can generate responses variabilities of both the plants and the microbial communities associated with them, as well the ecosystem processes that occur in the soil. The objective of this research was to determine the response of *F. mexicana* and its microbial communities to a temperature increase of 5.1 ° C. The plants subjected to high temperature presented greater accumulation of dry biomass of the aerial part (14.89 g), leaf area (653.17 cm²) and net assimilation rate (2.80 μmol m⁻² s⁻¹). However, the increase in temperature had a negative effect on the dry biomass of the root, the chlorophyll content, on the number of flowers and fruits; And on the dry weight of the fruits. On the other hand, the plants with low temperature showed an earlier onset of flowering and fruiting compared to plants subjected to high temperature. Increasing temperatura, there was a decrease in the diversity and evenness of microbial communities. Percentage of mycorrhization of wild strawberry plants was negatively affected by the increase in temperature, observing a decrease of 18.54%. No significant differences were found in the number of AMF spores for the two sites. The number of UFC recovered from free-living NFB was lower at the high temperature site.

Key words: temperature, microbial diversity, aerial biomass, radical biomass, soil respiration, mycorrhizae, free nitrogen fixing bacteria.

5.3. INTRODUCCIÓN

El cambio climático es un fenómeno natural que ha ocurrido a través de los años del planeta tierra (Florides *et al.*, 2013). Sin embargo, en la actualidad el clima del planeta se ha visto influenciado enérgicamente por la actividad antropogénica que ha aumentado la concentración de los gases con efecto de invernadero (GEI) como CO₂, CH₄, NO₂ en la atmósfera causando variaciones a nivel meteorológico y climático (Rajkumar *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2015; Liebig *et al.*, 2012; McCubbin *et al.*, 2015; Leng *et al.*, 2015).

El flujo de GEI a la atmósfera se debe principalmente al uso de combustibles fósiles (transporte e industria), el cambio en el uso del suelo, la deforestación, la ganadería, la fertilización nitrogenada, el tratamiento de aguas industriales, las actividades industriales (sector construcción, electricidad y energía) y la agricultura (IPCC, 2014; Huang *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2015; Liebig *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2015; Guenet *et al.*, 2012).

Una de los efectos más notables del aumento de los GEI en la atmósfera es el aumento de la temperatura en todo el planeta, tanto en la superficie terrestre como en el océano (IPCC, 2013; Leng *et al.*, 2015; Guenet *et al.*, 2012). Lo que afecta directamente el medio ambiente, la agricultura, las condiciones y calidad de vida de las poblaciones humanas, la biodiversidad y los ecosistemas terrestres y marinos (McCubbin *et al.*, 2015; Leng *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2013; IPCC, 2014; IPCC, 2013).

El aumento de temperatura podría tener cambios diferenciales en las plantas dependiendo de la región del planeta, la especie y el genotipo (Bär *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Lizana *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2011). Se ha encontrado que un incremento en la temperatura, aumenta el peso seco y aérea foliar en plantas de fresa (Sønsteby *et al.*, 2016); la fotosíntesis neta en uva (Greer y Weedon, 2012); el rendimiento del tubérculo en papa (Lizana *et al.*, 2017) y la producción de maíz (Li *et al.*, 2014).

Sin embargo, otros autores reportan una disminución en la producción fresa (Ledesma y Kawabata, 2016), arroz (Sheehy *et al.*, 2006), trigo (Asseng *et al.*, 2011), *Brachypodium distachyon* (Hartsan *et al.*, 2013), maíz (Li *et al.*, 2014; Sierra *et al.*, 2010) y frijol (Porch y Jahn, 2001), y menor acumulación de materia seca en olivo (Benlloch-González *et al.*, 2016). Así como una disminución en la producción de semillas y frutos, viabilidad del polen, contenido de clorofila y menor número de flores e inflorescencias (Young *et al.*, 2004; Prasad y Djanaguiraman, 2014; Hartsan *et al.*, 2013; Porch y Jahn, 2001; Sønsteby *et al.*, 2016; Sage *et al.*, 2015; Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Estas diferencias radican en el umbral máximo de temperatura y el tiempo de exposición a la que la planta es expuesta, después del cual los procesos fisiológicos y de crecimiento caen drásticamente; así como la ubicación geográfica de las especies (Struik, 2007; Li *et al.*, 2014; Greer, 2017).

Asimismo, algunos estudios han encontrado que al aumentar la temperatura del planeta aumentará la fotosíntesis de las plantas y la respiración del suelo (Wu *et al.*, 2011). Sin embargo, también existen reportes en plantas sensibles, en las que se ha observado una disminución en la fotosíntesis y su desaparición del ecosistema por los incrementos en la temperatura (Vanha-Majamaa *et al.*, 2017). Por otro lado, la relación existente entre la temperatura y los microorganismos, puede afectar la composición, estructura, biomasa y diversidad de las comunidades microbianas, así como la actividad enzimática; todo esto relacionado con los cambios experimentados en la planta y el medio ambiente (Castro *et al.*, 2010; Tripathi *et al.*, 2015; Jain y Pandey, 20016; Yao *et al.*, 2017).

El incremento en la temperatura del planeta puede tener efectos positivos, negativos, directo e indirectos sobre las comunidades microbianas (Sofi *et al.*, 2016; Compant *et al.*, 2010). Por ejemplo, en un estudio realizado por Egamberdiyeva y Höflich (2003) se observó que *Mycobacterium sp.* y *M. bullata* aisladas de clima semiárido se comportaban mejor en la rizósfera de trigo a 26°C que a 16°C. Mientras que estas mismas cepas aisladas de climas fríos, disminuían la colonización de la rizósfera de trigo al aumentar la temperatura. Por otro lado, se ha encontrado que al aumentar la temperatura en suelos

contaminados se reduce la actividad deshidrogenasa, la biomasa y la diversidad microbiana (Henriques *et al.*, 2015; Tripathi *et al.*, 2015).

En el caso de los hongos micorrízicos, se ha encontrado que el porcentaje de colonización micorrízica en la raíz de *Capsicum annuum* (Martin y Stutz, 2004), *Acacia farnesiana* (Udaiyan *et al.*, 1996) y *Pascopyrum smithii* (Monz *et al.*, 1994), así como la longitud del micelio extraradical (Gavito *et al.*, 2005) disminuyen al aumentar la temperatura.

Por otro lado, se ha reportado que el aumento de temperatura puede beneficiar el porcentaje de colonización micorrízica en *Antennaria dioica* (Vega-Frutis *et al.*, 2014), *Potentilla crantzii* y *Ranunculus acris* (Kitöviita y Ruotsalainen, 2007), *Trifolium subterraneum* (Gavito y Azcón-Aguilar, 2012), *Plantago lanceolata* (Heinemeyer y Fitter, 2004), así como en la proporción de longitud de raíces colonizadas (Gavito *et al.*, 2005); el crecimiento del micelio extraradical (Gavito *et al.*, 2005; Vega-Frutis *et al.*, 2014; Heinemeyer y Fitter, 2004) y el número de esporas por gramo de suelo (Vega-Frutis *et al.*, 2014). El objetivo de este estudio fue identificar los cambios en la fisiología de *Fragaria mexicana* y en las comunidades de microorganismos asociados a su rizósfera.

5.4. MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.1. Material Vegetal

Las plantas de fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schltldl.), fueron colectadas en el monte Tlálóc, Texcoco, Estado de México. El sitio de colecta geográficamente se encuentra entre las coordenadas 19° 30' 14" de latitud norte y a 98° 53' 7" de longitud oeste, a una altitud de 3,121 m, una temperatura promedio anual entre 10 a 14°C y una precipitación media entre 900 a 1,200 mm año⁻¹ (Ortiz-Solorio y Cuanalo de la Cerda, 1977). Se colectaron 56 plantas de fresa silvestre con 500 g de suelo, las cuales fueron trasladadas al invernadero de Microbiología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. Las plantas de *Fragaria mexicana* Schltldl. se colocaron en

bolsas plásticas de 2 kg con 50% de turba y 50% de arena de río previamente lavada, y se aclimataron en invernadero por un año. Una vez concluida la aclimatación, las plantas fueron separadas para establecer los tratamientos de temperatura e inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN).

5.4.2. Microorganismos rizosféricos

Las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) se obtuvieron de la endorizósfera de las plantas de fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schltl.). Se cortaron trozos de raíz de 1 cm de largo y se desinfectaron con cloro al 20% por 5 min. Se sembró una raíz por tubo de ensayo con medio Rennie semisólido, las cuales se incubaron a 28 °C por 10 días. De los tubos que presentaron crecimiento bacteriano en condiciones semi anaeróbicas se tomaron muestras con un asa bacteriológica y se sembraron en medio Rennie sólido en caja de Petri, aislando 11 cepas de las cuales 5 se utilizaron para probar su capacidad para promover el crecimiento vegetal de fresa silvestre (*Fragaria mexicana* Schltl.). Finalmente, las dos cepas (4 y 8) se seleccionaron por presentar un crecimiento rápido (24 h) en el medio de cultivo y por capacidad de promover crecimiento vegetal en *F. mexicana* (datos no mostrados).

5.4.3. Transformación genética del material microbiológico

Las cepas 4 y 8 fueron transformadas genéticamente mediante el método Sambrook *et al.* (1989), con modificaciones, para la obtención de células competentes.

Células competentes por el método Sambrook *et al.* (1989)

Para el método Sambrook *et al.* (1989) modificado se utilizó 1 mL de cultivo de células bacterianas crecidas en caldo nutritivo con y sin MgCl₂ (Método 1), y en medio NFB con y sin MgCl₂ (Método 2). A los medios de cultivo con MgCl₂ tanto para el caldo nutritivo y NFB, se les agregó 20 mmol L⁻¹ de MgCl₂. El Cuadro 5.1 presenta la concentración celular obtenida en los precultivos.

Cuadro 5.1. Concentración celular pre-cultivo bacteriano.

CEPA	MEDIO	CONCENTRACIÓN (células mL ⁻¹)
4	CN	2.4 X 10 ⁹
	CN con MgCl ₂	2.9 X 10 ⁹
	NFB	2.7 X 10 ⁸
	NFB con MgCl ₂	5.7 X 10 ⁸
8	CN	2.3 X 10 ⁹
	CN con MgCl ₂	2.6 X 10 ⁹
	NFB	3.5 X 10 ⁸
	NFB con MgCl ₂	4 X 10 ⁸

CN= caldo nutritivo. NFB= medio de cultivo para bacterias fijadoras de N atmosférico.

La biomasa bacteriana se colectó mediante centrifugación a 7,800 rpm durante 10 min, y se resuspendió con una solución de CaCl₂ 50 mmol L⁻¹, la cual había sido colocada en hielo. La suspensión bacteriana fue colocada en hielo por 30 min y centrifugada a 7,800 rpm durante 10 min.

Cuadro 5.2. Concentración celular células competentes.

CEPA	MEDIO	CONCENTRACIÓN (células mL ⁻¹)
4	CN	2.4 X 10 ⁹
	CN con MgCl ₂	4.5 X 10 ⁹
	NFB	1.5 X 10 ⁹
	NFB con MgCl ₂	3.9 X 10 ⁹
8	CN	4.3 X 10 ⁹
	CN con MgCl ₂	4.7 X 10 ⁹
	NFB	7.1 X 10 ⁸
	NFB con MgCl ₂	3.1 X 10 ⁹

CN= caldo nutritivo. NFB= medio de cultivo para bacterias fijadoras de N atmosférico.

Bajo cámara de flujo laminar se desechó el sobrenadante y se re-suspendieron nuevamente las células bacterianas en una solución de 50 mmol L⁻¹ de CaCl₂ con glicerol al 20%, previamente colocada sobre hielo. La concentración de las células competentes obtenidas se presenta en el Cuadro 5.2.

5.4.4. Transformación genética

Las cepas 4 y 8, se transformaron con el fin de poder rastrear las BFN inoculadas, dándoles la capacidad de fluorescencia y resistencia a antibióticos. Las cepas fueron transformadas genéticamente utilizando el método 1, con MgCl₂, debido a que en el método 2 se observó una concentración de células competentes menor. A 200 µL de células competentes se le agregaron 5 µl de plásmido. Los plásmidos utilizados fueron *pmp7604* y *p519gfp*, para las cepas 4 y 8, respectivamente. Los plásmidos fueron donados por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Sevilla, España. El plásmido *pmp7604*, contiene un gen de resistencia a tetraciclina (Tet), y la expresión de la proteína mCherry (proteína DsRed fluorescente).

El plásmido *p519gfp* presenta un gen de resistencia a kanamicina (Kan) y expresión del gen reportero *gfp* (proteína verde fluorescente). Las células competentes con los plásmidos se colocaron en hielo por 30 min y luego se sometieron a choque térmico, en plancha de calor a 42°C, por 30 s y se colocaron en hielo nuevamente por 5 min. Se agregó 1 mL de caldo nutritivo y se incubaron por 2 h a 28°C. Se sembraron 100 µL del anterior “inoculo” en medio de cultivo sólido con el antibiótico indicado para cada plásmido (tetraciclina para *pmp7604* y kanamicina para *p519gfp*).

La biomasa bacteriana sobrante se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min, desechando un poco de sobrenadante. Finalmente, esta se agitó manualmente y se sembraron 50 µL en medio de cultivo con antibiótico. Las colonias crecidas, supuestos transformantes, se resembraron en medio de cultivo con antibiótico tetraciclina (40 µl ml⁻¹) para la cepa 4 y kanamicina (50 µl ml⁻¹) para la cepa 8. Se comprobó la transformación con extracción del ADN plasmídico (ZyppyPlasmid Miniprep Kit, Zymo Research) y posterior electroforesis del ADN en gel de agarosa, así como la observación de las bacterias con ayuda de

microscopia de fluorescencia y el crecimiento de estas en medio de cultivo sólido con antibiótico, teniendo como control las cepas 4 y 8 sin transformar.

5.4.5. Preparación del inóculo

Las cepas 4 y 8 transformadas genéticamente fueron sembradas en 100 mL de caldo nutritivo con antibiótico, tetraciclina ($40 \mu\text{l ml}^{-1}$) para cepa 4 y kanamicina ($50 \mu\text{l ml}^{-1}$) para cepa 8, e incubadas por 24 h hasta obtener una concentración de 3.3×10^9 y 3.2×10^9 bacterias mL^{-1} , respectivamente. El inóculo se centrifugó a 7,000 rpm por 15 min. En cámara de flujo laminar se descartó el sobrenadante y se agregaron 25 mL de agua destilada estéril. Finalmente, se aplicaron 5 mL de esta suspensión acuosa a cada planta, con una concentración celular de 8.1×10^8 y 3.5×10^9 bacterias mL^{-1} , para las cepas 4 y 8, respectivamente.

5.4.6. Análisis de suelo

Un kilogramo de suelo del monte Tláloc se muestreo para su análisis químico en el laboratorio de Fertilidad de Suelos y de Nutrición Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El suelo presentó un pH de 5.89 (1:2 en agua), una conductividad eléctrica de 0.77 dSm^{-1} , 16.5% de materia orgánica (Walkley y Black, 1934), 3 ppm de fósforo (Bray y Kurtz, 1945), 31 ppm de N-NO_3 y 31 ppm de N-NH_4 por colorimetría (Baker, 1969). Al inicio (1ddi) y final (213ddi) del experimento, se realizó un análisis químico del sustrato en cada una de las unidades experimentales, para la variables: pH (1:2 en agua), conductividad eléctrica, materia orgánica (Walkley y Black, 1934), P (Bray y Kurtz, 1945), N-NO_3 y N-NH_4 determinados por destilación por arrastre de vapor (Baker, 1969).

5.4.7. Tratamientos

Las plantas de fresa silvestre se dividieron en dos grupos, uno fue conducido bajo invernadero y el otro se condujo a cielo abierto con el fin de dar dos condiciones diferentes de temperatura. En cada condición se establecieron cuatro tratamientos de inoculación: T, testigo sin inocular; CP8, plantas inoculadas con la cepa 8; CP4, plantas inoculadas con la cepa 4 y CP8+4, plantas inoculadas con las cepas 8 y 4. Cada

tratamiento consintió de 7 repeticiones, una maceta por repetición, dos plantas por maceta. El experimento se estableció en un diseño factorial completamente al azar.

5.4.8. Variables de crecimiento vegetal

Se llevó a cabo la cosecha de las plantas 213 días después de la inoculación (ddi). Se midió el peso seco de la planta (g): total, parte aérea y radical; altura de la planta (cm), longitud de raíz (cm); área foliar (cm²), número de flores y frutos; y peso seco de frutos (g).

5.4.9. Fotosíntesis y contenido y fluorescencia de clorofila

Tasa de fotosíntesis

Se realizaron tres evaluaciones de fotosíntesis con el equipo CIRAS-2 (Portable Photosynthesis System, PPSystems) con una lámpara para la medición del intercambio de gas en la hoja, PLC6 (U), Universal Leaf Cuvette, con un plato de 2.5 cm² y 18 mm de diámetro. Este cuenta con dos sensores para la medición de la radiación fotosintéticamente activa y un sensor de luz infraroja para medir la temperatura de la hoja. La cámara es un sistema abierto, donde se controla automáticamente la intensidad de luz (1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y la temperatura en la superficie de la hoja (aproximadamente 23°C). La concentración de CO₂ dentro de la cámara se mantuvo a 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para la medición se tomó el foliolo central de la hoja compuesta completamente abierta y la cámara permaneció cerrada durante 45 a 60 s. Las evaluaciones se realizaron a los 62, 113 y 130 ddi.

Además, se realizaron cuatro medidas de fotosíntesis con el equipo CIRAS-3 (Portable Photosynthesis System, PPSystems), al cual se le adaptó un sistema cerrado para medir el flujo de CO₂ hacia el dosel de la planta, CPY-4, Canopy Assimilation Chamber, la cámara tenía las siguientes dimensiones: 145 mm de altura, 146 mm de diámetro, un volumen de 2344 cm³ y un área de 167 cm². La cámara consiste de un material acrílico transparente con un anillo de acero inoxidable en la base con el fin de aislar totalmente

la planta del medio. La concentración máxima de CO₂ en la cámara se estableció a 50 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ y el tiempo máximo para tomar la medida fue de 90s. La cámara tiene un sistema de ventilación interno y sensores para medir la radiación fotosintéticamente activa y la temperatura del aire. En este caso, la medida de fotosíntesis se tomó teniendo en cuenta la planta completa. Para ello se aisló la planta completamente del suelo cubriendo ésta con polietileno de baja densidad. Las medidas se tomaron a los 132, 136, 140 y 144 ddi.

Contenido de Clorofila

El contenido de clorofila se midió a los 137, 145, 151, 157, 164, 171 y 180 ddi. Esta se determinó tomando el foliolo central de la hoja compuesta, el cual se encontraba completamente expandido. Se usó el equipo SPAD-502 (Marca Minolta).

Fluorescencia de la clorofila

A las 160, 171 y 180 ddi se midió la fluorescencia de la clorofila en el foliolo central de hojas completamente expandidas, mediante el uso de un fluorómetro (Modelo Chlorophyll Fluorometer OS30p, Marca Opti-sciences). Las variables medidas fueron: fluorescencia mínima (F_o), fluorescencia máxima (F_m), eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v /F_m) y fluorescencia variable (F_v).

5.4.10. Variables relacionadas con las comunidades rizosféricas de fresa silvestre

Respiración y temperatura del suelo

Se realizaron cuatro medidas de temperatura y respiración del suelo con el equipo CIRAS-3 (Portable Photosynthesis System, PPSystems), el cual es un sistema cerrado para medida la salida de CO₂ desde suelo. La cámara usada con medidas 21.5 cm de diámetro y 21 cm de altura, con un volumen de 7624.1 cm³ y un área de 363 cm². La concentración máxima de CO₂ en la cámara se estableció a 200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ y el tiempo

máximo para tomar la medida fue de 120s. Para ello se cubrieron las plantas con polietileno de baja densidad y plástico negro, para evitar la interferencia de las plantas en la medida de respiración. Las evaluaciones se realizaron a las 153, 160, 165 y 170 ddi.

Porcentaje de colonización micorrízica en plantas de fresa silvestre

Al inicio y final del experimento se evaluó la colonización micorrízica para cada tratamiento en los dos sitios. Para ello se colectaron raíces finas de las plantas de fresa silvestre y cortaron a aproximadamente 1 cm de largo. Luego, se realizó el procedimiento de clareo y tinción de raíces por el método de Brundrett *et al.* (1996). Los segmentos de raíz se colocaron en un vaso de precipitado con una solución de KOH al 10% por 24 h, de tal forma que se logró el clareo de las raíces. Luego, se retiró el exceso de KOH de las raíces con agua y se acidificaron con HCl al 10%. Después, se procedió a teñir las raíces con azul de tripano al 0.05%. Se colocaron 25 fragmentos de raíz en un portaobjetos y se humedecieron con lactoglicerol antes de colocar el cubreobjetos sobre ellas. Se realizó la observación en el microscopio con el objetivo 10X.

El porcentaje de colonización de raíces fue calculado teniendo en cuenta el número de raíces colonizadas por una estructura característica de hongos micorrízicos arbusculares, las cuales fueron vesículas, arbusculos o hifas cenocíticas, utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ de Colonización Micorrízica} = \left(\frac{\text{Segmentos colonizados}}{\text{Segmentos observados}} \right) * 100$$

Conteo de esporas de hongos micorrízicos arbusculares

La extracción y conteo de esporas se realizó mediante el método de tamizado húmedo con gradiente de sacarosa modificado de Gerderman y Nicholson (1963). Para ello se pesaron 10 g de suelo seco al cual se le agregó aproximadamente un litro de agua, se agitó vigorosamente por 10 s y se dejó reposar por 40 s, desechando el agua sobre una columna de tamices de 500 μm y 40 μm , procedimiento que se repitió cinco veces hasta

obtener el agua relativamente limpia. El suelo presente en el tamiz de 40 μm fue colectado en tubos de centrifuga con gradiente de sacarosa (20 y 60%) y centrifugados por 5 min a 3,000 rpm. El sobrenadante fue desechado y el pellet obtenido se pasó nuevamente por un tamiz de 40 μm , lavándose con abundante agua con el fin de retirar el exceso de sacarosa. El suelo retenido en el tamiz de 40 μm fue colectado en una caja de Petri. El material fue revisado con estereoscopio y las esporas fueron extraídas con ayuda de una micropipeta. Todas las esporas colectadas fueron colocadas sobre una lámina con alcohol polivinílico ácido-láctico-glicerol (PVLG) y reactivo de Melzer para su montaje y posterior observación en el microscopio. Para el conteo de esporas se tuvieron en cuenta solo aquellas esporas que se encontrarán en buen estado.

Perfil metabólico

Al inicio y final del experimento se realizaron los perfiles metabólicos de la rizósfera de *F. mexicana* para los cuatro tratamientos en las dos condiciones de temperatura, utilizando microplacas de Biolog TM EcoPlates (BIOLOG Inc., Hayward, CAC). Cada microplaca tiene 31 fuentes de carbono y un blanco de agua destilada esterilizada, con tres repeticiones para cada uno. Los sustratos de carbono utilizados fueron 9 ácidos carboxílicos (Ácido D-Galactónico γ -Lactona, Ácido D-Galacturónico, Ácido 2-Hidroxibenzoico, Ácido 4-Hidroxibenzoico, Ácido γ -Hidroxibutírico, Ácido D-Glucosaminico, Ácido Itaconico, Ácido α -Ketobutírico, Ácido D-Malico), 2 aminas/amidas (Fenil etil amina y Putrascina), 6 aminoácidos (L-Arginina, L-Asparagina, L-Fenilalanina, L-Serina, L-Treonina, Ácido Glicil-L-Glutámico), 7 carbohidratos (β -Metil-D-Glucosida, D-Xylosa, i-Eritritol, D-Manitol, N-Acetil-D-Glucosamina, D-Celobiosa, α -D-Lactosa), 3 misceláneos (Pyruvic Acid Methyl Ester, Glucose-1-Phosphate, D,L- α -Glicerol Fosfato) y 4 polímeros (Glicogeno, Tween 40, Tween 80, α -Ciclodextrina). Se tomaron 10 g de suelo de cada tratamiento y se adicionaron a una botella con 90 mL de agua destilada estéril. Con esto se construyó la dilución 10^{-1} . Después se realizó una serie de diluciones decimales desde 10^{-2} hasta 10^{-3} . Se colocó en cada pocillo de la placa biolog 150 μL de las diluciones 10^{-3} . Las placas biolog fueron incubadas a 28 $^{\circ}\text{C}$, por 24, 48 y 72 h y se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 590 nm, usando un lector de microplacas (Perkin-Elmer LifeSciences, Massachusetts, EEUU).

Diversidad metabólica

La absorbancia obtenida se utilizó como la densidad óptica (DO_i) a la cual se le restó la absorbancia obtenida del blanco (agua destilada esterilizada). El promedio del color desarrollado en el pozo (AWCD), se calculó teniendo en cuenta la sumatoria total de la DO_i dividido en 31 (número de sustratos usados):

$$AWCD = \frac{\sum DO_i}{31}$$

5.4.11. Variables ecológicas

La diversidad se calculó con el índice de Shannon-Weaver (H') teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$H' = -\sum p_i (\ln P_i)$$

Donde p_i es la densidad óptica, actividad obtenida en un sustrato particular y la suma de las actividades de todos los sustratos (Magurran, 1988). Además, se calculó el índice de equidad (E) y dominancia de Simpson (D) (Zak *et al.*, 1994; Choi and Dobbs, 1999):

$$E = \frac{H'}{H \text{ máx}}$$

Donde H' es el índice de diversidad de Shannon-Weaver y H máx es la diversidad máxima de la población, calculada como:

$$H \text{ máx} = \ln S$$

Donde S es la riqueza, determinada como el número de pozos con desarrollo de color (Staddon *et al.*, 1997). El índice de dominancia de Simpson (D) se calculó con la siguiente fórmula:

$$D = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

Población bacteriana inoculada recuperada

Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias en agar nutritivo con antibiótico. Se tomó 1 g de suelo y se adicionaron a un tubo de dilución de 9 mL con agua destilada estéril, de allí se realizó una serie de diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se sembraron 100 μ L de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} por triplicado en medio sólido con antibiótico

tetraciclina ($40 \mu\text{l ml}^{-1}$) para cepa 4 y kanamicina ($50 \mu\text{l ml}^{-1}$) para cepa 8, y se incubaron por 48 h a 28°C . Finalmente, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias recuperadas de las cepas 4 y 8.

5.4.12. Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), a los cuales se les realizó un análisis de varianza considerando un factorial 2×4 (ANOVA), y una prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$).

5.5. RESULTADOS

Durante el experimento el sitio con alta temperatura presentó una temperatura promedio de 19.6°C y el sitio con baja temperatura de 14.6°C . La máxima temperatura para los dos sitios se presentó en el mes de abril con un promedio de 22.3°C y 17.3°C para el sitio de alta y baja temperatura, respectivamente. En general se observó una diferencia de 5.1°C entre los dos sitios (Figura 5.1).

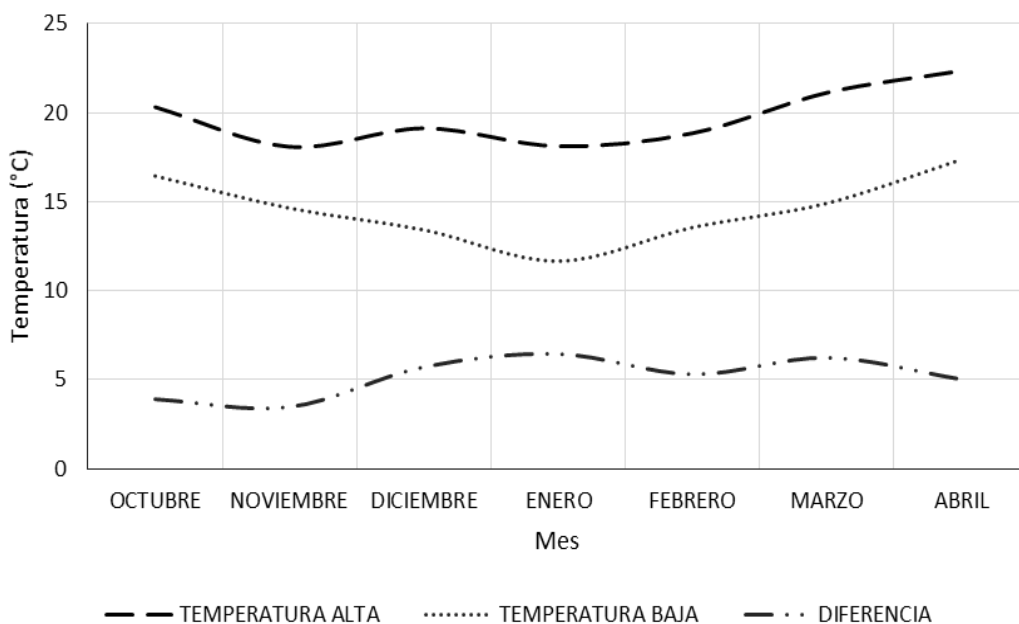


Figura 5.1. Temperatura promedio mensual en las dos condiciones en las que se condujo el experimento de fresa silvestre. Temperatura alta = bajo invernadero, Temperatura baja = en cielo abierto, Diferencia = diferencia de temperatura entre las dos condiciones.

La intensidad lumínica del sitio con alta temperatura en promedio fue de $341.3 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ y la del sitio con baja temperatura de $630.4 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$. En los dos sitios la mayor intensidad lumínica se obtuvo a la 1:30 p.m. (Figura 5.2a). Los valores de intensidad lumínica por muestreo mantienen la misma tendencia que la tomada en el perfil del sitio, siendo mayor para todos los casos en el sitio con baja temperatura (Figura 5.2b).

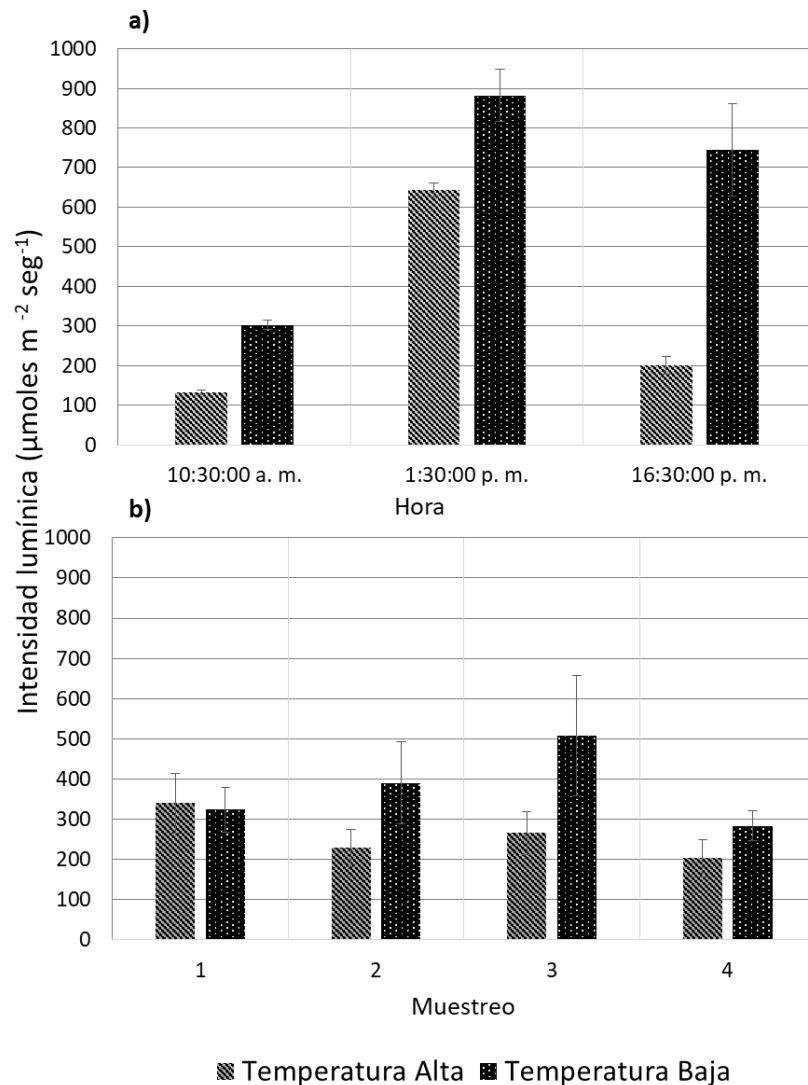


Figura 5.2. Intensidad lumínica durante el día (a) (Media \pm error estándar (n=27)) y en diferentes fechas (b) (Media \pm error estándar (n=28)), en el experimento de fresa silvestre conducido en dos condiciones ambientales. Temperatura alta = bajo invernadero, Temperatura baja = en cielo abierto.

5.5.1. Análisis de Suelos

Los resultados del análisis de suelo mostraron que en ambas condiciones de temperatura hubo una disminución en el contenido de MO, con un aumento en la concentración de NO₃, NH₄ y P, al final del experimento. Esta reducción en el contenido de MO indica un proceso de mineralización de la misma, proceso que es mayor cuando la temperatura es más alta, lo que concuerda con la mayor disponibilidad de N en forma de NO₃ y NH₄, y P disponible (Cuadro 5.3).

Cuadro 5.3. Diferencia entre las propiedades químicas finales del suelo de fresa silvestre inoculada sometidas a dos condiciones de temperatura.

Condición de Temperatura	MO (%)	N-NO ₃	N-NH ₄	P
Temperatura Baja	-3.8	+8.0	+0.75	+36
Temperatura Alta	-4.4	+15.0	+2.0	+34

Números positivos indican aumento en la concentración de los analitos y signos negativos indican reducción de la concentración de los analitos con respecto a la concentración inicial.

5.5.2. Variables de Crecimiento Vegetal

La temperatura tiene un efecto significativo sobre todas las variables de crecimiento vegetal, mientras que la inoculación con BFN no mostró efecto sobre las variables, excepto para tamaño de la planta. La interacción temperatura y BFN presentó un efecto significativo, solo para la altura (Cuadro 5.4).

Cuadro 5.4. Efecto de los factores BFN, temperatura y su interacción sobre las variables de crecimiento de la planta (ANOVA). Probabilidad de significancia <0.05.

Variable	Factor	Bacteria Fijadora de Nitrógeno (BFN)	Temperatura (Tmp)	Tmp * BFN
Altura (cm)		0.3738	<0.0001*	0.0030*
Longitud de Raíz (cm)		0.1079	<0.0001*	0.8244
Tamaño de la Planta (cm)		0.0439*	0.0027*	0.3907
Biomasa seca aérea (g)		0.5247	0.0001*	0.8503
Biomasa seca raíz (g)		0.1941	<0.0001*	0.4981
N° de Flores		0.6528	<0.0001*	0.9163
N° de Frutos		0.3752	<0.0001*	0.9653
Peso seco frutos (g)		0.5572	<0.0001*	0.1394
Área Foliar (cm²)		0.4508	<0.0001*	0.3794

A temperatura alta se observaron plantas con mayor altura (12.38 cm), con respecto al sitio de baja temperatura (10.49 cm). Las plantas inoculadas con la cepa 8 a temperatura alta presentaron la mayor altura, mientras que a temperatura baja las plantas inoculadas con las dos cepas fueron más altas (Figura 5.3).

En este estudio el aumento de temperatura afectó negativamente la longitud de la raíz disminuyendo el crecimiento de esta en 3.96 cm (18.15%) en el sitio de alta temperatura. Los testigos absolutos presentaron el menor crecimiento de raíz, aunque sin efecto estadísticamente significativo (Figura 5.3).

En general, las plantas que no fueron inoculadas con ninguna cepa de BFN presentaron el menor tamaño. Las plantas inoculadas con BFN, mostraron un comportamiento distinto en los sitios con alta y baja temperatura. La cepa 8 presentó el mayor tamaño de planta a alta temperatura pero el menor tamaño a baja temperatura.

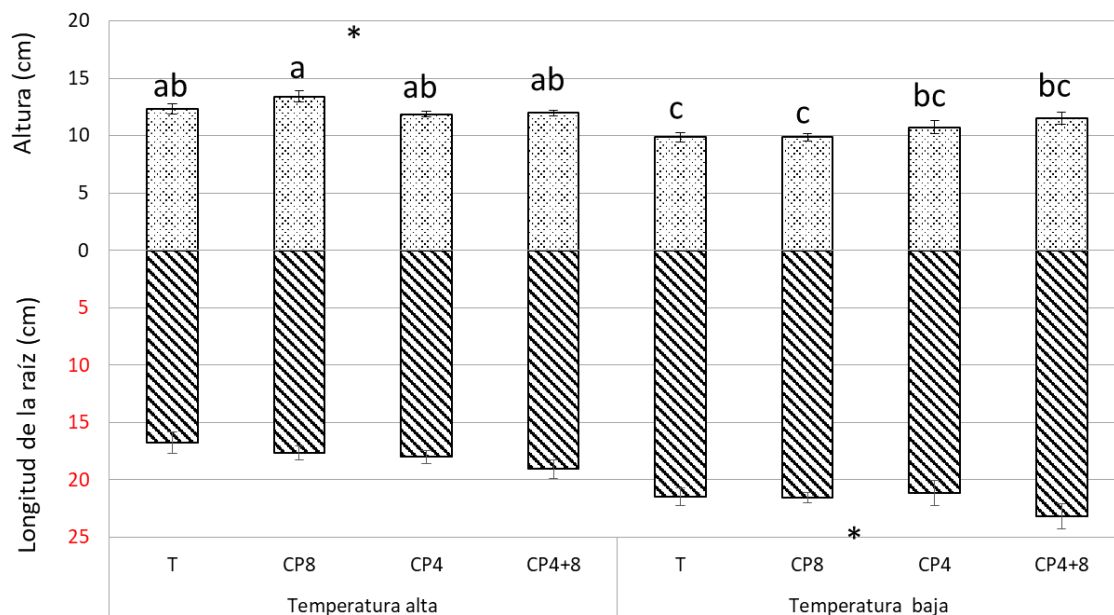


Figura 5.3. Altura de la planta y longitud de raíz con inoculación de BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo (T) para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).

Las plantas sometidas a un aumento de temperatura presentaron mayor acumulación de biomasa seca en la parte aérea, 3.1 g más, con respecto al sitio de baja temperatura. El peso seco de la raíz fue menor en 3.0 g a temperatura alta que a temperatura baja (Figura 5.4). Los testigos absolutos, a diferencia de las plantas inoculadas con BFN, presentaron la menor acumulación de biomasa seca de la parte aérea en ambas condiciones, aunque sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

El aumento de temperatura afectó positivamente el área foliar de las plantas, en promedio estas presentaron un área de 653.17 cm², mayor que la presentada en el sitio de baja temperatura, que tuvo un área foliar de 437.06 cm². En el sitio de temperatura alta, las plantas inoculadas con la cepa 4 y las dos cepas (4+8), presentaron la mayor área foliar; mientras que la menor se encontró con la cepa 8. A baja temperatura el tratamiento testigo mostró la menor área foliar con respecto a los tratamientos inoculados (Figura 5.5).

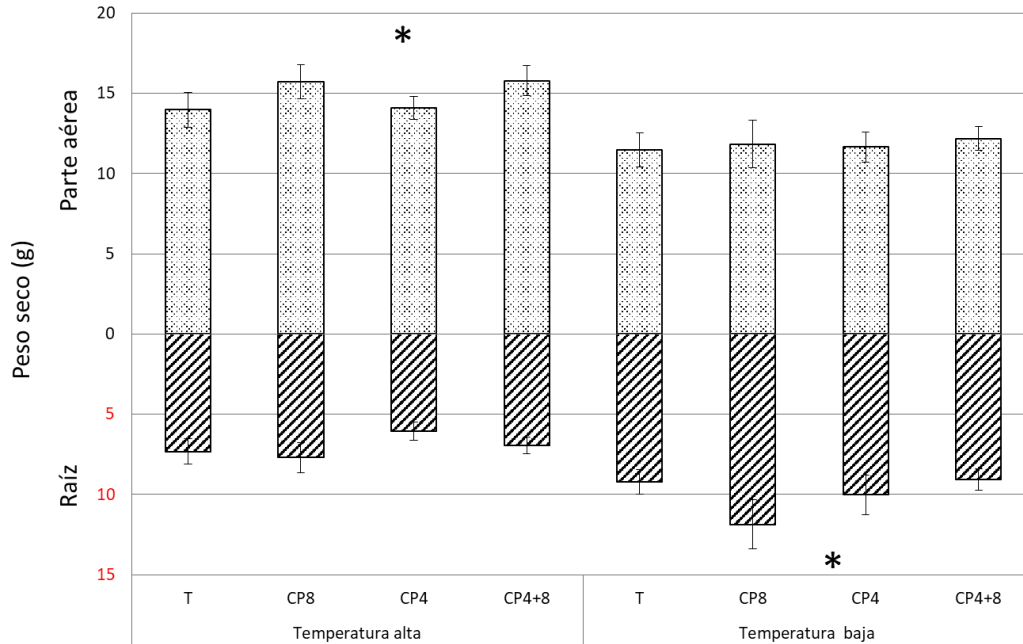


Figura 5.4. Biomasa seca de la parte aérea y la raíz con inoculación de BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo (T) para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).

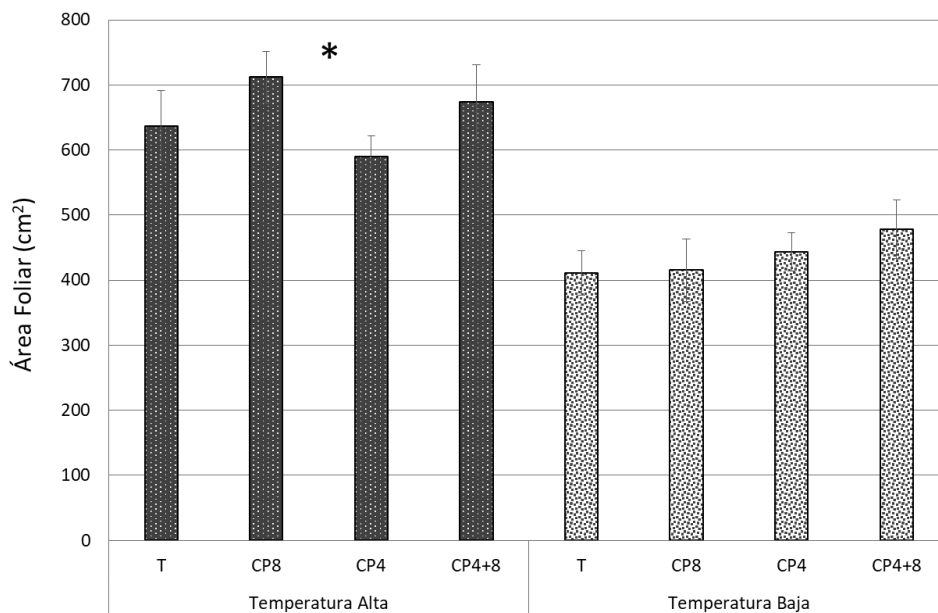


Figura 5.5. Área foliar de plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo (T) para alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).

La fecha de floración y fructificación para los dos sitios inició cuatro meses después de establecido el experimento. Sin embargo, en el sitio de alta temperatura la floración y fructificación empezó dos semanas después con respecto al de baja temperatura. El número de flores y frutos siempre fue mayor en el sitio de baja temperatura (Figura 5.6a, b, c y d).

El aumento de temperatura afectó significativamente el peso seco de los frutos siendo mayor en el sitio con baja temperatura. El peso seco de los frutos en el sitio con temperatura alta fue de 0.79 g, mientras que en el sitio de baja temperatura el peso de los frutos cosechados fue de 2.34 g. No se observó efecto relacionado con las BFN, ni con la interacción de la temperatura y las BFN. Sin embargo, el testigo absoluto a alta temperatura presentó el menor peso seco de frutos. El menor peso seco de frutos para las plantas sometidas a bajas temperaturas, lo presentaron las plantas inoculadas con la cepa 8 de BFN (Figura 5.7).

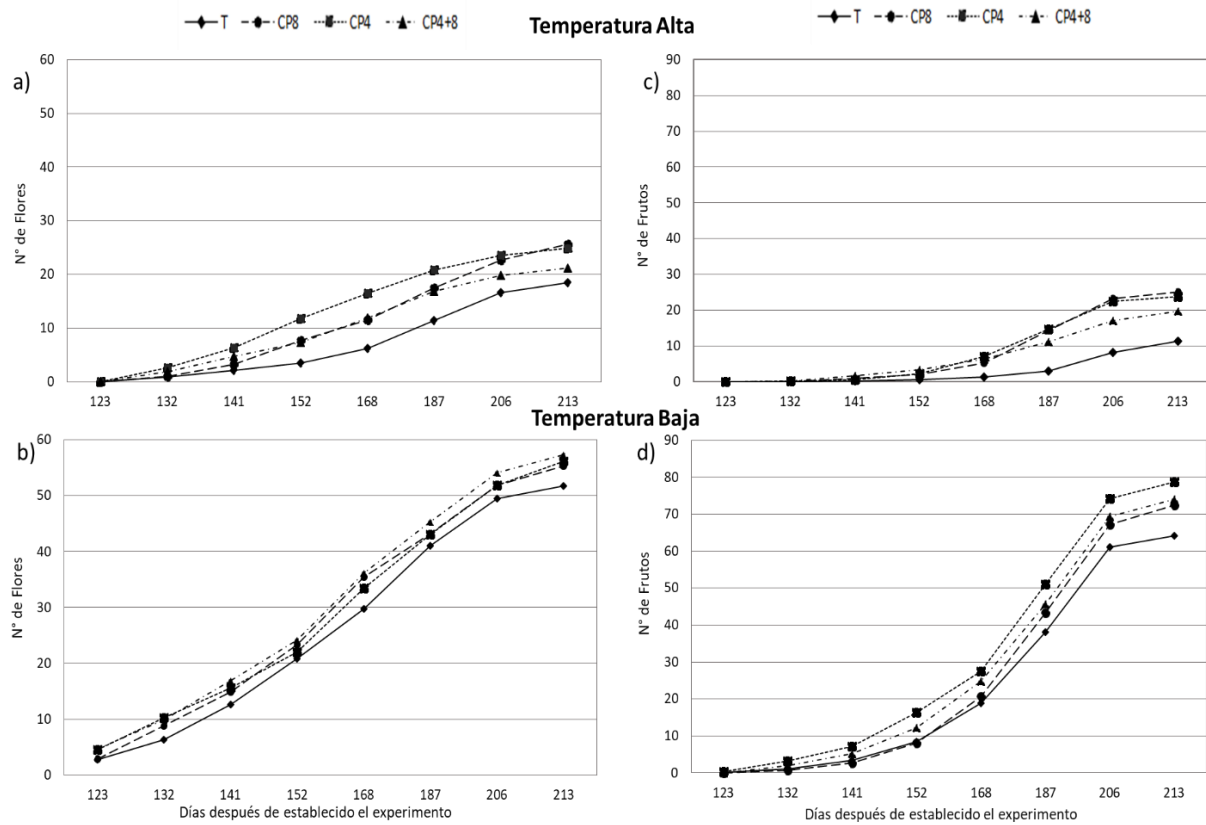


Figura 5.6. Numero de flores (a, b) y frutos (c, d) acumulados en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C).

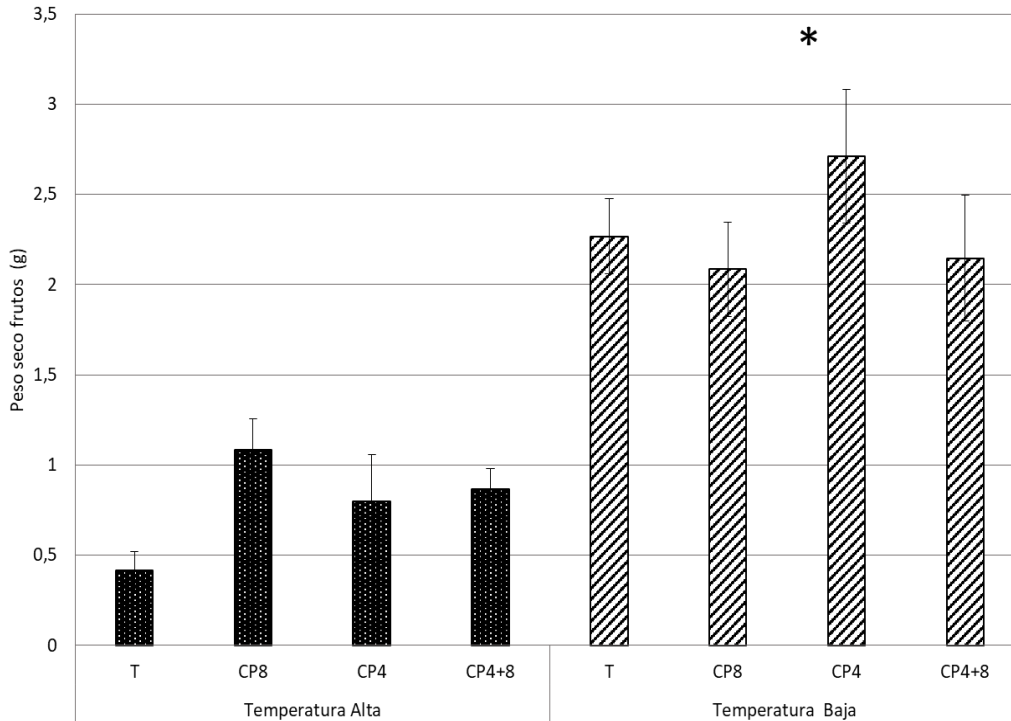


Figura 5.7. Peso seco de frutos cosechados en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).

5.5.3. Fotosíntesis y contenido y fluorescencia de clorofila

Las variables relacionadas con la fotosíntesis, contenido y fluorescencia de clorofila se vieron afectadas por la temperatura, pero no por la interacción entre los factores. Las BFN impactaron positivamente la fotosíntesis y el contenido de clorofila en las plantas. La fotosíntesis, el contenido de clorofila, la fluorescencia mínima (F_o), fluorescencia variable (F_v) y eficiencia fotoquímica del PSII (F_v/F_m), cambiaron con el tiempo presentando diferencias significativas entre los muestreos (Cuadro 5.5).

En la medición de fotosíntesis, en la cual se tuvo en cuenta la planta completa (CIRAS 3), se observó que las plantas del testigo absoluto presentaron el valor más bajo de fotosíntesis, mientras que las plantas inoculadas con BFN presentaron valores mayores de fotosíntesis, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos 4, 8 y 4+8. En este estudio, el aumento de temperatura en 5.1°C afectó directamente la tasa de

asimilación de las plantas siendo mayor en el sitio de temperatura alta, $2.80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con respecto al sitio de baja temperatura con una tasa de asimilación de $1.86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En cuanto a la tasa de asimilación de las plantas en el tiempo, esta disminuyó desde el muestreo 1 (133 días después de establecido el experimento) hasta el muestreo 4 (152 días después de establecido el experimento) (Figura 5.8).

Cuadro 5.5. Efecto de los factores: BFN, temperatura y su interacción, sobre la fotosíntesis, el contenido de clorofila y la fluorescencia de clorofila (ANOVA). Probabilidad de significancia <0.05 .

Variable	Factor		
	BFN	Tmp	Tmp * BFN
Fotosíntesis ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (CIRAS3)	$<0.0001^*$	$<0.0001^*$	0.6737
Fotosíntesis ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (CIRAS2)	$<0.0001^*$	$<0.0001^*$	0.0481*
Contenido de Clorofila (Lecturas SPAD)	0.0001^*	$<0.0001^*$	0.2032
Fluorescencia mínima (F_o)	0.3142	$<0.0001^*$	0.7501
Fluorescencia variable (F_v)	0.5498	$<0.0001^*$	0.2922
Fluorescencia máxima (F_m)	0.4542	$<0.0001^*$	0.3357
Eficiencia Fotoquímica del PSII (F_v/F_m)	0.7101	$<0.0001^*$	0.5487

La fotosíntesis medida en el foliolo central de la hoja compuesta completamente abierto (CIRAS 2), mantuvo la misma tendencia que al medir la planta completa (CIRAS 3). Sin embargo, en este caso se encontró efecto de la temperatura, las BFN y la interacción de los factores. Los testigos absolutos presentaron el valor más bajo de fotosíntesis ($6.65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y las plantas inoculadas con las dos cepas (4+8), presentaron una mayor fotosíntesis ($9.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para las dos temperaturas. Por otro lado, el sitio con alta temperatura presentó mayor fotosíntesis ($9.61 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que el sitio de baja temperatura ($6.86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 5.9).

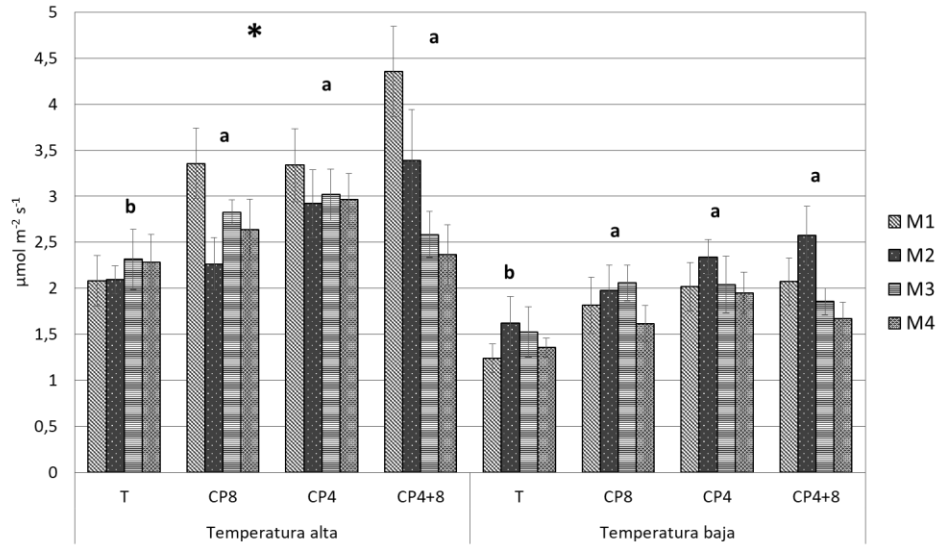


Figura 5.8. Tasa de fotosíntesis de las plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C) (CIRAS 3). M1 = 132, M2 = 136, M3 = 140 y M4 =144 ddi. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dada por la inoculación de BFN (Tukey $\alpha=0.05$). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).

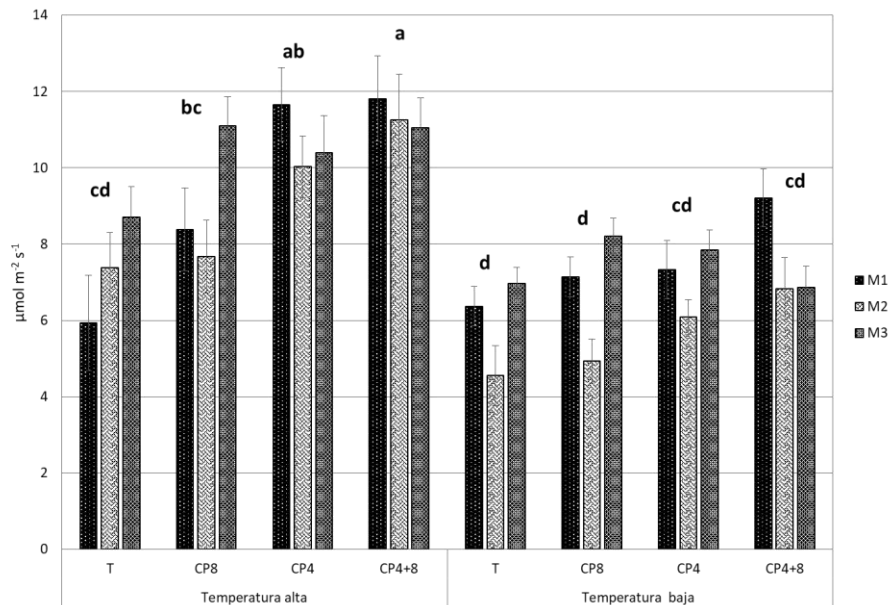


Figura 5.9. Fotosíntesis en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C) (CIRAS 2). M1 = 62, M2 = 113 y M3 = 130 ddi. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).

El contenido de clorofila a través del tiempo presentó un aumento significativo desde los 137 hasta los 164 días (39.06 lecturas SPAD), para luego disminuir entre los 171 y 180 (37.40 lecturas SPAD) días después de establecido el experimento (Figura 5.10a y b), lo que corresponde con un incremento acelerado en la producción de flores y frutos (Figura 5.6). Por otro lado, el aumento de temperatura afectó negativamente el contenido de clorofila, mientras que la inoculación de las plantas con BFN presentó un efecto positivo. Los testigos absolutos en los dos sitios presentaron el valor más bajo de contenido de clorofila (36.97 lecturas SPAD), con respecto a los tratamientos inoculados con las cepas 4, 8 y 4+8; 37.80, 37.97 y 38.28 lecturas SPAD, respectivamente (Figura 11a).

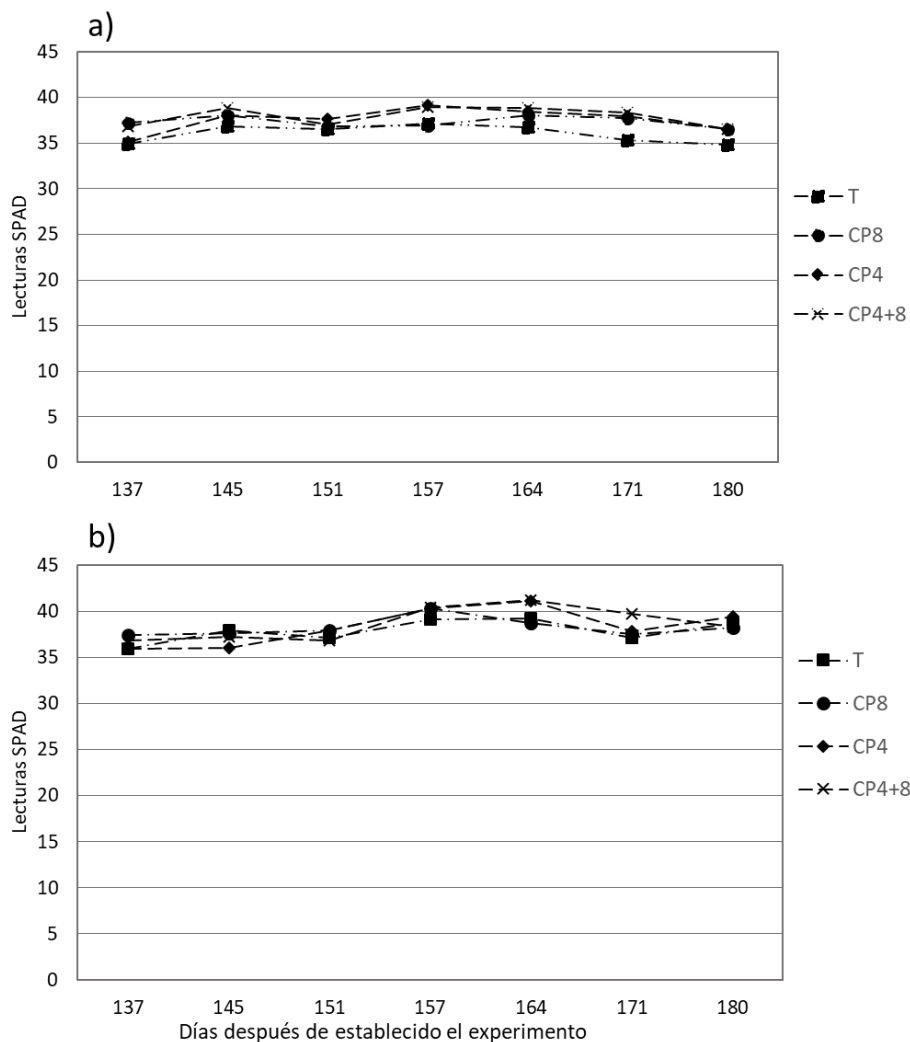


Figura 5.10. Contenido de Clorofila en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura a) alta (19.6 °C) y b) baja (14.6°C).

Las plantas sometidas a temperatura alta también presentaron el menor contenido de clorofila, 37.21 lecturas SPAD, con respecto a las plantas con menor temperatura. Sin embargo, no se observó un efecto contundente de la temperatura o las BFN, sobre el contenido de nitrógeno en las plantas de fresa silvestre. En esta variable, sería recomendable realizar más estudios y mediciones a lo largo de todo el ciclo para lograr observar una tendencia (Figura 5.11b).

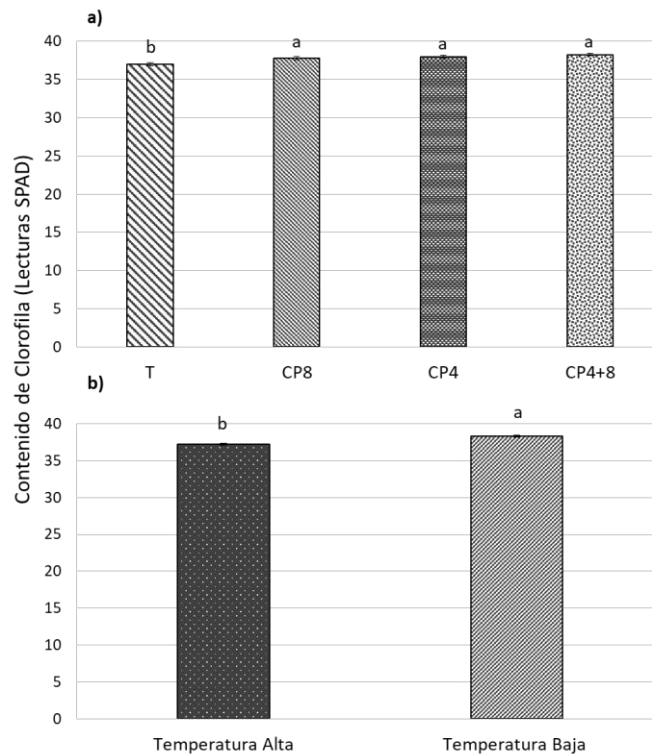


Figura 5.11. Contenido de Clorofila en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).

Las plantas en el sitio de alta temperatura presentaron mayores valores de fluorescencia mínima (F_o), fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia variable (F_v) y eficiencia fotoquímica del PSII (F_v/F_m). Para el sitio de alta temperatura, la F_o disminuyó desde los 160 hasta los 180 ddi y la F_m fue mayor en el segundo muestreo. En el sitio de baja de temperatura, el mayor valor de F_o se observó a los 180 ddi y el F_m aumentó desde los 160 hasta los 180 ddi (Figura 5.12).

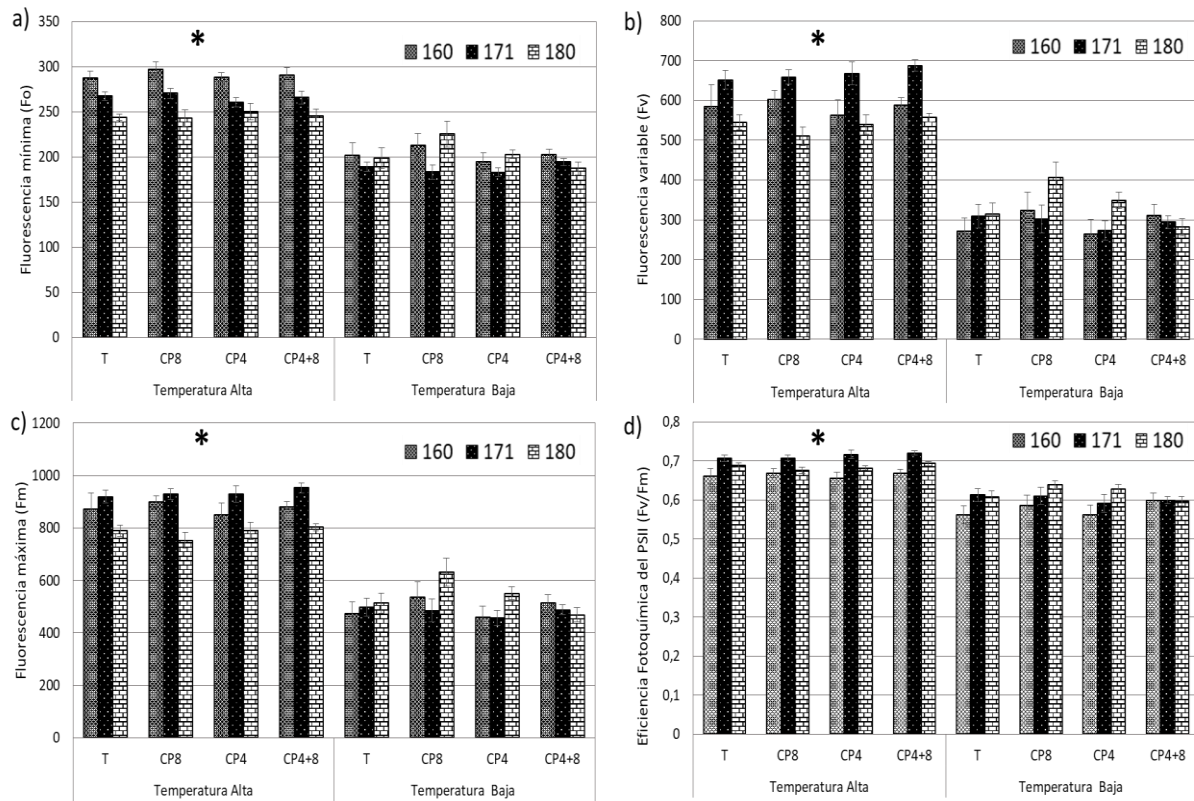


Figura 5.12. Fluorescencia de la clorofila en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C): fluorescencia mínima (Fo) (a), fluorescencia variable (Fv) (b), fluorescencia máxima (Fm) (c) y eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm) (d). * indica diferencias significativas dada por la temperatura (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).

5.5.4. Variables relacionadas con las comunidades rizosféricas de *F. mexicana*

Temperatura y respiración del Suelo

La temperatura del suelo en los cuatro muestreos realizados, varió entre 15.55°C a 18.22°C, observándose la mayor temperatura para los dos sitios en el muestreo 2, 160 días después de establecido el experimento (Figura 5.13a). El sitio de temperatura baja

presentó un promedio de 14.23°C, mientras que en el sitio de alta temperatura fue de 19.28°C, con una diferencia de 5.05°C (Figura 5.13b).

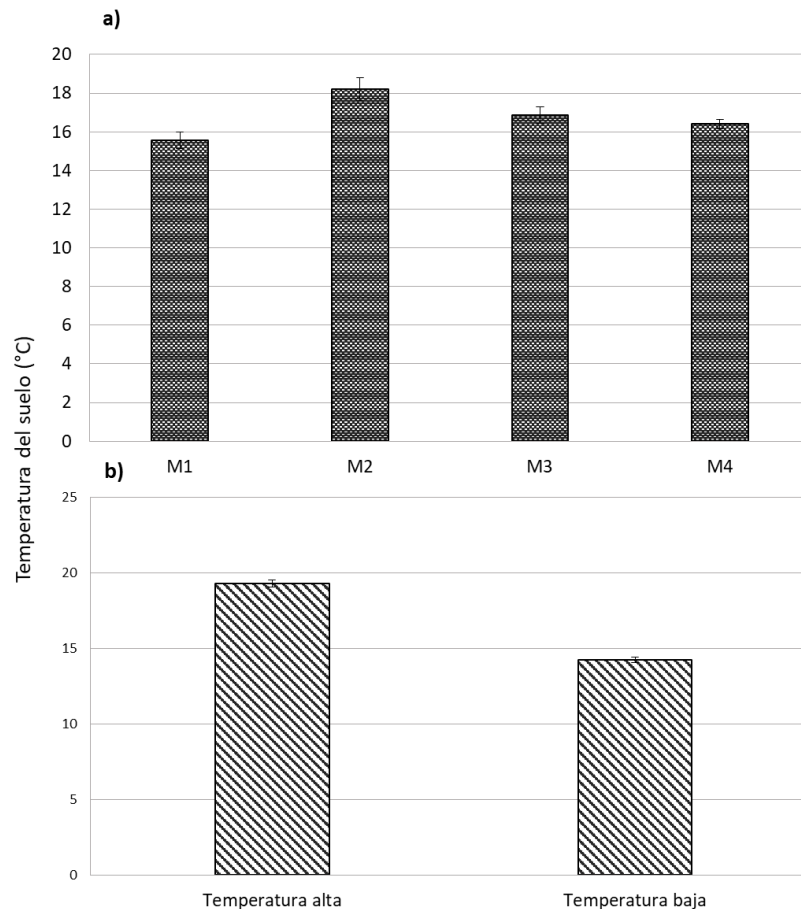


Figura 5.13. Temperatura promedio del suelo a) 153 (M1), 160 (M2), 165 (M3) y 170 (M4) días después de establecido el experimento y b) para los sitios de temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Media ± error estándar (n=7).

La respiración del suelo fue diferente para las cuatro evaluaciones realizadas. La mayor tasa de respiración fue de 225.40 mg m⁻² h⁻¹, y corresponde al muestreo 2 (160 ddi), donde también se observó la mayor temperatura del suelo (18.22°C). El valor más bajo de respiración fue de 158.25 mg m⁻² h⁻¹, a los 153 ddi (muestreo 1), la cual presentó una temperatura del suelo de 15.55°C, la menor temperatura registrada.

Las BFN, la temperatura y la interacción de los dos factores afectaron de manera significativa la tasa de respiración del suelo. El aumento en la temperatura en 5.1°C aumentó la respiración del suelo en 67.2 mg m⁻² h⁻¹ con respecto al sitio de baja

temperatura. La inoculación con BFN aumentó significativamente la respiración del suelo. El testigo presentó el promedio más bajo, $175.9 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, y las plantas inoculadas con las dos cepas presentaron el promedio más alto, $219.9 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Las plantas inoculadas con las dos cepas (4+8) a temperatura alta presentaron el valor más alto de respiración $269.1 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y el testigo a temperatura baja el menor valor, $145.3 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Figura 5.14).

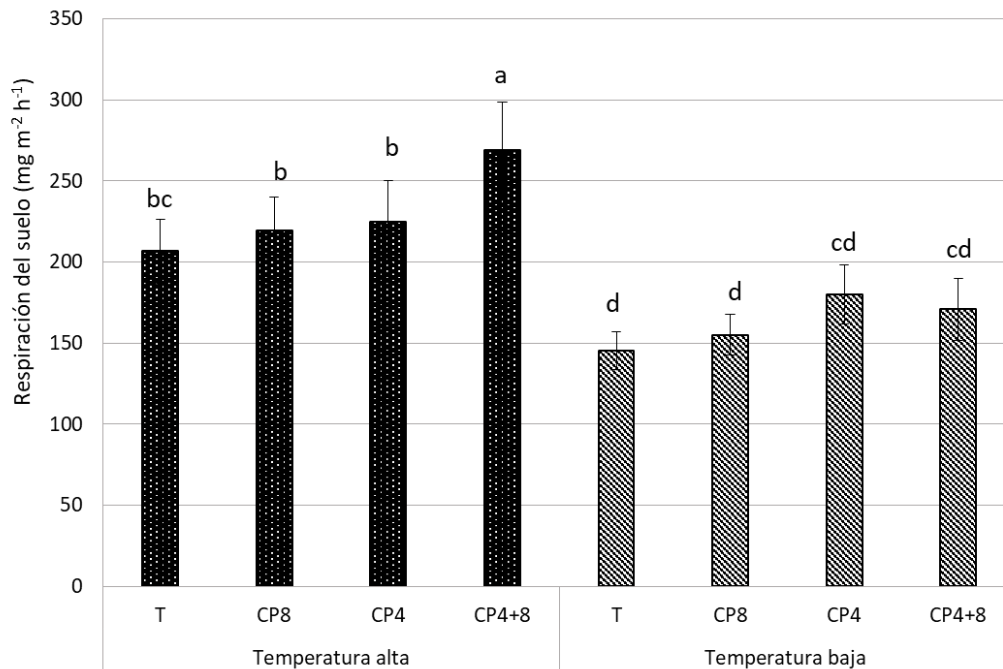


Figura 5.14. Respiración del suelo para a) temperatura alta ($19.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y baja (14.6°C), y b) en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Media \pm error estándar (n=7).

Porcentaje de colonización micorrízica y número de esporas

La temperatura y las BFN mostraron un impacto sobre el porcentaje de colonización micorrízica, pero no se encontró un efecto dado por la interacción de los factores. Para el número de esporas de HMA, no se observó un efecto estadísticamente significativo de ninguno de los factores (Cuadro 5.6).

Cuadro 5.6. Efecto de los factores: BFN, temperatura y su interacción, sobre el porcentaje de colonización micorrízica y el número de esporas por 10 gramos de suelo seco (ANOVA). Probabilidad de significancia <0.05.

Variable	Factor		
	BFN	Tmp	Tmp * BFN
Porcentaje de colonización micorrízica (%)	0.0058*	<0.0001*	0.3526
Esporas micorrízicas	0.4097	0.5656	0.6498

El porcentaje de colonización micorrízica al inicio del experimento no presentó diferencias significativas entre las unidades experimentales, encontrándose en un rango entre 33 y 55%. La colonización en plantas de *F. mexicana* fue mayor a los 213 ddi con respecto al tiempo cero, pasando de 47.36% a 68.09%, aumentando en un 20.73%. En el sitio de alta temperatura, se observó un incremento en el porcentaje de micorrización del tiempo cero al tiempo final de 10.89%; mientras que las plantas ubicadas a baja temperatura presentaron un mayor incremento en el número de esporas a los 213 ddi con 30.57%.

La colonización de HMA en raíces de fresa silvestre 213 ddi, fue diferente para los sitios de alta y baja temperatura, y entre las BFN inoculadas. La colonización micorrízica al final del experimento fue de 77.36%, para el sitio de temperatura baja; y de 58.82% a temperatura alta (Figura 5.15a). Las plantas del testigo absoluto presentaron el menor aumento en la colonización de raíces con respecto al tiempo inicial (8.14%), mientras que las plantas inoculadas con BFN mostraron un porcentaje mayor, siendo las plantas inoculadas con las cepas dos cepas, la de mayor aumento, 32.21% (Figura 5.15b). Los testigos absolutos en ambos sitios presentaron el menor porcentaje de colonización (62.79%), mientras que el mayor porcentaje de colonización lo mostró el tratamiento inoculado con la cepa 8 (75.57%).

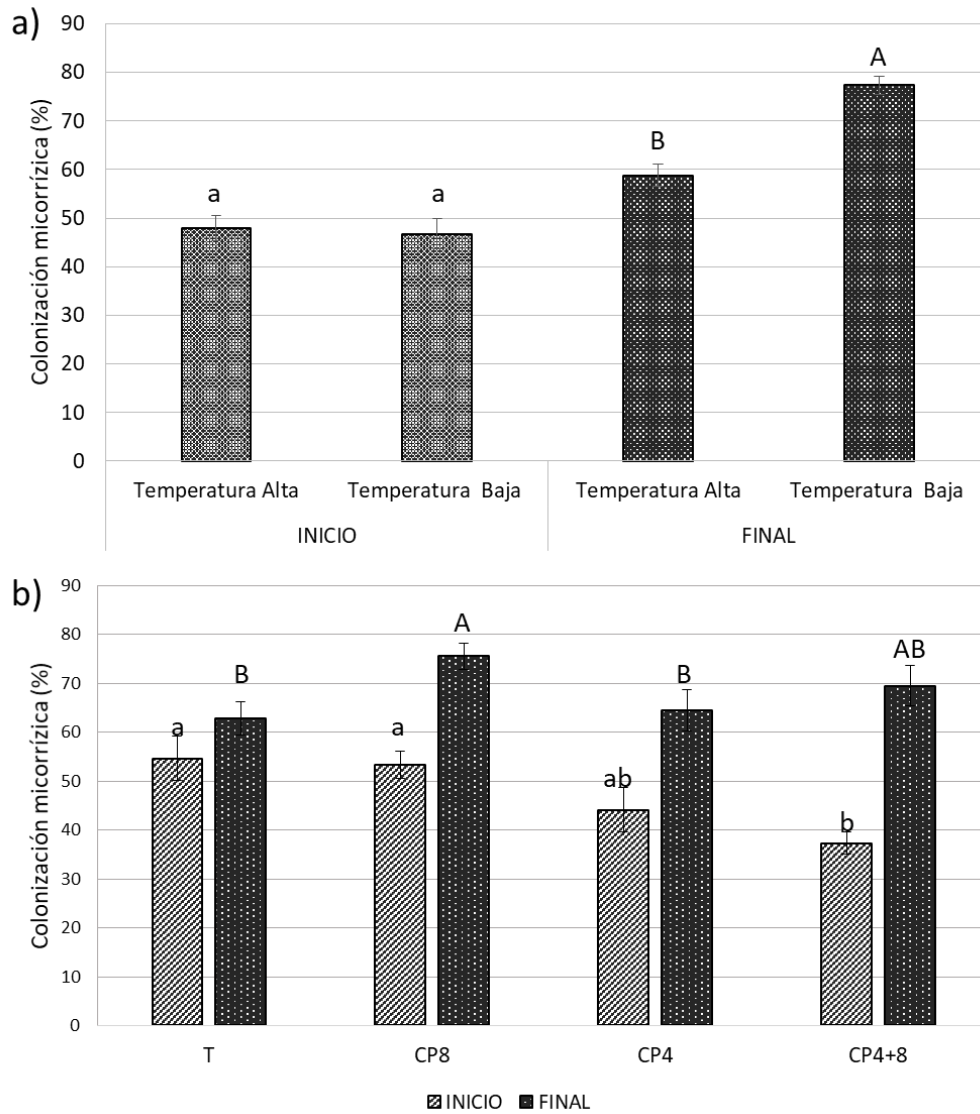


Figura 5.15. Colonización micorrízica para a) temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C), y b) en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Letras minúsculas en cada columna corresponden al tiempo inicial y letras mayúsculas al tiempo final. Media \pm error estándar (n=7).

El número de esporas al inicio del experimento no presentó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. El número de esporas de hongos micorrízicos fue mayor al final del experimento, pasando de 205.2 a 863.3 esporas por 100 g de suelo, observándose diferencia estadísticamente significativa en el tiempo. Todos los tratamientos aumentaron entre 60 a 82%, el número de esporas con respecto a lo

observado al inicio del experimento. Los tratamientos ubicados en el sitio de baja temperatura incrementaron el número de esporas en un 77%; mientras que a alta temperatura fue de 74%. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para los factores (Figura 5.16).

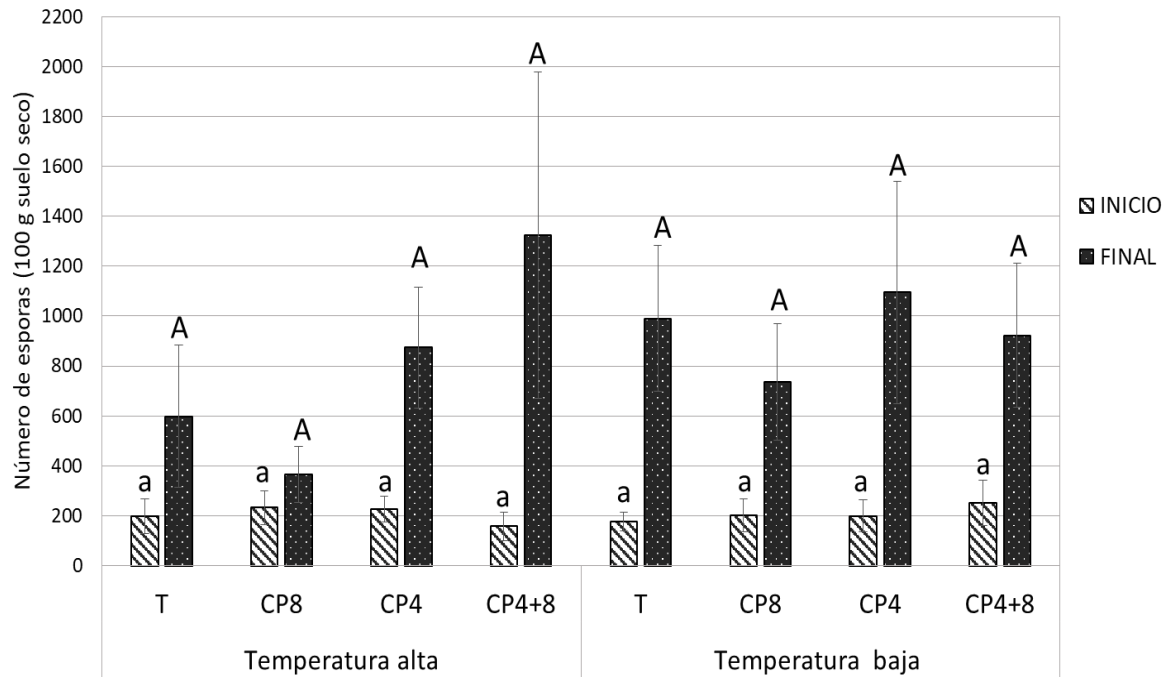


Figura 5.16. Número de esporas en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo (T) para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Letras minúsculas en cada columna corresponden al tiempo inicial y letras mayúsculas al tiempo final. Media \pm error estándar (n=7).

Para el final del estudio, en promedio la baja temperatura favoreció la esporulación de las especies de hongos micorrízicos en todos los tratamientos encontrando 935.7 esporas por 100 g de suelo seco. En el sitio de alta temperatura el promedio de esporas fue de 790.7, siendo mayor en los tratamientos 4 y 4+8, sin embargo, en este sitio se observó gran variación entre las repeticiones (Figura 5.16).

Población de BFN recuperada

Independientemente de la cepa, el sitio de alta temperatura presentó menor recuperación de la población microbiana de BFN, después de 213 ddi. Al aumentar la temperatura se observó una disminución en la población de BFN de ambas cepas a 213 ddi, con $35.7 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1}$, mientras que en el sitio de baja temperatura la recuperación fue de $80.8 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1}$. Las cepas 4 y 8 mostraron un comportamiento similar con el aumento de temperatura, disminuyendo su población en ambos casos. La cepa 8 mostró una disminución del 27.99% y la cepa 4 del 21.82%, en los tratamientos CP8 y CP4. Sin embargo, cuando se hizo la recuperación de BFN en el tratamiento CP8+4, la reducción fue del 70.10% y 76.73%, para las cepas 8 y 4, respectivamente (Figura 5.17). La cepa con mayor crecimiento en los sitios de alta y baja temperatura fue la cepa 8 ($85.4 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1}$).

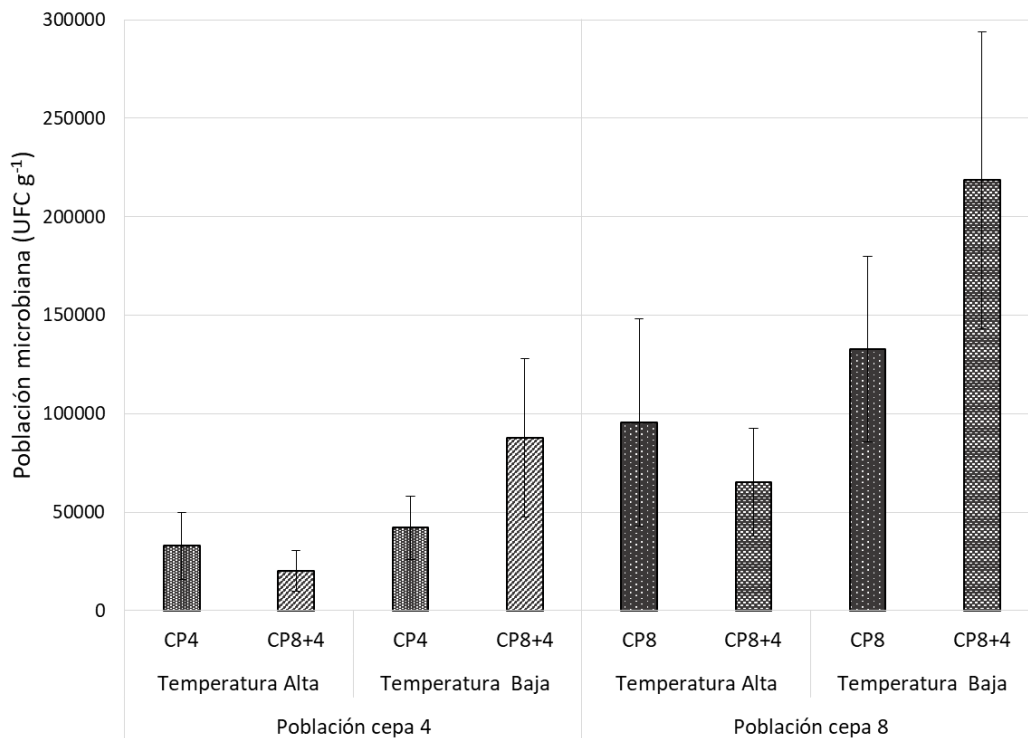


Figura 5.17. Población microbiana recuperada en suelo de rizósfera de *F. mexicana* inoculada con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo para temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C). Media \pm error estándar (n=3).

5.5.5. Diversidad Metabólica

El promedio de color desarrollado en el pozo (AWCD), es un indicador de la actividad de los microorganismos sobre las fuentes de carbono (Gómez-Luna *et al.*, 2012). Al inicio del experimento no se encontraron diferencias significativas entre las unidades experimentales para AWCD, ni para los seis grupos de sustratos. La actividad metabólica medida en el tiempo inicial fue menor (2.18), con respecto a la actividad metabólica desarrollada 213 ddi (2.26) (Figura 5.18). La actividad metabólica incrementó en 3.5% con respecto al inicio del experimento.

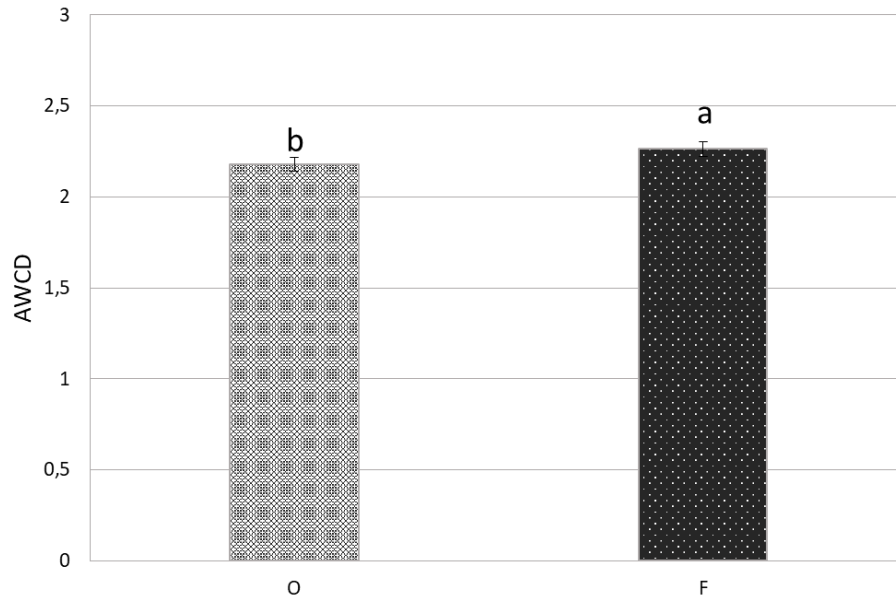


Figura 5.18. Promedio del color desarrollado en el pozo (AWCD) por las comunidades de microorganismos rizosféricos de plantas de *F. mexicana* inoculadas. Tiempo cero (O) y tiempo final (F). Media \pm error estándar (n=3).

La actividad metabólica (AWCD) dentro de los seis diferentes grupos de sustratos no presentó diferencias significativas en el tiempo inicial. La AWCD para los sustratos evaluados incrementó en todos los grupos con respecto al tiempo inicial, excepto en el sustrato de las aminas/amidas. Al final del experimento teniendo en cuenta el tiempo inicial, sólo se observaron diferencias significativas para el grupo de los ácidos carboxílicos (Cuadro 5.7).

Cuadro 5.7. Actividad metabólica (AWCD) para el tiempo inicial y final.

Grupo metabólico	Tiempo Inicial	Tiempo Final
Ácidos Carboxílicos	2,26157 a	2,3723 b
Aminas/Amidas	2,3439 a	2,2532 a
Aminoácidos	2,2333 a	2,2793 a
Carbohidratos	2,1794 a	2,2514 a
Misceláneos	1,9798 a	1,9892 a
Polímeros	2,0409 a	2,1267 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$).

Al finalizar el experimento, los dos sitios presentaron actividad metabólica (desarrollo de color) en todos los pozos en las primeras 24 h de lectura. El AWCD en los dos sitios, tuvo un comportamiento de crecimiento logarítmico aunque en el sitio de baja temperatura el punto de inflexión ocurrió a las 48 h mientras que a alta temperatura se dio a las 72 h (Figura 5.19a y b). Sin considerar el efecto de las BFN, el AWCD a las 24, 48 y 72 h fue más alto en el sitio de temperatura baja, observándose diferencias estadísticamente significativas a las 24 y 48 h. Por otro lado, la actividad metabólica dada por el efecto de las BFN presentó diferencias significativas sólo a las 72 h.

La actividad metabólica (AWCD) de las comunidades microbianas en cuanto a los grupos de sustratos fue diferente por efecto de las BFN, la temperatura y la interacción de estos dos (Cuadro 5.8), por ejemplo, las Aminas/Amidas y Aminoácidos, no se vieron afectados por ningún factor; mientras que los Carbohidratos y Polímeros, se vieron afectados negativamente por el incremento en la temperatura en 5.1°C (Figura 20a). En el caso de los Misceláneos y Ácidos Carboxílicos, las plantas con presencia de BFN presentaron menor actividad en comparación con el testigo absoluto (Figura 5.20b).

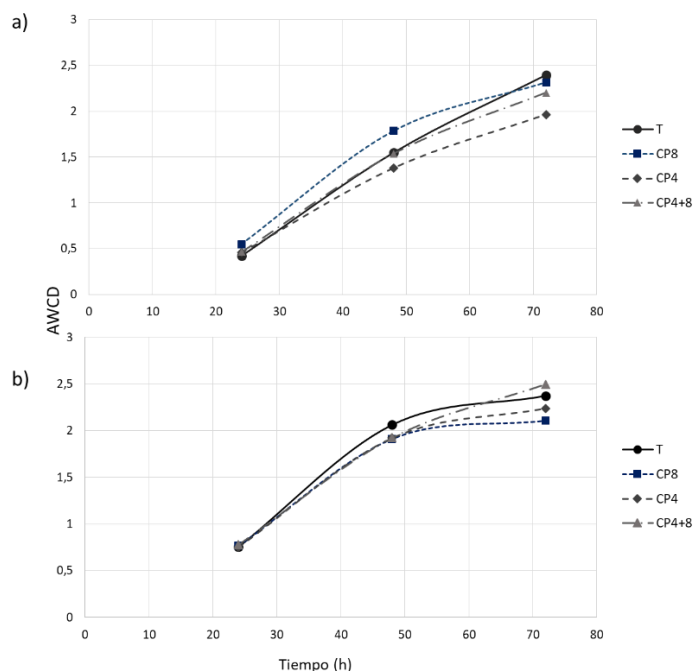


Figura 5.19. Promedio de color desarrollado en el pozo (AWCD) para a) temperatura alta (19.6 °C) y b) baja (14.6°C) en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo.

Cuadro 5.8. Efecto de los factores: BFN, temperatura y su interacción, sobre la actividad metabólica (AWCD) para los grupos metabólicos: Ácidos Carboxílicos, Aminas/Amidas, Aminoácidos, Carbohidratos, Misceláneos y Polímeros (ANOVA). Probabilidad de significancia <0.05*.

Variable	Factor BFN	Tmp	Tmp * BFN
Ácidos Carboxílicos	0.0330*	0.4247	0.1461
Aminas/Amidas	0.1292	0.1137	0.5339
Aminoácidos	0.0855	0.6450	0.9304
Carbohidratos	0.2577	0.0296*	0.2797
Misceláneos	0.0446*	0.0572	0.6109
Polímeros	0.1254	0.0455*	0.4009

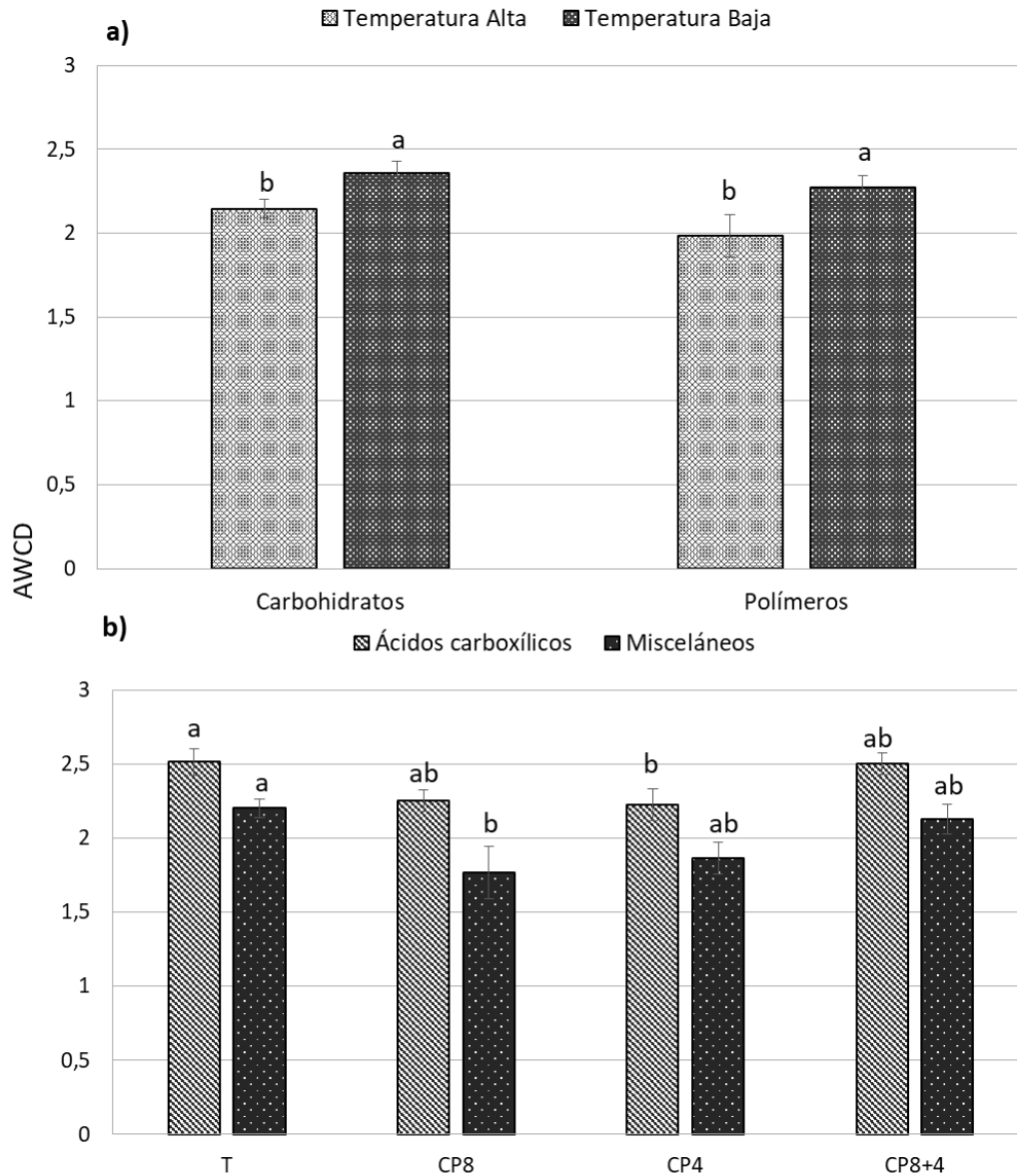


Figura 5.20. Actividad metabólica de las comunidades de microorganismos rizosféricas de *F. mexicana* en los diferentes sustratos para a) temperatura alta (19.6 °C) y baja (14.6°C), y b) en plantas inoculadas con BFN cepas 8, 4 y 8+4, y testigo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.5$). Media \pm error estándar (n=3).

5.5.6. Variables ecológicas

Al inicio del experimento no se encontraron diferencias significativas entre las unidades experimentales para la diversidad metabólica (H'), equidad (E) y dominancia (D). La

diversidad (H') y la equidad (E), aumentaron en 0.29%; mientras que la dominancia (D) disminuyó en 1.80%, desde el tiempo inicial hasta el final del experimento (Cuadro 5.9).

Cuadro 5.9. Diversidad metabólica {Índice Shannon-Weaver (H')}, equidad (E) y Dominancia {Índice Simpson (D)} para el tiempo inicial y final.

TIEMPO	Shannon-Weaver (H')	Equidad (E)	Dominancia de Simpson (D)
INICIAL	3,3976 a	0,9894 a	0,0343 a
FINAL	3,4073 b	0,9922 b	0,0337 b

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$).

A los 213 ddi los índices de: equidad (E), dominancia de Simpson (D) y diversidad metabólica de Shannon-Weaver (H'), mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios, pero no para la inoculación con BFN, ni para la interacción entre los factores.

La diversidad metabólica y la equidad de las comunidades microbianas se vieron afectadas negativamente por el aumento de temperatura en 5.1°C. El sitio de baja temperatura presentó la mayor diversidad metabólica y equidad con respecto al sitio de alta temperatura (Cuadro 5.10). El sitio de alta temperatura presentó la mayor dominancia, representada principalmente por la actividad metabólica de los microorganismos en el grupo de los ácidos carboxílicos y los aminoácidos (Figura 5.21).

Cuadro 5.10. Diversidad metabólica (Índice Shannon-Weaver (H')), equidad (E) y Dominancia (Índice Simpson (D)) para los sitios de baja y alta temperatura.

Factor	Shannon-Weaver (H')	Equidad (E)	Dominancia de Simpson (D)
Temperatura Alta	3.4028 a	0.9909 a	0.0340 a
Temperatura Baja	3.4118 b	0.9935 b	0.0334 b
Significancia			
Bacteria Fijadora de Nitrógeno (BFN)	$p = 0.0883$	$p = 0.0863$	$p = 0.1114$
Temperatura (Tmp)	$p = 0.0306^*$	$p = 0.0319^*$	$p = 0.0219^*$
Tmp * BFN	$p = 0.6524$	$p = 0.6388$	$p = 0.5644$

*ANOVA: Probabilidad de significancia <0.05.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$).

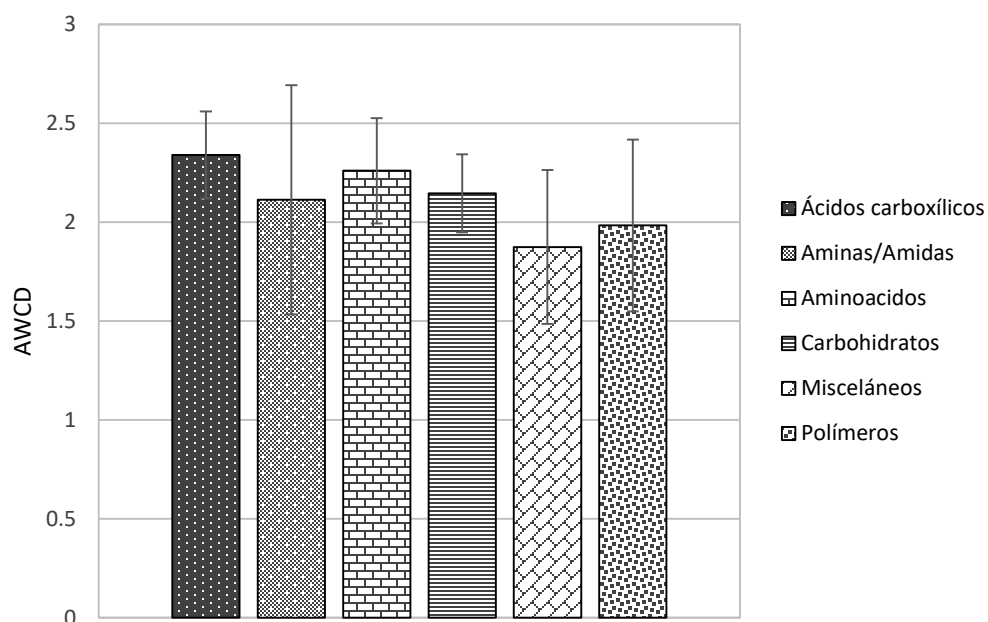


Figura 5.21. Promedio del color desarrollado en el pozo (AWCD) por comunidades de microorganismos rizosféricos de plantas de *F. mexicana* a temperatura alta (19.6 °C) (para seis fuentes de sustrato. Media \pm error estándar (n=3)).

5.6. DISCUSIÓN

La intensidad lumínica y la temperatura son factores ambientales estrechamente relacionados con la fenología, desarrollo, crecimiento, floración, fructificación, biomasa y fotosíntesis de la planta (Salisbury y Ross, 1992; Hatfield y Prueger, 2015; Freschet *et al.*, 2015; Valencia *et al.*, 2016). La planta desarrolla estrategias de adaptación a los cambios en el ambiente, como la temperatura y/o intensidad lumínica, de tal forma, que en muchos casos logra adaptarse.

Algunas de estas adaptaciones morfológicas y de fotomorfogénesis, están vinculadas a cambios en la fenología vegetativa y reproductiva, área foliar, elongación del tallo, elongación de los entrenudos, longitud de la raíz, altura de la planta, entre otros (Salisbury y Ross, 1992; Valencia *et al.*, 2016; Freschet *et al.*, 2015). El incremento en la temperatura y eventos con temperaturas extremas, pueden causar estrés en la planta induciendo, por ejemplo, disminución en la polinización, floración, fructificación y viabilidad del polen; así como aborto floral, infertilidad, reducción en el tamaño y peso del fruto (Hatfield y Prueger, 2015; Ledesma y Kawabata, 2016; Müller *et al.*, 2016; Prasad y Djanaguiraman, 2014).

En este estudio el incremento de temperatura, permitió mayor altura, biomasa seca aérea y área foliar, pero con una menor longitud y biomasa seca de la raíz en plantas de fresa silvestre. El incremento en la biomasa seca de la parte aérea fue de 20.80% con una disminución de la biomasa radical del 30.27%. Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores, quienes reportan un incremento en el peso seco aéreo entre 5 – 40% en diferentes especies de plantas con un aumento de temperatura (Heinemeyer y Fitter, 2004; Kytöviita y Ruotsalainen, 2007; Biasi *et al.*, 2008).

Wu *et al.* (2011) reporta un aumento en la biomasa aérea del 27%, pero sin un efecto aparente sobre la biomasa radical, debido a un incremento de temperatura. Por otro lado, existen reportes de mayor peso seco de raíz (Flanagan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017; Gavito y Azcón-Aguilar, 2012), o disminución de la biomasa radical entre 24% a 62%

(Zhou *et al.*, 2011; Bronson *et al.*, 2008), en diferentes especies de plantas al aumentar la temperatura.

La respiración del suelo, relacionada con la producción de CO₂, dada por los microorganismos y la fauna del suelo, las raíces de las plantas y en menor grado por la oxidación de los compuestos carbonados (Lloyd y Taylor, 1994; Luo y Zhou, 2006) incrementó en 17.76%, al aumentar la temperatura en 5.1°C. Este mayor flujo de CO₂ derivado de la respiración del suelo, por un aumento en la temperatura ha sido reportado por diferentes autores entre 10% a 45% para diferentes ecosistemas y tipos de cultivos (Liu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2011; Schindlbacher *et al.*, 2009; Schindlbacher *et al.*, 2012; Chun *et al.*, 2017).

De acuerdo a lo anterior, en esta investigación la respiración del suelo vinculada a la respiración de las raíces podría ser menor, dada la disminución en la biomasa radical. Por tanto, el aumento en la respiración del suelo en este investigación pudo darse por un lado por la oxidación de los compuestos de carbono más lábiles (Bronson *et al.*, 2008; Melilo *et al.*, 2002; Peterjohn *et al.*, 1994), y por otro, el cambio en las comunidades microbianas del suelo especialmente en la diversidad catabólica, favoreciendo las comunidades microbianas de hongos (Wang *et al.*, 2017).

Asimismo, el aumento en la respiración del suelo puede ser respuesta a la descomposición de la materia orgánica, junto con una acelerada mineralización del suelo, lo que permite más disponibilidad de nutrientes para la planta, relacionado con una mayor acumulación de biomasa seca de la parte aérea (Rustad *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2016; Chun *et al.*, 2017), con un menor crecimiento de la raíz (Zhou *et al.*, 2011), ya que esta no necesita extenderse en busca de nutrientes (Freschet *et al.*, 2015). Con un incremento de temperatura, la alta disponibilidad de nitrógeno para la planta por una mayor tasa de mineralización (Biasi *et al.*, 2008; Rustad *et al.*, 2001), reduce la necesidad de crecimiento de la raíz, lo cual disminuye los pelos radicales encargados de la absorción de N para la planta (Zhou *et al.*, 2011). Wang *et al.* (2017), encontraron que un cambio en la composición y cantidad de las comunidades microbianas, pueden

originar cambios en la producción, mortalidad y tasa de retorno de las raíces, relacionado a su vez con los cambios en la productividad de la planta y la composición química de los residuos orgánicos derivados de ella, limitando los recursos para los microorganismos, de tal forma que se puede beneficiar una comunidad microbiana más que otra (Wang *et al.*, 2017).

La fotosíntesis es uno de los procesos de la planta que se ve afectado por las condiciones ambientales, como alta y baja temperatura, contaminación ambiental, alta luminosidad, deficiencia de nutrientes y agua, entre otros (Baker y Rosenqvist, 2004). En esta investigación, las plantas sometidas a temperatura alta, presentaron valores mayores de fotosíntesis (28 a 33%), fluorescencia mínima (F_o), fluorescencia variable (F_v), fluorescencia máxima (F_m) y eficiencia fotoquímica del PSII (F_v/F_m). Greer (2015), reporta mayor tasa de fotosíntesis a temperatura alta en hojas de manzana, sin diferencias aparentes en la medida de fluorescencia de la clorofila. Por su parte en *F. vesca* se reporta una disminución en la fotosíntesis neta con un incremento en la intensidad lumínica (Chabot y Chabot, 1977).

La eficiencia fotosintética del PSII, se encontró en 0.69 a alta temperatura y en 0.60 a baja temperatura. Las plantas en este estudio presentaron valores bajos de F_v/F_m , aunque cercano al rango de 0.7 a 0.85, típico de plantas no estresadas, siendo un valor óptimo 0.83 (Maxwell y Johnson, 2000; Baker, 2008). Vega-Frutis *et al.*, (2014), encontraron que al incrementar la temperatura de 16°C a 26°C, se observaba un valor de F_v/F_m mayor que a temperatura baja. Esto puede ser resultado de la capacidad de absorber luz por parte de las plantas, dado por la intensidad lumínica y la humedad, y su interacción con la temperatura. Un efecto negativo sobre el aparato fotosintético se ha observado a baja temperatura con alta intensidad lumínica (Goh *et al.*, 2012), como en el caso de este estudio.

Por otro lado, al analizar los cambios de F_o y F_m , por sitio, se observó una disminución de estos a temperatura alta; mientras que las plantas sometidas a condiciones de temperatura baja mostraron un incremento en F_o y F_m , desde el primer muestreo (160

ddi) hasta el último muestro (180 ddi). Estos resultados sugieren que las plantas pueden encontrarse en una fase de aclimatación (Greer, 2015; Baker y Rosenqvist, 2004); o un proceso de regulación, recuperación o ajuste de las reacciones y de la capacidad fotosintética; o por cambios en la capacidad de disipación térmica (Porcar-Castell *et al.*, 2008). Asimismo, una disminución en la señales de fluorescencia de la clorofila, puede darse con un incremento en el contenido de clorofila en la planta, lo cual puede ocurrir debido a un aumento en la reabsorción de la proporción de fluorescencia emitida (Björkman y Demmig, 1987).

De igual manera, un aumento de los valores de fluorescencia mínima y una disminución en F_m , pueden reflejar una pérdida o destrucción de los centros de reacción del PSII, o una ruptura en el transporte de electrones (Bolhar-Nordenkampf *et al.*, 1989; Baker, 2008). También se ha reportado que una disminución en F_v/F_m , puede estar dada por daños de foto-inhibición ocasionados por la luz en plantas sujetas a diferentes condiciones de estrés ambiental y su respuesta de resistencia a las condiciones ambientales, tales como bajas temperaturas con alta radiación solar (Boese y Huner, 1990; Bolhar-Nordenkampf *et al.*, 1989).

En general, muchas características morfológicas de la hoja y la fenología vegetativa de la planta, está relacionada con los factores ambientales, tales como la temperatura, la intensidad lumínica y la precipitación (Li *et al.*, 2015; Chabot y Chabot, 1977; Boese y Huner, 1990; Valencia *et al.*, 2016). El aumento en el área foliar suele ser una estrategia adaptativa de la planta, de tal forma que al aumentar su área fotosintéticamente activa, fortalece su habilidad para competir por radiación solar y con ello todos los procesos relacionados con la fotosíntesis, y la producción de biomasa seca en la planta (Evans y Porter, 2001; Zhong *et al.*, 2014).

Una mayor área foliar específica (área foliar por unidad de materia seca de la hoja), puede estar dado como una respuesta de aclimatación a una baja intensidad lumínica (Freschet *et al.*, 2015). En este estudio se encontró que las plantas sometidas a temperatura alta, presentaron mayor área foliar, con respecto a las de baja temperatura.

Un aumento en el área foliar con un incremento de temperatura ha sido reportado por varios autores (Heinemeyer y Fitter, 2004; Ghannoum *et al.*, 2009), vinculado al fotoperiodo (Sønsteby *et al.*, 2016). Sin embargo, Zhong *et al.* (2014), reporta una disminución en el área foliar de *Phragmites australis* y ningún cambio en *Imperata cylindrica* con un incremento de temperatura, así como lo observado por Hatfield y Prueger (2015). La respuesta de las plantas a los eventos de cambio climático depende de las características intrínsecas de cada una (Zhong *et al.*, 2014).

En este estudio, el incremento en la biomasa seca de la parte aérea está relacionado con un aumento en la fotosíntesis, una mayor área foliar, e indirectamente con la disponibilidad de nutrientes, derivados posiblemente de una alta tasa de mineralización de la materia orgánica del suelo (Rustad *et al.*, 2001). La disminución en la biomasa de la raíz, puede atribuirse a un incremento en la mineralización del suelo con una posterior disponibilidad de N para la planta (Zhou *et al.*, 2011), así como por un efecto dado por el cambio en las comunidades microbianas por el incremento de temperatura (Wang *et al.*, 2017). Por otro lado, la respuesta en mayor biomasa aérea y menor biomasa radical, posiblemente fue un cambio alométrico, entre la parte aérea y raíces, debido a la adquisición del recurso más limitante, de tal forma que la planta invierte más biomasa en el órgano encargado de adquirir ese recurso (Freschet *et al.*, 2015; Sønsteby *et al.*, 2016).

En este estudio el aumento de temperatura en 5.1°C afectó directamente el desarrollo reproductivo de la planta, disminuyendo la floración, fructificación y el peso seco de los frutos; y postergo la época de floración en 16 días. Una de las primeras señales de la planta al incremento de temperatura son las respuestas fenológicas vegetativas y reproductivas (Hatfield y Prueger, 2015; Valencia *et al.*, 2016). Sønsteby *et al.* (2016), encontraron un retraso en la floración de 14 días en plantas de fresa comercial bajo condiciones de alta temperatura y días cortos. Igualmente, Cao *et al.* (2016), reportaron un retraso en el inicio de la floración en 3.6 días para *Cardamine hirsuta*.

La disminución en el número de flores y frutos en plantas sometidas a periodos de alta temperatura o por un incremento en la temperatura, ha sido reportado en diferentes estudios (Ledesma y Kawabata, 2016; Liu *et al.*, 2012; Valencia *et al.*, 2016). En *Antennaria dioica* se encontró una disminución en el número de brotes florales con un aumento en la temperatura, tanto de 5 y 10 °C (Vega-Frutis *et al.*, 2014). Otros estudios, sin embargo, han encontrado que un aumento de temperatura incrementa el número de flores por planta y el peso de los frutos (Sønsteby *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2016).

Los resultados encontrados en este estudio, sobre fructificación y floración, pueden ser una respuesta a la disminución en la capacidad de floración inducida por un efecto fisiológico, la vernalización, proceso que puede ser afectado por el calentamiento en el ambiente (Liu *et al.*, 2012; Chouard, 1960). En fresa cultivar Camarosa se ha encontrado que largos periodos de vernalización de 4 +/- 1°C, mejora la producción (de Oliveira y Scivittaro, 2009). Las plantas endémicas de condiciones frías, podrían verse afectadas negativamente con un aumento de temperatura, en la fenología de la floración y en la reproducción, lo que podría implicar un riesgo para la supervivencia de la especie (Vega-Frutis *et al.*, 2014). Sin embargo, las fresa silvestre puede reproducirse vegetativamente, lo que podría permitir una migración de esta bajo eventos de cambio climático, aunque una predicción en este sentido es complicada (Liu *et al.*, 2012)

En esta investigación, las BFN presentaron un efecto sobre el tamaño de la planta, la fotosíntesis, el contenido de clorofila y el porcentaje de colonización micorrízica. Las plantas del tratamiento CP4+8, presentaron la mayor tasa de fotosíntesis y contenido de clorofila, mientras que los testigos fueron los más bajos. El contenido de clorofila se ha relacionado en diversas ocasiones con el contenido de nitrógeno, por tanto, un mayor contenido de clorofila en las plantas inoculadas con BFN puede estar relacionado con la capacidad de estas bacterias para fijar N atmosférico, quedando esté disponible para la planta (Robertson y Groffman, 2015; Coleman y Wall, 2015).

Las plantas inoculadas con BFN presentaron el mayor porcentaje de colonización micorrízica con respecto al testigo. Se ha encontrado que bacterias aisladas de la

rizósfera de plantas micorrízicas, favorecen el porcentaje de colonización micorrízica debido a que tienen la capacidad de degradar los tejidos vegetales de la raíz facilitando la penetración de los HMA y la formación de la simbiosis. Asimismo, ayudan en la germinación y maduración de las esporas, aumentan la formación de micelio extraradical y de nuevas esporas (Awasthi *et al.*, 2011; Roesti *et al.*, 2005; Fernández-Bidondo *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se observó que las plantas inoculadas con la cepa 8 a temperatura alta presentaron el mejor comportamiento en crecimiento de la planta, mientras que a temperatura baja las plantas inoculadas con la cepa 4 y con ambas cepas 4+8, presentaron mayor desarrollo, aunque sin diferencias estadísticamente significativas para las variables biomasa seca de la parte aérea y área foliar. Este comportamiento se ve reflejado con la población microbiana recuperada en el sitio de alta temperatura, la cual fue mayor para la cepa 8 (53.6×10^3 ufc g^{-1}), que para la cepa 4 (17.7×10^3 ufc g^{-1}).

Lo anterior, puede sugerir que de las dos cepas aisladas del suelo rizósferico de fresa silvestre, la cepa 8 podría tener mejor capacidad de adaptación a eventos de aumento de temperatura vinculado con el crecimiento de la planta. Zhang *et al.* (2014), encontraron que con un incremento de temperatura entre 0.4 a 1.7°C, aumentaba la abundancia de todos los grupos microbianos, excepto de los protozoos. Los microorganismos del suelo tienden a presentar un comportamiento distinto a eventos de aumento de temperatura; mientras que algunas comunidades de microorganismos pueden aumentar su crecimiento otras disminuyen, esto está relacionado con la capacidad de termo-adaptación, cambios en la productividad de la planta, composición química, cantidad y calidad de la materia orgánica, adaptación evolutiva, pérdida del carbono lábil del suelo, entre otros (Wang *et al.*, 2017; Creamer *et al.*, 2015; Bradford *et al.*, 2010; Romero-Olivares *et al.*, 2017).

En este estudio, el porcentaje de colonización micorrízica de la planta y el número de esporas fue mayor en el sitio de baja temperatura con respecto al sitio de alta

temperatura. Monz *et al.* (1994), reportaron una disminución en la colonización micorrízica de *Pascopirum smithii* del 15% con un aumento de temperatura en 4°C. Por otro lado, Martin y Stutz (2004), reportan igualmente una disminución en la colonización de *Capsicum annuum* con un aumento de temperatura, para dos de los tres inóculos utilizados en la investigación. Sin embargo, otros autores reportan un incremento en la colonización micorrízica con un incremento en la temperatura (Heinemeyer y Fitter, 2004; Kytöviita y Ruotsalainen, 2007; Gavito *et al.*, 2005).

El sitio de baja temperatura pudo presentar una mayor colonización micorrízica en las plantas de *F. mexicana*, debido a una posible limitación de nutrientes, como el N, dada una menor mineralización de la materia orgánica del suelo (Zhou *et al.*, 2011) o a una inmovilización de N por parte de las comunidades microbianas (Wilson y Agnew, 1992). Pese a que se encontró un mayor porcentaje de colonización en las raíces de fresa silvestre a baja temperatura, estas no mostraron una biomasa aérea mayor a la del sitio de alta temperatura, lo que indica que las especies micorrízicas presentes en el suelo no beneficiaron el crecimiento y transferencia de nutrientes a la planta, como se ha observado en ecosistemas fríos (Kytöviita y Ruotsalainen, 2007).

En cuanto a la diversidad metabólica microbiana determinada con el índice de Shannon-Weaver (H') y la equidad (E), estas fueron mayores en el sitio de baja temperatura, mientras que la dominancia de Simpson (D) fue mayor en el sitio de alta temperatura, vinculada principalmente a la actividad metabólica de las comunidades microbianas asociadas a los sustratos de los ácidos carboxílicos. Sin embargo, en general se observó una disminución en cuanto a la actividad metabólica en el sitio de alta temperatura. Estos resultados son similares a los encontrados por Wang *et al.* (2017), reportaron menor diversidad con un incremento de temperatura, así como una disminución en los patrones de utilización de las diferentes fuentes de sustratos.

La composición, estructura, abundancia, diversidad, funcionalidad y crecimiento de las comunidades microbianas, incluyendo los hongos micorrízicos arbusculares; así como la actividad enzimática, pueden ser afectadas por el incremento en la temperatura del suelo

(Staddon *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2014). Pero a su vez, la respuesta observada puede estar influenciada por los cambios en la fotosíntesis y producción de biomasa seca de la planta derivado de un aumento en la temperatura del ambiente, debido a que la planta puede mover una mayor cantidad de carbono hacia el suelo (materia orgánica y exudados de la raíz), afectando fuertemente la disponibilidad de sustrato y con ello el crecimiento y la actividad de las comunidades microbianas (Staddon *et al.*, 2002; Pendall *et al.*, 2003; Berg y Steinberger, 2008; Zhang *et al.*, 2014).

El aumento de temperatura, vinculado al cambio climático puede tener efectos negativos o positivos, tanto en la superficie del suelo (plantas) como debajo de ella. La respuesta de las plantas al ambiente, es diferente dependiendo la condición de estrés o cambio al que se someta, o las combinaciones de estos, así como de las características genotípicas y fenotípicas de la planta. Además, los microorganismos del suelo están estrechamente relacionados con los cambios que ocurren dentro de la planta, y en muchos casos su desarrollo depende de esta, pero a su vez están fuertemente vinculados a los eventos que ocurren constantemente en el suelo, que finalmente responden a los cambios en el ambiente. Por tanto, un simple cambio en uno o más factores del ambiente puede desencadenar gran cantidad de eventos dentro del ecosistema, y con ello una variedad de respuestas, que en muchos casos pueden dar como resultado patrones similares o diferentes.

5.7. CONCLUSIONES

- *Fragaria mexicana* y las comunidades microbianas asociadas a su rizósfera, se encuentran mejor adaptadas a condiciones frías (19.6°C), debido a que esta planta naturalmente crece en altitudes altas con temperaturas entre 10-14°C, sin embargo, estas podrían llegar a adaptarse bajo condiciones de cambio climático y colonizar nuevas áreas.
- En este estudio un aumento en la temperatura de 5.1°C, presentó un efecto negativo para la reproducción de las plantas, la biomasa radical y las comunidades microbianas asociadas a ella.

- El incremento en la temperatura presentó un efecto positivo sobre la biomasa aérea, la altura de la planta y el área foliar.
- El porcentaje de colonización micorrízica en las plantas de *F. mexicana* fue estadísticamente mayor a temperatura baja.
- El sitio con temperatura baja presentó mayor diversidad y equidad en las comunidades microbianas de la rizósfera, mientras que el sitio de alta temperatura presentó mayor dominancia, principalmente dada por la actividad metabólica en el grupo de los ácidos carboxílicos.
- El incremento en la temperatura afectó negativamente la población de BFN recuperadas del suelo rizosférico de *F. mexicana*, la cual fue mayor en el sitio de baja temperatura.
- La respiración del suelo fue mayor en el sitio de alta temperatura, lo cual puede estar relacionado con una mayor tasa de descomposición de materia orgánica y mineralización del suelo.

5.8. LITERATURA CITADA

- Asseng, S., I. Foster y N. C. Turner. 2011. The impact of temperature variability on wheat yields. *Global Change Biology* 17, 997–1012.
- Awasthi, A., N. Bharti, P. Nair, R. Singh, A. K. Shukla, M.M. Gupta, M.P. Darokar y A. Kalra. 2011. Synergistic effect of *Glomus mosseae* and nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain Daz26 on artemisinin content in *Artemisia annua* L. *Applied Soil Ecology* 49, 125 – 130.
- Baker, A. S. 1969. Colorimetric determination of nitrate in soil and plant extracts with brucine. En: *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 17, 802.
- Baker, N. R. y E. Rosenqvist. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55(403), 1607–1621.
- Baker, N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology* 59, 89–113.

- Bär, R., E. Rouholahnejad, K.C. Abbaspour, A. Lehmann. 2015. Climate change and agricultural water resources: A vulnerability assessment of the Black Sea catchment. *Environmental Science & Policy* 46, 57 – 69.
- Benlloch-González, M., J.M. Quintero, M. P. Suárez, R. Sánchez-Lucas, R. Fernández-Escobar y M. Benlloch. 2016. Effect of moderate high temperature on the vegetative growth and potassium allocation in olive plants. *Journal of Plant Physiology* 207, 22–29.
- Berg, N. y Y. Steinberger. 2008. Role of perennial plants in determining the activity of the microbial community in the Negev Desert ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 2686–2695.
- Biasi, C., H. Meyer, O. Rusalimova, R. Hämmerle, C. Kaiser, C. Baranyi, H. Daims, N. Lashchinsky, P. Barsukov y A. Richter. 2008. Initial effects of experimental warming on carbon exchange rates, plant growth and microbial dynamics of a lichen-rich dwarf shrub tundra in Siberia. *Plant Soil* 307, 191 – 205.
- Björkman, O. y B. Demmig. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489 – 504.
- Boese, S.R. y N.P.A. Huner. 1990. Effect of growth temperature and temperature shifts on spinach leaf morphology and photosynthesis. *Plant Physiology* 94, 1830-1836.
- Bolhar-Nordenkamp, H. R., S. P. Long, N. R. Baker, G. Öquist, U. Schreiber y E. G. Lechner. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3, 497-514.
- Bradford, M.A., B.W. Watts y C. Davies. 2010. Thermal adaptation of heterotrophic soil respiration in laboratory microcosms. *Global Change Biology* 16, 1576–1588.
- Bray, R. y L. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59, 39-45.
- Bronson, D. R., S. T. Gower, M. Tanner, S. Linder y I. van Herk. 2008. Response of soil surface CO₂ flux in a boreal forest to ecosystem warming. *Global Change Biology* 14, 856–867.

- Cao, Y., Y. Xiao, H. Huang, J. Xu, W. Hu y N. Wang. 2016. Simulated warming shifts the flowering phenology and sexual reproduction of *Cardamine hirsuta* under different planting densities. *Scientific Reports* 6, 1-9.
- Castro, H.F., A.T. Classen, E.E. Austin, R.J. Norby y C.W. Schadt. 2010. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology* 999 – 1007.
- Chabot, B.F. y J. F. Chabot. 1977. Effects of light and temperature on leaf anatomy and photosynthesis in *Fragaria vesca*. *Oecologia* 26, 363-377.
- Choi, K.H. y F.C. Dobbs. 1999. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 36, 203–213.
- Chouard, P. 1960. Vernalization and its relations to dormancy. *Annual Reviews of Plant Physiology* 11, 191-238.
- Chun, T., L. Fa-dong, Q. Yun-feng, Z. nong, G. Cong-ke y Z. Xin. 2017. Effect of experimental warming on soil respiration under conventional tillage and no-tillage farmland in the North China Plain. *Journal of Integrative Agriculture* 16(4), 967 – 979.
- Coleman, D.C. y D. Wall. 2015. Chapter 5: Soil Fauna: Occurrence, Biodiversity, and Roles in Ecosystem Function. En: Eldor, P. (Ed). 2015. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Pp. 111-149.
- Compant, S., M.G.A. van der Heijden y A. Sessitsch. 210. Minireview: Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 197 – 214.
- Creamer, C.A., A.B. de Menezes, E.S. Krull, J. Sanderman, R. Newton-Walters y M. Farrell. 2015. Microbial community structure mediates response of soil C decomposition to litter addition and warming. *Soil Biology & Biochemistry* 80, 175-188.
- Dukes, J. S., N.R. Chiariello, E.E. Cleland, L.A. Moore, M. R. Shaw, S. Thayer, T. Tobeck, H. A. Mooney y C. B. Field. 2005. Responses of Grassland Production to Single and Multiple Global Environmental Changes. *PLOS Biology* 3(10), e319.

- Egamberdiyeva, D. y G. Höflich. 2003. Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 973–978.
- Evans, J. R. y H. Poorter. 2001. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell and Environment* 24, 755–767.
- Fernandez-Bidondo, L., R. Colombo, J. Bompadre, M. Benavides, V. Scorza, V. Silvani, M. Pérgola y A. Godeas. 2016. Short communication: Cultivable bacteria associated with infective propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. Implications for mycorrhizal activity. *Applied Soil Ecology* 105, 86 – 90.
- Flanagan, L.B., E.J. Sharp y M.G. Letts. 2013. Response of plant biomass and soil respiration to experimental warming and precipitation manipulation in a Northern Great Plains grassland. *Agricultural and Forest Meteorology* 173, 40-52.
- Florides, G. A., P. Christodoulides y V. Messaritis. 2013. Reviewing the effect of CO₂ and the sun on global climate. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 26, 639–65.
- Freschet, G.T., E.M. Swart y J.H.C. Cornelissen. 2015. Integrated plant phenotypic responses to contrasting above- and below-ground resources: key roles of specific leaf area and root mass fraction. *New Phytologist* 206, 1247–1260.
- Gavito, M.E. y C. Azcón-Aguilar. 2012. Temperature stress in arbuscular mycorrhizal fungi: a test for adaptation to soil temperature in three isolates of *Funneliformis mosseae* from different climates. *Agricultural and Food Science* 21, 2 – 11.
- Gavito, M.E., P.A. Olsson, H. Rouhier, A. Medina-Peñafiel, I. Jakobsen, A. Bago y C. Azcón-Aguilar. 2005. Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 168, 179–188.
- Ghannoum, O., N.G. Phillips, J.P. Conroy, R.A. Smith, R.D. Attard, R. Woodfield, B.A. Logan, J.D. Lewis y D.T. Tissue. 2010. Exposure to preindustrial, current and future atmospheric CO₂ and temperature differentially affects growth and photosynthesis in *Eucalyptus*. *Global Change Biology* 16, 303–319.

- Goh, C.H., S.M Ko, S. Koh, Y. J. Kim y H.J. Bae. 2012. Photosynthesis and environments: photoinhibition and repair mechanisms in plants. *Journal of Plant Biology* 55, 93 – 101.
- Greer, D.H. 2015. Temperature-dependent responses of the photosynthetic and chlorophyll fluorescence attributes of apple (*Malus domestica*) leaves during a sustained high temperature event. *Planta Physiology and Biochemistry* 97, 139 – 146.
- Greer, D.H. y M.M. Weedon. 2012. Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevines (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. *Plant, Cell and Environment* 35, 1050 – 1064.
- Greer, H.D. 2017. Responses of biomass accumulation, photosynthesis and the net carbon Budget to high canopy temperatures of *Vitis vinifera* L. cv. Semillon vines grown in field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 138, 10 – 20.
- Guenet, B., K. Lenhart, J. Leloup, S. Giusti-Miller, V. Pouteau, P. Mora, N. Nunan y L. Abbadie. 2012. The impact of long-term CO₂ enrichment and moisture levels on soil microbial community structure and enzyme activities. *Geoderma* 170, 331–336
- Harsant, J., L. Pavlovic, G. Chiu, S. Sultmanis y T.L. Sage. 2013. High temperature stress and its effect on pollen development and morphological components of harvest index in the C3 model grass *Brachypodium distachyon*. *Journal of Experimental Botany* 64 (10), 2971–2983.
- Hasanuzzaman, M., K. Nahar, M. M. Alam, R. Roychowdhury y M. Fujita. 2013. Review: Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 9643 – 9684.
- Hatfield, J.L. y J.H. Prueger. 2015. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes* 10, 4–10.
- Heinemeyer, A. y A. H. Fitter. 2004. Impact of temperature on the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: growth responses of the host plant and its AM fungal partner. *Journal of Experimental Botany*, 55 (396), 525-534.
- Henriques, I., S. Araújo, A. Pereira, V. B. Menezes-Oliveira, A. Correia, A.M.V.M. Soares, J. J. Scott-Fordsmand, M. J.B. Amorim. Combined effect of temperature and copper

- pollution on soil bacterial community: Climate change and regional variation aspects. 2015. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111, 153-159.
- Huang, H., M. von Lampe, F. van Tongeren. 2011. Climate change and trade in agricultura. *Food Policy* 36, S9–S13.
- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1132 pp.
- IPCC. 2013. The Physical Science Basis. In: Stocker TF, DQ, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM, editors. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Jain, R. y A. Padey. 2016. Soil enzymes and microbial endophytes as indicators of climate variation along an altitudinal gradient with respect to wheat rhizosphere under mountain ecosystem. *Rhizosphere* 2, 75 – 84.
- Kytöviita, M. y A. L. Ruotsalainen. 2007. Mycorrhizal benefit in two low arctic herbs increases with increasing temperature. *American Journal of Botany* 94(8), 1309–1315.
- Ledesma, N. A. y S. Kawabata. 2016. Responses of two strawberry cultivars to severe high temperature stress at different flower development stages. *Scientia Horticulturae* 211, 319 – 327.
- Leng, G., Q. Tang y S. Rayburg. 2015. Climate change impacts on meteorological, agricultural and hydrological droughts in China. *Global and Planetary Change* 126, 23–34.
- Li, H., S. Yang, Z. Xu, Q. Yan, X. Li, J.D. van Nostrand, A. He, F. Yao, X. Han, J. Zhou, Y. Deng y Y. Jiang. 2017. Responses of soil microbial functional genes to global

- changes are indirectly influenced by aboveground plant biomass variation. *Soil Biology and Biochemistry* 104, 18-29.
- Li, X., T. Takahashi, N. Suzuki y H.M. Kaiser. 2014. Impact of climate change on maize production in Northeast and Southwest China and risk mitigation strategies. *APCBEE Procedia* 8, 11 - 20.
- Li, X., Y. Li, Z. Zhang y X. Li. 2015. Influences of environmental factors on leaf morphology of chinese jujubes. *PLOS ONE* 10(5), 1-16.
- Liebig, M. A., A. Franzluebbbers y R. F. Follett .2012. Chapter 1: Agriculture and Climate Change: Mitigation Opportunities and Adaptation Imperatives. En: Liebig, M. A., A. Franzluebbbers y R. F. Follett. (Eds). 2012. *Managing Agricultural Greenhouse Gases*. Published by Elsevier Inc.
- Liu, Y., J. Mu, K.J. Niklas, G. Li y S. Sun. 2012. Global warming reduces plant reproductive output for temperate multi-inflorescence species on the Tibetan plateau. *New Phytologist* 195, 427–436.
- Liu, Y., S. Liu, S. Wan, J. Wang, H. Wang y K. Liu. 2017. Effects of experimental throughfall reduction and soil warming on fine root biomass and its decomposition in a warm temperate oak forest. *Science of the Total Environment* 574, 1448-1455.
- Liu, Y., S. Liu, S. Wan, J. Wang, J. Luan y H. Wang. 2016. Differential responses of soil respiration to soil warming and experimental throughfall reduction in a transitional oak forest in central China. *Agricultural and Forest Meteorology* 226 – 227, 186 – 198.
- Lizana, X.C., A. Avila, A. Tolaba y J.P. Martinez. 2017. Field responses of potato to increased temperatura during tuber bulking: Projection for climate change scenarios, at high-yield environments of Southern Chile. *Agricultural and Forest Meteorology* 239, 192 – 201.
- Lloyd, J. y J.A. Taylor. On the temperature dependence of soil respiration. *Functional Ecology* 8 (3), 315 – 323.
- Luo, Y. y X. Zhou. 2006. Chapter 2: Importance and Roles of Soil Respiration. En: Luo, Y. y X. Zhou. 2006. *Soil Respiration and the Environment*. Academic Press. p. 328.
- Magurran A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, Princeton.

- Martin, C. A. y J. C. Stutz. 2004. Interactive effects of temperature and arbuscular mycorrhizal fungi on growth, P uptake and root respiration of *Capsicum annuum*. *Mycorrhiza* 14, 241–244.
- Maxwell, K. y G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345), 659 – 668.
- McCubbin, S., B. Smit y T. Pearce. 2015. Where does climate fit? Vulnerability to climate change in the context of multiple stressors in Funafuti, Tuvalu. *Global Environmental Change* 30, 43–55.
- Melillo, J. M., P. A. Steudler, J. D. Aber, K. Newkirk, H. Lux, F. P. Bowles, C. Catricala, A. Magill, T. Ahrens y S. Morrisseau. 2002. Soil Warming and Carbon-Cycle Feedbacks to the Climate System. *Science* 298, 2173 – 2176.
- Monz, C. A., H. W. Hunt, E B. Reeves y E. T. Elliott. 1994. The response of mycorrhizal colonization to elevated CO₂ and climate change in *Pascopyrum smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Plant and Soil* 165, 75-80.
- Müller, F., J. Xu, L. Kristensen, M. Wolters-Arts, P.F.M. de Groot, S. Y. Jansma, C. Mariani, S. Park y I. Rieu. 2016. High-temperature-induced defects in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther and pollen development are associated with reduced expression of B-class floral patterning genes. *PLOS ONE* 11(12), 1 – 14.
- Oliveira, R.P. y W.B. Scivittaro. 2009. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. *Horticultura Brasileira* 27, 091-095.
- Omirou, M., D. A. Fasoula y I.M. Ioannides. 2016. *Bradyrhizobium* inoculation alters indigenous AMF community assemblages and interacts positively with AMF inoculum to improve cowpea performance. *Applied Soil Ecology* 108, 381 – 389.
- Ortiz-Solorio C. y Cuanalo de la Cerda H. 1977. Levantamiento Fisiográfico del Área de Influencia de Chapingo. Colegio de Postgraduados, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Estado de México.
- Pendall, P., S. Bridgham, P.J. Hanson, B. Hungate, D.W. Kicklighter, D.W. Johnson, B.E. Law, Y. Luo, J.P. Megonigal, M. Olsrud, M.G. Ryan y S. Wan. 2004. Research review: Below-ground process responses to elevated CO₂ and temperature: a

- discussion of observations, measurement methods, and models. *New Phytologist* 162, 311–322.
- Peterjohn, W.T., J.M. Melillo, P.A. Steudler y K.M. Newkirk. 1994. Responses of trace gas fluxes and N availability to experimentally elevated soil temperatures. *Ecological Applications* 4(3), 617-625.
- Porcar-Castell, A., E. Juurola, E. Nikinmaa, F. Berninger, I. Ensminger y P. Hari. 2002. Seasonal acclimation of photosystem II in *Pinus sylvestris*. I. Estimating the rate constants of sustained thermal energy dissipation and photochemistry. *Tree Physiology* 28, 1475–1482.
- Porch, T. G. y M. Jahn. 2001. Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. *Plant, Cell and Environment* 24, 723 –731.
- Prasad, P. V. V. y M. Djanaguiraman. 2014. Response of floret fertility and individual grain weight of wheat to high temperature stress: sensitive stages and thresholds for temperature and duration. *Functional Plant Biology*, 41, 1261–1269.
- Rajkumar, M., M. N. V. Prasad, S. Swaminathan y H. Freitas. 2013. Climate change driven plant–metal–microbe interactions. *Review. Environment International* 53: 74–86
- Robertson, G.P. y P.M. Groffman. 2015. Chapter 14: Nitrogen Transformations. En: Eldor, P. (Ed). 2015. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Pp. 421-446.
- Roesti, D., K. Ineichen, O. Braissant, D. Redecker, A. Wiemken y M. Aragno. 2005. Bacteria associated with spores of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11), 6673-6679.
- Romero-Olivares A.L., S.D. Allison y K.K. Treseder. 2017. Review Paper: Soil microbes and their response to experimental warming over time: A meta-analysis of field studies. *Soil Biology & Biochemistry* 107, 32- 40.
- Rossi, F., E. J. Olguín, L. Diels y R. de Philippis. 2015. Microbial fixation of CO₂ in water bodies and in drylands to combat climate change, soil loss and desertification. *New Biotechnology* 32, 109 - 120.

- Rustad, L.E., J.L. Campbell, G.M. Marion, R.J. Norby, M.J. Mitchell, A.E. Hartley, J.H.C. Cornelissen y J. Gurevitch. 2001. A meta-analysis of the response of soil respiration, net nitrogen mineralization, and aboveground plant growth to experimental ecosystem warming. *Oecologia* 126, 543–562.
- Sage, T. L., S. Bagha, V. Lundsgaard-Nielsen, H. A. Branch, S. Sultmanis y R.F. Sage. 2015. The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. *Field Crops Research* 182, 30–42.
- Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company. p. 682.
- Sambrook J., T. Maniatis & R.T. Fritsch. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Segunda Edición. Volumen 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU. p. 1626.
- Sardans, J., J. Peñuelas, M. Estiarte y P. Prieto. 2008. Warming and drought alter C and N concentration, allocation and accumulation in a Mediterranean shrubland. *Global Change Biology* 14, 2304–2316.
- Schindlbacher, A., S. Wunderlich, W. Borken, B. Kitzler, S. Zechmeister-Boltenstern y R. Jandl. 2012. Soil respiration under climate change: prolonged summer drought offsets soil warming effects. *Global Change Biology* 18, 2270–2279.
- Schindlbacher, A., S. Zechmeister-Boltenstern y R. Jandl. 2009. Carbon losses due to soil warming: Do autotrophic and heterotrophic soil respiration respond equally?. *Global Change Biology* 15, 901–913.
- Schneider, A., A. Townsend-Small y D. Rosso. 2015. Impact of direct greenhouse gas emissions on the carbon footprint of water reclamation processes employing nitrification–denitrification. *Science of the Total Environment* 505: 1166–1173.
- Sheehy, J. E., P.L. Mitchell y A.B. Ferrer. 2006. Decline in rice grain yields with temperature: Models and correlations can give different estimates. *Field Crops Research* 98, 151–156.
- Sierra, J., N. Brisson, D. Ripoche y M. Dequé. 2010. Modelling the impact of thermal adaptation of soil microorganisms and crop system on the dynamics of organic matter in a tropical soil under a climate change scenario. *Ecological Modelling* 221, 2850–2858.

- Smith, W.N., B.B. Grant, R.L. Desjardins, R. Kroebel, C. Li, B. Qian, D.E. Wortha, B.G. McConkey y C.F. Drurye. 2013; Assessing the effects of climate change on crop production and GHG emissions in Canada. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 179, 139– 150.
- Sofi, J.A., A.H. Ganie, N.A. Dar, S.A. Bhat, M. Mukhtar, M.A. Dar y S. Ramzan. 2016. Soil microbiological activity and carbon dynamics in the current climate change scenarios: A review. *Pedosphere* 26 (5), 577 – 591.
- Sønsteby, A., K.A. Solhaug y O.M. Heide. 2016. Functional growth analysis of 'Sonata' strawberry plants grown under controlled temperature and daylength conditions. *Scientia Horticulturae* 211 26 – 33.
- Staddon, P.L., A. Heinemeyer y A. H. Fitter. 2002. Mycorrhizas and global environmental change: research at different scales. *Plant and Soil* 244, 253–261.
- Struick, P.C. 2007. Chapter 18: Responses of the potato plant to temperatura. En: Vreugdenhil, D. (Ed.). 2007. *Potato Biology and Biotechnology 1st Edition: Advances and Perspectives*. Elsevier Science. p 856.
- Tripathi, V., P.C. Abhilash, H.B. Singh, N. Singh y D.D. Patra. 2015. Effect of temperature variation on lindane dissipation and microbial activity in soil. *Ecological Engineering* 79, 54 – 59.
- Udaiyan K., A. Karthikeyan y T. Muthukumar. 1996. Influence of edaphic and climatic factors on dynamics of root colonization and spore density of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in *Acacia farnesiana* Willd. and *A. planifrons*. *Trees* 11, 65–71.
- Valencia, E., M. Méndez, N. Saavedra y F.T. Maestre. 2016. Plant size and leaf area influence phenological and reproductive responses to warming in semiarid Mediterranean species. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 21, 31 - 40.
- Vanha-Majamaa I., E. Shorohova, H. Kushnevskaya y J. Jalonen. 2017. Resilience of understory vegetation after variable retention felling in boreal Norway spruce forests – A ten-year perspective. *Forest Ecology and Management* 393, 12-28.
- Vega-Frutis, R., S. Varga y M. M. Kytöviita. 2014. Host plant and arbuscular mycorrhizal fungi show contrasting responses to temperature increase: Implications for dioecious plants. *Environmental and Experimental Botany* 104, 54–64.

- Walkley, A. y I.A. Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37, 29-38.
- Wang, C., X. Zhao, H. Zi, L. Hu, L. Ade, G. Wang y M. Lerdau. 2017. The effect of simulated warming on root dynamics and soil microbial community in an alpine meadow of the Qinghai-Tibet Plateau. *Applied Soil Ecology* 116, 30-41.
- Wilson, J.B. y A.D.Q. Agnew. 1992. Positive-feedback switches in plant communities. *Advances in Ecological Research* 23, 263-336.
- Wu, Z., P. Dijkstra, G.W. Koch, J. Peñuela y B.A. Hungate. 2010. Responses of terrestrial ecosystems to temperature and precipitation change: a meta-analysis of experimental manipulation: Review. *Global Change Biology* 17, 927–942.
- Yao, M., J. Rui, H. Niu, P. Heděnc, J. Li, Z. He, J. Wang, W. Cao, X. Li. 2017. The differentiation of soil bacterial communities along a precipitation and temperature gradient in the eastern Inner Mongolia steppe. *Catena* 152, 47 -56.
- Young, L. W., R.W. Wilen y P.C. Bonham-Smith. 2004. High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *Journal of Experimental Botany* 55 (396), 485 – 495.
- Zak, J.C., M.R Willing, D.L. Moorhead, H.G. Wildman. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1101–1108.
- Zhang, J., C. Peng, Q. Zhu, W. Xue, Y. Shen, Y. Yang, G. Shi, S. Shi y M. Wang. 2016. Temperature sensitivity of soil carbon dioxide and nitrous oxide emissions in mountain forest and meadow ecosystems in China. *Atmospheric Environment* 142, 340 – 350.
- Zhong, Q., J. Gong, K. Wang y C. Zhang. 2014. Effects of 3-year air warming on growth of two perennial grasses (*Phragmites australis* and *Imperata cylindrica*) in a coastal salt marsh reclaimed for agriculture. *Aquatic Botany* 117, 18 – 26.
- Zhou, Y., J. Tang, J.M. Melillo, S. Butler y J. E. Mohan. 2011. Root standing crop and chemistry after six years of soil warming in a temperate forest. *Tree Physiology* 31, 707 – 717.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

- El desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* en *F. mexicana* permitió dilucidar la mejor combinación de reguladores de crecimiento y el tipo de explante adecuado para utilizar durante el cultivo de fresa silvestre *in vitro*.
- La respuesta a un incremento de temperatura de las plantas de *F. mexicana* estuvo dada por un patrón diferente entre la parte aérea y la raíz.
- Los principales cambios fisiológicos ocurridos en las plantas de fresa silvestre (*F. mexicana*) sometida a condiciones de alta temperatura estuvieron relacionados con una mayor tasa de asimilación neta, biomasa seca aérea, área foliar, altura de la planta y fluorescencia de la clorofila.
- La diversidad metabólica en la rizósfera de fresa silvestre (*F. mexicana*) sometida a diferentes condiciones de temperatura, disminuyó al incrementar la temperatura, aumentando el índice de dominancia en las comunidades microbianas.
- La colonización y el número de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la rizósfera de fresa silvestre (*F. mexicana*) bajo diferentes condiciones de temperatura, fue mayor a temperatura baja.
- Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN) en la rizósfera de fresa silvestre (*F. mexicana*) disminuyeron al aumentar la temperatura.
- Los resultados obtenidos en este estudio pueden dar información importante sobre los posibles efectos del cambio climático en plantas de fresa silvestre presentes en bosques templados de México.

- El cambio climático puede afectar negativamente las comunidades microbianas de la rizósfera de fresa silvestre, disminuyendo su población y las interacciones con su hospedero simbiote.
- Las respuestas de las plantas de *F. mexicana* puede estar dada por más de un factor dentro del sistema suelo-planta-ambiente, directa o indirectamente relacionado con el incremento en la temperatura.
- Aunque se observa un efecto positivo de las plantas de fresa silvestre en cuanto a la biomasa seca de la parte aérea; la reproducción de la planta puede ser afectada negativamente por un aumento en la temperatura en 5.1°C.
- El equilibrio de todo el ecosistema de las plantas de *F. mexicana* puede verse ampliamente afectado al aumentar la temperatura, por lo tanto es importante realizar nuevas investigaciones teniendo en cuenta otros factores como la humedad del suelo y analizando más variables como la tasa de mineralización del suelo y descomposición de la materia orgánica; el efecto sobre otras comunidades microbianas; y el movimiento de carbono en el sistema.