



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

## CAMPUS SAN LUIS POTOSÍ

POSTGRADO EN  
INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

**DIVERSIDAD DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS Y SU RELACIÓN CON  
RIZOBACTERIAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE *Pinus  
maximartinezii* Rzedowski.**

**ALEJANDRA ALMARAZ LLAMAS**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México  
Abril de 2019

---



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

### CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe Alejandra Almaraz Llamas, alumno(a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del (la) Profesor(a) Ismael Hernández Ríos, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Diversidad de hongos ectomicorrízicos y su relación con rizobacterias sobre el crecimiento de plantas de "Pinus maximiliana" Benth. y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El (la) Consejero (a) o Director (a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, a 22 de abril de 2019.

Alejandra Almaraz Llamas

Firma

Vo. Bo. Profesor(a) Consejero(a) o Director(a) de Tesis


DR. ISMAEL HERNÁNDEZ RÍOS

La presente tesis titulada: **Diversidad de hongos ectomicorrizicos y su relación con rizobacterias sobre el crecimiento de plantas de *Pinus maximartinezii* Rzedowski** realizada por la alumna **Alejandra Almaraz Llamas** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada y aceptada por el mismo como requisito parcial para obtener el grado de:


**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:   
Dr. ISMAEL HERNÁNDEZ RÍOS

DIRECTOR:   
Dr. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESORA:   
Dra. MARGARITA TORRES AQUINO

ASESOR:   
M.C. MOISÉS CARCAÑO MONTIEL

Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí  
Abril, 2019

**DIVERSIDAD DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS Y SU RELACIÓN CON  
RIZOBACTERIAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE *Pinus maximartinezii***

**Rzedowski.**

**Alejandra Almaraz Llamas, MC  
Colegio de Postgraduados, 2019**

**RESUMEN GENERAL**

La mayoría de las plantas terrestres forman estructuras micorrízicas especializadas con hongos simbióticos. Estos mejoran el establecimiento y desarrollo de las plantas asociadas, mediante la modificación del sistema radical, al facilitar una mayor captación de agua y nutrientes del medio, especialmente cuando existe una baja disponibilidad de los recursos. Un factor biótico adicional es el uso de bacterias auxiliaoras de la micorrización, cuyas propiedades benéficas incrementan los beneficios originados por las micorrizas. Por ello, se ha estudiado su uso potencial como herramienta biotecnológica en aplicaciones forestales, particularmente para futuras prácticas de manejo y recuperación de poblaciones forestales. *Pinus maximartinezii* Rzed. es una especie de importancia económica y ecológica, endémica de México y catalogada en peligro de extinción, debido a su distribución restringida y baja densidad poblacional. Por lo tanto, se considera de gran relevancia conocer las interacciones simbióticas, tales como, la simbiosis ectomicorrízica y los microorganismos asociados. Con el fin de desarrollar estrategias de conservación y manejo de esta especie forestal. En el presente trabajo se determinó la abundancia y riqueza de morfotipos de hongos EcM asociados a *P. maximartinezii* en una de sus áreas de distribución natural. Se realizó la caracterización morfológica de los morfotipos HEcM registrados. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la inoculación de cuatro fuentes de inóculo ectomicorrízico (*Laccaria proxima*, *Helvella lacunosa*, suelo nativo y suelo nativo incendiado) y la coinoculación de la rizobacteria *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento, contenido nutrimental y porcentaje de micorrización de los árboles. En total, se registraron un total de 18 morfotipos EcM asociados a árboles adultos de *P. maximartinezii* durante dos temporadas de muestreo, de los cuales tres (MZac2, MZac5 y MZac 8) representaron aproximadamente el 90% del número total de puntas de ápices ectomicorrizados. De acuerdo al conjunto de características

morfoanatómicas distintivas, se identificó de forma confiable al morfotipo MZac5 como *Cenococcum geophilum*. Este morfotipo fue el más abundante, dado que se registró en el 42.5% del total de raíces ectomicorrizadas vivas (18.3 y 24.2% para época seca y de lluvia respectivamente). Se observó un efecto sinérgico de los hongos (*L. proxima* o *H. lacunosa*) y la bacteria *A. brasilense*, en términos de biomasa, diámetro y altura; aunque en algunas de éstas el valor fue similar o superior cuando se implementaron los HEcM sin la bacteria. Las plantas inoculadas con *H. lacunosa* y *H. lacunosa* + *A. brasilense* presentaron mejor calidad, la cual se expresó en un mayor crecimiento que las plantas sin inocular y las inoculadas exclusivamente con la bacteria. De la misma manera, estas plantas coinoculadas presentaron mayores contenidos de macronutrientes y micronutrientes, aunque la mayor movilización nutrimental (P, K, Fe, Na y Zn) en la parte aérea se observó en las plantas inoculadas con *L. proxima*. La colonización micorrízica varió de 68.69 a 92.73%, registrándose el mayor porcentaje en plantas inoculadas con suelo nativo + *A. brasilense*. Se registraron un total de ocho morfotipos EcM asociados a plantas jóvenes de pino azul en las que se inoculó suelo nativo. Por consiguiente, se concluye que la inoculación individual de hongos EcM y dual de bacterias como *A. brasilense* pueden mejorar la calidad fisiológica y nutrimental de plantas de *P. maximartinezii*, sin embargo, el conocimiento e implementación de los HEcM y bacterias nativas representan un enorme potencial biotecnológico en la producción de plantas de dicha especie forestal en peligro de extinción.

**Palabras clave:** ectomicorrizas; especie endémica; pinos en peligro de extinción; inoculación.

**DIVERSITY OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI AND ITS RELATIONSHIP WITH  
RHIZOBACTERIA ON *Pinus maximartinezii* Rzedowski PLANT GROWTH**

**Alejandra Almaraz Llamas, MSc.**

**Colegio de Postgraduados, 2019**

**GENERAL ABSTRACT**

Most terrestrial plants form specialized mycorrhizal structures with symbiotic fungi. These improve the establishment and development of the associated plants, through the modification of the root system, by facilitating greater uptake of water and nutrients from the environment, especially when resources are scarce. An additional biotic factor is the use of mycorrhizal helper bacteria, whose beneficial functions increase the benefits of mycorrhizae. For this reason, its potential use as a biotechnological tool in agricultural and forestry applications has been actively studied, particularly for future management practices and recovery of forest populations. *Pinus maximartinezii* Rzed. is an endemic species of Mexico of economic and ecological importance, considered in danger of extinction, due to its restricted distribution and low population density. Therefore, it is considered of great importance to increase the knowledge of important interactions such as ectomycorrhizal symbiosis and associated microorganisms for the development of management strategies in order to conserve and increase their population. In the present work, the abundance and richness of EcM morphotypes associated with *P. maximartinezii* were determined in their natural distribution areas. The morphological characterization of the EcM morphotypes collected was carried out. Additionally, the effect of the inoculation of four sources of ectomycorrhizal inoculum (*Laccaria proxima*, *Helvella lacunosa*, native soil and burned native soil) and the co-inoculation of the rhizobacteria *Azospirillum brasilense* on the growth, nutritional content and percentage of mycorrhization of the trees was evaluated. In total, 18 EcM morphotypes associated with adult

*P. maximartinezii* trees were recorded during two sampling seasons of which three (MZac2, MZac5 and MZac8) represented approximately 90% of the total number of tips of ectomycorrhizal apices. According to the set of distinctive morphoanatomical features, the MZac5 morphotype was reliably identified as *Cenococcum geophilum*. This morphotype was the most abundant, given that it was recorded in 42.5% of the total live ectomycorrhizal roots (18.3 and 24.2% for dry and rainy seasons respectively). A synergistic effect of the fungus (*L. proxima* and *H. lacunosa*) and the bacterium (*A. brasilense*) was observed in terms of biomass, diameter and height, although in some of these the value was similar or higher when the HEcM were implemented without the bacteria. The plants inoculated with *H. lacunosa* and *H. lacunosa* + *A. brasilense* showed better physiological quality than the plants non inoculated or those inoculated exclusively with the bacteria. In the same way, these co-inoculated plants presented higher contents of macronutrients and micronutrients, although the greater nutrimental mobilization to aerial part (P, K, Fe, Na and Zn) was observed in the plants inoculated with *L. proxima*. The mycorrhizal colonization varied from 68.69 to 92.73%, registering the highest percentage in plants inoculated with native soil + *A. brasilense*. A total of eight EcM morphotypes associated with young blue pine plants in which native soil was inoculated were recorded. Therefore, it is concluded that the individual inoculation of EcM and dual fungi of bacteria such as *A. brasilense* can improve the physiological and nutritional quality of plants of *P. maximartinezii*, since their implementation and knowledge of native HEMCs represent an enormous biotechnological potential in the production of plants of said forest species in danger of extinction.

**Keywords:** ectomycorrhizae; endemic species; endangered pines; inoculation.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada durante la realización del postgrado.

Al personal del **Colegio de Postgraduados (COLPOS), Campus San Luis Potosí**, por su ayuda y facilidades en procesos académicos y administrativos.

A la **Dra. Margarita Torres Aquino**, quien me brindo en primer lugar la oportunidad de trabajar a su lado bajo su invaluable asesoría y amistad. Le agradezco me compartiera el mundo apasionante de las micorrizas, me iniciara en este y aprendiéramos juntas. Le doy gracias por el tiempo invertido en el trabajo, por las horas de relax, cafecitos, pláticas y risas, de igual manera por el ánimo constante y preocupación por que todo saliera bien y a tiempo. Sin olvidar las numerosas oportunidades brindadas, por confiar en mí y hacerme crecer. Le aprecio de corazón.

Al **Dr. Jesús Pérez Moreno** pionero y apasionado de las ectomicorrizas que me brindó su apoyo y amistad desde el inicio. Le agradezco su optimismo, motivación y el adentrarme de a poco a poco en esta hermosa simbiosis, cada vez que visitaba su oficina. Por permitirme formar parte de su equipo y hacerme sentir como en casa. Gracias infinitas por compartir su conocimiento y las experiencias vividas con el reino Fungi y las ectomicorrizas que siempre llevare en mis recuerdos.

Al **Dr. Ismael Hernández Ríos** por el apoyo brindado durante la maestría y en la presente investigación.

Al **M.C. Moisés Carcaño Montiel** por su apoyo y disponibilidad en cualquier momento y aportaciones en el presente proyecto.

A mis padres **Rosa Martha Llamas Zamora** y **Luis Ignacio Almaraz Rojas**, principalmente porque fruto de su esfuerzo constante, día a día es lo que hoy me tiene aquí, finalizando esta etapa. Los amo. Gracias padre por el oído, el consejo y ánimo, la ayuda brindada, por el cariño, entusiasmo y por adentrarse en lo que ahora es mi mundo, por comprenderlo y transmitirlo. Gracias madre mía por el amor profesado, por los abrazos, por los te quiero, por los ánimos, por sufrir conmigo en la distancia y cercanía, por confiar en mí, por darme fuerzas,



por escucharme, por ser grande, por trasmitirme ese amor por los demás, por la comida cuando me encontraba cerca, que nada sabe más rico, ni extrañe tanto en la distancia que la comida de mamá. Gracias madre.

A **Mauricio Berumen Jiménez** culpable de mi crecimiento personal y profesional, por adentrarse a mi lado en la ciencia, por soñar juntos por algo mejor para nosotros y el mundo, por animarme a dar este paso y muchos otros que se presentaron a lo largo de esta etapa. Gracias infinitas por tu amor, enorme apoyo y presencia incondicional cuando esto se ponía difícil. Por aventurarte a mi lado, por los viajes y todas las bonitas experiencias que esta oportunidad nos permitió vivir. Por el cariño, por escucharme una y otra vez, por esperarme, por tu paciencia que en veces parecía agotarla. Por tu motivación cuando sentía no poder y me invadían mil miedos y frustraciones, así como mostrarme que no pasa nada y ayudarme con ello inmensamente en mi confianza. Agradezco tu admiración que no basta con aclarar que es mutua. Te agradeceré infinitamente por darme ese empujoncito para estar aquí, porque fuiste pieza clave en mi proyecto y ahora lo que considero mi pasión. Te amo.

Al **Ingeniero Isaac Quintero Quintero** quien siempre se mostró con la mejor disponibilidad para recibarnos y llevarnos al predio y área natural protegida Pino azul, le agradezco de corazón las atenciones y su amistad. De igual manera a **Elías Magallanes** quien nos ayudó arduamente en la recolección de raíces y en llevarnos y hacernos regresar con bien siempre.

A compañeros y amigos que conocí durante esta etapa y que me brindaron su amistad durante la Maestría, que hicieron de mis días llevaderos con complicidades, risas y colaboración de manera directa o indirecta en esta investigación: **Adriana, Alfredo, Norma, Dra. Alejandra, Paty, Lenin, Elizabeth (Scarlet), Luis Carlos, Eyra, Iris, M.C. Clarita, Yeimy, Abigail, Paola, Julieta, Karina, Jonathan (Teo), Liz, Rodolfo, Nilda, Mayra, Alfonso, Cristina, Dra. Magda y Dr. Faustino.**

## CONTENIDO

RESUMEN GENERAL .....	iii
GENERAL ABSTRACT .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE CUADROS .....	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
LITERATURA CITADA .....	6
<b>CAPITULO I. ESTACIONALIDAD, DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD ECTOMICORRÍZICA ASOCIADA CON <i>Pinus maximartinezii</i> Rzed. ....</b>	<b>10</b>
1.1. RESUMEN.....	10
1.2. ABSTRACT .....	11
1.3. INTRODUCCIÓN.....	12
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
1.4.1. Área de estudio y recolecta de material biológico.....	14
1.4.2. Caracterización y análisis de la comunidad de hongos ectomicorrízicos....	15
1.4.3. Análisis de diversidad .....	15
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
1.5.1. Caracterización y análisis de la comunidad de hongos ectomicorrízicos....	18
1.5.2. Caracteres macroscópicos de morfotipos ectomicorrízicos .....	20
1.5.3. Porcentaje de abundancia de morfotipos ectomicorrízicos registrados en ambas épocas de muestreo .....	29
1.5.4. Diversidad de morfotipos ectomicorrízicos .....	31
1.6. CONCLUSIONES.....	35
1.7. LITERATURA CITADA .....	36
<b>CAPITULO II. PRIMER REGISTRO DE LA ESPECIE ECTOMICORRÍZICA <i>Cenococcum geophilum</i> Fr. CON <i>Pinus maximartinezii</i> Rzed. ÁRBOL NATIVO DE MÉXICO .....</b>	<b>42</b>
2.1. RESUMEN.....	42
2.2. ABSTRACT .....	43
2.3. INTRODUCCIÓN.....	44
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.4.1. Localización del área de estudio .....	46
2.4.2. Recolecta del material biológico .....	47
2.4.3. Caracterización morfológica de <i>C. geophilum</i> .....	48
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
2.5.1. Descripción del morfotipo <i>Cenococcum geophilum</i> Fr. con <i>P. maximartinezii</i>	

2.6.	CONCLUSIONES.....	53
2.7.	LITERATURA CITADA .....	54
<b>CAPITULO III. EFECTOS DE LA COINOCULACION DE HONGOS ECTOMICORRIZICOS Y LA BACTERIA <i>Azospirillum brasillense</i> SOBRE EL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN DE <i>Pinus maximartinezii</i> Rzed.</b> .....		
3.1.	RESUMEN.....	60
3.2.	ABSTRACT .....	61
3.3.	INTRODUCCIÓN.....	62
3.4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
3.4.1.	Material vegetal .....	64
3.4.2.	Material biológico .....	65
3.4.3.	Cepas bacterianas .....	65
3.4.4.	Diseño experimental.....	66
3.4.5.	Variables evaluadas.....	67
3.4.5.1.	Crecimiento vegetal de <i>P. maximartinezii</i> .....	67
3.4.5.2.	Análisis nutrimental .....	68
3.4.5.3.	Porcentaje de micorrización.....	68
3.4.6.	Caracterización macromorfológica de las ectomicorrizas en asociación con <i>P. maximartinezii</i> .....	69
3.4.7.	Análisis estadístico .....	71
3.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
3.5.1.	Variables evaluadas en crecimiento vegetal .....	71
3.5.2.	Contenido nutrimental.....	75
3.5.3.	Absorción nutrimental parte aérea: raíz (pa: pr).....	83
3.5.4.	Porcentaje de micorrización .....	85
3.6.	Caracterización de los morfotipos ectomicorrízicos .....	87
3.7.	CONCLUSIONES.....	98
3.8.	LITERATURA CITADA .....	100
CONCLUSIONES GENERALES .....		109

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución de los sitios de muestreo a) *Pinus maximartinezii*; b) Estróbilo del pino azul (reportado como uno de los conos de mayor tamaño (30 cm); c) Sitios de muestreo en Sierra Morones cercanos a la localidad de Juchipila, con una superficie total de 1,495 m<sup>2</sup>. ..... 14
- Figura 2.** Apices ectomicorrizados sencescentes encontrados en *Pinus maximartinezii* en dos épocas de muestreo ..... 18
- Figura 3.** Imagen de la izquierda MZac1 en *P. maximartinezii*, imagen de la derecha, *Thelephora terrestris* - *Pinus sylvestris* (Aleksandrowicz-Trzcinska, 2018). ..... 27
- Figura 4.** Imagen de la izquierda MZac14 en *P. maximartinezii*, imagen de la derecha, *Pseudotomentella tristis* en *Pinus pinaster*, reportado por Pestaña-Nieto y Santolamazza (2009). ..... 28
- Figura 5.** Porcentaje de abundancia total de morfotipos ectomicorrízicos asociados a *P. maximartinezii* en época de sequía y lluvia. .... 29
- Figura 6.** Cortes histológicos de raíces de *P. maximartinezii* ectomicorrizada con los morfotipos más abundantes en ambas temporadas de muestreo (Me = manto externo; he = hifa extraradical; rh = red de Hartig). ..... 31
- Figura 7.** Ectomicorriza de *Cenococcum geophilum* con *Pinus maximartinezii*. a) Morfotipo ectomicorrízico dicotómico (4X); b) Morfotipo ectomicorrízico simple (2.1X); c) Corte transversal: manto (m) y red de Hartig (rH) (40X); d) Manto plectenquimatoso melanizado t tipo G; e) esclerocio característico de *C. geophilum* (4.5X); f) Manto plectenquimatoso (mp) con hifa emanante (he) (40X) (Barra = 0.5mm). ..... 52
- Figura 8.** Aspectos generales del bioensayo. a) predio Pino azul (Área Natural Protegida); b) semillas y estróbilo de *P. maximartinezii*; c) inoculación líquida del hongo *L. proxima*; d) inoculación del hongo *H. lacunosa*; e) inoculación de suelo nativo incendiado; f) módulos y tratamientos. .... 70
- Figura 9.** Relación parte aérea: raíz en los tratamientos evaluados. .... 84
- Figura 10.** Ectomicorriza de *Pinus maximartinezii* inoculada con *Laccaria proxima*. a) morfotipo EcM de *L. proxima* en estadio joven-inmaduro, visto a 2.0X; b) 2.0X c) 2.0X; d) corte transversal de la ectomicorriza mostrando red de hartig (rH) manto (m) y restos de pelos radicales (pr) vista en 40X (Barra= 1 mm). ..... 88

<b>Figura 11.</b> Ectomicorriza de <i>H. lacunosa</i> en <i>Pinus maximartinezii</i> . Morfotipos a) 1.0X; b) 1.6X; c) 0.63X; d) corte transversal: red de Hartig (rH), manto (m). (Barra= 1 mm). .....	89
<b>Figura 12.</b> Morfotipo EcM (M1_Sn) en suelo nativo asociado a <i>P. maximartinezii</i> , a) 0.8X; b) 1.0X; c) 0.63X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm). .....	90
<b>Figura 13.</b> Morfotipo EcM (M2_Sn) en suelo nativo (SN) asociado a <i>Pinus maximartinezii</i> , a) 1.6X; b) 1.8X; c) 2.0X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm). .....	90
<b>Figura 14.</b> Morfotipo ectomicorrizico (M3_Sn) en el tratamiento de suelo nativo (SN) asociado a <i>P. maximartinezii</i> ; a) 0.8X; b) 0.8X; c) 0.8X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm). .....	91
<b>Figura 15.</b> Morfotipo ectomicorrizico (M4_Sn) asociado a plantas jóvenes (14 meses) de la especie de pino <i>P. maximartinezii</i> , a) 0.8X; b) 1.6x; c) 2.0X; d) corte transversal: red de Hartig (rH), manto (m). (Barra= 1 mm).....	92
<b>Figura 16.</b> Morfotipo EcM (M5_Sn) asociado a plantas jóvenes de la especie <i>P. maximartinezii</i> , a) 1.0X; b) 2.5X; c) 3.2X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm). .....	93
<b>Figura 17.</b> Morfotipo EcM (M6_Sn) en el tratamiento suelo nativo en plantas de <i>P. maximartinezii</i> , a) 0.63X; b) 2.0X; c) 2.5X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm). .....	94
<b>Figura 18.</b> Morfotipo EcM (M7_Sn) en el tratamiento suelo nativo, suelo nativo incendiado y suelo nativo incendiado + <i>A. brasilense</i> en plantas de <i>P. maximartinezii</i> , a) 2.5X; b) 1.25X; c) 1.25X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm). .....	95
<b>Figura 19.</b> Morfotipo EcM (M8_Sni) en el tratamiento suelo nativo incendiado y suelo nativo incendiado + <i>A. brasilense</i> en plantas de <i>P. maximartinezii</i> , a) 2.5X; b) 2.5X; c) 1.6X; d) corte transversal: red de Hartig (rH), manto (m), hifas emanantes (hf). (Barra= 1 mm).....	96

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Número y abundancia de ápices EcM en asociación con <i>P. maximartinezii</i> , registrados durante dos épocas del año. ni= número de ápices ectomicorrízicos por morfotipo i; pi= abundancia proporcional de morfotipo i (pi= ni/N) por estación. ....	19
<b>Cuadro 2.</b> Características macroscópicas principales de los morfotipos ectomicorrízicos asociados a la especie forestal <i>P. maximartinezii</i> en época de sequía. ....	20
<b>Cuadro 3.</b> Características macroscópicas principales de los morfotipos ectomicorrízicos asociados a la especie forestal <i>P. maximartinezii</i> en época de lluvia. ....	23
<b>Cuadro 4.</b> Características macroscópicas principales de los morfotipos ectomicorrízicos asociados a la especie forestal <i>P. maximartinezii</i> en época seca y de lluvia. ....	24
<b>Cuadro 5.</b> Diversidad de morfotipos ectomicorrízicos registrados en asociación con <i>Pinus maximartinezii</i> . ....	32
<b>Cuadro 6.</b> Valores de referencia para la condición de diversidad (Margalef, 1972). ....	32
<b>Cuadro 7.</b> Tratamientos establecidos con plantas de <i>P. maximartinezii</i> . ....	67
<b>Cuadro 8.</b> Peso seco de la parte aérea y radical, diámetro del tallo y altura de plantas de <i>Pinus maximartinezii</i> Rzed. 398 días después de la inoculación de cuatro distintas fuentes de inóculo ectomicorrízico y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal ( <i>Azospirillum brasilense</i> ). ....	73
<b>Cuadro 9.</b> Contenido de macronutrientes de la parte aérea y raíz en plantas de <i>P. maximartinezii</i> Rzed. inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> , <i>LACUNO lacunosa</i> , suelo nativo, suelo nativo posterior a un incendio y <i>Azospirillum brasilense</i> . ....	77
<b>Cuadro 10.</b> Contenido de macronutrientes de la parte aérea y raíz de plantas de <i>P. maximartinezii</i> Rzed. inoculados con <i>Laccaria proxima</i> , <i>Helvella lacunosa</i> , suelo nativo, suelo nativo posterior a un incendio y <i>Azospirillum brasilense</i> . ....	80
<b>Cuadro 11.</b> Colonización ectomicorrízica de las raíces cortas en plantas de <i>P. maximartinezii</i> inoculadas y coinoculadas. ....	85



## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los bosques de coníferas en México ocupan cerca del 16% de la superficie total del territorio, lo que equivale aproximadamente a 34 millones de ha (Rzedowski, 2006; SEMARNAT, 2013). El país cuenta con cuatro de las seis familias de coníferas reconocidas a nivel mundial (Cupressaceae, Pinaceae, Podocarpaceae y Taxaceae), distribuidas en 10 de los 71 géneros, que a su vez representan 14% de la diversidad mundial con un total de 95 especies de coníferas distribuidas dentro del territorio mexicano (Gernandt y Pérez de la Rosa, 2014). De éstas, más de la mitad corresponden a la familia Pinaceae, representada en su mayoría por especies de coníferas pertenecientes al género *Pinus*, lo que convierte al país en el principal centro de diversificación y riqueza de pinos con aproximadamente 46 de las 113 especies reportadas en el mundo (Farjon y Styles, 1997; Gernandr y Pérez de la Rosa, 2014; Barrera-Zubiaga *et al.*, 2018; Romero-Sanchez *et al.*, 2018). De manera que el endemismo del género *Pinus* para México es alto, pues alberga 29 especies únicamente encontradas en el territorio nacional (Farjon y Filer, 2013), de los cuales se estima 10 taxones pertenecen a la subsección Cembroides, en donde se agrupan los pinos piñoneros, especies caracterizadas por formar comunidades o bosques aislados de poca extensión (Barrera-Zubiaga *et al.*, 2018), Como el conformado al sur del estado de Zacatecas por la especie de pino piñonero *Pinus maximartinezii* Rzedowski.

*Pinus maximartinezii*, fue descrito por primera ocasión por J. Rzedowski en 1964, al sur del estado de Zacatecas, dentro del Cerro de Piñones de la Sierra de Morones colindante al municipio de Juchipila. Durante más de cuatro décadas fue considerado exclusivo a dicha localidad (Ledig *et al.*, 1999). Sin embargo, en 2010 se corroboró la presencia de una segunda población en el sur del estado de Durango, cerca del poblado La Muralla, municipio de El Mezquital, aproximadamente a 190 km al noroeste de la localidad tipo (González-Elizondo *et al.*, 2011). Actualmente, *P. maximartinezii* se considera como una especie con restricción geográfica.



El pino azul, piñon real o maxipiñon, como de manera común se le conoce, es una especie endémica de México cuya relación taxonómica con el resto de los pinos piñoneros es incierta (Ledig *et al.*, 2001). Se considera el más extraño de los 9 a 12 piñoneros que se estima existen en el país (Gernandt y Pérez de la Rosa, 2014), debido a que la mayoría de estos producen pequeños conos con frágiles escamas, a diferencia del cono del maxipiñon de mayor tamaño y amaderado (Ledig *et al.*, 1999), con una magnitud superior a los 30 cm y un peso mayor a los dos kilos (López-Mata y Galván-Escobedo, 2011), mientras que sus semillas tienen un tamaño superior a los 25 mm de largo y 12.8 mm de ancho, las cuales poseen excelentes propiedades alimenticias, ya que cuentan con un contenido de 18 aminoácidos, incluyendo todos los esenciales y seis ácidos grasos (84% de ellos insaturados) (López-Mata, 2001-2013), características que han llevado a comercializarlas en mercados locales, nacionales e internacionales. Además de ser una especie adaptada a condiciones de escasa humedad, suelos someros, rocosos y muy secos (López-Mata y Galván-Escobedo, 2011).

De acuerdo a estimaciones de Donahue y Mar-López (1995), la población de pino azul para el sur de Zacatecas se extiende en un total de 400 ha, con una población de entre 2000-2500 árboles maduros dispersos a lo largo de suelos calcáreos. No obstante, existe discrepancia en cuanto al número de individuos, pues se encuentran estimaciones de una población total de 60,548 individuos maduros distribuidos en 415 ha de una superficie total de 3,500 ha (Lara-Rodríguez, 1997), lo que probablemente es reflejo de diferentes estrategias de muestreo. Datos más recientes reportan que *P. maximartinezii* se distribuye en una superficie disgregada de 375 km<sup>2</sup>, con una superficie real de solo 35 km<sup>2</sup> y una población probablemente de 10,000 individuos maduros (Farjon, 2013).

Debido a su distribución natural restringida, hábitat fragmentado y una regeneración escasa o prácticamente inexistente (producto de la cosecha de piñon para fines de consumo y venta) (Perry, 1991). En 2010 fue reclasificado por la SEMARNAT dentro de la NOM-059 como una especie en peligro de extinción, sujeta a protección especial, misma condición señalada por la lista roja de especies amenazadas (IUCN, 2018), en donde se reporta a los incendios en tiempos recientes como el

principal factor de destrucción de parte de la población (tres generaciones, estimadas en alrededor de 150 años).

Aunque existen registros de que *P. maximartinezii* ha sido utilizado en programas de conservación *ex situ*, empleada por ejemplo por parte del programa internacional CAMCORE (Cooperativa de Recursos de Coníferas de Centroamérica y México) en países como Brasil, Sudáfrica y Zimbabwe (Donahue y Mar-López, 1995; Romero *et al.*, 2001; Jiménez-Hernández, 2015), el planteamiento de estrategias y medidas de conservación *in situ* para el establecimiento y supervivencia de esta especie endémica es una gran problemática, puesto que principalmente se distribuye en predios particulares y de difícil acceso. Por otra parte, ha sido una especie forestal frecuentemente amenazada por factores de perturbación como la sequía y el fuego, dando como resultado una rápida reducción de sus poblaciones que prosperan en el área natural y en bajas tasas de supervivencia cuando es reintroducida (CONAFOR, 2011).

Lo anterior, asociado a los programas de reforestación que se han implementado, en los que la recuperación del área forestal y protección de las especies forestales ha sido mínima, con tasas de mortandad de 60 a 90% de plantas reintroducidas como parte de los programas de reforestación nacional (Gómez-Romero *et al.*, 2012). Este fenómeno puede ser explicado por el gran desconocimiento de la ecología e interacción con el medio, tales como condiciones ambientales del sitio, morfología y fisiología (Sigala-Rodríguez *et al.*, 2015), aunado a que la regeneración de los recursos forestales es gradual, principalmente debido a la lenta tasa de crecimiento de algunas especies forestales (Heredia-Acuña *et al.*, 2018) tal es el caso del pino azul. Asimismo, ha existido escaso esfuerzo de investigación e interés en el estudio de las poblaciones nativas como la de *P. maximartinezii*, a pesar de su enorme relevancia en términos de conservación de recursos genéticos forestales y potencial aplicación comercial, por la comestibilidad de sus semillas.

Existe, por ende, la urgente necesidad de desarrollar proyectos de investigación relacionados con el estado de las poblaciones de especies de pinos mexicanos en peligro de extinción (Romero-Sanchez *et al.*, 2018), como es el caso del pino azul.

De acuerdo a lo planteado por López-Mata y Galván-Escobedo (2011), dentro de las principales estrategias de conservación, se debe incluir la protección de árboles juveniles y adultos longevos, así como el cuidado del correcto establecimiento y óptimo desarrollo tanto de las plántulas como de los árboles juveniles, asegurando con ello el aumento en la tasa de supervivencia.

Por consiguiente, es esencial proponer alternativas que contribuyan a incrementar la supervivencia, óptimo establecimiento de árboles juveniles y adultos de *P. maximartinezii* bajo condiciones naturales. En este sentido, el uso de hongos EcM representan una opción tecnológica y ecológica sustentable para incrementar las tasas actuales de regeneración natural o reforestación, debido a que estos simbiontes fúngicos cumplen un rol fundamental dentro de la mayoría de los ecosistemas de bosque; de hecho, tal como lo describen Trocha *et al.* (2012), la ausencia de hongos ectomicorrízicos ha obstaculizado el éxito de muchas especies de coníferas transplantadas o reintroducidas.

Entre los principales mecanismos de acción cabe destacar, el incremento de la superficie de absorción radical, por ende, el volumen de suelo explorado que favorece la nutrición hídrica-mineral; biodisponibilidad de nutrientes minerales y orgánicos limitados como nitrógeno (N) y fósforo (P), protección contra agentes patógenos del suelo y probablemente en el aumento de tolerancia condiciones ambientales adversas (pH extremo, temperatura, metales pesados y pesticidas) (Smith y Read, 1997; Smith y Read, 2010). Asimismo, existe un gran potencial, en la coinoculación de HEcM y bacterias rizoféricas (Barragán-Soriano *et al.*, 2017), cuyas propiedades benéficas podrían tener un efecto en la fisiología, nutrición y crecimiento de las plantas forestales hospedadoras, resultado de dicha asociación tripartita (Frey-Klett *et al.*, 2007). No obstante, el conocimiento de los simbiontes mutualistas fúngicos y bacterianos asociados en la regeneración natural de diversas especies forestales como es el caso del pino azul, es un caso incipiente, puesto que se desconoce, tanto la composición de la comunidad ectomicorrízica, diversidad y dinámica ecológica, así como su posible interacción con bacterias auxiliaadoras de la micorrización. Con base en lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivos:

i). Determinar la abundancia, riqueza y diversidad de la comunidad de morfotipos ectomicorrízicos en asociación con árboles adultos de la especie *P. maximartinezii* durante el periodo de sequía y lluvia, este último posterior a un incendio forestal dentro del área de distribución del pino azul, así como realizar la caracterización morfológica de los morfotipos EcM registrados; ii). Realizar la primera caracterización morfo-anatómica del morfotipo formado por la especie *Cenococcum geophilum* en asociación con *Pinus maximartinezii*; y iii). Evaluar el efecto de la inoculación de cuatro fuentes de inóculo ectomicorrízico y la coinoculación con bacterias auxiliaadoras de la micorrización (*Azospirillum brasilense*), sobre el crecimiento, contenido nutrimental y porcentaje de micorrización en plantas de *Pinus maximartinezii*.

## LITERATURA CITADA

**Barragán-Soriano, J.L., J. Pérez-Moreno, J.J. Almaraz-Suárez, M.G. Carcaño-Montiel, K.I. Medrano Ortiz, 2018.** Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 24(1): 3-16.

**Barrera-Zubiaga, E.J., D. Granados-Sánchez, R.L. Granados-Victorino, M. Luna-Cavazos, 2018.** Characterization of four pinyon pine forests in the state of Zacatecas, Mexico. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 24(3).

**CONAFOR.** 2011. Prácticas de Reforestación, Manual Básico. Fecha de consulta: 22 de enero de 2018. [http://www.conafor.gob.mx/BIBLIOTECA\\_MANUAL\\_PRACTICAS\\_DE\\_REFORESTACION.PDF](http://www.conafor.gob.mx/BIBLIOTECA_MANUAL_PRACTICAS_DE_REFORESTACION.PDF)

**DOF (Diario Oficial de la Federación), 2010.** Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, "Protección ambiental – Especies nativas de México de flora y fauna silvestre – categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo", Segunda Sección, México (2010). SEMARNAT. 30 de diciembre del 2010.

**Donahue, J.K., C.M. López, 1995.** Observations on *Pinus maximartinezii* Rzedowski. Madroño, 42(1): 19:25.

**Farjon A., B.T. Styles, 1997.** *Pinus* (Pinaceae)", In: Flora Neotropica vol. 75. In: The New York Botanical Garden, New York, pp. 221-224.

**Farjon, A. 2013.** *Pinus maximartinezii*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Consultado 18 de diciembre de 2018.

**Farjon, A., D. Filer, 2013.** An Atlas of the World's Conifers: An analysis of their distribution, biogeography, diversity and conservation status; Brill, Publishing, Leiden, The Netherlands.

- Frey-Klett, P., J.A. Garbaye, M. Tarkka, 2007.** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176(1): 22-36.
- Gernandt, D.S., J.A. Pérez de la Rosa, 2014.** Biodiversity of Pinophyta (conifers) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 126-133.
- Gómez-Romero, M., J.C. Soto-Correa, J.A. Blanco-García, C. Sáenz-Romero, J. Villegas, R. Lindig-Cisneros, 2012.** Estudio de especies de pino para restauración de sitios degradados. *Agrociencias*, 46(8): 795–807.
- González-Elizondo, M., M.S. González-Elizondo, L. Ruacho-González, M. Molina-Olvera, 2011.** *Pinus maximartinezii* Rzed. (Pinaceae), first record for Durango, second locality for the species. *Acta Botánica Mexicana*, (96): 33-48.
- Heredia-Acuña, C., J.J. Almaraz-Suárez, R. Arteaga-Garibay, R. Ferrera-Cerrato, D.Y. Pineda-Mendoza, 2018.** Isolation, characterization and effect of plant-growth-promoting rhizobacteria on pine seedlings (*Pinus pseudostrobus* Lindl.). *Journal of Forestry Research*, 1-8.
- IUCN, 2017.** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-3. <<http://www.iucnredlist.org>> Consultado el 12 de enero 2019.
- Jiménez-Hernández, L., 2015.** Indicadores reproductivos de conos, semillas y plántulas para dos años de colecta de *Pinus maximartinezii* Rzedowski en Juchipila, Zacatecas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 59 pp.
- Lara-Rodríguez, L., 1997.** Caracterización y evaluación del bosque natural del pino azul (*Pinus maximartinezii* Rzed) en el Cerro de Piñones de Juchipila, Zacatecas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. 68 pp.
- Ledig, F.T., M. Thompson Conkle, B. Bermejo-Velázquez, T. Eguluz-Piedra, P.D. Hodgskiss, D.R. Johnson, W.S. Dvorak, 1999.** Evidence for an

extreme bottleneck in a rare mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution*, 53(1): 91-99.

**Ledig, F.T., M.A. Capó-Arteaga, P.D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M. Thompson Conkle, B. Bermejo-Velázquez, 2001.** Genetic diversity and the mating system of a rare mexican pinon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 88(11): 1977-1987.

**López Mata, L., 2001.** Proteins, amino acids and fatty acids composition of nuts from the mexican endemic rarity *Pinus maximartinezii* and its conservation implications. *Interciencia*, 26: 606-610.

**López-Mata, L., I. G. Galván-Escobedo, 2011.** Extracción de semillas de *Pinus maximartinezii* y sus consecuencias poblacionales. *Biodiversitas*, 98:1-7.

**López-Mata, L., 2013.** The impact of seed extraction on the population dynamics of *Pinus maximartinezii*. *Acta Oecologica*, 49: 39-44.

**Romero, J.L., T.K. Stranger, W.S. Dvorak, 2001.** Collection and conservation of *Pinus maximartinezii*, a rare and endangered pine species. *The Southern African Forestry Journal*, 190(1): 95-98.

**Romero-Sanchez, M., R. Pérez-Miranda, A. González-Hernández, M. Velasco-García, E. Velasco-Bautista, A. Flores, 2018.** Current and potential spatial distribution of six endangered pine species of Mexico: Towards a Conservation Strategy. *Forest*, 9(12) 767.

**Rzedowski, J., 1964.** Una nueva especie de pino piñonero del Estado de Zacatecas (México). *Ciencia*, 23:17-20.

**Rzedowski, J., 2006.** Vegetación de México. 1ª Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 504 pp.

**Perry, J.P., 1991.** The pines of Mexico and Central America. Timber Press, Portland, Oregon. 231 pp.

**SEMARNAT, 2013.** Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales 2012. SEMARNAT. México.

**Sigala-Rodríguez, J.A., M.A. González-Tagle, J. Jiménez-Pérez, 2015.** Análisis de supervivencia para una reforestación con *Pinus pseudostrobus* Lindl. en el sur de Nuevo León. Ciencia UANL, 18(75): 61-66.

**Smith, S. E., D. J. Read, 1997.** Mycorrhizal symbiosis. Second Edition, Academic Press. 605 pp.

**Smith, S.E., D.J. Read, 2008.** Mycorrhizal symbiosis. 3rd. edition. London, UK: Academic Press.

**Trocha, L.K., L. Kalucha, M. Stasińska, W. Nowak, M. Dabert, T. Leski, M. Rudawska, J. Oleksyn, 2012.** Ectomycorrhizal fungal communities of native and non-native *Pinus* and *Quercus* species in a common garden of 35-year-old trees. Mycorrhiza, 22: 121–134.



# **CAPITULO I. ESTACIONALIDAD, DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD ECTOMICORRÍZICA ASOCIADA CON *Pinus maximartinezii* Rzed.**

## **1.1. RESUMEN**

Las asociaciones mutualistas ectomicorrízicas entre diversas especies de hongos y plantas superiores son un componente esencial de la mayoría de las comunidades forestales. Diversas investigaciones han demostrado que factores climáticos con una marcada estacionalidad tienden a originar un impacto sobre la presencia, estructura y abundancia de hongos ectomicorrízicos, y no está claro si existe un beneficio igual en el rendimiento de las plantas tanto en condiciones de humedad como de sequía (agente común en entornos dominados por plantas que dependen de forma obligada de dicha asociación). En especies forestales endémicas de México, los estudios sobre aspectos que efectúen una comparación entre época de sequía y lluvia sobre las comunidades ectomicorrízicas son escasos. El presente trabajo reporta la influencia estacional sobre la diversidad y presencia de morfotipos EcM asociados con la especie arbórea endémica y en peligro de extinción *Pinus maximartinezii* Rzed. Se evaluó la abundancia, riqueza y diversidad mediante índices de Margalef, Shannon-Wiener y Simpson durante el periodo de sequía y lluvia; este último posterior a un incendio forestal dentro del área de distribución natural. Se registraron 18 morfotipos EcM en ambas temporadas de muestreo, de los cuales 6 morfotipos (MZac2, MZac5, MZac7, MZac8, MZac10 y MZac14) se encontraron en ambos periodos, mientras que algunos fueron específicos para una sola temporada. En ambos muestreos, tres morfotipos EcM (MZac2, MZac5 y MZac 8) dominaron y representaron aproximadamente el 90% del número total de puntas de ápices ectomicorrizados; mientras que 14 tipos EcM contribuyeron a la restante diversidad registrada. Cabe destacar que existe un potencial importante, en caracterizar e identificar la diversidad de las comunidades de hongos EcM, incluso conocer la dinámica ecológica de las ectomicorrizas nativas asociadas a especies de interés forestales, debido a que estos afectan el desarrollo del hospedero y el establecimiento de las plantas.

**Palabras clave:** ectomicorriza; morfotipos; diversidad; México; pino azul.

## 1.2. ABSTRACT

Ectomycorrhizal mutualist associations between fungal species and higher plants are an essential component of most forest communities. A number of studies have shown that climatic factors with a marked seasonality tend to impact the presence, structure and abundance of ectomycorrhizal fungi, and it is not clear if there is an equal benefit in the performance of plants in both wet and dry conditions. Drought is a common agent in environments dominated by plants that depend on this association. In Mexico, studies related to comparisons between dry and rainy seasons on ectomycorrhizal communities are scarce. The present work reports the seasonal influence on the diversity and presence of EcM morphotypes associated to the endemic and endangered species *Pinus maximartinezii* Rzed. The abundance, richness and diversity were evaluated by using the Margalef, Shannon-Wiener and Simpson indexes during the period of drought and rain, the latter after a forest fire within the natural distribution area of the pine species. We recorded 18 EcM morphotypes in both sampling seasons, of which 6 morphotypes (MZac2, MZac5, MZac7, MZac8, MZac10 and MZac14) were found in both periods, while some were specific for a single season. In both seasons, three EcM morphotypes (MZac2, MZac5 and MZac 8) dominated and accounted for approximately 90% of the total number of tips of ectomycorrhizal apices; while 14 EcM types contributed to the remaining recorded diversity. It should be noted that there is an important potential in characterizing and identifying the diversity of EcM mushroom communities, including the knowledge related to the ecological dynamics of native ectomycorrhizas associated with species of forest interest, because these affect the development of the host and the establishment of the plants.

**Keywords:** ectomycorrhizae; morphotypes; diversity; Mexico; blue pine.

### 1.3. INTRODUCCIÓN

La regeneración natural es un proceso fundamental en la dinámica y mantenimiento de la diversidad de los bosques. Este es un proceso condicionado por características y condiciones edáficas del medio, como la simbiosis ectomicorrízica, asociación mutualista que se establece entre las raíces de especies forestales y el micelio de especies fúngicas. Esta relación simbiótica representa una importante opción ecológica para favorece la rehabilitación de múltiples comunidades vegetales mediante una serie de ventajas que le aporta a las plantas con las que se establece dicha asociación (Smith y Read, 2008), especialmente cuando las condiciones ambientales pueden reducir significativamente la supervivencia de las plántulas (Reverchon *et al.*, 2012).

Estudios previos han asumido que la diversidad local de EcM está determinada por una serie de implicaciones bióticas, abióticas y climáticas, tales como: contenido de nutrientes; competencia; interacción con otros organismos; tipo de suelo; humedad; pH; microbioma y microfauna presente; así como el vigor y genotipo del hospedero (Korkama *et al.*, 2006; Lee y Eom, 2013; Goicochea *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha considerado el efecto de las condiciones ambientales, la variabilidad estacional a lo largo del año, así como factores antrópicos, como la perturbación ambiental causada por la actividad humana (Buee *et al.*, 2005).

La sequía es una anomalía climatológica transitoria que suele ser un punto referencial de múltiples zonas de transición que albergan especies dominantes de interés ecológico, como las pertenecientes el género *Pinus*, más específicamente, aquellas especies denominadas como pinos piñoneros. Esta condición se ha acentuado en los últimos años como consecuencia del cambio en los patrones de precipitación e incremento de temperaturas extremas alrededor del mundo. Al respecto, Campos-Aranda (2016), reporta para el año 2011, sequías extremas en las tres zonas geográficas de Zacatecas. Otro agente de perturbación de mayor impacto tanto para las especies vegetales como para los conjuntos microbianos, es el fuego, favorecido por la sequía (Martin-Pinto *et al.*, 2006; Cairney y Bastias, 2007) el cual puede afectar principalmente a la biomasa fúngica ectomicorrízica (Egidi *et*

*al.*, 2016; Smith *et al.*, 2017) y sin duda con ello, la resiliencia o regeneración de los ecosistemas (Glassman *et al.*, 2015).

Estos cambios y condiciones adversas han traído consigo una influencia notable sobre los organismos del suelo, provocado cambios en la abundancia, diversidad fúngica y por lo tanto en su conservación. Sin embargo, la dinámica ecológica de las comunidades de hongos formadores de ectomicorríza, así como su diversidad, comportamiento e implicaciones en la regeneración natural son procesos que en general no están claramente elucidados (Lee y Eom, 2013; Santamaría-Pérez *et al.*, 2013). Principalmente existe escases de conocimiento de la influencia de los patrones de distribución temporal y estructural, determinados por las condiciones climáticas y edáficas, la edad del hospedero y del bosque (Aucina *et al.*, 2011). No obstante, se considera que los hongos ectomicorrízicos (HEcM) contribuyen a la reforestación y recuperación de los bosques. Por lo tanto, es necesario comprender los procesos clave que permiten que los árboles y los hongos EcM superen las condiciones adversas, resultado del constante cambio climático (Courty *et al.*, 2010; Rainer *et al.*, 2015).

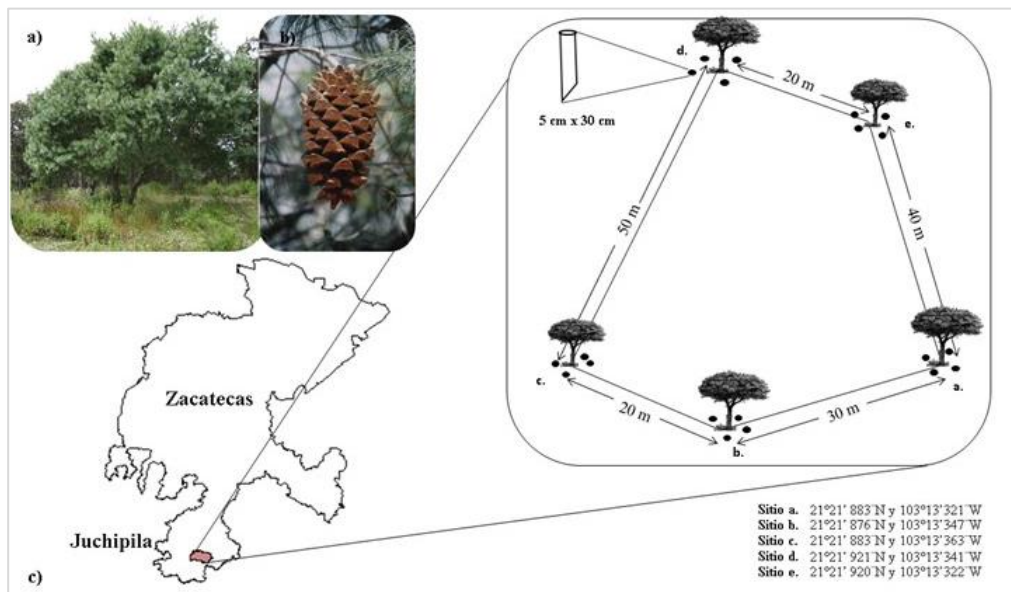
Así, en el contexto del cambio climático global, adquiere gran relevancia el comprender esta dinámica ecológica y los factores que pueden influir y mantener la estructura y diversidad de morfotipos ectomicorrízicos asociados a especies de interés ecológico, ornamental y alimenticio, durante periodos secos y de humedad, en particular después de un incendio forestal que agravan junto con las condiciones de sequía la erosión del suelo. Esto es especialmente importante para comprender aspectos de regeneración natural y reintroducción de especies forestales para las que se tenga como objetivo conservar y aumentar su población.

Con base en los antecedentes señalados, se realizó el presente trabajo de investigación el cual tuvo como objetivo general: Evaluar la abundancia, riqueza y diversidad de la comunidad de morfotipos ectomicorrízicos en asociación con *P. maximartinezii* durante los periodos de sequía y lluvia, este último posterior a un incendio forestal dentro del área de distribución del pino azul.

## 1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.4.1. Área de estudio y recolecta de material biológico

La zona de estudio se localizó a  $21^{\circ} 20' - 21^{\circ} 22'$  latitud N y  $103^{\circ} 12' - 103^{\circ} 15'$  longitud O en el cerro de Piñones perteneciente a la Sierra de Morones, al oeste del ejido Pueblo Viejo, colindante al municipio de Juchipila, estado de Zacatecas; con una elevación entre 1,650 y 2,500 m (López-Mata, 2013). El muestreo de raíces perteneciente a la época de sequía se realizó en el mes de marzo del 2017 y el correspondiente a la época de lluvia se llevó a cabo en septiembre del mismo año (Figura 1). Para ambas temporadas se seleccionaron 5 árboles adultos de *P. maximartinezii* con una altura de entre 8-12 m, cuyo diámetro fluctuó entre 40-50 cm a la altura del pecho (DAP). De cada árbol se obtuvieron un total de cuatro muestras. El método empleado fue completamente al azar, con una distancia aproximada entre cada árbol de 30 a 50 m y a 1.5 m de distancia del tronco; las raíces se extrajeron mediante el uso de tubos de PVC a una profundidad de 20-30 cm, los cuales se conservaron hasta su análisis en laboratorio.



**Figura 1.** Distribución de los sitios de muestreo a) *Pinus maximartinezii*; b) Estróbilo del pino azul (reportado como uno de los conos de mayor tamaño (30 cm); c) Sitios de muestreo en Sierra Morones cercanos a la localidad de Juchipila, con una superficie total 1,495 m<sup>2</sup>.

#### **1.4.2. Caracterización y análisis de la comunidad de hongos ectomicorrízicos**

Todas las raíces colectadas fueron tamizadas y revisadas en laboratorio con la ayuda de un microscopio estereoscópico marca LEICA (mismo con el que se tomaron las fotografías). Los ápices ectomicorrízicos se seleccionaron y agruparon de acuerdo a sus características macro-morfológicas, donde se consideraron los métodos y descripciones proporcionados por Ingleby *et al.* (1990); Agerer (1991); Goodman *et al.* (1998); DEEMY (2018) y por búsqueda en línea de la base de datos en línea *Descriptions of Ectomycorrhizae* (DDE) (Goodman *et al.*, 2000), actualmente remplazado por el sitio web BC Ectomycorrhiza Research Network (BCERN, 2018). Los criterios morfológicos de mayor relevancia entre otros son el tipo de ramificación del ápice radical, forma, textura, presencia de hifas emanantes y rizomorfos. Además, el color de los morfotipos ectomicorrízicos se determinó mediante las cartas de color de Munsell (Munsell Color Laboratory, New Windsor, New York, 2000) y el sistema de color NBS/ISCC. Posteriormente se efectuaron cortes histológicos transversales con la finalidad de diferenciar los morfotipos similares y observar bajo microscopio los tejidos fúngicos que forman a la ectomicorriza (manto externo, manto interno y red de Hartig). A cada morfotipo se le asignó una clave de identificación (Morfotipo I (MI); Morfotipo II (MII),...etc.); una vez diferenciados, se realizó la cuantificación del número de morfotipos, por medio de conteo manual, para finalmente fotografiarlos y colocarlos en tubos de Eppendorf para su conservación en refrigeración.

#### **1.4.3. Análisis de diversidad**

A cada morfotipo asociado a *P. maximartinezii* se le determinó la abundancia proporcional (número de individuos sobre el número total de especies).

Por otra parte, para conocer la riqueza específica, se calculó el índice de Margalef (ecuación 1) para el total de morfotipos ectomicorrízicos (MEcM) y para conocer la diversidad de estos en época de seca y lluvia, también se estimaron el índice de dominancia de Simpson y el índice de equidad de Shannon-Weaver (ecuación 2 y

3, respectivamente) para las épocas de seca y de lluvia. El cálculo de los índices se realizó mediante el software EstimateSWin (v.9.1.); para ello, se elaboró una matriz de datos en la que se calculó la cantidad de morfotipos presentes para cada sitio.

A continuación, se presentan las ecuaciones utilizadas para determinar cada índice:

### 1) Índice de diversidad de Margalef

$$D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln N}$$

Donde:

S = número de especies.

N = número total de individuos.

ln = logaritmo neperiano.

El índice de Margalef mide el número de especies por número de individuos especificados o la cantidad de especies por área en una muestra. Este índice supone que hay una relación funcional entre la cantidad de especies y el número total de individuos (Magurran, 1988).

### 2) Índice de Shannon-Wiener

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Donde:

S = número de especies

$p_i$  = abundancia proporcional de la especie  $i$  (el número de individuos de la especie  $i$  dividido entre el número total de individuos de la muestra).

ln = logaritmo neperiano

El índice de Shannon-Wiener expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar (Magurran, 1988; Moreno, 2001).

### 3) Índice de Simpson

$$\lambda = \sum p_i^2$$

Donde:

$p_i$  = abundancia proporcional de la especie  $i$  (el número de individuos de la especie  $i$  dividido entre el número total de individuos de la muestra).

El índice de dominancia de Simpson considera la probabilidad que dos individuos de la población seleccionados al azar sean de la misma especie. Indica la relación existente entre riqueza o número de especies y la abundancia o número de individuos por especie (Moreno, 2001).

## 1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

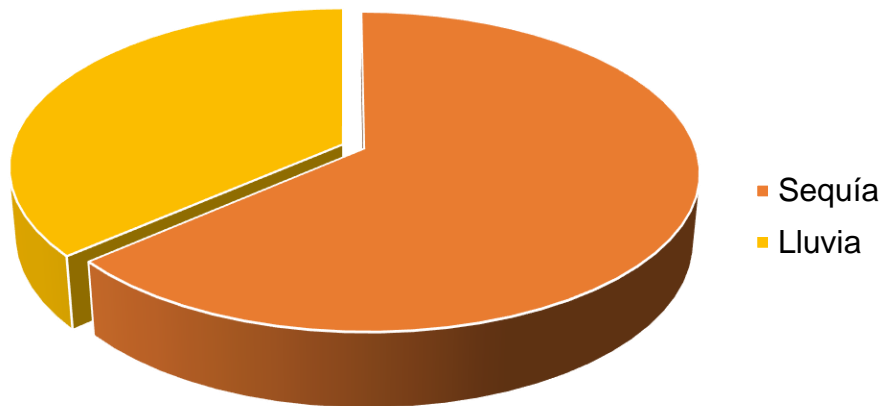
En la actualidad la dinámica ecológica de los hongos formadores de ectomicorriza, así como de su diversidad, mantenimiento e implicaciones en procesos de gran importancia como la regeneración natural de los ecosistemas forestales, su rol funcional bajo condiciones climáticas cambiantes (periodos secos y de humedad) y agentes de perturbación frecuentes como son los incendios forestales no han sido totalmente comprendidos (Lee y Eom, 2013). Por lo tanto, es de esencial importancia, conocer y clasificar esta gran diversidad de estructuras ectomicorrízicas con base en sus características morfológicas y anatómicas (Agerer, 2001).

El conocimiento de la comunidad de morfotipos ectomicorrízicos en asociación con especies de interés ecológico, ornamental, de aprovechamiento alimenticio y sobre todo catalogadas en estándares de peligro de extinción, contribuye sin lugar a dudas a la comprensión de procesos de recambio de especies de hongos ectomicorrízicos en el sistema radical del hospedero (Galindo-Flores *et al.*, 2015) y en inferir el posible papel ecológico por parte de estos simbioses EcM frente a cambios climáticos y situaciones adversas a las que se enfrentan las especies vegetales con las cuales establecen asociación, condiciones desfavorables que probablemente repercuten tanto en el establecimiento como en la supervivencia y regeneración de las comunidades forestales.



### 1.5.1. Caracterización y análisis de la comunidad de hongos ectomicorrízicos

Se analizaron un total de 12,286 puntas de raíces micorrizadas de *Pinus maximartinezii*, obtenidas de un conjunto de 20 muestras de suelo y raíces recolectadas en cinco sitios (cuatro muestras por sitio) del área donde se distribuye de forma natural *P. maximartinezii*. De estas puntas ectomicorrizadas 6,266 y 3,574 se clasificaron como senescentes para época seca y de lluvia respectivamente debido a su carencia de turgencia (Figura 2).



**Figura 2.** Ápices ectomicorrizados senescentes encontrados en *Pinus maximartinezii* en dos épocas de muestreo

En los 2,446 extremos radicales restantes, se registraron un total de 18 morfotipos EcM (MEcM), a los cuales se les asignó una clave de identificación [Morfotipo 1 (MZac 1), Morfotipo 2, (MZac2), y así progresivamente hasta (MZac18)]. En el Cuadro 1 se observa que la mayor abundancia de ápices ectomicorrizados se registró en la época seca (1,588) con respecto a la época de lluvia (858). Asimismo, la mayor riqueza de morfotipos se encontró durante el período seco con un total de 14 morfotipos. Cabe señalar que los morfotipos MZac2, MZac5, MZac7, MZac8,

MZac10 y MZac14 estuvieron presentes en ambos periodos de muestreo y solo los morfotipos EcM MZac15, MZac16, MZac17 y MZac18 fueron exclusivos de la temporada de lluvias.

**Cuadro 1.** Número y abundancia de ápices EcM en asociación con *P. maximartinezii*, registrados durante dos épocas del año. ni= número de ápices ectomicorrízicos por morfotipo i; pi= abundancia proporcional de morfotipo i ( $pi = ni/N$ ) por estación.


Morfotipo	Época seca		Época lluvia	
	ni	pi	ni	pi
MZac1	402	0.253	0	0
MZac2	142	0.089	152	0.177
MZac3	21	0.013	0	0
MZac4	209	0.132	0	0
MZac5	290	0.183	208	0.242
MZac6	72	0.045	0	0
MZac7	185	0.116	129	0.149
MZac8	132	0.083	115	0.134
MZac9	11	0.007	0	0
MZac10	35	0.022	44	0.051
MZac11	33	0.021	0	0
MZac12	14	0.009	0	0
MZac13	17	0.011	0	0
MZac14	25	0.016	37	0.043
MZac15	0	0	111	0.129
MZac16	0	0	23	0.027
MZac17	0	0	33	0.038
MZac18	0	0	7	0.008
<b>Número total de individuos (N)</b>	<b>1588</b>		<b>858</b>	
<b>Número total de especies (S)</b>	<b>14</b>		<b>10</b>	

### 1.5.2. Caracteres macroscópicos de morfotipos ectomicorrízicos

De los 18 morfotipos fúngicos ectomicorrízicos asociados con *P. maximartinezii*, solo el morfotipo MZac5 fue identificado en forma confiable como *Cenococcum geophilum*, con base en sus características morfoanatómicas distintivas semejantes a las reportadas por distintos autores (Ingleby *et al.*, 1990; Ponge, 1990; LoBuglio, 1999; Spatafora *et al.*, 2012).

A continuación, se describen las principales características macroscópicas del resto de morfotipos ectomicorrízicos asociados a *Pinus maximartinezii* en época de sequía (22 de mayo, 2017) (Cuadro 2) y época de lluvias (22 de septiembre, 2017) (Cuadro 3) y en ambas épocas de muestreo (Cuadro 4).

**Cuadro 2.** Características macroscópicas principales de los morfotipos ectomicorrízicos asociados a la especie forestal *P. maximartinezii* en época de sequía.

Morfotipo	Descripción macroscópica
	Ramificación dicotómica a simple; las terminaciones no ramificadas son rectas de color amarillo verdoso brillante <sup>1</sup> ; las puntas son cilíndricas textura de suave a granulosa y coloración beige pálido durazno; presencia de escasas hifas emanantes; color del manto naranja profundo <sup>1</sup> .

**Cuadro 2.** Continuación...



MZac3

Ramificación dicotómica; textura granulosa; ápices de puntas un poco más claros (7.5YR 5/8) que el resto del morfotipo; en las partes viejas (oscuras) presenta micelio extramatricial; color del manto café fuerte (7.5YR 5/6).



MZac4

Ramificación dicotómica; textura lisa; ápices rectos; ausencia de estructuras como micelio o rizomorfos; color del manto café rojizo oscuro (5YR 3/2).

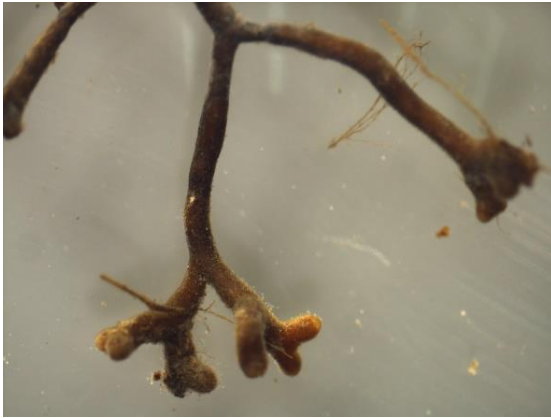


MZac6

Ramificación simple y dicotómica; presencia de rizomorfos color amarillo anaranjado fuerte<sup>1</sup>; terminaciones rectas; presencia de micelio extramatricial en las partes viejas; color del manto café oscuro (7.5YR 3/4).

**Cuadro 2.** Continuación...

---



MZac11

Ramificación coraloide; ápices de puntas amarillo naranja moderado<sup>1</sup>; presencia de cordones miceliares (rizomorfos) café claro; cortas hifas emanantes blanquecinas distribuidas irregularmente por parches; color de manto café amarillento profundo<sup>1</sup>.



MZac12

Ramificación simple a dicotómica; superficie lisa; ápices de puntas rectas a ligeramente curvadas, claras (amarillo anaranjado intenso<sup>1</sup>) y largas; ausencia de rizomorfos y micelio extramatricial; color de manto rojo amarillento (5YR 4/6).



MZac13

Ramificación simple-dicotómica; textura algodonosa y superficie ligeramente granulosa; presencia de micelio extramatricial blanquecino distribuido irregularmente por partes; ausencia de rizomorfos; color de manto negro (7.5YR 2/0).

**Cuadro 3.** Características macroscópicas principales de los morfotipos ectomicorrízicos asociados a la especie forestal *P. maximartinezii* en época de lluvia.



MZac15

Ramificación dicotómica; superficie lisa; puntas de ápices rectos; presencia de cordones miceliares blanquecinos; presencia de cistidios tipo a; terminaciones rectas; color de manto naranja rojizo grisáceo<sup>1</sup>.



MZac16

Ramificación dicotómica; textura algodonosa y superficie granulosa; abundante micelio extramatricial a lo largo del morfotipo; presencia de cordones miceliares color café oscuro<sup>1</sup>; color de manto pálido amarillento a beige.



MZac17

Ramificación dicotómica o coraloide; terminaciones no ramificadas tiene forma recta y doblada; puntas cilíndricas comprimidas naranja-amarillo, partes distales color café; presencia de rizomorfos; textura lisa con hifas emanantes cortas de color blanco concentradas en su mayoría en las puntas de las raíces: color de manto amarillo (10YR 8/6).

**Cuadro 3.** Continuación...



MZac18

Ramificación simple; punta de los ápices cortos rectos con terminaciones cilíndricas de color café amarillento; partes más viejas de color café; superficie granulosa; presencia de escasas hifas emanantes concoloras; ausencia de rizomorfos; color de manto naranja pálido a amarillo.

---

**Cuadro 4.** Características macroscópicas principales de los morfotipos ectomicorrízicos asociados a la especie forestal *P. maximartinezii* registrados para ambas épocas de evaluación (seca y de lluvia).



MZac2

Ramificación coraloide; textura lisa; presencia de escasas hifas emanantes concentradas en los ápices del morfotipo; gruesos rizomorfos de color café rojizo oscuro (5YR 3/2); color del manto café amarillento claro

**Cuadro 4. Continuación...**



MZac5

Ramificación simple a dicotómica; terminaciones rectas o sinuosas; superficie brillante a granulosa; presenta de escasas a abundantes negras hifas gruesas; presencia de esclerocios; color del manto negro carbonizado.



MZac7

Ramificación monopoidal e irregular pinnada; terminaciones tortuosas; superficie granulosa; escasas hifas emanantes translucidas; no hay presencia de rizomorfos; color del manto amarillo pardusco (10YR 6/6).



MZac8

Ramificación simple y dicotómica; textura algodonosa y superficie lisa cubierta de micelio extramatricial de color blanco relativamente abundante; presencia de cortos cordones miceliares oscuros (rizomorfos); color del manto gris rojizo grisáceo<sup>1</sup>.



**Cuadro 4.** Continuación...

---



MZac10

Ramificación monopodial pinada irregular; superficie lisa; pocas hifas emanantes y rizomorfos ausentes; color aperlado a arena del manto en las puntas jóvenes con partes grisáceas melocotón.



MZac14

Ramificación irregular pinada o dicotómica; la terminación no es ramificada, sinuosa o recta de color olivo moderado<sup>1</sup>; ausencia de hifas emanantes: presencia de cordones miceliares de color marrón olivo medio a café olivo<sup>1</sup>; superficie lisa; color de manto arena oscuro.

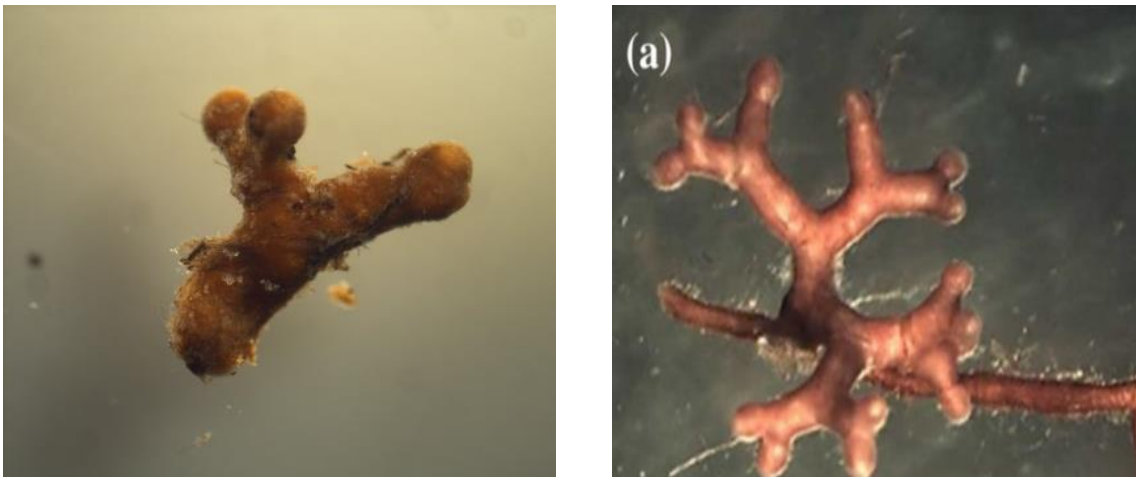
---

El presente estudio contempló el análisis de raíces ectomicorrizadas, así como la descripción e identificación de MEcM asociados a *P. maximartinezii*, lo anterior respecto a lo mencionado por Anderson *et al.* (2007) quienes señalaron que las comunidades de HEcM son mejor analizadas sobre la base de su identificación morfológica y contabilización de raíces laterales cortas colonizadas por taxa fúngicos ectomicorrízicos (=raíces ectomicorrizadas) que cuando se analizan en relación al estudio de esporomas. Además, en algunos estudios se ha observado que los hongos que no forman estructuras de fructificación evidente, constituyen la mayor abundancia de ectomicorrizas en el medio (Dahlberg, 2001), a diferencia de

las especies que forman esporomas que llegan a constituir simplemente del 20 al 30% de las micorrizas.

El número de puntas de raíces ectomicorrizadas encontradas en *P. maximartinezii* fueron 2,446 y un total de 18 morfotipos caracterizados, notándose que el número de morfotipos fue considerablemente menor al reportado por Lee y Eom (2013), quienes obtuvieron un total de 251 puntas ectomicorrizadas en siete sitios de estudio, perturbados y no perturbados e identificaron 40 MEcM, con base a sus características morfo-anatómicas. No obstante, se argumenta que el menor número de MEcM reportados en el presente trabajo pueden ser debido a la estructura inherente de la mayoría de las comunidades de EcM con pocas especies comunes y un gran número de especies raras, lo cual puede limitar la evaluación precisa de la riqueza de especies (Taylor, 2002).

Se realizó una comparación de los morfotipos con los reportados en la literatura y se encontró que la forma de las puntas del morfotipo MZac1-*P.* se asemejan al morfotipo *Thelephora terrestris* – *Pinus sylvestris* (Aleksandrowicz-Trzcinska, 2018), sin embargo, difiere un tanto el color.



**Figura 3.** Imagen de la izquierda MZac1 en *P. maximartinezii*, imagen de la derecha, *Thelephora terrestris* - *Pinus sylvestris* (Aleksandrowicz-Trzcinska, 2018).

Mientras, que el MZac14 se asemeja al morfotipo formado por *Pseudotomentella tristis* en *P. pinaster*, reportado por Pestaña-Nieto y Santolamazza (2009). Sin

embargo, se requiere realizar una identificación molecular, tanto para estos morfotipos como para el resto.

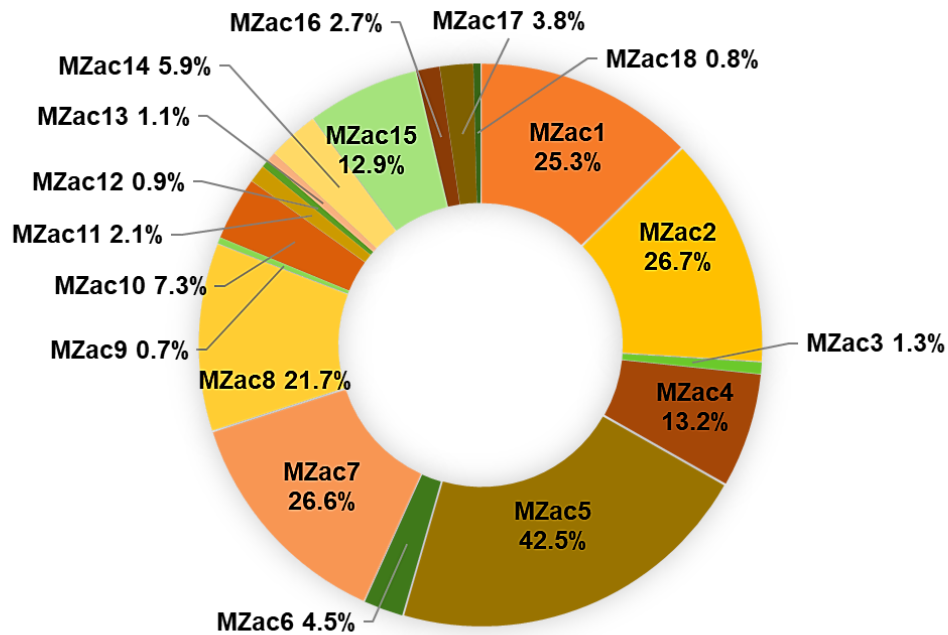


**Figura 4.** Imagen de la izquierda MZac14 en *P. maximartinezii*, imagen de la derecha, *Pseudotomentella tristis* en *Pinus pinaster*, reportado por Pestaña-Nieto y Santolamazza (2009).

A diferencia de los morfotipos antes mencionados, para el resto de los tipos EcM, no fue posible realizar su identificación con base en sus características morfológicas. Es importante destacar que la descripción e identificación de la comunidad de hongos ectomicorrízicos es necesaria con el fin de monitorear cambios en las comunidades ectomicorrízicas y poder relacionar dichos cambios con prácticas de manejo o estudiar y comprender los roles y cambios de las especies de HEcM inclusive individuales que ocurren naturalmente en el entorno forestal (Trofymow et al., 2001). Por ejemplo, es importante determinar si los morfotipos ectomicorrízicos presentes en la época de lluvia posterior el incendio forestal son morfoespecies pertenecientes a los ascomicota, debido a que generalmente los miembros que conforman este grupo suelen ir en incremento consistente en dominancia a diferencia de los basidiomicetos tras una alteración por fuego (Huffman y Madrich, 2018).

### 1.5.3. Porcentaje de abundancia de morfotipos ectomicorrízicos registrados en ambas épocas de muestreo

El morfotipo más abundante fue el MZac5 con 42.5% del total de las raíces EcM vivas, siguiéndole en orden de abundancia, MZac2, MZac7, MZac8 y MZac1 con porcentajes superiores a 20% pero inferiores 27% (Figura 5). El resto de los morfotipos tuvieron porcentajes que variaron de 0.7 a 13.2%.

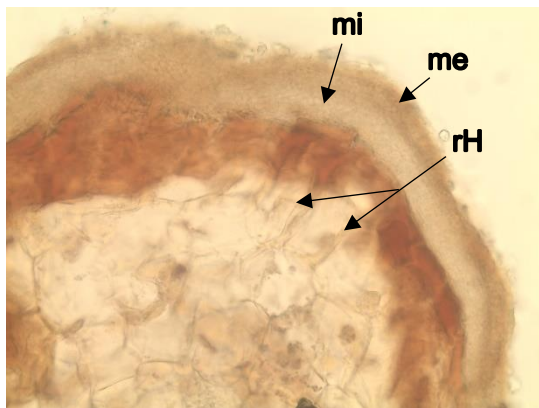


**Figura 5.** Porcentaje de abundancia total de morfotipos ectomicorrízicos asociados a *P. maximartinezii* en época de sequía y lluvia.

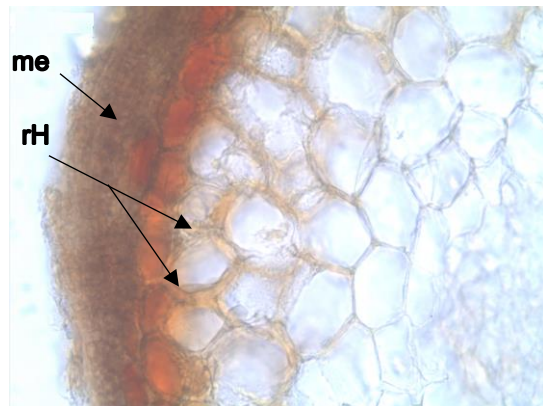
En ambas temporadas de muestreo, tres morfotipos EcM (MZac2, MZac5 y MZac8) dominaron y representaron aproximadamente el 90% del número total de puntas de raíces ectomicorrizadas. Los morfotipos EcM presentes en ambas épocas de muestreo fueron: MZac2, MZac5, MZac7, MZac8, MZac10 y MZac14, donde el morfotipo más abundante fue el MZac5 (> 40%) del total de las raíces EcM vivas (18.25 y 24.21% en época de seca y lluvia, respectivamente). Datos similares en cuanto a abundancia relativa reportada por Outerbridge y Trofymow (2009), quienes lo registran con el 35.88% de la abundancia relativa. Cabe señalar, que MZac5 fue

identificado con base en sus características anatómicas particulares y a sus estructuras de resistencia típicas (esclerocios), como *Cenococcum geophilum* Fr., morfotipo ectomicorrízico reportado en asociación con numerosas especies forestales alrededor del mundo (Matsuda *et al.*, 2017; Garay-Serrano *et al.*, 2018; Obase *et al.*, 2018), entre las cuales se ubican diversas especies de pino (García *et al.* 2016).

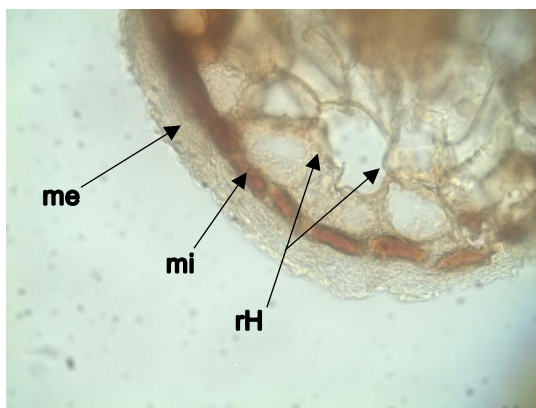
Para complementar el estudio se realizaron cortes transversales de las raicillas de pino azul colonizadas por los diferentes morfotipos (Figura 6), ejemplifica los morfotipos más abundantes encontrados en ambas épocas de muestreo.



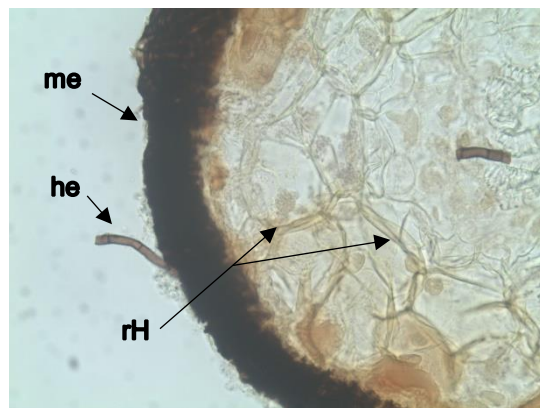
**MZac1**



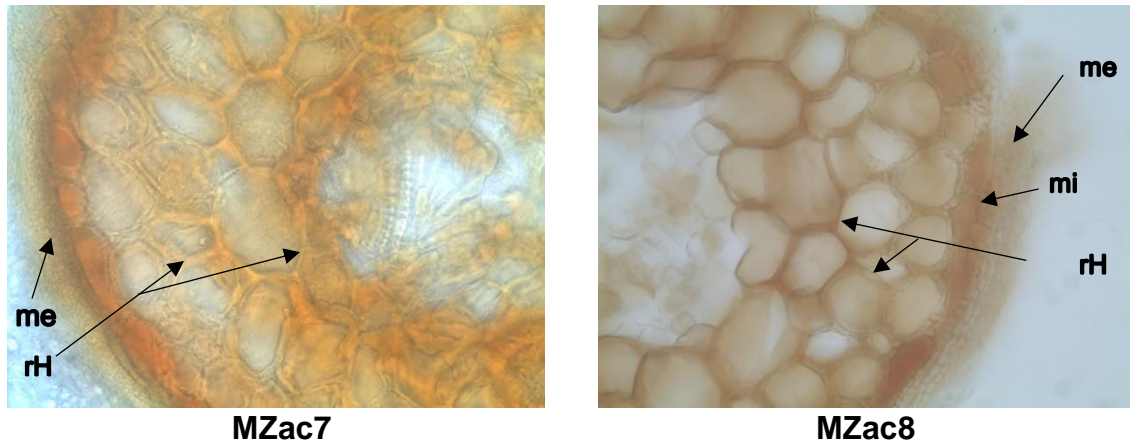
**MZac2**



**MZac4**



**MZac5**



**Figura 6.** Cortes histológicos de raíces de *P. maximartinezii* ectomicorrizada de los morfotipos más abundantes en ambas temporadas de muestreo (Me = manto externo; he = hifa extraradical; rh = red de Hartig).

#### 1.5.4. Diversidad de morfotipos ectomicorrízicos

En el total de sitios analizados por estación (seca o lluviosa) se obtuvo una riqueza de 1.76 para el periodo seco y de 1.33 para el periodo de lluvia (Cuadro 5). El análisis de diversidad estimada con el índice de Shannon-Wiener osciló entre 2.01 para la época de lluvia y de 2.15 para la época de seca, lo cual nos indica una diversidad de baja a media, ligeramente mayor para esta última, esto con base en los valores de referencia (Cuadro 6). Por otra parte, los indicadores de dominancia de Simpson se mantuvieron bajos para ambas estaciones de muestreo (0.15), indicando que pese a la dominancia en frecuencia de un par de morfotipos (MZac1 y MZac5), no existe una dominancia absoluta.

**Cuadro 5.** Diversidad de morfotipos ectomicorrízicos registrados en asociación con *Pinus maximartinezii*.

	Diversidad $\alpha$	
	Estación seca	Estación lluviosa
Nº de morfotipos EcM	1588	858
Índice de Margalef	1.76	1.33
Índice de Shannon-Wiener (H')	2.15	2.01
Índice de Simpson ( $\lambda$ )	0.15	0.15

**Cuadro 6.** Valores de referencia para la condición de diversidad (Margalef, 1972).

Valores de referencia del índice de diversidad de Shannon-Wiener	Condición de la diversidad
0 - 1	Muy baja
1 - 2	Baja
2 - 3.5	Media
> 3.5	Alta

La riqueza específica total (valores inferiores a 2) nos indica que ambas estaciones de muestreo son áreas de baja biodiversidad, donde las condiciones del sitio (suelos someros, rocosos y calcáreos) probablemente influyen en la diversidad de morfoespecies y en un número reducido de ejemplares, no obstante, se requiere más estudios que corroboren lo mencionado.

Con base en lo descrito por Margalef (1972), los resultados obtenidos en la presente investigación nos indican que tanto la riqueza como la diversidad de morfotipos EcM fueron similares en ambos periodos de muestreo (Cuadro 6). El índice de Shannon-Wiener varía normalmente de 1 a 5 e interpreta a valores inferiores a 2 como baja biodiversidad, de 2 a 3.5 media y alta diversidad con valores superiores a 3.5. De acuerdo con estos criterios, los resultados sugieren una diversidad media (2.15 y

2.01) para el periodo seco y de lluvia, respectivamente; valores de diversidad similares a los reportados por Lee y Eom (2013) quienes estudiaron la diversidad de especies ectomicorrízicas en *Pinus densiflora* con un índice de Shannon de entre 2.18 y 1.78 para sitios perturbados y no perturbados por la actividad humana. Estos mismos autores señalan que la causa y magnitud de la perturbación puede afectar la biodiversidad y composición de la comunidad de hongos EcM. Por su parte, Long *et al.* (2016), al estudiar las comunidades de HEcM asociados a rodales de *Pinus tabuliformis* en tres regiones de la meseta de Loess al noroeste de China, registran un índice que varía de 2.65 a 3.31, en un área caracterizada por un clima que varía de seco a semiseco y con una severa erosión del suelo.

Los valores de dominancia de Simpson determinados en la presente investigación fueron de  $D = 0.15$ , en los dos periodos de muestreo. Esto significa que los morfotipos se encuentran igualmente representados o no existe dominancia (Palacios *et al.*, 2012). Al respecto, Dahlberg (2001), menciona que la dominancia de pocas especies de HEcM en un ámbito local es un fenómeno común en estudios de la comunidad EcM, es decir, que solo algunos taxones de hongos EcM representan la mayor parte de la abundancia de las micorrizas (>50%) y se encuentran ampliamente dispersos, mientras que la mayoría de las especies rara vez se encuentran. Situación similar a la comunidad de HEcM en asociación con *P. maximartinezii* pues se detectó una riqueza de especies relativamente baja, identificándose 18 morfotipos ectomicorrízicos, la mayoría perteneciente a la época de sequía, de los cuales tres resultaron más abundantes.

Es importante mencionar que posterior al muestreo realizado durante el mes de mayo, el área de estudio fue afectada por un incendio forestal, lo cual puede explicar una disminución del 30% en la frecuencia y abundancia de ápices ectomicorrizados para la temporada de lluvias, por lo que se puede inferir que el incendio tuvo un efecto negativo sobre la biomasa fúngica ectomicorrízica. Al respecto, Chai *et al.* (2013) señalaron que la riqueza de especies EcM nativas y la estructura de la comunidad pueden verse fuertemente influenciadas por los incendios forestales, debido a que cesa el flujo de carbohidratos a la población nativa de HEcM. La respuesta del ecosistema a los incendios forestales a menudo está vinculada a la



magnitud del fuego, con consecuencias potencialmente importantes para la biogeoquímica subterránea y los procesos microbianos (Huffman y madrich, 2018).

Por su parte, Dove y Hart (2017), mencionaron que el fuego probablemente erradica especies fúngicas que no soportan un calor intenso y reduce la riqueza de aquellas especies que tienen la capacidad de sobrevivir al fuego a través de sus estructuras de resistencia. Estos mismos autores concluyen que si las condiciones permiten a las comunidades recuperarse, (por ejemplo, sin un disturbio subsecuente y condiciones de crecimiento favorables), los hongos del suelo son resilientes a escalas de tiempo decenales, lo que contribuye a una rápida recuperación del ecosistema después de un incendio forestal.

A pesar de la información existente, al menos en este estudio no podemos asegurar que ocurre un cambio en la dinámica temporal de las comunidades ectomicorrízicas en asociación con el pino azul, pues si bien se observó una variación en la abundancia de ciertos morfotipos, el factor fuego pudo alterar la presencia o riqueza entre temporadas de muestreo. Al respecto, de acuerdo a lo reportado por los índices de diversidad realizados por Kataníc *et al.* (2015), quienes analizaron los cambios estacionales entre primavera y otoño en la comunidad de HEcM asociados a álamo blanco (*Populus alba* L.) sin ninguna alteración en el ecosistema, reportan, que la tasa de dominancia de las especies más abundantes no difirió significativamente, ni existió un cambio en la estructura de la comunidad EcM entre temporadas.

Con los datos obtenidos en la presente investigación es difícil determinar si la diversidad y abundancia de los hongos ectomicorrízicos fue solo dependiente de la severidad del incendio y/o por la época de muestreo, pues aunque si se detectó un decremento en el número de individuos o puntas de ápices ectomicorrízados, en el muestreo correspondiente a la época de lluvia, éste pudo haber sido influenciado también por el incendio.

## 1.6. CONCLUSIONES

El presente estudio de la comunidad de hongos ectomicorrízicos, en un grupo de árboles adultos de pino azul (*Pinus maximartinezii*), especie en peligro en extinción, es el único desarrollado en una de las áreas de distribución natural de esta especie. El número de raíces cortas analizadas fue de 12,286 ápices, sin considerar a las puntas no micorrizadas dentro del conteo. En total se registraron 18 morfotipos EcM en ambas temporadas de muestro, de los cuales 6 morfotipos (MZac2, MZac5, MZac7, MZac8, MZac10 y MZac14) se encontraron tanto en época seca como en el periodo de lluvia, mientras que algunos fueron específicos para una sola temporada. En ambos muestreos, tres morfotipos EcM (MZac2, MZac5 y MZac 8) representaron aproximadamente el 90% del número total de puntas de ápices ectomicorrizados; mientras que 14 tipos EcM (estación seca y de lluvia) contribuyeron al resto del porcentaje. Como se ha señalado, es de suma importancia conocer e identificar la comunidad de hongos EcM que se asocian a especies forestales por su importancia ecológica, económica y social, sobre todo el conocer la dinámica ecológica de ésta y su papel frente a cambios estacionales o por factores de estrés como los incendios (factor recurrente), principalmente porque tienen una participación activa en el desarrollo del hospedero y el establecimiento de las plantas. En particular para proponer estrategias de conservación, recuperación y reproducción de especies forestales y evitar con ello su extinción.

## 1.7. LITERATURA CITADA

- Agerer, R. 1991.** Characterization of ectomycorrhiza. In: Methods in microbiology. Vol. 23. J.R. Norris, D.J. Read, and A.K. Varma (editors). Academic Press, New York, pp. 25–73.
- Agerer, R. 1987–2008.** Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn–Verlag, Munich. Vol. 1–2.
- Aleksandrowicz-Trzcińska M., M. Szaniawski, M. Studnicki, M. Bederska-Błaszczyk, A. Urban. 2018.** The effect of silver and copper nanoparticles on the growth and mycorrhizal colonisation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in a container nursery experiment. Forest, 11: 690-697.
- Aučina, A., M. Rudawska, T. Leski, D. Ryliškis, P. Pietras, E. Riepšas, 2011.** Ectomycorrhizal fungal communities on seedlings and conspecific trees of *Pinus mugo* grown on the coastal dunes of the Curonian Spit in Lithuania. Mycorrhiza, 21:237–245.
- BCERN 2008.** British Columbia Ectomycorrhizal Research Network website. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service. [www.pfc.cfs.nrcan.gc.ca/biodiversity/bcern/index\\_e.html](http://www.pfc.cfs.nrcan.gc.ca/biodiversity/bcern/index_e.html).
- Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J., 2005.** Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. Mycorrhiza, 15 (4): 235-245.
- Cairney, J.W.G., B.A. Bastias. 2007.** Influences of fire on forest soil fungal communities. Canadian Journal of Forest Research, 37: 207-215.
- Campos-Aranda, D.F. 2016.** Estudio de sequías meteorológicas anuales por medio del índice de aridez, en el estado de Zacatecas, México. Ingeniería. Investigación y Tecnología. XVII (3): 405-417
- Chai, D.D., S.J. Guo, X.B. Sun, T.T. N. Qin, 2013.** The major factors affecting

ectomycorrhizal fungi diversity in the forest ecosystem. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(7): 879-890.

**Courty, P.E., M. Buée, A.G. Diedhiou, P. Frey-Klett, F. Le Tacon, F. Rineau. M.P. Turpault, S. Uroz, J. Garbaye. 2010.** The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5): 679-698.

**Dahlberg A. 2001.** Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist*, 150: 555 – 562.

**Dove, N.C., S.C. Hart. 2017.** Fire reduces fungal species richness and in situ mycorrhizal colonization: a meta-analysis. *Fire Ecology*, 13(2): 37-65.

**Egidi, E., S. McMullan-Fisher, J.W. Morgan, T. May, B. Zeeman, A.E. Frank. 2016.** Fire regime, not time-since-fire, affects soil fungal community diversity and composition in temperate grasslands. *FEMS Microbiology letters*, 363 (17): 1-11.

**Galindo-Flores, G., C. Castillo-Guevara, A. Campos-López, C. Lara. 2012.** Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichoremophora* y *Suillus tormenosus* en *Pinus montezume*. *Botanical Sciences*, 93(4): 855-863.

**Garray-Serrano, E., M. del Pilar Ortega-Larrocea, F. Reverchon, I. Suarez-Quijada. 2018.** Persistence of ecto- and ectendomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* in experimental microcosms. *Symbiosis*, 74(1): 67-78.

**Glassman, S.I., K.G. Peay, J.M. Talbot, D.P. Smith, J.A. Chung, J.W. Taylor, R. Vilgalys, T.D. Bruns. 2015.** A continental view of pine-associated ectomycorrhizal fungal spore banks; a quiescent functional guild with a strong biogeographic pattern. *New Phytologist*, 205(4): 1619-1631.

**Goicoechea, N., I. Closa, A.M. de Miguel. 2009.** Ectomycorrhizal communities within beech (*Fagus sylvatica* L.) forests that naturally regenerate from clear-

cutting in northern Spain. *New Forests*, 38(2): 157-175.

**Goodman, D.M., D.M. Durall, J.A. Trofymow, and S.M. Berch (editors). 1996–2000.** A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae including microscopic and molecular characterization. Co-published by Mycologue Publications, Canadian Forest Service and BC Ministry of Forests.

**Goodman, D.M., J.A. Trofymow, A.J. Thomson. 2000.** Developing an online database of descriptions of ectomycorrhizae. *Journal of Ecosystems and Management*, 1(1):1–8.

**Huffman, M.S. M.D. Madritch. 2018.** Soil microbial response following wildfires in thermic oak-pine forests. *Biology and Fertility of Soils*, 54(8): 985–997.

**Ingleby, K., P.A. Manson, F.T. Last, L.V. Fleming, 1990.** Identification of ectomycorrhizas. Institute of Terrestrial Ecology, Natural Environment Research Council. London. Institute of Terrestrial Ecology Research Publication 5.

**Katanic, M., T. Grebenc, S. Orlovic, M. Matavuly, B. Kovacevic, M. Bajc, H. Kraihger. 2015.** Ectomycorrhizal fungal community associated with autochthonous white poplar from Serbia. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 9(2): 330.

**Kelly, K.L. 1955.** The ISCC-NBS method of designating colors and a dictionary of color names. Natl Bur. Stand, Circular.  
[https://www.w3schools.com/colors/colors\\_nbs.asp](https://www.w3schools.com/colors/colors_nbs.asp)

**Korkama, T., A. Pakkanen, T. Pennanen.** Ectomycorrhizal community structure varies among Norway spruce (*Picea abies*) clones. *New Phytologist*, 171(4): 815-824.

**Lee, E. H., A. H. Eom. 2013.** Ectomycorrhizal fungal communities of red pine (*Pinus densiflora*) seedlings in disturbed sites and undisturbed old forest sites. *Mycobiology*, 41(2): 77-81.

- LoBuglio, K.F., 1999.** *Cenococcum*. In Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile. Berlin: Springer-Verlag. Chapter 12 pp. 287-309.
- Long, D., J. Liu, Q. Han, X. Wang, J. Huang. 2016.** Ectomycorrhizal fungal communities associated with *Populus simonii* and *Pinus tabulaeformis* in the hilly-gully region of the Loess Plateau, China. Scientific reports, vol. 6: 2433 pp.
- López-Mata, L., 2013.** The impact of seed extraction on the population dynamics of *Pinus maximartinezii*. Acta Oecologica, 49: 39-44.
- Magurran, A.E. 1988.** Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, New Jersey, 179 pp.
- Margalef, R. 1972.** Homage to E. Hutchison, or why is there an upper limit to diversity. Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences 44: 211-235.
- Martin-Pinto, P., H. Vaquerizo, F. Peñalver, J. Olaizola, J.A. Oria-de-Rueda. 2006.** Early effects of a wildfire on the diversity and production of fungal communities in Mediterranean vegetation types dominated by *Cistus ladanifer* and *Pinus pinaster* in Spain. Forest Ecology and Management, 225: 296-305.
- Matsuda, Y., M. Yamakawa, T. Inaba, K. Obase, S.I. Ito. 2015.** Intraspecific variation in mycelial growth of *Cenococcum geophilum* isolates in response to salinity gradients. Mycoscience, 58(5): 369-377.
- Moreno, C.E. 2001.** Manual de métodos para medir la biodiversidad. M&T- Manuales y Tesis SEA. vol1: 84 pp.
- Munsell, A. H. 2000.** Munsell soil color charts. New Windsor, NY, Munsell Color.
- Obase, K., G.W. Douhan, Y. Matsuda, M.E. Smith. 2018.** Isolation source matters: sclerotia and ectomycorrhizal roots provide different views of genetic diversity in *Cenococcum geophilum*. Mycologia, 110(3): 473-481.
- Outerbridge R.A., J.A. Trofymow 2009.** Forest management and maintenance of

ectomycorrhizae: A case study of green tree retention in south-coastal British Columbia. *Journal of Ecosystems and Management*, 10: 59–80

**Palacios, M. Y., G. Palfner, C.E. Hernández. 2012.** The ectomycorrhizal community in a chronosequence of *Pinus radiata* (Pinophyta: Pinaceae) of the transitional Mediterranean-temperate climatic zone of central Chile. *Revista chilena de historia natural*, 85(1): 61-71.

**Pestaña-Nieto M., C.S. Santolamazza. 2009.** Characterization of juvenile maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) ectomycorrhizal fungal community using morphotyping, direct sequencing and fruitbodies sampling. *Mycorrhiza*, 19(2):91–98.

**Ponge, J.F. 1990.** Ecological study of a forest humus by observing a small volume. I. Penetration of pine litter by mycorrhizal fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 20: 290-303.

**Rainer, G., R. Kuhnert, M. Unterholzer, P. Dresch, A. Gruber, U. Peintner. 2015.** Host-Specialist Dominated Ectomycorrhizal Communities of *Pinus cembra* are not Affected by Temperature Manipulation. *Journal of Fungi*, 1(1): 55-75.

**Reverchon, F., M. del Pilar Ortega-Larrocea, G. Bonilla-Rosso, J. Pérez-Moreno. 2012.** Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(2): 479-487.

**Santamaría-Pérez, B., M. Pardos-Mínguez, A.M. Rincon-Herranz. 2013.** Comunidad de hongos ectomicorrízicos asociados al regenerado de *Pinus sylvestris* L. a distinta altitud. In: *Congresos (Sociedad Española de Ciencias Forestales)*.

**Smith, S.E., D.J. Read, 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Third Edition. Academic Press, London. 605 pp.

**Smith, S.E., L.A. Kluber, T.N. Jennings, D. Mackay, G. Brenner, E.W. Sulzman.**

**2017.** Does the presence of large down wood at the time of a forest fire impact soil recovery?. *Forest Ecology and Management*, 391: 52-62.

**Spatafora, J.W., G.W. Douhan, E.W.A. Boehm, C.L. Schoch, 2012.** Phylogenetic placement of the ectomycorrhizal genus *Cenococcum* in Gloniaceae (Dothideomycetes). *Mycologia*, 104: 758-765.

**Taylor A.F.S. 2002.** Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil*, 244: 19 – 28

**Trofymow, J.A., D.M. Goodman, A.J. Thomson. 2001.** Developing an online database of descriptions of ectomycorrhizae. *Journal of Ecosystems and Management*, 1(1): 1-8.



## CAPITULO II. PRIMER REGISTRO DE LA ESPECIE ECTOMICORRÍZICA *Cenococcum geophilum* Fr. CON *Pinus maximartinezii* Rzed. ÁRBOL NATIVO DE MÉXICO

### 2.1. RESUMEN

Pese a su amplia distribución y ubicuidad en diferentes ambientes, *Cenococcum geophilum* ha sido poco estudiado en México, en particular su asociación con especies en peligro de extinción y de distribución restringida, tal es el caso de *Pinus maximartinezii* Rzed. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológica y anatómicamente a *Cenococcum geophilum* asociado en condiciones naturales al pino azul. Para ello se realizó un muestreo de raíces en los cuatro puntos cardinales de árboles adultos. Cada muestra fue extraída con un tubo de PVC (5 cm x 30 cm). Posteriormente en laboratorio, se analizaron las raíces obtenidas en época de sequía y lluvia. *C. geophilum* fue caracterizado morfoanatómicamente de acuerdo a sus rasgos distintivos. De un total de 18 morfotipos *C. geophilum* fue el más abundante, debido a que se encontró en el 42.5% del total de raíces ectomicorrizadas vivas. Es importante mencionar que no existía registro previo de la formación de la simbiosis *Cenococcum geophilum* - *Pinus maximartinezii*. Sin embargo, se requiere realizar estudios de biología molecular con el fin de identificar los diferentes morfotipos ectomicorrízicos asociados al pino azul, así como estudios fisiológicos con el fin de elucidar el papel que desempeña *C. geophilum* en la conservación de esta especie en peligro de extinción y de distribución restringida.

Palabras clave: Micorriza; *Pinus*; especies nativas; regiones semiáridas

## 2.2. ABSTRACT

Despite its wide distribution and ubiquity in different environments, *Cenococcum geophilum* has been little studied in Mexico, particularly its association with endangered species and those with restricted distribution, such as *Pinus maximartinezii* Rzed. The objective of the present work was to characterize morphologically and anatomically *Cenococcum geophilum* associated in natural conditions with blue pine. Roots were sampled at the four cardinal points of adult trees. Each sample was extracted with a PVC tube (5 cm x 30 cm). Later in the laboratory, the roots obtained during the dry season and rain were analyzed. *C. geophilum* was characterized morphoanatomically according to its distinctive features. Among a total of 18 morphotypes *C. geophilum* was the most abundant, because it was found in 42.5% of the total living ectomycorrhizal roots. It is important to mention that there has not been previous record of the formation of the symbiosis *Cenococcum geophilum* - *Pinus maximartinezii*. However, physiological studies are required in order to elucidate the role played by *C. geophilum* in the conservation of this endangered tree species with a very restricted distribution.

Keywords: Micorrhiza; *Pinus*; native species; semi-arid regions.

### 2.3. INTRODUCCIÓN

Las asociaciones micorrízicas son abundantes en el reino vegetal (Smith y Read, 2008; van der Heijden *et al.*, 2015). Se estima que solo un número reducido de plantas vasculares (2 %) forman ectomicorrizas (Dickie *et al.*, 2013), con entre 20 a 25 mil especies de hongos de diversos clados fúngicos (Comandini *et al.*, 2012; van der Heijden *et al.*, 2015). La simbiosis ectomicorrízica, es un componente esencial en la mayoría de las comunidades vegetales que conforman los bosques templados, boreales, tropicales y subtropicales, ya que juegan un importante papel en el crecimiento y supervivencia de sus plantas hospederas, a través de una mayor absorción de nutrientes y agua (Smith y Read, 2008). En intercambio, el hongo ectomicorrízico (EcM) recibe carbono fotosintéticamente fijado por la planta hospedera (Treseder y Lennon, 2015; van der Heijden *et al.*, 2017). Mucha de la sucesión vegetal forestal, establecimiento y rehabilitación de ecosistemas forestales, han sido ligados a la disponibilidad de esporas y esclerocios producidos por una amplia gama de hongos EcM (Garibay-Orijel *et al.*, 2013). Las especies fúngicas responden al estrés ambiental producto de periodos secos y temperaturas extremas, a través de la formación de masas compactas esféricas de micelio endurecido con la apariencia de estructuras en reposo, que se conocen como esclerocios, los cuales contienen sustancias de reserva y agua (Amasya *et al.*, 2015; Matsuda *et al.*, 2015).

Una de las especies ectomicorrízicas más representativas en la producción de estas estructuras de resistencia es *Cenococcum geophilum* Fr., o lo que se considera podría ser un complejo de especies crípticas, es decir, un conjunto de especies estrechamente relacionadas con una variación genética significativa, inclusive dentro de comunidades forestales análogas (Jany *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007; Douhan *et al.*, 2007). Es el único hongo EcM dentro de la clase Dothideomycetes, cuyo genoma fúngico se considera el de mayor tamaño (178 Mb), resultado de su alto contenido en secuencias repetidas (81%) compuestas principalmente de elementos transponible; secuencias de ADN que podrían explicar el éxito de *C. geophilum* para colonizar un amplio rango de hospederos y hábitats, debido a que

estos elementos contribuyen a la plasticidad y adaptación de los hongos a su entorno (Peter et al., 2016); de tal forma que este simbionte fúngico se ha reportado como abundante bajo condiciones de estrés hídrico y suelos erosionados (Chen et al., 2007; Herzog et al., 2012; Obase et al., 2016; Peter et al., 2016). Por lo que, se ha sugerido que genera resiliencia en más de 200 especies vegetales con las que se asocia (40 géneros entre angiospermas y gimnospermas), las cuales se desarrollan bajo condiciones restrictivas de agua (LoBuglio, 1999; Douhan et al., 2007; Tedersoo et al., 2010), tal es el caso de especies el género *Pinus* (Jany et al. 2002; Matsuda et al. 2009).

Se ha mencionado, que la producción de melanina, pigmento que le da el color negro a *C. geophilum*, es un importante rasgo funcional que contribuye a la tolerancia al estrés hídrico de este hongo, e inclusive se ha aludido que la melanina puede ser utilizada por otros micobiontes y otros hongos asociados a las raíces para tolerar tanto el estrés osmótico como la desecación (Fernández y Koide, 2013). Sin embargo, los rasgos fisiológicos específicos responsables del éxito frente al estrés hídrico y su biología en general son poco conocidos (Spatafora et al., 2012; Fernández y Koide, 2013; Peter et al., 2016).

Debido a su morfología distintiva, *C. geophilum* es una de las pocas especies de hongos ectomicorrízicos que se pueden identificar de manera confiable con base en las características morfológicas de las raíces colonizadas (Obase et al., 2017). *C. geophilum* ha sido poco estudiado en México, en particular su asociación con especies de zonas semiáridas, tal es el caso de *Pinus maximartinezii* Rzed, especie endémica y de distribución restringida, puesto que solo se ha reportado para el sur de Durango (González-Elizondo et al., 2011) y sur de Zacatecas (Sierra de Morones, Juchipila), México (Rzedowski, 1964). Donde ocupa una superficie total de 376 km<sup>2</sup>, no obstante, se estima se distribuye en una superficie real de 35 km<sup>2</sup> (Farjon, 2013). De acuerdo a la Lista Roja de especies amenazadas de la IUCN, 2018 y a la NOM-059-SEMARNAT-2010, esta especie se encuentra en peligro de extinción, debido a la recolecta no controlada de semilla, que afecta la regeneración natural de la especie, ganado itinerante dentro del área de distribución e incendios inducidos,

que han destruido gran parte de la población localizada en el sur de Zacatecas (López-Mata *et al.*, 2013). Esta especie forestal, se desarrolla en suelos muy delgados y pedregosos que en ocasiones presentan afloramiento de la roca madre y además es frecuentemente colonizador de lugares que han sido afectados por incendios forestales. Adicionalmente es abundante en laderas, llegando a formar pequeños rodales fragmentados de una hectárea y raramente rodales más grandes (López-Mata y Galván-Escobedo, 2011). *P. maximartinezii*, conocido como pino azul, piñón azul o piñón real, es considerado una especie de interés ornamental, caracterizada por el gran tamaño de sus semillas (Rzedowski, 1964), comestibles y de alto valor nutritivo (López-Mata, 2013). López-Mata y Galván-Escobedo (2011), reportaron la venta de semilla, en el mercado nacional (Pueblo Viejo y Juchipila, Zacatecas) e internacional (Nuevo México, Estados Unidos y Japón), para el año 2005 cotizada en USD\$ 21.60 el kg. Con base en lo anterior, la descripción e identificación de especies ectomicorrízicas que proporcionen nutrimentos y agua, que aminoren los efectos negativos de la sequía y de altas temperaturas son de gran relevancia, para el diseño de estrategias de conservación del pino azul. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue realizar la primera caracterización morfo-anatómica del morfotipo formado por *Cenococcum geophilum* en asociación con *Pinus maximartinezii* creciendo en su área de distribución natural.

## **2.4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.4.1. Localización del área de estudio**

La población de *P. maximartinezii* que se estudió se ubica en el Cerro de Piñones, el cual forma parte de la Sierra de Morones, perteneciente a la Sierra Madre Occidental, a una altitud de entre 1,650-2,500 msnm. Esta población se localiza al sur de Zacatecas, oeste de la comunidad Pueblo Viejo, perteneciente al municipio de Juchipila (21° 20' a 21° 22' N y 103° 12' a 103° 15' O). La precipitación y temperatura máxima anual es de 691 mm y 21.7 °C, respectivamente (Campos-Aranda, 2016). La época seca comprende los meses de enero a mayo, mientras que la mayor precipitación se presenta durante los meses de junio a septiembre

(Medina *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2017). El clima del área de estudio se clasifica como semicálido, semiárido a templado (Ruiz-Garduño *et al.*, 2011).

El pino azul crece sobre una superficie fragmentada, escasamente en terrenos planos y de manera más densa sobre pendientes empinadas (70.02%–142.81%) siendo áreas de difícil acceso; el tipo de suelo es calcáreo, rocoso y muy seco (López-Mata y Galván-Escobedo, 2011; López-Mata, 2013). Dentro del ecosistema natural del pino azul, es posible encontrar especies, tales como *Quercus macrophilla* Nee, *Quercus eduardii* Trel., *Quercus resinosa* Liebm., *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M. C. Johnst., *Pinus lumholtzii* Robins & Ferns y algunas especies arbustivas o semiarbustivas como *Arctostaphylos pungens*, *Arbutus* sp., *Dodonea viscosa* y *Jatropha dioica* Sessé (Rzedowski, 1964; Barrera-Zubiaga *et al.*, 2018); la vegetación dominante es matorral subtropical (*Acacia* sp., *Acacia farnesiana*, *acacia gregii*, etc).

#### **2.4.2. Recolecta del material biológico**

Se establecieron un total de cinco sitios de muestreo y con el fin de descartar la presencia de otros hospederos ectomicorrízicos pertenecientes a las especies forestales circundantes, se seleccionaron rodales puros de árboles adultos de *P. maximartinezii*, (N= 8/1000 m<sup>2</sup>). El método de recolecta fue completamente al azar y se escogieron 5 árboles al azar a una distancia de cada árbol de entre 30 a 50 m. Se tomaron cuatro muestras de suelo por árbol a una distancia aproximada de 1.5 m del tronco del árbol (área de goteo) y en cada uno de los puntos cardinales. Para esto se removió la hojarasca hasta dejar el suelo al descubierto y se tomaron las muestras con tubos de policloruro de vinilo (PVC) de 5X30 cm para la extracción de las muestras. Cada una fue etiquetada y mantenida en los tubos de PVC para su transporte, conservándose a 4°C hasta su procesamiento de acuerdo a la metodología propuesta por Argüelles *et al.* (2016), modificada para las condiciones de bosque de *P. maximartinezii*. Se llevaron a cabo dos muestreos, el primero se realizó en época seca (mayo del 2017) y el segundo en la época de lluvia (septiembre del mismo año), El número total de muestras fue n= 40.

### **2.4.3. Caracterización morfológica de *C. geophilum***

En el laboratorio de Micorrizas del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, se efectuó la extracción de raíces, para lo cual se realizó el siguiente procedimiento: cada muestra fue colocada en recipientes con agua destilada durante un periodo de 24 horas, con la finalidad de eliminar las partículas de suelo adherido a las raíces. Posteriormente, se realizó un tamizado (de malla 16, abertura 1.18 mm) y con la ayuda de pinzas de disección se recolectaron las raíces las cuales fueron conservadas en alcohol 70%). Enseguida, con la ayuda de un microscopio estereoscópico marca LEICA (mismo con el que se tomaron las fotografías) se realizó la descripción macroscópica y microscópica, para la que se efectuaron cortes histológicos transversales del morfotipo *C. geophilum*. Realizado lo anterior, se observó bajo microscopio los tejidos: manto fúngico, manto interno y red de Hartig, realizándose la caracterización e identificación de acuerdo a las características distintivas propuestas para esta especie (Trappe, 1964; LoBuglio, 1999).

## **2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se identificó a *C. geophilum* asociado con raíces de árboles adultos de *P. maximartinezii*, especie endémica y en peligro de extinción localizada al sur del estado de Zacatecas (Sierra Morones, cerca del municipio de Juchipila). De un total de 18 morfotipos, *C. geophilum* fue el más abundante, dado que se encontró en el 42.5% del total de raíces ectomicorrizadas vivas analizadas (18.3 y 24.2 % para época seca y de lluvia, respectivamente). Es importante señalar que en el área de estudio la precipitación promedio que se ha reportado es de 691 mm (Campos-Aranda, 2016) y durante el año que se realizaron los muestreos fue de 390 mm (Medina *et al.*, 2017), por lo cual se considera que el pino azul estuvo sometido a condiciones de estrés hídrico y altas temperaturas (35.8°C promedio anual); aunado a esto y posterior al muestreo correspondiente al mes de mayo, se tuvo una perturbación por incendio forestal, que afectó gran parte de la población natural de pino azul. No obstante, estas condiciones *C. geophilum* fue el morfotipo más

abundante, de manera que se infiere la importancia que juega este simbiote en la conservación del pino azul, el cual se desarrolla bajo condiciones de estrés hídrico, altas temperaturas y suelos erosionados.

Se ha demostrado que a pesar de la exploración a corta distancia por parte de este simbiote fúngico, puede proporcionar ventajas al sistema radical de su hospedero en absorción de nutrimentos y agua (Jany *et al.*, 2002), contribuyendo en la conservación y supervivencia de múltiples especies forestales (Mohatt *et al.*, 2008; Nedelin, 2014). Previamente, *C. geophilum* se ha reportado asociado a árboles adultos de *Pinus sylvestris* en Francia (Ponge *et al.*, 1990); en *Pinus thunbergii*, Korea (Obase *et al.*, 2010); *Pinus densiflora* en China (Ma *et al.*, 2012), asimismo, para la sierra de México (Sierra de Chichinautzin) asociado a *Pinus montezumae* (Reverchon *et al.*, 2010); considerándose, por lo tanto un simbiote dominante en bosques de pinos, tanto en árboles maduros como en plántulas que se regeneran naturalmente (Obase *et al.*, 2010; Peter *et al.* 2016; Garay-Serrano *et al.* 2018). Al respecto, se ha reportado a *C. geophilum* como el hongo EcM más frecuente (64%) y abundante (51%) en plántulas de *Pinus albicaulis*, debajo del área de goteo de árboles adultos y menos abundante en plántulas más alejadas de los árboles (Mohatt *et al.*, 2008), así como en plántulas y juveniles *Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt. y *Picea engelmannii* Parry (Hasselquist *et al.*, 2005). Mientras que, en *Pinus mugo* subsp. Turra y *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc., *C. geophilum* se registró en una abundancia relativa dos veces mayor en plántulas que en árboles adultos en la región costera de Lituania y al este de China (Aučina *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012), lo que se puede atribuir al papel vital que desempeña *C. geophilum* en la regeneración de los rodales (Ma *et al.*, 2012).

Es importante señalar que existe otros mecanismos diferentes a los aportados por la simbiosis EcM que contribuyen en la supervivencia de las plántulas, tales como tolerancia al sombreado, resistencia a patógenos, herbívoros y predadores de semillas (Mc Guire, 2007). Al mismo tiempo, las consecuencias ecológicas de simbioses generalistas, tales como *C. geophilum* versus simbioses más específicos (*Rhizopogon* y *Suillus* spp.) en el establecimiento de plántulas son poco conocidos



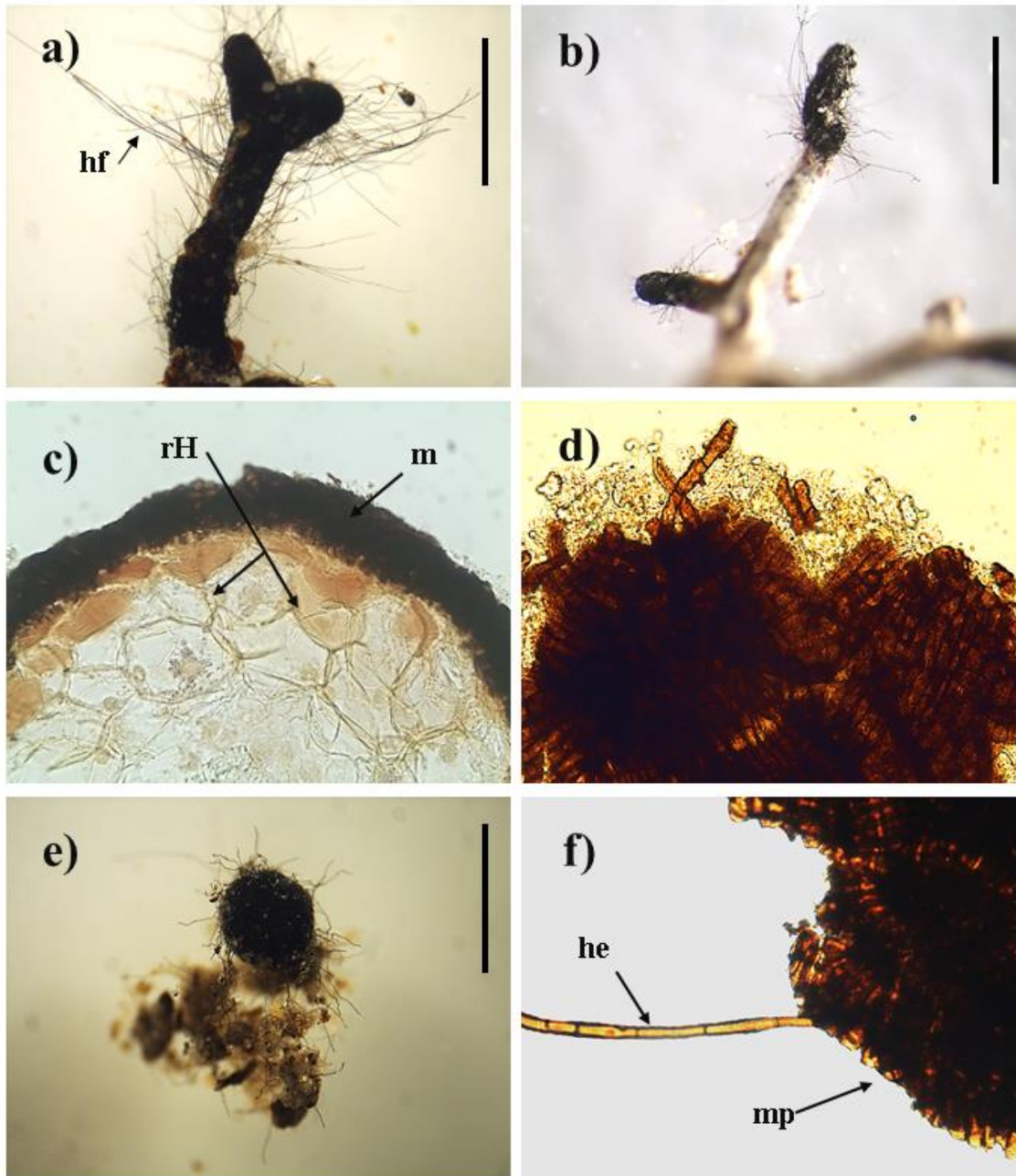
(Mohatt *et al.*, 2008). No obstante, se argumenta el importante papel de *C. geophilum* al incrementar la tolerancia a la sequía, de tal manera que dicha asociación podría beneficiar a especies forestales que habiten bajo condiciones de estrés hídrico, suelos erosionado y en la supervivencia de múltiples especies de coníferas (Mohatt *et al.*, 2008; Nedelin, 2014).

### **2.5.1. Descripción del morfotipo *Cenococcum geophilum* Fr. con *P. maximartinezii***

#### **Características morfoanatómicas**

La ramificación del morfotipo *C. geophilum* asociado con *P. maximartinezii*, fue dicotómica o simple (Figura 7a), cuya longitud varia de entre 4 a 5 mm, lo cual coincide con lo observado en *Pinus sylvestris* y *Pinus montezumae* (Ponge, 1990; Garay-Serrano, *et al.*, 2018), así como en *Picea sitchensis* (Ingleby *et al.*, 1990) en los cuales la ramificación fue simple y dicotómica; mientras que en especies como *Pinus resinosa* y *Pinus densiflora* solo forman ramificación simple (LoBuglio, 1999; Ma *et al.*, 2010). El morfotipo presenta un color negro carbonizado y una superficie brillante (Trappe, 1964; Ponge, 1990; LoBuglio, 1999; Spatafora *et al.*, 2012); desde la superficie del manto de aspecto granuloso se desarrollan abundantes hifas gruesas de color café oscuro a negras (Figura 7a), no ramificadas, frecuentemente curvas y con presencia de septos a distancia irregular; esta red de filamentos de exploración corta conforma un micelio extraradical bien desarrollado y concentrado principalmente en el ápice de los morfotipos evaluados. La disposición y organización del manto es plectenquimatoso, con hifas dispuestas radialmente (Figura 7d), y un patrón tipo estrella corresponde al tipo G, es decir, con hifas distribuidas de forma compacta y sin espacio entre ellas (Agerer y Rambold, 2004-2018). Se ha reportado un espesor del manto externo para *Pinus resinosa* entre 20-30  $\mu\text{m}$  (LoBuglio, 1999) y de 10 a 25  $\mu\text{m}$  de espesor para *Piceas sitchensis* (Ingleby *et al.*, 1990). Respecto a la red de Hartig, interface entre la planta hospedera y su micosimbionte, solo ocupo de una a dos capas de células corticales cercanas a la epidermis (Figura 7e), lo cual coincide con lo reportado para *Pinus ayacahuite*

(Arteaga-León, 2014); y no se registraron estructuras como rizomorfos o cistidios. Así mismo, los esclerocios presentaron una consistencia dura, color negro, y en su mayoría forma esférica con cuantiosas hifas emanantes; datos similares han sido descritos en la literatura (Amasya *et al.*, 2015), estas estructuras se encontraron en abundancia pero no se detectaron en asociación directa o cercanos a los morfotipos de *C. geophilum*, dato contrastante con lo reportado por Trappe (1969), quién menciona que los esclerocios son abundantes en la micorrizosfera de *C. geophilum* y su planta hospedera. El diámetro estimado oscilo entre 0.04 a 4 mm en *P. maximartinezii*, mientras que Arteaga-León (2014), reportó un diámetro para estas estructuras en *Pinus ayacahuite* de 0.5 a 1.5 mm, mayores diámetros de 0.4-2.6 mm y 0.8-4.4 mm fueron reportados por Amasya *et al.* (2015).



**Figura 7.** Ectomicorriza de *Cenococcum geophilum* con *Pinus maximartinezii*. a) Morfotipo ectomicorrízico dicotómico (4X); b) Morfotipo ectomicorrízico simple (2.1X); c) Corte transversal: manto (m) y red de Hartig (rH) (40X); d) Manto plectenquimatoso melanizado t tipo G; e) esclerocio característico de *C. geophilum* (4.5X); f) Manto plectenquimatoso (mp) con hifa emanante (he) (40X) (Barra = 0.5mm)).

## 2.6. CONCLUSIONES

De un total de 18 morfotipos, *C. geophilum* fue el más abundante, dado que se registró en 42.5% del total de raíces ectomicorrizadas vivas analizadas (18.3 y 24.2% para época seca y de lluvia, respectivamente). Es importante enfatizar que no existía registro previo de la formación de la simbiosis *Cenococcum geophilum* - *Pinus maximartinezii*. Las características morfoanatómicas del morfotipo formado por *C. geophilum* y *P. maximartinezii* creciendo en su área de distribución natural, son similares a las descritas por diversos autores para otras especies forestales. Es importante identificar molecularmente y realizar trabajos de fisiología que nos permitan elucidar el papel que juega este simbionte y los otros morfotipos ectomicorrízicos en la conservación de esta especie forestal en peligro de extinción, la cual se desarrolla bajo condiciones de estrés hídrico, altas temperaturas y suelos erosionados.

## 2.7. LITERATURA CITADA

- Amasya, A.F., K. Narisawa, M. Watanabe, 2015.** Analysis of sclerotia-associated fungal communities in Cool-temperate forest soil in north Japan. *Microbes and Enviroments*, 30:113:116.
- Agerer, R., G. Rambold, 2004-2018.** DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. [www.deemy.de](http://www.deemy.de) – München, Germany.
- Argüelles-Moyao, A., R. Garibay-Orijel, L.M. Márquez-Valdelamar, E. Arellano-Torres, 2016.** *Clavulina-Membranomyces* is the most important lineage within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza*, 27: 53-65.
- Arteaga-León, C., 2014.** Ectomicorización con hongos de la Sierra Nevada, México en el crecimiento y movilización nutrimental de *Pinus ayacahuite* Ehrenb. Ex Schldl. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco Edo. de México.
- Aučina, A., M. Rudawska, T. Leski, D. Ryliškis, P. Pietras, E. Riepšas, 2011.** Ectomycorrhizal fungal communities on seedlings and conspecific trees of *Pinus mugo* grown on the coastal dunes of the Curonian Spit in Lithuania. *Mycorrhiza*, 21:237–245.
- Campos-Aranda, D.F., 2016.** Annual Meteorological Droughts Study by Means of the Aridity Index, in the Zacatecas State of Mexico. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 17(3): 405-417.
- Chen L.H., Y.A.N. Wei, X.U. Yan, 2007.** Identification and preliminary analysis og the genetic diversity of *Cenococcum geophilum* Fr. *Agricultural Sciences in China* 6: 956-963.
- Comandini, O., A.C. Rinaldi, T.W. Kuyper, 2012.** Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: a continuous challenge. *Mycorrhiza: ocurrence in natural and restored enviroments*. Marcela Pagano. Nova Science Publishers.

Nueva York. pp. 165 – 200.

**Dickie, I.A., L. B. Martínez-García, N. Koele, G. A. Grelet, J. M. Tylianakis, D. A. Peltzer, S. J. Richardson. 2013.** Mycorrhizas and mycorrhizal fungal communities throughout ecosystem development. *Plant Soil*, 367:11–39.

**Douhan, G.W., K.L. Huryn, L.I. Douhan, 2007.** Significant diversity and potential problems associated with inferring population structure within the *Cenococcum geophilum* species complex. *Mycologia*, 99: 812-819.

**Farjon, A. 2013.** *Pinus maximartinezii*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Consultado: 12 de junio de 2017.

**Fernández, C.W., R.T. Koide, 2013.** The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology*, 6: 479-486.

**Garay-Serrano, E., M.P. Ortega-Larrocea, F. Reverchon, I. Suárez-Quijada, 2018.** Persistence of ecto- and ectendomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* in experimental microcosms. *Symbiosis*, 74: 67–78.

**Garibay-Orijel, R., E. Morales-Marañón, M. Domínguez-Gutiérrez, A. Flores-García, 2013.** Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84: 153-169.

**González-Elizondo, M., S. González-Elizondo, L. Ruacho-González, M. Molina-Olvera, 2011.** *Pinus maximartinezii* rzed. (Pinaceae), primer registro para Durango, segunda localidad para la especie. *Acta Botánica Mexicana*, 96: 33-48.

**García-Guzmán, O.M., R. Garibay-Orijel, E. Hernández, E. Arellano-Torres, K. Oyama, 2017.** World-wide meta-analysis of *Quercus* forest ectomycorrhizal fungal diversity reveals southwestern Mexico as a hotspot. *Mycorrhiza*, 27: 811-822.

**Hasselquist, N., M.J. Germino, T. McGonigle, W.K. Smith, 2005.** Variability of *Cenococcum* colonization and its ecophysiological significance for young conifers at alpine-treeline. *New Phytologist*, 165: 867–873.

- Heijden, M.G.A., F.M. Martin, MA. Selosse, I.R. Sanders, 2015.** Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205: 1406 – 1423.
- Herzog, C., M. Peter, K. Pritsch, M.S. Gunthardt-Goerg, S. Egli, 2012.** Drought and air warming affects abundance and exoenzyme profiles of *Cenococcum geophilum* associated with *Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*. *Plant Biology*, 15: 230-237.
- Ingleby, K., P.A. Manson, F.T. Last, L.V. Fleming, 1990.** Identification of ectomycorrhizas. Institute of Terrestrial Ecology, Natural Environment Research Council. London. Institute of Terrestrial Ecology Research Publication 5.
- IUCN, 2017.** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. <<http://www.iucnredlist.org>> Consultado el 18 de junio de 2017.
- Jany, J.L., J. Garbaye, F. Martin, 2002.** *Cenococcum geophilum* population show a high degree of genetic diversity in beech forests. *New Phytologist*, 154: 651-659.
- LoBuglio, K.F., 1999.** *Cenococcum*. In *Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 287-309.
- López-Mata, L., I.G. Galván-Escobedo, 2011.** Extracción de semillas de *Pinus maximartinezii* y sus consecuencias poblacionales. *Biodiversitas*, 98:1-7.
- López-Mata, L., 2013.** The impact of seed extraction on the population dynamics of *Pinus maximartinezii*. *Acta Oecologica*, 49: 39-44.
- Ma, D., G. Yang, L. Mu, 2010.** Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in *Pinus densiflora* seedlings. *Symbiosis*, 51: 233–238.
- Ma, D., S. Zang, L. Wan, D. Zhang, 2012.** Ectomycorrhizal community structure in chronosequences of *Pinus densiflora* in eastern China. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 6204-6209.
- Mc Guire K.L., 2007.** Common ectomycorrhizal networks may maintain monodominance

in a tropical rain forest. *Ecology*, 88: 567–574.

**Matsuda, Y., N. Hayakawa, S. Ito, 2009.** Local and microscale distribution of *Cenococcum geophilum* in soil of coastal pine forest. *Fungal Ecology*, 2: 31-35.

**Matsuda, Y., K. Takeuchi, K. Obase, S. Ito, 2015.** Spatial distribution and genetic structure of *Cenococcum geophilum* in coastal pine forest in Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 91: 1-14.

**Medina, G.G., F.J.I. Casas, M.M.P. Narvaez, M.V.M. Rodríguez, 2017.** Reporte agromereológico. Red de monitoreo agroclimático del estado de Zacatecas. Centro de Investigación Regional Norte Centro (INIFAP), Campo Experimental Zacatecas. Folleto informativo No. 159 pp. 1-28.

**Medina G. G., J.I.F. Casas, G.M.A. González, S.A. Corrales, J.L.A. González, 2016.** Red de monitoreo agroclimático del Estado de Zacatecas. Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental Zacatecas, Calera, Zacatecas, México.

**Mohatt, K.R., C.L. Cripps, M. Lavin, 2008.** Ectomycorrhizal fungi of whitebark pine (a tree in peril) revealed by sporocarps and molecular analysis of mycorrhizae from treeline forests in the Greater Yellowstone Ecosystem. *Botany*, 86:14–25.

**Nedelin, T., 2014.** Ectomycorrhiza–nature and significance for functioning of forest ecosystems. *Forestry ideas*, 20, 3-29.

**Nobuo, S., 2010.** Analysis on formation factor of sclerotia of *Cenococcum geophilum* in *Piceas abies* forest, Harz Mts., Germany. *Geographical review of Japan series B* 82(2): 184-195.

**Obase, K., G.W. Douhan, Y. Matsuda, M.E. Smith, 2016.** Revisiting phylogenetic diversity and cryptic species of *Cenococcum geophilum* sensu lato. *Mycorrhiza*, 26: 529-540.

**Obase, K., G.W. Douhan, Y. Matsuda, M.E. Smith, 2017.** Progress and challenges in understanding the Biology, Diversity, and Biogeography of *Cenococcum geophilum*.



In Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Springer, Cham, pp. 299-317.

**Peter M., A. Kohler, R.A. Ohm, A. Kuo, J. Krützmann, E. Morin, M. Arend, K.W. Barry, 2016.** Ectomycorrhizal ecology is imprinted in the genome of the dominant symbiotic fungus *Cenococcum geophilum*. Nature Communications 7: 12662 pp.

**Ponge, J.F. 1990.** Ecological study of a forest humus by observing a small volume. I. Penetration of pine litter by mycorrhizal fungi. European Journal of Forest Pathology, 20: 290-303.

**Reverchon, F., M.D.P. Ortega-Larrocea, J. Pérez-Moreno, V.M. Peña-Ramírez, C. Siebe, 2010.** Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, Mexico. Canadian Journal of Forest Research, 40: 1165-1174.

**Ruiz-Garduño, R. R., M. Márquez Madrid, R.D. Valdez Cepeda, F. Blanco Macías y J. C. Ledesma Mares. 2011.** Estado y conservación del pino azul (*Pinus maximartinezii*) y sus especies asociadas en la Sierra de Juchipila, Zacatecas. pp. 351–361. En: Laclette J.P, P. Zúñiga y J. A. Romero (Eds.). El Impacto de los Fondos Mixtos en el Desarrollo Regional. CONACYT, FCCYT y REDNACECYT. Ciudad de México, México. 390 pp.

**Rzedowski, J. 1964.** Una especie nueva de pino piñonero del estado de Zacatecas (México). Ciencia, 23: 17-20.

**Sakagami, S., 2010.** Analysis on formation factor of sclerotia of *Cenococcum geophilum* in *Picea abies* forest, Harz Mts., Germany. Geographical review of Japan series B, 82: 184-195.

**SEMARNAT, 2010.** Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, “Protección ambiental – Especies nativas de México de flora y fauna silvestre – categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo”, Segunda Sección, México (2010). Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre del 2010.

- Smith, S.E., D.J. Read, 2008.** Mycorrhizal symbiosis. Third Edition. Academic Press, London. 605 pp.
- Spatafora, J.W., G.W. Douhan, E.W.A. Boehm, C.L. Schoch, 2012.** Phylogenetic placement of the ectomycorrhizal genus *Cenococcum* in Gloniaceae (Dothideomycetes). *Mycologia*, 104: 758-765.
- Tedersoo, L., T.W. May, M.E. Smith, 2010.** Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20: 217-263.
- Trappe, J.M., 1964.** Mycorrhizal host and distribution of *Cenococcum graniforme*. *Lloydia*, 27: 100-106.
- Trappe, J.M., 1969.** Studies on *Cenococcum graniforme*. I. An efficient method for isolation from sclerotia. *Canadian Journal of Botany*, 47: 1389-1390.
- Treseder, K.K., J.T. Lennon, 2015.** Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2): 243-262
- Van der Heijden, M.G.A., F.M. Martin, M.A. Selosse, I.R. Sanders, 2015.** Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205: 1406–1423.
- Van der Heijden M.G.A, N. Dombrowski, K. Schlaeppi, 2017.** Continuum of root–fungal symbioses for plant nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 11574-11576

### CAPITULO III. EFECTOS DE LA COINOCULACION DE HONGOS ECTOMICORRIZICOS Y LA BACTERIA *Azospirillum brasilense* SOBRE EL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN DE *Pinus maximartinezii* Rzed.

#### 3.1. RESUMEN

Los hongos ectomicorrízicos participan en el desarrollo de las plantas a través de una absorción más eficiente de nutrientes y agua, que incrementan su productividad y tolerancia a condiciones de estrés. Dentro de esta asociación las bacterias constituyen un tercer componente el cual desempeña también un papel crucial dentro de los ecosistemas forestales. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro fuentes de inóculo ectomicorrízico y la bacteria *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento, contenidos de elementos primarios (N, P, K) y secundarios (Fe, Na, Zn), porcentaje de colonización ectomicorrízica y absorción de nutrientes. Se observó un efecto sinérgico cuando se coinoculó (*Laccaria proxima* o *Helvella lacunosa*) con *A. brasilense*, lo cual se expresó en un mayor crecimiento de las plantas. Las plantas inoculadas con *L. proxima* + *A. brasilense* o *H. lacunosa* + *A. brasilense* presentaron mejor calidad fisiológica que las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria, así como las plantas testigo. Una tendencia similar se observó en los contenidos de macronutrientes y micronutrientes. La mayor movilización nutrimental a la parte aérea (P, K, Fe, Na y Zn) se observó en las plantas inoculadas con *L. proxima*. La colonización micorrízica varió entre 68.69 a 92.73%, registrándose el mayor porcentaje en plantas inoculadas con suelo nativo + *A. brasilense*. Asimismo, se registraron un total de ocho morfotipos EcM asociados a plantas jóvenes de pino azul en las que se inoculó suelo nativo. Se concluye que la inoculación individual de hongos EcM o dual (hongo-bacteria) representa un potencial biotecnológico para la producción de plantas de calidad con mayor probabilidad de supervivencia bajo condiciones climáticas y edáficas adversas, lo cual podría garantizar el éxito en programas de reforestación de dicha especie forestal en peligro de extinción.

**Palabras clave:** simbiosis ectomicorrízica; biotecnología forestal; reforestación; rizobacteria, inoculación.

### 3.2. ABSTRACT

Ectomycorrhizal fungi actively participate in the development of plants through the efficient absorption of nutrients and water which increase their productivity and tolerance to stress conditions. In this association, bacteria constitute a third component which also plays a crucial role within forest ecosystems. The objective of this study was to evaluate the effect of four sources of ectomycorrhizal inoculum and the bacterium *Azospirillum brasilense* (Ab) on growth, macronutrient contents (N, P, K) and micronutrients (Fe, Na, Zn), percentage of ectomycorrhizal colonization and nutrient absorption. A synergistic effect of the fungus (*L. proxima* and *H. lacunosa*) and the bacterium *A. brasilense* on biomass, diameter and height was observed. However, in some variables equal or higher values were recorded when the HEcM were inoculated without the bacteria. The plants inoculated with *H. lacunosa* and *H. lacunosa* + *A. brasilense* showed higher physiological quality than the plants without inoculation or those inoculated exclusively with the bacteria. A similar trend was observed in the contents of macronutrients and micronutrients. The highest nutrimental mobilization to the shoots (P, K, Fe, Na and Zn) was observed in the plants inoculated with *L. proxima*. The mycorrhizal colonization varied from 68.69 to 92.73%, with the highest percentage registered in plants inoculated with native soil + *A. brasilense*. Likewise, a total of eight EcM morphotypes associated with young blue pine plants in which native soil was inoculated were recorded. Therefore, it is concluded that the individual inoculation of EcM fungi and dual bacteria such as *A. brasilense* improve the physiological and nutritional quality of plants of *P. maximartinezii*, since their implementation and knowledge of native HEcM represent an enormous biotechnological potential in the production of plants of this forest species in danger of extinction.

**Keywords:** ectomycorrhizal symbiosis; forest biotechnology; reforestation; rhizobacteria; inoculation.

### 3.3. INTRODUCCIÓN

El papel que desempeña las asociaciones de hongos ectomicorrízicos (EcM) en la nutrición de árboles forestales actualmente es reconocido como crucial para la salud de los ecosistemas boreales, templados, subtropicales y algunos tropicales (Pérez-Moreno y Read, 2004; Smith y Read, 2008; Váldez *et al.*, 2018), así como ser una relación fundamental al atenuar factores de estrés e incrementar el crecimiento y rendimiento de las plantas (Franco *et al.*, 2014).

La simbiosis EcM tiene efectos positivos en la planta hospedera, principalmente bajo condiciones ambientales desfavorables (Cairney, 2012; Gómez-Romero *et al.*, 2015), mismas condiciones que han influido de manera notable en la pérdida de bosques alrededor del mundo (FAO, 2010). Dentro de los beneficios que aporta la interacción entre el micelio de cientos de diferentes especies de hongos EcM y billones de raicillas de plantas colonizadas (Martin *et al.*, 2016), se destaca el incremento de la superficie de exploración de suelo, más allá del que la planta pueda explorar por sí sola, facilitando el acceso a nutrientes minerales como nitrógeno, fósforo y aumentando la captación de agua (Read y Pérez-Moreno, 2004; Courty *et al.*, 2006). Además, constituye un importante factor de protección contra potenciales patógenos de la raíz, resistencia contra enfermedades, condiciones adversas; por ejemplo, resistencia contra enfermedades, condiciones adversas (pH extremo, temperatura, metales pesados y pesticidas) y en la formación y mantenimiento de la estructura del suelo (Smith y Read, 2008); beneficios reflejados en una mayor supervivencia y crecimiento vegetal. En intercambio, la planta hospedera proporciona carbohidratos fotosintéticos y otros exudados de la raíz a los micobiontes asociados (Sousa *et al.*, 2010). Así que el papel de los hongos EcM se engloba en incrementar el crecimiento y desarrollo del hospedero y en mitigar condiciones de estrés (López-Gutiérrez *et al.*, 2018); lo que sin duda hace de su implementación como herramienta biotecnológica una alternativa para las múltiples actividades que derivan en una silvicultura sustentable y con ello, en el mantenimiento y aumento de las áreas boscosas.

Los incendios forestales a menudo tienen un impacto en las propiedades físicas y

químicas del suelo (Sousa *et al.*, 2010), en la disponibilidad de agua y probablemente tengan un efecto en la composición y ensamblaje de las comunidades de hongos EcM, así como en su papel ecológico (Cairney y Bastias, 2007; Sousa *et al.*, 2011; Egidi *et al.*, 2016). Por otro lado, se considera que estos organismos fúngicos EcM juegan un rol clave en el complejo proceso de resiliencia de los ecosistemas forestales posterior a la presencia de tal agente de perturbación (Vasquez-Gassibe *et al.*, 2016; Dove y Stephen, 2017). Bajo este escenario, la introducción de plantas inoculadas con HEcM seleccionados puede resultar beneficioso, sobre todo en la implementación de aquellos simbioses fúngico adaptados al fuego (Franco *et al.*, 2014; Glassman *et al.*, 2015); sin embargo, estos beneficios pueden variar de acuerdo con las condiciones ambientales y las especies involucradas en la simbiosis mutualista (Barroetaveña *et al.*, 2012).

Lo anterior, debido a que esta simbiosis mutualista puede ser mejorada por la asociación de bacterias rizosféricas (Cumming *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2018), dado que ayudan al establecimiento y estimulación de la micorriza, a su morfología, y expresión fúngica de sus asociados fúngicos (Deveau *et al.* 2007; Kataoka y Futai, 2009; Hryniewicz *et al.*, 2010), además, de favorece la morfología y fisiología de las plántulas (Dominguez-Nuñez *et al.*, 2015). Por lo que se han catalogado como bacterias auxiliaoras de la micorrización (BAM) o MHB (mycorrhizal helper bacteria) por sus siglas en inglés (Garbaye, 1994).

Diversas investigaciones han demostrado los beneficios de la coinoculación de hongos EcM y bacterias rizosféricas (Sousa *et al.*, 2015; Barragán-Soriano *et al.*, 2017), pues se infiere podrían contribuir a una serie de condiciones benéficas como: el mejoramiento metabólico, en cuanto a la adquisición de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo (Frey-Klett *et al.*, 2007); la estimulación del crecimiento de la raíz; en la modificación de las comunidades microbianas de la rizósfera (Hryniewicz *et al.*, 2010) e influir en aspectos estructurales y funcionales de los hongos ectomicorrízicos asociados, mejorando con ello a la vez, el rendimiento del árbol y la resistencia a condiciones de estrés ambiental (Cumming *et al.*, 2015). Incluso los beneficios de la coinoculación pueden ser ventajosos, cuando las condiciones

ambientales son desfavorables para los hongos EcM (Sousa *et al.*, 2015). Adicionalmente a los beneficios ecológicos, existen ventajas económicas al reducir el tiempo de estancia en vivero de plantas inoculadas previo a su transferencia a plantaciones forestales.

Pese a que esta simbiosis de árboles y plantas, se ha utilizado en programas de reforestación a gran escala (Karkouri *et al.*, 2005), la implementación y el efecto en la fisiología, nutrición y crecimiento de las plantas forestales como resultado de esta asociación tripartita, es aún información incipiente, por lo que más estudios son vitales para dilucidar el comportamiento sinérgico en diferentes escenarios. Por consiguiente, la presente investigación tuvo como objetivo: Evaluar el efecto de la inoculación de cuatro fuentes de inóculo ectomicorrízico y la coinoculación con bacterias auxiliaadoras de la micorrización (*Azospirillum brasilense*), sobre el crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus maximartinezii*. Adicionalmente se realizó la caracterización de los morfotipos ectomicorrízicos y se evaluó el porcentaje de micorrización.

### **3.4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.4.1. Material vegetal**

El germoplasma utilizado para establecer el experimento en invernadero fue adquirido mediante CONAFOR y colectado dentro del predio natural Pino Azul (Área Natural Protegida) localizado al sur de Zacatecas, México (Figura 8 a, b). El experimento se estableció durante el periodo de junio 2017 a agosto 2018 con un total de 416 días hasta su evaluación (Figura 8 c, d, e, f).

Previo a la siembra, las semillas de *P. maximartinezii* se colocaron dentro de un contenedor con agua estéril durante 24 horas, cambiando el agua en un lapso de ocho horas para permitir el flujo de oxígeno hacia estas. Lo anterior con la finalidad de eliminar aquellas que flotarían sobre la superficie del agua. Posteriormente, las semillas restantes sumergidas y sin alguna rotura aparente sobre la testa fueron esterilizadas mediante inmersión en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30% durante

20 minutos en agitación y enjuagadas enseguida con suficiente agua destilada estéril (Martínez-Reyes *et al.*, 2012; León-Arteaga, 2014) para eliminar el exceso de desinfectante. Las semillas con pequeñas aberturas solo fueron esterilizadas superficialmente con Captan® M-50 en una proporción de 2 g.L<sup>-1</sup> durante una hora después de las 24 h de inmersión.

### **3.4.2. Material biológico**

Se utilizaron esporomas procedentes del mercado local de Ozumba, Estado de México de las especies *Laccaria proxima* (Boud.) Pat. y *Helvella lacunosa* Afzel. para el experimento biotecnológico. Así como suelo nativo (Sn), tercera fuente de inóculo, proveniente de la rizósfera de pino azul y recolectado en época seca, mismo que se implementó como cuarta fuente de inóculo, pero posterior al incendio forestal y en época de lluvia.

La preparación del inóculo en fresco de *L. proxima* y *H. lacunosa*, consistió en separar los píleos de los estípes y moler únicamente los píleos en una licuadora con agua en proporciones 1:1. El suelo nativo se extrajo de puntos al azar en los que dominaban árboles juveniles de la especie *P. maximartinezii* cercar del área de goteo de los mismos y a una profundidad de entre 25 a 30 cm. Para lo anterior, en campo se utilizaron palas y costales; este fue tamizado para la homogenización de partículas y almacenado a 5°C hasta su utilización. Mismo procedimiento fue realizado para obtener el suelo nativo incendiado que fue utilizado como inóculo.

### **3.4.3. Cepas bacterianas**

Se utilizaron dos cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal de *Azospirillum brasilense* (1. Mayormente solubilizadora de fosfóro 2. Auxinas) aisladas a partir de plantas de maíz, proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Ambas cepas fueron mezcladas y se inocularon 5 mL de la suspensión bacteriana y a una concentración de 10<sup>9</sup> ufc mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colonias por mililitros) aplicado con la ayuda de una micropipeta en cada una de las plantas. Con



la finalidad de potenciar el efecto sinérgico de estas cepas bacterianas se realizó una reinoculación 90 días después de la primera.

#### **3.4.4. Diseño experimental**

La siembra se efectuó en contenedores de plástico negro de 125 cm<sup>3</sup> a una profundidad de 2 cm. Anterior a su llenado los contenedores fueron desinfectados por inmersión en cloro al 20% y alcohol a 96%; en la parte inferior de cada tubete se colocó algodón estéril, con la finalidad de retener en mayor medida el sustrato de crecimiento (Zúñiga-Cruz, 2018), el cual consistió en una mezcla compuesta de arena de río, corteza de pino y suelo forestal en una proporción 2:2:1 respectivamente (sustrato Colpos). Previo a su uso el sustrato se esterilizó en autoclave con vapor de agua a 125 °C durante un periodo de tres horas, dejándolo reposar por 48 h para después realizar una segunda esterilización durante dos horas.

La inoculación de los hongos ectomicorrízicos a *P. maximartinezii* correspondió a 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> esporas por planta, concentración determinada con un hematocitómetro. El suelo nativo inoculado consistió en 10 g de suelo por contenedor, inoculado a 2 cm de profundidad de la parte superior del tubete. Se realizaron dos inoculaciones por separado; la primera se efectuó simultáneamente a la siembra (*Laccaria proxima* y suelo nativo) y la segunda 103 días después (*Helvella lacunosa* y suelo nativo incendiado). Las bacterias se inocularon seis meses después de establecer el experimento y se realizó una re-inoculación dos meses después. Adicionalmente se mantuvieron pinos sin inocular que correspondieron a los testigos.

En total se establecieron 10 tratamientos (Cuadro 7). Cada tratamiento consto de 12 repeticiones, por lo que en total se obtuvieron 120 unidades experimentales, cada una constituida por una planta.

**Cuadro 7.** Tratamientos establecidos con plantas de *P. maximartinezii*.

Tratamientos	Inóculos	Clave de referencia
1	Testigo (sin inocular)	pT
2	<i>Azospirillum brasilense</i>	Ab
3	<i>Laccaria proxima</i>	Lp
4	<i>Laccaria proxima</i> + Ab	Lp+Ab
5	Suelo nativo	Sn
6	Suelo nativo + Ab	Sn+Ab
7	<i>Helvella lacunosa</i>	HI
8	<i>Helvella lacunosa</i> + Ab	HI+Ab
9	Suelo nativo incendiado	Sni
10	Suelo nativo incendiado + Ab	Sni+Ab

Con el fin de prevenir problemas de “damping-off” en las plantas, se aplicó en el riego el fungicida Captan® M-50 (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida), en solución de 2.5 g L<sup>-1</sup> cada tercer día hasta la lignificación de los tallos (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010; Arteaga-León, 2014). Así mismo, con el objetivo de controlar el esparcimiento de esporas entre los diferentes tratamientos, se diseñaron módulos en los cuales los contenedores fueron colocados en bandejas, acondicionándoles en la parte superior una estructura plástica (Figura 8f) con el propósito de controlar la contaminación cruzada entre tratamientos (Carrasco- Hernández *et al.*, 2011).

### 3.4.5. Variables evaluadas

#### 3.4.5.1. Crecimiento vegetal de *P. maximartinezii*

La altura del vástago de la planta y diámetro del tallo de 12 plantas por tratamiento se midieron durante ocho meses con espacio de dos, mediante una regla y vernier digital (Truper CALDI-6MP, México). El primer experimento (Testigo, *L. proxima* y suelo nativo) se evaluó a los 156, 217, 276, 337 y 398 días y para el segundo experimento (Testigo, *H. lacunosa* y suelo nativo incendiado) el diámetro y altura se

evaluaron a los 112, 171, 232, 293 y 302 días; cada dos meses del sexto mes de haberse establecido el primer experimento (Testigo, *L. proxima* y suelo nativo) y desde el cuarto mes de establecido para el segundo experimento. La medición de la altura se realizó desde el cuello de la raíz hasta la yema apical de la planta, utilizando una regla graduada (mm). Para la evaluación de biomasa (peso seco de la raíz y parte aérea) se cosecharon 7 plantas en forma aleatoria por cada tratamiento; para ello, la parte aérea de la planta, así como el total de la raíz fueron colocadas en bolsas de papel y deshidratadas a 70 °C durante 72 h hasta lograr peso constante para después ser pesadas en una balanza analítica.

#### **3.4.5.2. Análisis nutrimental**

Los análisis nutrimentales de los macro y micronutrientes se realizaron a partir de las plantas utilizadas para la evaluación del peso seco. El análisis de los elementos minerales se llevo a cabo en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. En total de analizaron 6 nutrientes tanto para la parte aérea como de raíz (N, P, K, Na, Fe y Zn). El contenido de N se determinó mediante digestión diácida y por arrastre de vapor (Bremner, 1965); el P por fotolorimetría por reducción con molibdato-vanadato (Harris y Warren, 1962); y el contenido de K por espectrofotometría de flama (Alcántar y Sandoval, 1999). El análisis de los micronutrientes (Fe, Zn y Na) se realizó por la extracción de amonio por fotolorimetría con azometina.

#### **3.4.5.3. Porcentaje de micorrización**

Se tomaron 3 plantas al azar de cada tratamiento para determinar el porcentaje de micorrización; para esto, el sistema radical se extraje de los cepellones de los tubetes, y fue colocado en remojo en un periodo aproximado de 24 h. Procediendo a retirar la parte aérea del pino, enjugando enseguida cuidadosamente la parte radical sobre tamices de diferentes diámetros de abertura (1.19, 0.180, 0.085 mm) bajo un chorro de agua con baja presión para evitar la pérdida de raíces cortas. Una vez retirado el sustrato en total, las raíces fueron divididas en tres segmentos (parte superior, media e inferior del cepellón) y colocadas en viales con agua destilada

para su observación, evaluación y cuantificación del número total de raíces cortas vivas micorrizadas (RCVM), raíces cortas vivas no micorrizadas (RCVNM), raíces cortas muertas micorrizadas (RCMM) y raíces muertas no micorrizadas (RMNM), mediante el uso de un microscopio estereoscópico (LeicaEZ4). El porcentaje de colonización ectomicorrízica se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\%CEM = \frac{\text{raíces cortas micorrizadas}}{(\text{raíces cortas micorrizadas} + \text{raíces cortas vivas no micorrizadas})} * 100$$

#### **3.4.6. Caracterización macromorfológica de las ectomicorrizas en asociación con *P. maximartinezii***

Una vez realizado el conteo de raíces, se efectuaron cortes transversales con la ayuda de navajas marca Gillette y tomas de microfotografías (cámara digital Leica DFC290) para la confirmación de las raíces micorrizadas y el análisis micromorfológico de las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza: manto, red de Hartig y micelio externo. Comprobando la asociación, mediante un microscopio óptico (Leica®, MD1000, EUA) y estereoscopio (Leica® EZ4) en donde se tomó a consideración características como i. tipo de ramificación, ii. forma de las puntas, iii. textura del manto, iv. color del ápice y v. anatomía externa del manto para diferenciar los morfotipos ectomicorrízicos, todo lo anterior basado en el sistema de información para caracterización de las ectomicorrizas (Agerer y Rambold, 2014-2018). El color de los morfotipos ectomicorrízicos se determinó con las cartas de color de Munsell (Munsell Color Laboratory, New Windsor, New York, 2000) (Ramírez-Razo, 2018).



**Figura 8.** Aspectos generales del bioensayo. a) predio Pino azul (Área Natural Protegida); b) semillas y estróbilo de *P. maximartinezii*; c) inoculación líquida del hongo *L. proxima*; d) inoculación del hongo *H. lacunosa*; e) inoculación de suelo nativo incendiado; f) módulos y tratamientos.

### **3.4.7. Análisis estadístico**

La comparación de los tratamientos se efectuó mediante un análisis de varianza de una vía o de un diseño experimental completamente aleatorio y prueba de comparación Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para comparaciones múltiples en caso de haber detectado diferencias significativas entre tratamientos. El número de repeticiones varió para algunas variables de respuestas, y en función de esto, es decir, del número de observaciones total, se determinó la prueba de hipótesis más adecuada para corroborar los supuestos relativos a los residuales: normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia. Si por lo menos, el supuesto de normalidad no se cumplía, la herramienta utilizada se basó en métodos no paramétricos, en particular, en la prueba de hipótesis de Kruskal-Wallis técnica análoga al del análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples (sólo en algunos casos se utilizaron estos métodos). El análisis estadístico se implementó en el paquete estadístico R (R Core Team, 2018).

## **3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La presente investigación es la primera que evalúa el efecto de la coinoculación de hongos ectomicorrízicos (EcM) y bacterias sobre el crecimiento y fisiología de *Pinus maximartinezii*.

### **3.5.1. Variables evaluadas en crecimiento vegetal**

En general las variables del crecimiento (peso seco, diámetro del tallo y altura del vástago) medidas fueron mayores en plantas de *Pinus maximartinezii* inoculadas con las cuatro distintas fuentes de inóculo ectomicorrízico, así como en plantas coinoculadas (HEcM+Ab) en comparación con las plantas testigo (pT y Ab). Sin embargo, en algunas variables se observaron diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

Con respecto al peso seco, se encontró diferencias estadísticas significativas en el peso seco de la parte aérea de plantas inoculadas con *Laccaria proxima* (Lp) con

respecto al resto de los tratamientos (Cuadro 8.) Aun cuando se obtuvo un 25% en el incremento del peso seco de plantas inoculadas con *Helvella lacunosa* + *A. brasilense* (HI+Ab) con respecto a las plantas no inoculadas, no existió disimilitud estadística. Para esta variable se observó un efecto sinérgico, producto de la coinoculación HEcM+Ab (Cuadro 8). Tendencia opuesta en el peso seco de la parte radical, pues en los diferentes tratamientos evaluados a excepción de las plantas inoculadas con *A. brasilense* existió diferencia significativa con relación a las plantas testigo.

El mayor diámetro del tallo, se obtuvo en el tratamiento HI+Ab (4.40 mm) el cual fue estadísticamente significativo ( $P \leq 0.05$ ) al de las plantas testigo (3.39 mm), pero igual al obtenido en el resto de los tratamientos. Mientras que para la variable altura se observaron diferencias estadísticas entre las plantas testigos (pT y Ab) con respecto al resto de los tratamientos. Donde plantas inoculadas con *L. proxima* presentaron la mayor altura (17.52 cm) seguidas de Sn+Ab (16.30 cm), registrándose la menor altura en las plantas testigo (12.55 cm). Misma tendencia se presentó en las tres variables en las que se esperaba que la coinoculación (HEcM+Ab) provocara sinergismo sobre dichas variables en las plantas de pino azul.

**Cuadro 8.** Peso seco de la parte aérea y radical, diámetro del tallo y altura de plantas de *Pinus maximartinezii* Rzed. 398 días después de la inoculación con cuatro distintas fuentes de inóculo ectomicorrízico y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Azospirillum brasilense*).

Tratamiento	Peso seco (g)		Diámetro (mm)	Altura (cm)
	Parte aérea	Parte radical		
Plantas testigo (pT)	1.84±0.095 a	0.69±0.042 a	3.9±0.088 a	12.55±0.30 a
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	2.19±0.077 ab	1.0±0.06 ab	4.04±0.05 ab	13.6±0.16 ab
<i>Laccaria proxima</i> (Lp)	2.83±0.096 c	0.87±0.06 c	4.16±0.07 ab	17.52±0.317 c
Lp + Ab	2.24±0.048 ab	1.08±0.210 c	4.04±0.04 ab	16.30±0.41 c
Suelo nativo (Sn)	1.92±0.20 ab	0.77±0.068 c	4.24±0.13 ab	15.88±0.33 c
Sn + Ab	2.18±0.081 ab	0.66±0.060 c	4.20±0.11 ab	16.56±0.35 c
<i>Helvella lacunosa</i> (HI)	1.98±0.130 ab	1.08±0.131 c	4.23±0.11 ab	16.03±0.51 c
HI + Ab	2.30±0.16 abc	0.97±0.088 c	4.40±0.11 b	15.32±0.42 c
Suelo nativo incendiado (Sni)	2.12±0.150 ab	0.71±0.073 bc	4.06±0.92 ab	15±0.45 bc
Sni + Ab	1.80±0.71 ab	0.71±0.06 bc	4.03±0.10 ab	15±0.37 bc

\* Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ )  $\pm$  Error estándar de la media n=7 para peso seco y n=12 para la altura y diámetro del tallo.

En el presente trabajo se observó que las plantas inoculadas con *L. proxima* (Lp), respecto al resto de los tratamientos, fue estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ), al menos en dos variables; principalmente en comparación con las plantas testigo (pT y Ab); siendo inclusive mayor que los tratamientos en los que se realizó una coinoculación (Lp+Ab, Sn+Ab y Sni+Ab), como se observa para la altura y el peso seco de la parte aérea. Tendencia similar reporto Zúñiga-Cruz (2018) para la parte aérea de *Pinus cembroides* Zucc. inoculado con *L. proxima* con respecto a las plantas sin inocular. Condición similar reporto Ramírez-Razo (2018) para plantas de *Abies religiosa*, para las tres variables evaluadas en las que se registró un mayor peso seco aéreo y radical, así como un mayor diámetro de tallo y altura en plantas inoculadas con *L. proxima*, en relación con las plantas testigo e inoculadas con suelo nativo; esta última situación análoga a lo registrado para el pino azul (*Pinus maximartinezii*) y los tratamientos en los que se implementó suelo del área de



distribución natural (Sn), en lo que respecta a las plantas inoculadas y coinoculadas con esta fuente de inóculo ectomicorrízico, solo se observó un incremento considerable en la variable altura.

Cabe mencionar que plantas inoculadas con la bacteria *A. brasilense* solo se reflejó en ligeros incrementos en las variables estudiadas con respecto a las plantas testigo (pT). No obstante, en el estudio el efecto de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento de plántulas de *P. maximartinezii* fue solo significativo para el diámetro del vástago, cuando *A. brasilense* fue coinoculada con el hongo *Helvella lacunosa*.

*Azospirillum* es actualmente una de las rizobacterias ampliamente estudiadas y empleadas comercialmente, estudios previos destacan su capacidad de fijación de nitrógeno, así como la promoción del crecimiento de las plantas a través de la síntesis de fitohormonas, más recientemente se ha demostrado que los beneficios se extienden a su capacidad de algunas cepas de *Azospirillum* para proteger las plantas del estrés abiótico, desencadenando algunas formas de defensa. Los mecanismos de las rizobacterias para hacer frente a diversos factores beneficiosos varía con las especies de plantas, cultivares, cepas y especies de bacterias (Fukami *et al.*, 2018). Además, hay que tomar en cuenta que las cepas inoculadas de *Azospirillum brasilense* proceden de plantas de maíz (Paredes-Cardona *et al.*, 1988), lo cual puede explicar en parte la respuesta hacia las plantas de pino y para tener una mejor respuesta benéfica en procesos de inoculación mixta (bacteria-hongo), se sugiere aislar, seleccionar, caracterizar e identificar las cepas acordes a las especies vegetales.

Las ligeras o ausentes diferencias estadísticas morfométricas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamiento y en comparación al testigo se adjudica a que en esta fase de invernadero las plantas estuvieron provistas de condiciones como humedad, temperatura, luminosidad y los elementos minerales provenientes de cada sustrato, por lo que los beneficios de la micorrización podrían no ser tan notorios o no manifestarse (Barroetaveña *et al.*, 2012). Inclusive los valores similares en variables como la altura o el diámetro en comparación a las plantas testigo (pT, Ab) podrían atribuirse al gasto energético mayor en mantener la simbiosis (Smith y Read, 2008)

o quizás a factores como el tipo de sustrato, los niveles de nutrientes presentes en este o el tamaño de los contenedores que juegan negativamente en el estímulo del crecimiento (Rincon *et al.*, 2001). Por lo que, los beneficios de la inoculación micorrízica y la mejora del vigor de la planta huésped a menudo se refleja o se observa cuando el suministro de nutrientes es limitado (Smith y Read, 1997).

### **3.5.2. Contenido nutrimental**

#### **Macronutrientes en plantas de *Pinus maximartinezii***

Para el contenido de macronutrientes (N, P, K) en la parte aérea (Cuadro 9) se puede observar que solo existió diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) en el tratamiento inoculado con *Laccaria proxima* (Lp) con respecto a las plantas testigo. En relación al N foliar el tratamiento con *Helvella lacunosa* (HI) fue estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos. Plantas inoculadas con HI y Lp presentaron un incremento en el contenido de nitrógeno (N) foliar del 81.80 y 70.59%, respectivamente con respecto a las plantas testigo (pT). Mientras que, el contenido de nitrógeno en la parte radical, no se encontró diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 9). Sin embargo, en plantas coinoculadas con Sni+Ab se observó un incremento del 157.97% del contenido de N radical con respecto a las plantas testigo (pT), seguido de los tratamientos HI+Ab con 74.87% y Lp+Ab con 73.39%.

Con respecto al contenido de P en la parte aérea y radical de las plantas de *Pinus maximartinezii*, se registraron diferencia significativa cuando se inoculo (HI) y *Helvella lacunosa* + *A. brasilense* (HI + Ab) con respecto a los demás tratamientos. Donde HI+Ab; HI y Lp produjeron un incremento del 54.58%, 53.71% y 42.79%, en relación al contenido de P foliar en las plantas testigo. Mientras que, en parte radical, se registró diferencia significativa en plantas inoculadas con HI y HI+Ab que incremento el contenido de P radical un 176.92% y 117.30%, respectivamente con respecto a las pT.

De igual manera, el contenido de K, en plantas inoculadas con Ab; Lp; Lp+Ab y HI+Ab incrementaron significativamente el contenido de potasio (K) foliar en relación

al de las plantas no inoculadas. Dichos tratamientos incrementaron el contenido de K foliar en un 34.67%, 49.48%, 39.95% y 38.77%, respectivamente. Misma tendencia presentaron los tratamientos Lp; Lp+Ab y HI+Ab en el contenido de K radical (Cuadro 9), en donde los últimos dos tratamientos presentaron el mayor contenido de potasio radical (3.09 y 3.06 mg<sup>-1</sup> planta, respectivamente) con respecto a las plantas testigo (1.32 mg<sup>-1</sup> planta).

Al analizar el efecto de la inoculación y coinoculación en los contenidos de macronutrientes, podemos señalar que la inoculación de *L. proxima* en *P. maximartinezii* tuvo un efecto positivo sobre la absorción de NPK debido a que el contenido foliar fue mayor al registrado en las plantas testigo. Mientras que la coinoculación HEcM + bacteria favoreció la absorción de fósforo y potasio.

**Cuadro 9.** Contenido de macronutrientes de la parte aérea y raíz en plantas de *P. maximartinezii* Rzed. inoculadas con *Laccaria proxima*, *Helvella lacunosa*, suelo nativo, suelo nativo posterior a un incendio y *Azospirillum brasilense*.

Tratamiento	Macronutrientes (mg <sup>-1</sup> planta)		
	N	P	K
Parte aérea			
Plantas testigo (pT)	14.18±0.73 a	2.29±0.12 a	12.69±0.66 a
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	16.09±0.57 ab	2.64±0.092 ab	17.09±0.60 b
<i>Laccaria proxima</i> (Lp)	25.78±0.87 c	3.27±0.11 b	18.97±0.64 b
Lp + Ab	15.69±0.34 ab	3.00±0.064 ab	17.76±0.38 b
Suelo nativo (Sn)	13.43±1.40 ab	2.56±0.266 ab	14.03±1.46 ab
Sn + Ab	13.79±0.50 ab	2.82±0.102 ab	14.10±0.51 ab
<i>Helvella lacunosa</i> (HI)	24.19±1.59 c	3.52±0.232 b	16.09±1.06 ab
HI + Ab	15.29±1.04 ab	3.54±0.24 b	17.61±1.20 b
Suelo nativo incendiado (Sni)	17.12±1.21 ab	2.52±0.18 ab	12.49±0.88 ab
Sni + Ab	14.47±1.26 ab	2.47±0.22 ab	14.55±1.27 ab
Parte radical			
Plantas testigo (pT)	4.06±0.19 a	0.52±0.024 a	1.32±0.062 a
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	4.42±0.27 a	0.98±0.06 ab	2.68±0.16 ab
<i>Laccaria proxima</i> (Lp)	6.74±0.61 a	0.80±0.07 ab	2.30±0.21 abc
Lp + Ab	7.04±1.62 ab	1.039±0.24 ab	3.09±0.71 b
Suelo nativo (Sn)	4.92±0.62 ab	0.76±0.096 ab	2.03±0.255 ab
Sn + Ab	4.07±0.40 ab	0.73±0.07 ab	1.98±0.20 ab
<i>Helvella lacunosa</i> (HI)	6.41±0.86 ab	1.44±0.19 bc	2.99±0.40 b
HI + Ab	7.10±0.64 ab	1.13±0.10 bc	3.06±0.28 b
Suelo nativo incendiado (Sni)	4.19±0.45 ab	0.78±0.082 ab	2.00±0.213 ab
Sni + Ab	10.23±0.83 b	0.70±0.057 ab	1.92±0.16 ab

\* Los valores representan promedios ± Error estándar de la media (n=7). Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## Micronutrientes en plantas de *Pinus maximartinezii*

En cuanto al contenido de micronutrientes (Fe, Na y Zn) al menos para la parte aérea, existió una diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre la mayoría de las plantas inoculadas y coinoculadas en relación con las plantas testigo (pT) registrándose dicha diferencia más que evidente en el contenido de Zn (parte aérea).

Pues bien, entre las cuatro fuentes de inoculo, incluyendo a las plantas coinoculadas (HEcM+Ab) el mayor contenido de Fe en parte aérea se confiere al tratamiento con Suelo nativo + *Azospirillum brasilense* (Sn+Ab), con un incremento del 244% sobre las plantas testigo (pT), seguido del tratamiento con Suelo nativo incendiado (Sni) (205.82%) y Suelo nativo incendiado + *A. brasilense* (Sni+Ab) (137.7%). Contrariamente al contenido de Fe en la parte radical, donde el tratamiento HI y Sn+Ab presentaron el mayor contenido de hierro, los cuales fueron estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) con el de las plantas testigo (Cuadro 10). Sin embargo, solo se detectaron ligeros incrementos del 37% y 37.97%, en relación con las plantas testigo (pT).

El elemento Na resultó considerablemente mayor en plantas inoculadas con *Helvella lacunosa* + *Azospirillum brasilense* (HI+Ab) con incrementos del 80.99%, seguido de las plantas inoculadas con *L. proxima* y la bacteria *A. brasilense* con un mismo incremento de 50.22% y del tratamiento Lp+Ab (47.46%). Cabe destacar, que en la parte radical el Na presentó el mayor contenido en plantas que fueron inoculadas con el hongo *Helvella lacunosa* con un incremento 115.18% respecto al testigo (pT), seguido del tratamiento Lp+Ab (90.51%); misma tendencia respecto al Zn y Fe en el tratamiento HI, puesto que se encuentra dentro de los tres tratamientos con mayor contenido de micronutrientes.

A su vez, el tratamiento Lp junto con el tratamiento Sn+Ab encabezan el valor mayor en contenido de Zn en parte aérea con un incremento superior al 100% (107.14%), seguido de las plantas inoculadas con HI+Ab (75%), siendo este último junto con las plantas inoculadas con el hongo *H. lacunosa* las que muestran un mayor

contenido de Zn para la parte radical con un incremento del 106.25% y 93.75% respectivamente, aunque para este caso, las diferencias estadísticas significativas son menores en relación a las plantas testigo.

Al igual que el Cuadro 9 es posible observar un efecto sinérgico en el contenido de micronutrientes en los tratamientos en los que se utilizó a la rizobacteria *A. brasilense*, particularmente en plantas coínoculadas para este caso con suelo nativo + *A. brasilense* (Sn+Ab) y las coínoculadas con la bacteria + el hongo EcM *H. lacunosa* (Hl+Ab).

**Cuadro 10.** Contenido de macronutrientes de la parte aérea y raíz de plantas de *P. maximartinezii* Rzed. inoculados con *Laccaria proxima*, *Helvella lacunosa*, suelo nativo, suelo nativo posterior a un incendio y *Azospirillum brasilense*.

Tratamiento	Micronutrientes ( $\mu\text{g}^{-1}$ planta)		
	Fe	Na	Zn
Parte aérea			
Plantas testigo (pT)	0.20±0.011 a	2.21±0.11 a	0.028±0.001 a
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	0.54±0.019 b	3.32±0.12 b	0.051±0.001 b
<i>Laccaria proxima</i> (Lp)	0.46±0.016 b	3.32±0.11 b	0.058±0.001 b
Lp + Ab	0.29±0.006 a	3.27±0.07 b	0.030±0.000 a
Suelo nativo (Sn)	0.39±0.040 ab	2.70±0.28 ab	0.048±0.004 b
Sn + Ab	0.71±0.026 c	3.11±0.112 b	0.058±0.002 b
<i>Helvella lacunosa</i> (HI)	0.21±0.013 a	2.81±0.18 ab	0.039±0.002 ab
HI + Ab	0.29±0.020 a	4.00±0.28 bc	0.049±0.003 b
Suelo nativo incendiado (Sni)	0.63±0.044 bc	2.51±0.18 ab	0.041±0.003 b
Sni + Ab	0.48±0.043 b	2.37±0.206 ab	0.035±0.003 ab
Parte radical			
Plantas testigo (pT)	2.37±0.11 a	1.58±0.074 a	0.016±0.0007 a
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	1.69±0.100 ab	2.65±0.16 ab	0.021±0.000 ab
<i>Laccaria proxima</i> (Lp)	1.26±0.11 ab	1.86±0.17 ab	0.019±0.002 ab
Lp + Ab	1.12±0.26 a	3.01±0.70 b	0.022±0.005 ab
Suelo nativo (Sn)	1.91±0.24 ab	1.69±0.21 ab	0.019±0.002 ab
Sn + Ab	3.21±0.318 b	1.81±0.18 ab	0.019±0.002 ab
<i>Helvella lacunosa</i> (HI)	3.27±0.43 b	3.40±0.45 b	0.033±0.004 bc
HI + Ab	2.61±0.239 ab	2.93±0.27 ab	0.031±0.002 bc
Suelo nativo incendiado (Sni)	2.97±0.32 ab	1.94±0.207 ab	0.018±0.002 ab
Sni + Ab	2.64±0.213 ab	1.86±0.150 ab	0.018±0.001 ab

\* Los valores representan promedios ± Error estándar de la media (n=7). Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Además de favorecer la absorción de nutrientes minerales del suelo, los hongos micorrízicos juegan un rol de suma importancia en la biodisponibilidad de nutrientes esenciales con poca movilidad como P, Fe y Zn de fuentes como partículas minerales del suelo, sustratos orgánicos inaccesibles y superficies de rocas (Smith y Read, 2008); para ello, los hongos micorrízicos adoptan métodos como: i). mayor superficie de absorción hacia el suelo adyacente al sistema radical (Marupakula *et al.*, 2016); ii). en la liberación de compuestos bioquímicos y iii). en la formación de consorcios con diferentes microorganismos (Teotia *et al.*, 2017); estos últimos denominados como bacterias auxiliares de la micorrización (micorriza helper bacteria (MHB)) (Garbaye, 1994; Frey-Klett *et al.*, 2007), que influyen tanto en las plantas como en los hongos micorrízicos asociados a través de mecanismos que involucran la producción de factores de crecimiento, que pueden estimular la germinación de esporas y propágulos fúngicos, en el crecimiento del micelio o incremento de la ramificación de la raíz y en aumentar una mayor colonización de las raíces en el suelo, así como reducir el impacto de las condiciones ambientales adversas para el micelio de los HEcM (Frey-Klett *et al.*, 2007; Aspray *et al.*, 2013; Cumming *et al.*, 2015). Sin dejar de mencionar su efecto en la germinación de semilla y regeneración de raíces (Heinonsalo *et al.*, 2004).

La importancia de la inoculación ectomicorrízica en términos de crecimiento y contenido nutrimental ha sido ampliamente documentado, sobre todo en especies de géneros como *Laccaria* (Heinonsalo *et al.*, 2004; Carrasco-Hernández *et al.*, 2010; Rentería-Chávez *et al.*, 2017; López-Gutiérrez *et al.*, 2018), sin embargo, de forma no tan específica el efecto benéfico de especies ectomicorrízicas como *Helvella lacunosa* (Arteaga-León *et al.*, 2018), o la implementación de suelo nativo y suelo nativo posterior a un incendio forestal.

Previamente distintos autores han documentado la influencia de la coinoculación de hongos ectomicorrízicos y bacterias auxiliares de la micorrización (BAM) en contenidos de macro y micronutrientes sobre distintos hospederos. Tal es el caso del trabajo desarrollado por Barragan-Soriano *et al.* (2018), en plantas de *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas con el hongo EcM *Hebeloma mesophaeum* (Hm) y



coinoculadas con las bacterias (*Cohnella* sp. (C) o *Azospirillum brasilense* (Ab)). En dicho estudio se obtuvieron incrementos considerables en cuanto al contenido de N en plantas coinoculadas con el hongo *H. mesophaeum* más la bacteria *A. brasilense*, misma tendencia para el caso de P y K; observando un efecto sinérgico mayor sobre las plantas que constituían el tratamiento Hm+Ab. En el trabajo de Dominguez-Nuñez *et al.* 2015, registraron un aumento significativo en las concentraciones y el contenido total de P y un aumento significativo en el contenido de K en parte aérea cuando se coinoculo la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* CECT 844 y el hongo *Tuber melanosporum*. En la presente investigación se registró el efecto sinérgico en relación al contenido de N, P y K en la totalidad de los tratamientos, registrandose incrementos del 103.93 y 81% en el contenido total del P y Zn respectivamente al coinocular plantas de *P. maximartinezii* con el hongo EcM *Helvella lacunosa* y la bacteria *Azospirillum brasilense* (Hl+Ab) con respecto a las plantas testigo. Lo anterior, podría tener importantes implicaciones en la producción de plantas de *P. maximartinezii* eficientes en la absorción de nutrimentos poco móviles en el suelo y esenciales en la nutrición de las plantas, lo cual puede asegurar su supervivencia en su entorno natural.

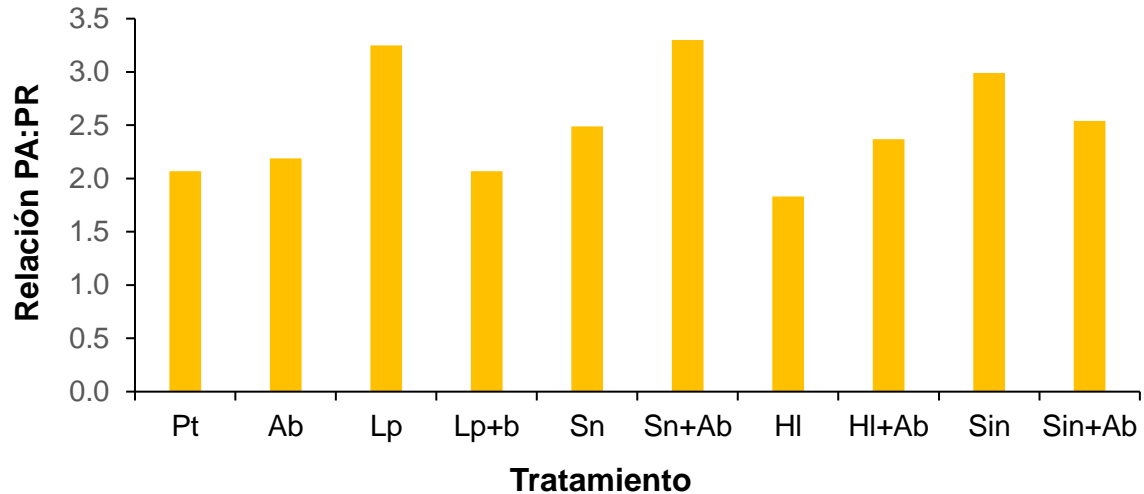
Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) establecen relaciones benéficas con las plantas y evitan la competencia con la microbiota presente en el suelo y están directamente involucradas en la promoción del crecimiento de las plantas, vía producción y secreción de varios reguladores químicos como las auxinas las cuales son de carácter orgánico y activan varias respuestas en la célula vegetal a nivel bioquímico, fisiológico y morfológico. Los compuestos liberados por las bacterias de la rizósfera afectan principalmente al sistema radical, con incidencia en la proliferación celular y elongación radical y, por ende, en el aumento de su tamaño y peso, ramificación y área superficial en contacto con el suelo. lo que repercute en la parte aérea de la planta y facilitan de modo directo el crecimiento de las plantas al aportar nitrógeno, fósforo y microelementos (López-Reyes *et al.*, 2018).

Otros estudios han argumentado de forma más específica que las interacciones entre bacterias y micorrizas desempeñan un papel significativo en la fijación de nitrógeno (Pérez-Moreno y Read, 2000; Paul *et al.*, 2007). Tendencia observada en este estudio; en tres de los cuatro tratamientos evaluados, donde se obtuvieron incrementos similares en el contenido de nitrógeno en la parte radical, al coinocular HEcM+Ab (74.13% en promedio), pero superior en suelo nativo incendiado + *A. brasilense* (Sni+Ab) (151.97%) con respecto al testigo (pT).

Las investigaciones desarrolladas sobre especies forestales e interacciones benéficas de microorganismos se han centrado principalmente en el uso de las micorrizas, mientras que las rizobacterias, PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) o bacterias auxiliares de la micorrización (MHB) se han estudiado en menor cantidad en el área de la silvicultura (Karličić *et al.*, 2016). Por lo que, la falta de estudios similares con la inoculación de plantas con la bacteria *Azospirillum brasilense* limita las comparaciones directas con el presente estudio.

### **3.5.3. Absorción nutrimental parte aérea: raíz (pa: pr)**

En las plantas testigo la relación pa: pr fue de 2.2; mientras que en las plantas inoculadas con EcM o la bacteria oció entre 1.8 a 3.3 y en plantas donde se realizó la coinoculación fue de 2.1 a 2.5 (Figura 9). Al respecto, Thompson (1985), citado por Grossnickle y South (2017) menciona que una buena relación parte aérea: parte radical debe fluctuar entre 1.0 a 2.5. Relaciones mayores a 3 indican un desequilibrio entre parte aérea/raíz, traduciendo en un sistema radical insuficiente para proveer de energía a la parte aérea de la planta. Sin embargo, esta relación cambia con la asociación micorrízica. Read y Smith (2008) señalan la relación parte aérea/raíces puede aumentar debido a que las plantas micorrizadas tienen una mayor capacidad para absorber nutrientes en comparación con las plantas no micorrizadas.



**Figura 9.** Relación parte aérea: raíz en los tratamientos evaluados. Plantas testigo (pT); *A. brasilense* (Ab); *L. proxima* (Lp); *L. proxima* + *A. brasilense* (Lp+Ab); Suelo nativo (Sn); Suelo nativo + *A. brasilense* (Sn+Ab); *H. lacunosa* (HI); *H. lacunosa* + *A. brasilense* (HI+Ab); Suelo nativo incendiado (Sin) y Suelo nativo incendiado + *A. brasilense*.

En cuanto a la absorción nutrimental, son muy pocos los estudios que demuestran la translocación de macro y micronutrientes por parte de los hongos ectomicorrízicos desde el sustrato a las raíces de las plantas y posteriormente a la parte aérea de la planta.

Aunque se observaron distintas respuestas, en general, no se observó una movilización considerable de nutrientes. Lo anterior podría adjudicarse a que las reservas de los cotiledones de especies del género *Pinus* son grandes y probablemente en el tiempo que las plantas se mantuvieron en invernadero, no dependían de sus asociaciones ectomicorrízicas para el crecimiento (Rincon et al., 2001).

### 3.5.4. Porcentaje de micorrización

Respecto a las raíces cortas vivas micorrizadas (RCVM), existieron diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre el testigo y los tratamientos inoculados, notándose la mayor diferencia para esta variable para el tratamiento (Sn+Ab) y suelo nativo (Sn) (Cuadro 11), con porcentajes de colonización del 92.73% y 80.03% respectivamente. En general, la diferencia en porcentaje entre los tratamientos inoculados (HEcM) y en los que se implementó la coinoculación (HEcM+Ab) fue mínima.

**Cuadro 11.** Colonización ectomicorrízica de las raíces cortas en plantas de *P. maximartinezii* inoculadas y coinoculadas.

Tratamiento	Raíces vivas		Raíces muertas		%Colonización
	RCVM	RCVNM	RCMM	RCMNM	
Plantas testigo (pT)	4.7±0.67 a	361±40.52 a	3±1.53 a	143±24.17 a	1.28
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	42±17.90 ab	164.7±48.11 b	32±14.19 ab	107.33±15 ab	20.32
<i>Laccaria proxima</i> (Lp)	435±27.15 c	144±31.6 b	183.3±31.3 c	98±31.4 ab	75.13
Lp + Ab	406.7±105.18 c	142±36.9 b	157.3±42.5 c	73±23.06 ab	74.12
Suelo nativo (Sn)	646.7±25.15 cd	161.3±50.6 b	143.3±26.91 bc	116±10.15 ab	80.03
Sn + Ab	799.3±100.19d	62.7±11.9 b	156.3±6.84 c	70.33±3.0 ab	92.73
<i>Helvella lacunosa</i> (HI)	366.3±68.31 c	167±19.20 b	100.33±18.22 abc	116±23.11 ab	68.69
HI + Ab	549.7±46.93 c	176±46.03 b	147.3±19.3 c	100±30.9 ab	75.75
Suelo nativo incendiado (Sni)	413.7±54.5 c	122.7±23.24 b	154.7±28.17 c	76.7±18.44 ab	77.13
Sni + Ab	294±25.0 cb	127.3±13.6 b	118.7±11.7 bc	65±9.01 ab	69.78

\* Los valores representan promedios ± Error estándar de la media (n=7). Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Los porcentajes de colonización en el presente estudio fueron relativamente altos, considerando que el porcentaje mayor fue 92.73% en plantas inoculadas con suelo nativo + *A. brasilense* (Sn+Ab).

Si bien, la colonización determina la calidad de las plantas ectomicorrizadas, pues se asume que plantas con altos porcentajes de colonización micorrízica tienen una mayor posibilidad de establecimiento y supervivencia en campo, posterior al trasplante (Iwanski y Rudawska, 2006). En la presente investigación se observó que el mayor porcentaje con 92.73% del tratamiento (Sn+Ab) y en plantas inoculadas de manera individual con suelo nativo (Sn) 80.03%. No obstante, para las variables evaluadas estos tratamientos en pocos casos presentaron diferencias estadísticas significativas, por lo que sugerimos que el nivel de colonización podría no estar relacionado directamente con el efecto del conjunto de especies micorrízicas en el desarrollo de la planta o bien, nos enfrentamos a un proceso de antagonismo mediante la competencia por nutrientes entre especies de hongos micorrízicos o entre estos y *A. brasilense*.

La coinoculación de hongos EcM y PGPR, puede aumentar la colonización fúngica o observar efectos sinérgicos en el crecimiento de las plantas, aunque los estudios en los que se evalúen estos en plantas coinoculadas con EcM y *Azospirillum* son escasos (Dominguez-Nuñez *et al.*, 2015).

### 3.6. Caracterización de los morfotipos ectomicorrízicos

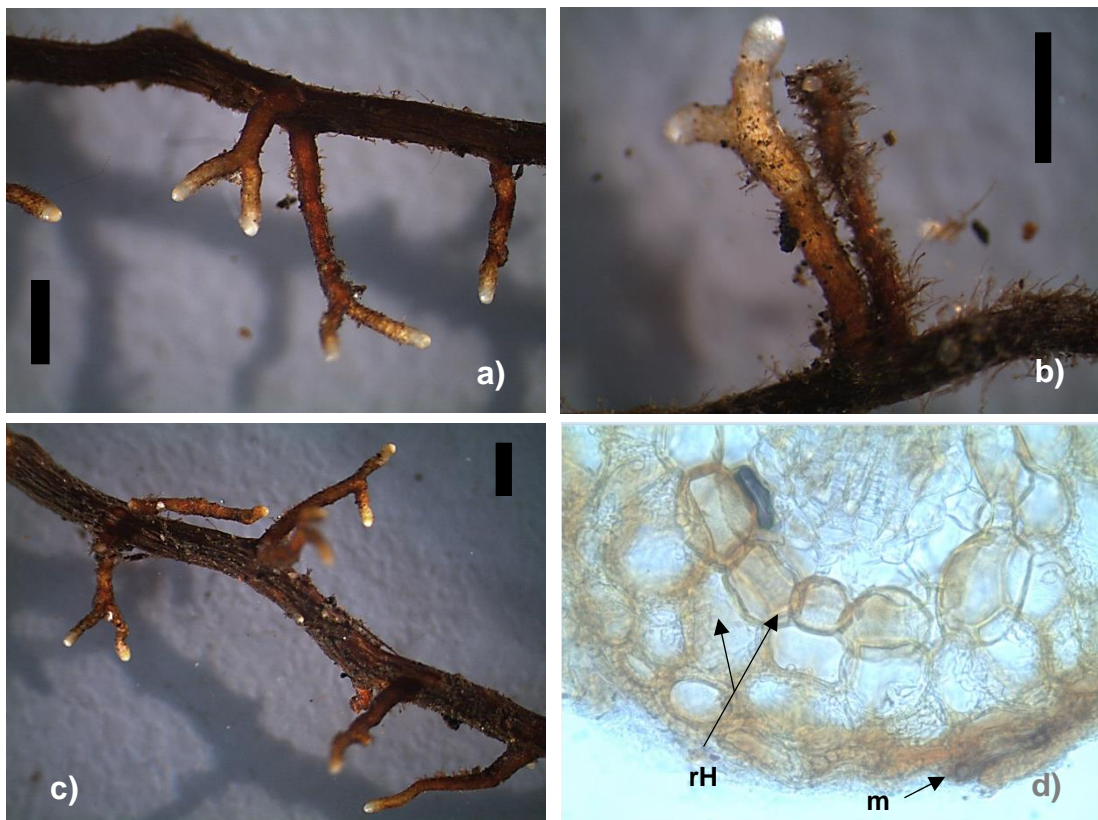
En el siguiente apartado se realiza la caracterización morfo-anatómica de los morfotipos que se presentaron en asociación con las plantas de *Pinus maximartinezii* en condiciones de invernadero.

*Laccaria proxima* se presentó en la mayoría de los cepellones analizados en un periodo o estadio que se describe como micorrizas jóvenes-inmaduras (presencia de pocos pelos absorbentes) (Jiménez-Ruíz, 2011) y con un tipo de ramificación en su mayoría dicotómica, con una longitud 1 a 3 mm; presenta una coloración rojo amarillenta (5YR 5/6) a un color más oscuro (5YR 4/4) diferenciándose la base en coloración del resto del morfotipo en etapa adulta. La presencia de micelio externo o hifas emanantes fue de escaso a nulo. Se observó que la Red de Hartig de *L. proxima* en asociación con *P. maximartinezii* penetró de la tercera hasta la quinta capa de células corticales. En promedio de ambos tratamientos con *L. proxima* (Lp y Lp+Ab) se registró en un 74. 63% de colonización ectomicorrízica (Figura 10).



**Figura 10.** Ectomicorriza de *P. maximartinezii* inoculada con *L. proxima*. a) morfotipo EcM de *L. proxima* en estadio joven-inmaduro, visto a 2.0X; b) 2.0X c) 2.0X; d) corte transversal de la ectomicorriza mostrando red de hartig (rH) manto (m) y restos de p pelos radicales (pr) vista en 40X (Barra= 1 mm).

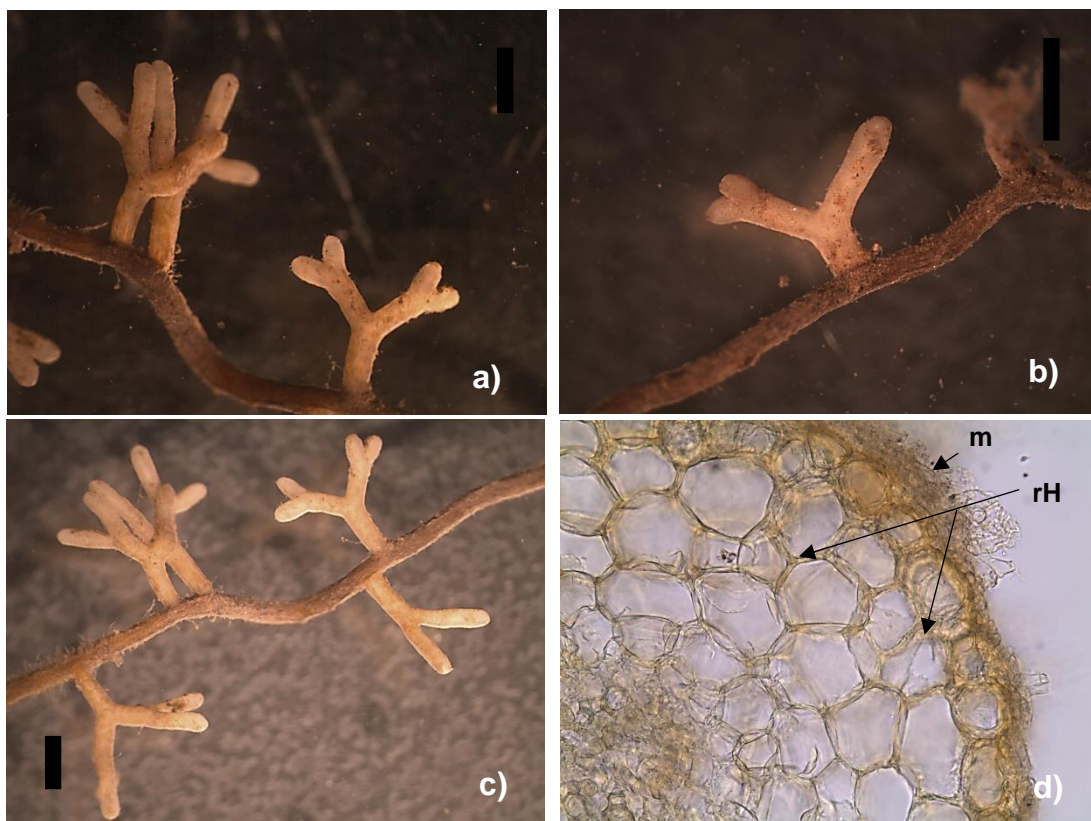
*Helvella lacunosa* presentó una disposición de simple a dicotómica, con una longitud de entre 1 a 3 mm; morfotipos color café rojizo oscuro (5YR 3/3) en la base y de color café amarillento (10YR 5/6) en el resto del morfotipo. Ápices en su mayoría con una coloración café muy pálida (10YR 8/4); superficie granulosa y presencia de hifas externas escasas o nulas. No hubo presencia de estructuras como rizomorfos o esclerocios. La red de Hartig se encuentra entre los espacios intersticiales de las tres primeras células corticales. A diferencia de las plantas inoculadas con *H. lacunosa* a las plantas tratadas con *H. lacunosa* + *A. brailense* se pudo observar un evidente sinergismo, al menos en el número de raíces cortas vivas micorrizadas y en un aumento como en el contenido de macronutrientes, p. ej. Nitrógeno y potasio, así como en peso seco y diámetro (Figura 11).



**Figura 11.** Ectomicorriza de *H. lacunosa* en *P. maximartinezii*. Morfotipos a) 1.0X; b) 1.6X; c) 0.63X; d) corte transversal: red de Hartig (rH), manto (m). (Barra= 1 mm).

Para el caso de las plantas inoculadas con suelo nativo (Sn) y suelo nativo incendiado (Sni), se registraron 8 morfotipos EcM, los cuales se describen a continuación.

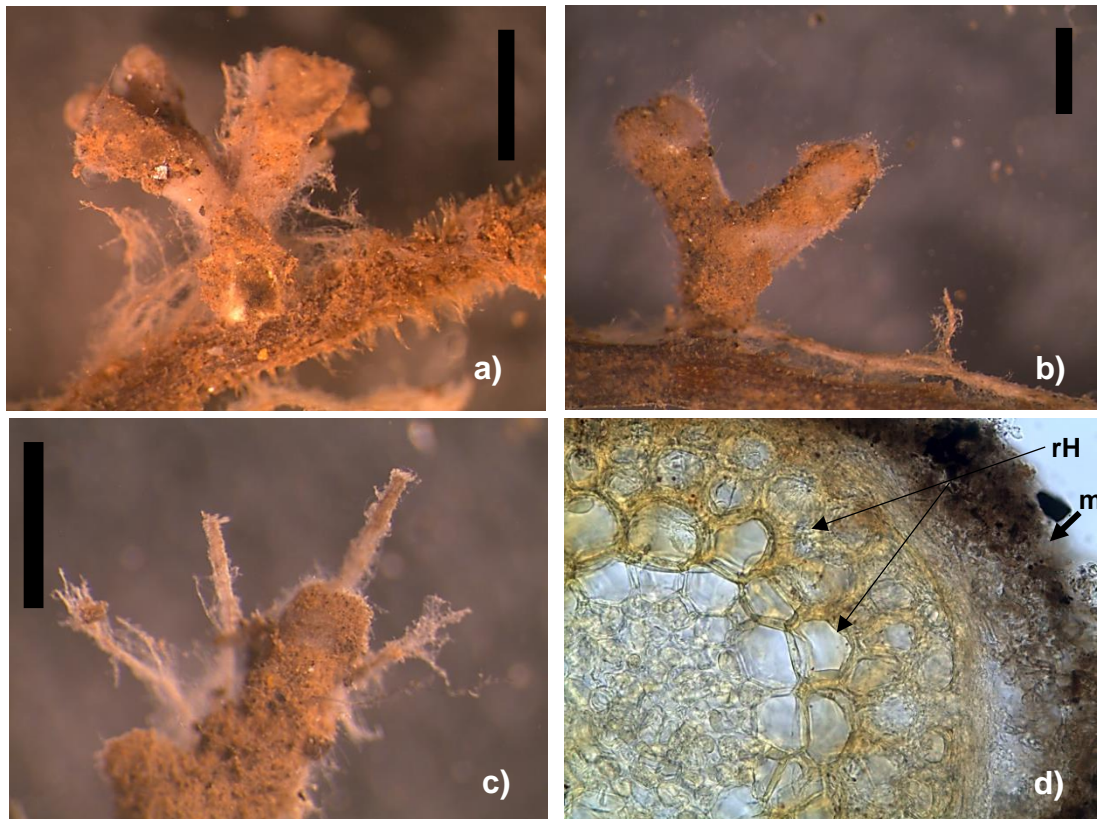
El morfotipo (M1\_Sn) presenta una ramificación dicotómica, puntas de ápices rectos con terminaciones cilíndricas; superficie lisa y color del morfotipo naranja palido<sup>1</sup>; la longitud oscila entre 2 a 4 mm. Escasas o ausentes hifas emanantes, no hay presencia de rizomorfos o estructuras como esclerocios. En cuanto al corte transversal podemos observar la penetración de la red de Hartig entre los espacios intersticiales de la tercera y cuarta célula cortical; un manto grueso y ligeramente algodonoso (Figura 12).





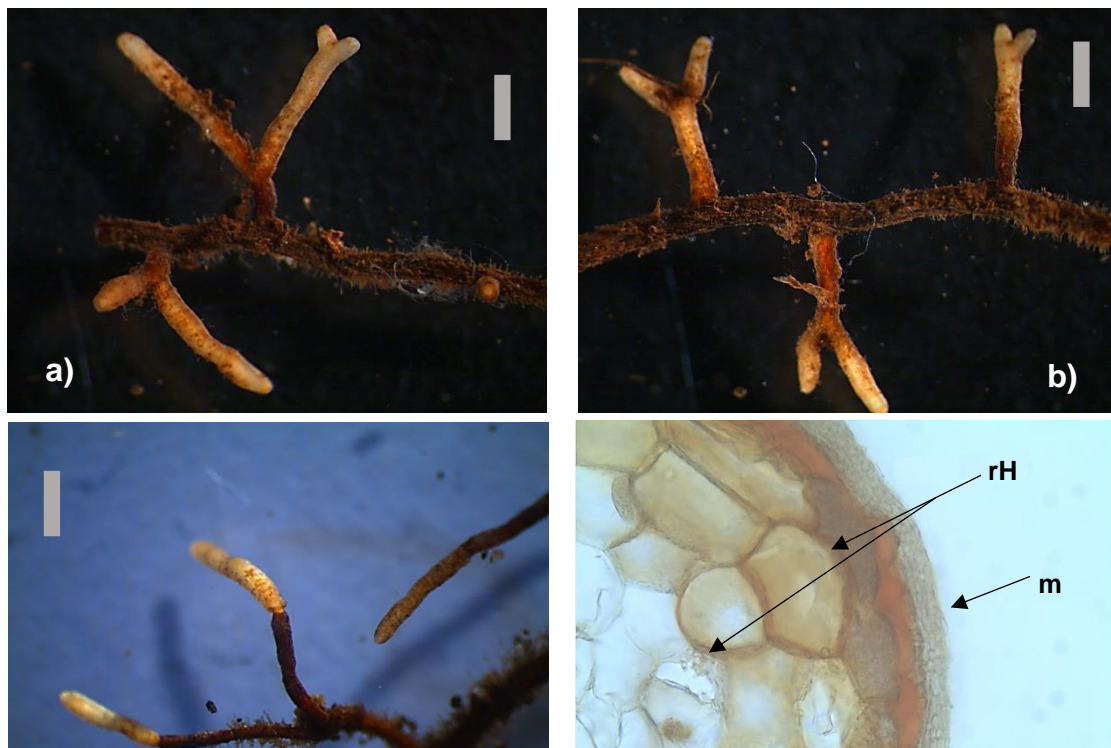
**Figura 12.** Morfotipo EcM (M1\_Sn) en suelo nativo asociado a *P. maximartinezii*, a) 0.8X; b) 1.0X; c) 0.63X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm).

El morfotipo (M2\_Sn) presenta ramificación de simple a coraloide, superficie algodonosa y una longitud de 2 a 3 mm; ápices de puntas cilíndricas. Presenta un color entre rosa amarillento morado<sup>1</sup> y un color rojo pálido (10R 6/2). Existe abundante micelio externo y formación abundante de extensos y gruesos cordones miceliares (rizomorfos). La red de Hartig penetra entre los espacios intercelulares de la tercera y cuarta célula cortical. El manto es considerablemente grueso (Figura 13).



**Figura 13.** Morfotipo EcM (M2\_Sn) en suelo nativo (SN) asociado a *P. maximartinezii*, a) 1.6X; b) 1.8X; c) 2.0X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm).

El morfotipo (M3\_Sn) presentó una ramificación simple a dicotómica y una longitud de 2 a 5 mm, presenta una superficie lisa y coloración del morfotipo amarillo naranja moderado<sup>1</sup> en la parte superior del morfotipo y naranja rojizo profundo<sup>1</sup>. Hay ausencia de hifas emanantes y estructuras como los rizomorfos y esclerocios. En el corte transversal se observa la diferenciación entre un manto externo casi transparente y un manto medio con coloraciones rojizas. Se observó que la Red de Hartig del morfotipo (M3\_Sn) en asociación con las raíces de *P. maximartinezii* penetra bien diferenciado de la primera a la segunda capa de células corticales (Figura 14).



**Figura 14.** Morfotipo ectomicorrizico (M3\_Sn) en el tratamiento de suelo nativo (Sn) asociado a *P. maximartinezii*; a) 0.8X; b) 0.8X; c) 0.8X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm).

El morfotipo (M4\_Sn) presenta una ramificación dicotómica y coraloide, un color amarillo (10YR 7/8, 10YR 7/6) y un color café amarillento (10YR 5/8) en la base de

la ectomicorriza. Su longitud oscila de 1 a 3 mm; presenta ápices de puntas completamente rectos y cilíndricos, escasas hifas blanquecinas emanantes y cordones miceliares (rizomorfos) en abundancia. No existe presencia de estructuras de resistencia como los esclerocios. La red de Hartig infecta hasta los espacios intersticiales de la tercera capa de células corticales de forma definida (Figura 15).



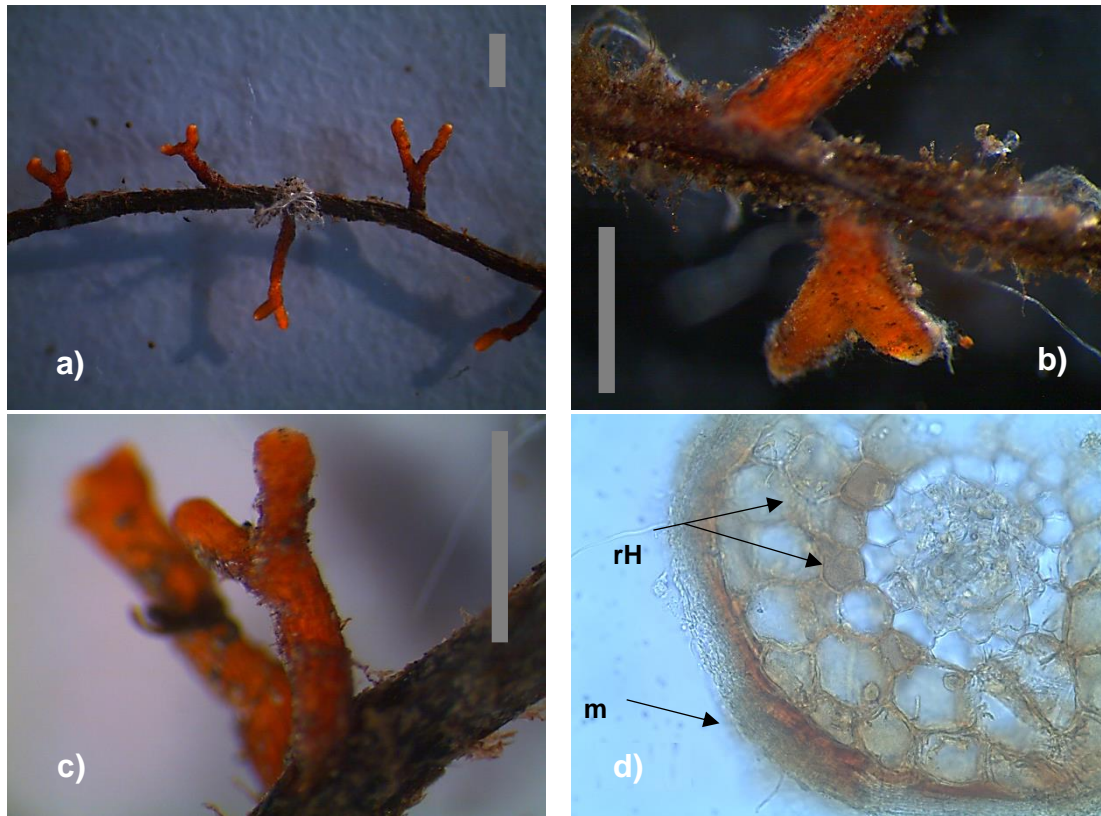
**Figura 15.** Morfotipo ectomicorrízico (M4\_Sn) asociado a plantas jóvenes (14 meses) de la especie de pino *P. maximartinezii*, a) 0.8X; b) 1.6x; c) 2.0X; d) corte transversal: red de Hartig (rH), manto (m). (Barra= 1 mm).

El morfotipo (M5\_Sn) presenta una ramificación dicotómica coraloide y un color de la ectomicorriza blanquecina (5Y 8/1) con una longitud de 1-2.5 mm. Presenta una superficie brillante y algodonosa, ápices rectos e hinchados; abundante micelio blanquecino extramatricial y presencia de largos y delgados cordones miceliares (rizomorfos). En el respectivo corte transversal se puede observar que la red de Hartig penetra entre los espacios intercelulares de la tercera a la cuarta capa de células corticales (Figura 16).



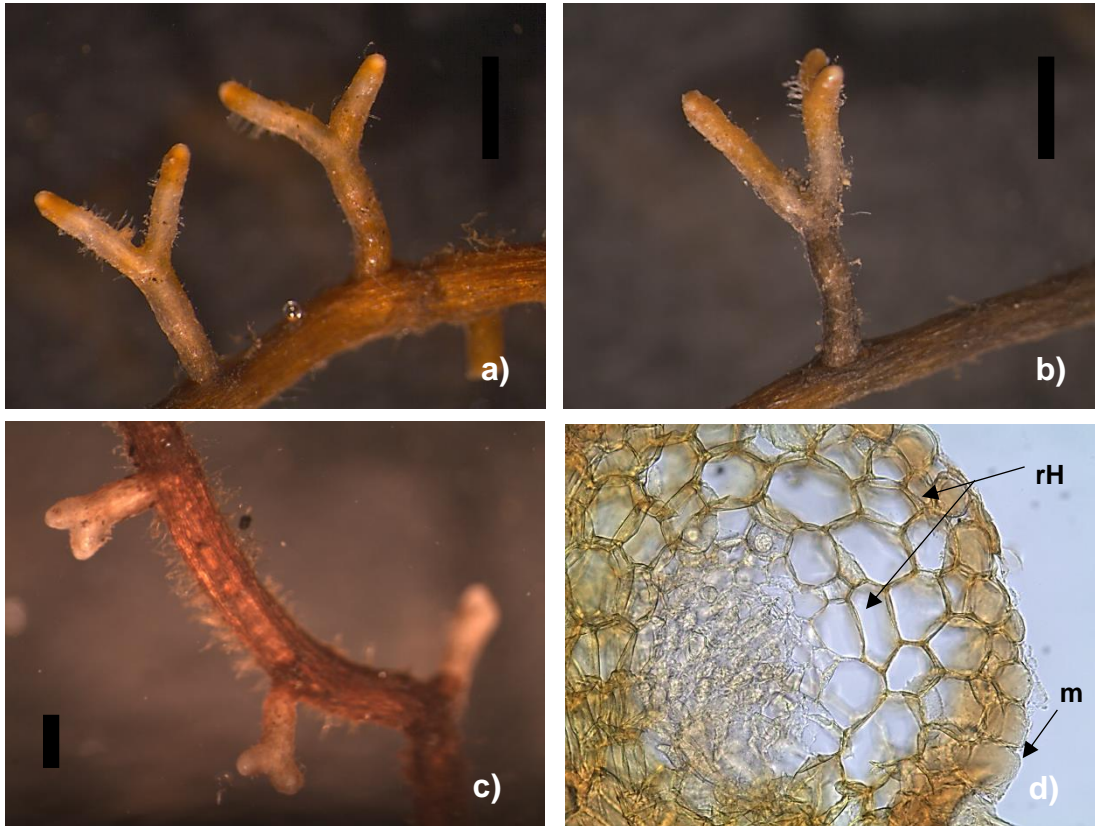
**Figura 16.** Morfotipo EcM (M5\_Sn) asociado a plantas jóvenes de la especie *P. maximartinezii*, a) 1.0X; b) 2.5X; c) 3.2X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm).

El morfotipo (M6\_Sn) presenta una ramificación dicotómica a coraloide en su mayoría con una longitud de 1 a 2 mm; una coloración roja brillante (10R 4/6) a excepción de las puntas de los ápices, las cuales tienen una coloración amarilla rojiza (7.5YR 7/8). Hay presencia de micelio extramatricial y ausencia de hifas emanantes, rizomorfos, cistidios y esclerocios. En el caso del corte transversal del morfotipo (M6\_Sn) la red de Hartig penetra de la segunda a la tercera capa de células. Este morfotipo es similar a los morfotipos descritos para los géneros *Rhizopogon* o *Suillus*, con abundantes rizomorfos (Figura 17).



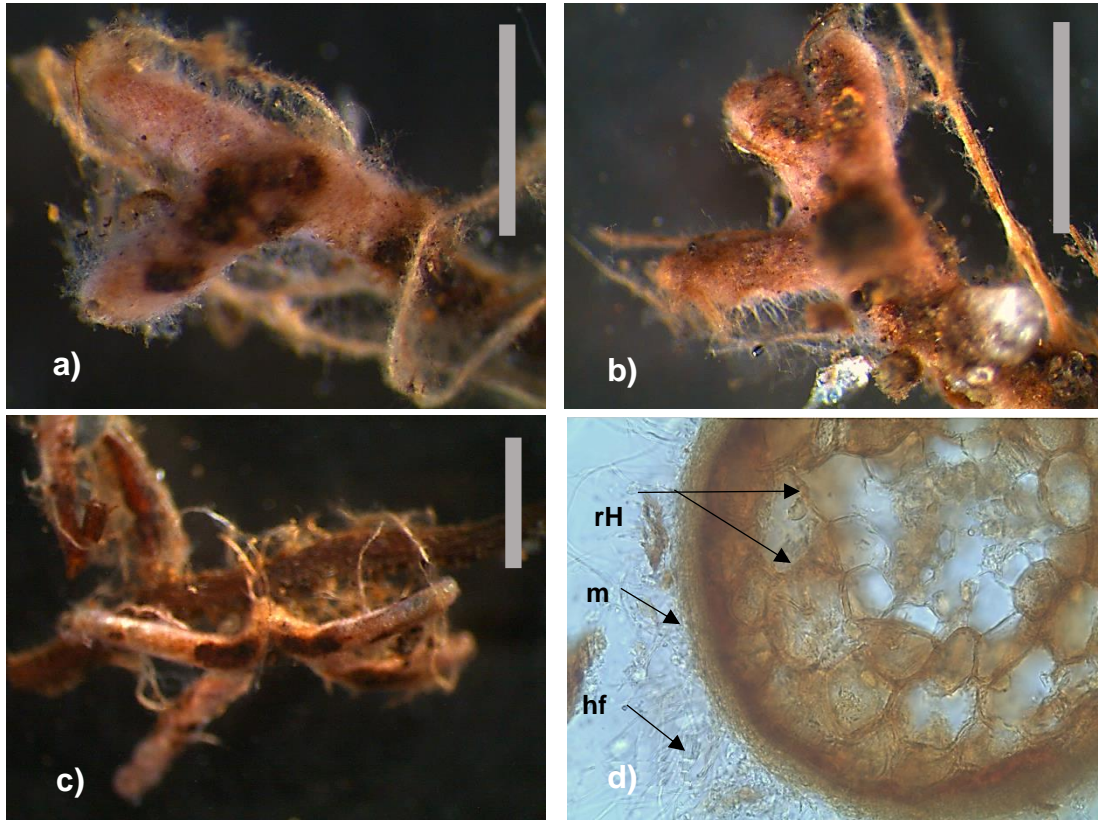
**Figura 17.** Morfotipo EcM (M6\_Sn) en el tratamiento suelo nativo en plantas de *P. maximartinezii*, a) 0.63X; b) 2.0X; c) 2.5X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm).

El morfotipo ectomicorrízico (M7\_Sn) presenta una ramificación dicotómica y una coloración entre café grisácea (10YR 5/2) principalmente hacia la base del morfotipo y una coloración amarilla rojiza (7.5YR 7/8) hacia las puntas de los ápices. Presenta una longitud de 0.5 a 3 mm. Para este caso en particular la micorrización está en proceso, punto por el cual podemos observar aun parte de los morfotipos EcM con pelos absorbentes. Hay ausencia de hifas, rizomorfos y esclerocios. En lo que corresponde a la red de Hartig, esta llega a cubrir los espacios intersticiales hasta la tercera capa de células corticales (Figura 18).



**Figura 18.** Morfotipo EcM (M7\_Sn) en el tratamiento suelo nativo, suelo nativo incendiado y suelo nativo incendiado + *A. brasilense* en plantas de *P. maximartinezii*, a) 2.5X; b) 1.25X; c) 1.25X; d) corte transversal: manto (m), red de Hartig (rH). (Barra= 1 mm).

El morfotipo ectomicorrizico (M8\_Sni) presenta una ramificación simple, coraloide y en su mayoría dicotómica, una superficie lisa, brillante, con presencia de setas algodonosa blanquecina y un color del morfotipo amarilla rojiza (7.5YR 7/8). La longitud oscila entre 1.5 a 3 mm. Presenta abundante micelio extramatricial y extensos y largos cordones miceliares (rizomorfos) con una coloración café clara (7.5YR 6/4). En el corte transversal podemos observar que la red de Hartig penetra de la segunda a la tercera capa de células corticales. Esta morfología es similar a los morfotipos formados por *Lactarius* o *Russula* (Figura 19).



**Figura 19.** Morfotipo EcM (M8\_Sni) en el tratamiento suelo nativo incendiado y suelo nativo incendiado + *A. brasilense* en plantas de *P. maximartinezii*, a) 2.5X; b) 2.5X; c) 1.6X; d) corte transversal: red de Hartig (rH), manto (m), hifas emanantes (hf). (Barra= 1 mm).

Las descripciones de las características morfo-anatómicas de las ectomicorrizas nativas asociadas a diversas especies forestales y su respectiva identificación molecular han recibido escasa atención (Aguilar-Aguilar *et al.*, 2011; Garibay-Orijel *et al.*, 2013; Oros-Ortega *et al.*, 2016; Baeza-Guzmán *et al.*, 2017; Arguelles-Moayo *et al.*, 2018), así como el efecto de los HEcM nativos y su papel crucial en condiciones de vivero y campo (Flores-Rentería *et al.*, 2018), pues a menudo los trabajos experimentales suelen desarrollarse con especies no nativas de hongos EcM, o incluso con cepas de hongos comerciales, que en su mayoría son generalistas y colonizadores agresivos con posibles efectos negativos (p. ej. el desplazamiento) en la composición de las comunidades locales de hongos EcM (Dunk *et al.*, 2012; Hart *et al.*, 2017).

La importancia de los hongos EcM nativos radica en que probablemente le brinden un beneficio mayor y estén adaptadas mejor a las condiciones ambientales del sitio o área natural para el trasplante final (Menkis et al., 2007). Además, el llevar a cabo un proceso de selección, es de vital importancia sobre todo basados en las características de las especies fúngicas y en su habilidad para colonizar y extenderse en la rizosfera de la planta hospedante, cubriendo los requerimientos de la especie forestal asociada.



### 3.7. CONCLUSIONES

Las distintas fuentes de inóculo ectomicorrízico individual o coinoculados con la bacteria *A. brasilense*, indujeron distintas respuestas en biomasa, diámetro, altura y porcentaje de colonización. Se presentó un efecto sinérgico del hongo (*L. proxima* y *H. lacunosa*) y la bacteria (*A. brasilense*) en biomasa, diámetro y altura, aunque en algunas de estas el valor fue similar o superior cuando se implementaron los HEcM sin la bacteria. Las plantas inoculadas con *H. lacunosa* y *H. lacunosa* + *A. brasilense* (HI+Ab), presentaron mejor calidad fisiológica y morfológica que las plantas sin inocular y de aquellas inoculadas exclusivamente con la bacteria, así como el resto de las plantas; las plantas de estos tratamientos presentaron mayores contenidos de macronutrientes y micronutrientes, aunque la mayor movilización nutrimental a parte aérea (P, K, Fe, Na y Zn) se observó en las plantas inoculadas con *L. proxima*. La inoculación de *L. proxima* y *H. lacunosa* favorecieron la absorción de N P K mientras que la coinoculación *A. brasilense* en plantas inoculadas con *H. lacunosa*, *L. próxima*, HEcM nativos de suelo natural y suelo incendiado tuvieron un efecto positivo sobre la absorción de Zn y Fe. Lo cual nos indica que los HEcM tienen capacidad diferencial en la absorción de nutrientes del suelo. Sin embargo, la coinoculación tuvo un menor efecto sobre la absorción de P y K que cuando solo fueron inoculadas con *L. próxima* o *H. lacunosa* no así cuando fueron coinoculadas con suelo natural, donde se obtuvo un mayor contenido de K, Zn y Fe, mientras que en suelo nativo incendiado (Sni) favoreció la absorción de N y K. La colonización micorrízica varió de 68.69 a 92.73%, registrándose el mayor porcentaje en plantas inoculadas con suelo nativo + *A. brasilense* (Sn+Ab). Asimismo, se registraron un total de ocho morfotipos EcM asociados a plantas jóvenes de pino azul en las que se inocularó suelo nativo y suelo nativo incendiado; registrándose cuatro de estos en los cepellones de las plantas inoculadas con suelo nativo incendiado; no obstante, se desconoce la identidad de estos. Se concluye que la inoculación individual de los hongos EcM *L. proxima* y *H. lacunosa*, así como la coinoculación con la bacteria *A. brasilense* pueden mejorar la calidad morfológica, fisiológica y nutrimental de plantas de *P. maximartinezii*, bajo condiciones de invernadero, pues su implementación incrementa su posible sobrevivencia en campo. Sin embargo, es

recomendable conocer e identificar los hongos ectomicorrízicos y bacterias asociadas de forma natural al pino azul, pues estos podrían potenciar la respuesta y tolerancia de las plantas transportadas a campo, sobre todo bajo las condiciones restrictivas en las que se desarrolla dicha especie en peligro de extinción, y con ello, aumentar el éxito de futuros programas de reforestación, además de representar una alternativa a fertilizantes convencionales y contribuir a la conservación de la biodiversidad del suelo.

### 3.8. LITERATURA CITADA

- Alcántar, G., V.M. Sandoval, 1999.** Manual de análisis químico de tejido vegetal. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C.
- Alves, L., V.L. Oliveira, G.N.S. Filho, 2010.** Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3): 676–684.
- Arteaga-León, C., 2014.** Ectomicorización con hongos de la Sierra Nevada, México en el crecimiento y movilización nutrimental de *Pinus ayacahuite* Ehrenb. Ex Schlttdl. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco. Estado. de México.
- Arteaga-León, C., J. Pérez-Moreno, D. Espinoza-Victoria, J.J, Almaraz-Suárez, H. Silva-Rojas, A. Delgado-Alvarado, 2018.** La inoculación ectomicorrízica con hongos comestibles incrementa el crecimiento vegetal y el contenido nutrimental de *Pinus ayacahuite*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89: 1089-1099.
- Aspray, T.J., E.E. Jones, M.W. Davies, M. Shipman, G.D. Bending, 2013.** Increased hyphal branching and growth of ectomycorrhizal fungus *Lactarius rufus* by the helper bacterium *Paenibacillus* sp. *Mycorrhiza*, 23(5): 403–410.
- Barragán-Soriano, J.L., J. Pérez-Moreno, J.J. Almaraz-Suarez, M.G. Carcaño-Montiel, K.I. Medrano-Ortiz, 2018.** Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 24(1): 3-16.
- Barroetaveña, C.V., N. Bassani, M. Rajchenberg, 2012.** Inoculación micorrícica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. *Bosque*

(Valdivia), 33(2): 163-169.

**Bremner, J.M. 1965.** Total nitrogen. In: Black CA (ed) Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin 9: 1149-1178.

**BCERN 2008.** British Columbia Ectomycorrhizal Research Network website. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service. [www.pfc.cfs.nrcan.gc.ca/biodiversity/bcern/index\\_e.html](http://www.pfc.cfs.nrcan.gc.ca/biodiversity/bcern/index_e.html).

**Cairney, J.W., B.A. Bastias, 2007.** Influences of fire on forest soil fungal communities. Canadian Journal of Forest Research, 37(2): 207-215.

**Cairney, J.W., 2012.** Extramatrical mycelia of ectomycorrhizal fungi as moderators of carbon dynamics in forest soil. Soil Biology and Biochemistry. 47(0): 198-208.

**Carrasco-Hernández, V., J. Pérez-Moreno, V. Espinosa-Hernández, J.J. Almaraz-Suárez, R. Quintero-Lizaola, M. Torres-Aquino, 2010.** Characterization of mycorrhizas established between two wild edible mushrooms and native pines of Mexico. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 1(4): 567-577.

**Carrasco-Hernández, V., J. Pérez-Moreno, V. Espinosa-Hernández, J.J. Almaraz-Suárez, R. Quintero-Lizaola, M. Torres-Aquino, 2011.** Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. Revista Chilena de Historia Natural, 84(1): 83-96.

**Courty, P.E., R. Pouysegur, M. Buée, J. Garbaye, 2006.** Laccase and phosphatase activities of the dominant ectomycorrhizal types in a lowland oak forest. Soil Biology and Biochemistry, 38(6): 1219-1222.

**Cumming, J.R., C. Zawaski, S. Desai, F.R. Collart, 2015.** Phosphorus disequilibrium in the tripartite plant-ectomycorrhiza-plant growth promoting rhizobacterial association. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 15(2):

464–485.

**DEEMY, 2017.** An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. [www.deemy.de/](http://www.deemy.de/) Consultado: 12 de enero 2019.

**Dominguez-Nuñez, J.A., M. Medina, M. Berrocal-Lobo, A. Anriquez, A. Albanesi, 2015.** The combined effects of *Pseudomonas fluorescens* CECT 844 and the black truffle co-inoculation on *Pinus nigra* seedlings. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 8(5): 624.

**Dove, N.C., S.C. Hart, 2017.** Fire reduces fungal species richness and in situ mycorrhizal colonization: A meta-analysis. *Fire Ecology*, 13(2): 37-65.

**Dunk, C., T. Lebel, P. Keane, 2012.** Characterisation of ectomycorrhizal formation by the exotic fungus *Amanita muscaria* with *Nothofagus Cunninghamii* in Victoria, Australia. *Mycorrhiza*, 22:135–147.

**Egidi, E., S. McMullan-Fisher, J.W. Morgan, T. May, B. Zeeman, A.E. Franks, 2016.** Fire regime, not time-since-fire, affects soil fungal community diversity and composition in temperate grasslands. *FEMS Microbiology Letters*, 363(17).

**Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2010.** Global forest resources assessment 2010. Rome, Italy.

**Franco, A.R., N.R. Sousa, M.A. Ramos, R.S. Oliveira, P.M. Castro, 2014.** Diversity and Persistence of Ectomycorrhizal Fungi and Their Effect on Nursery-Inoculated *Pinus pinaster* in a Post-fire Plantation in Northern Portugal. *Microbial Ecology*, 68(4): 761-772.

**Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka, M. 2007.** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176(1), 22-36.

**Fukami, J., P. Cerezini, M. Hungria. 2018.** *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8(1): 73.

- Garbaye J., 1994.** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 128: 197–210.
- Glassman, S.I., C.R. Levine, A.M. DiRocco, J.J. Battles, T.D. Bruns. 2015.** Ectomycorrhizal fungal spore bank recovery after a severe forest fire: some like it hot. *The ISME Journal*, 10(5): 1228-1239.
- Gómez-Romero, M., J.C. Soto-Correa, J.A. Blanco-García, C. Sáenz-Romero, J. Villegas, R. Lindig-Cisneros, 2012.** Estudio de especies de pino para restauración de sitios degradados. *Agrociencia*, 46(8): 795–807.
- Grossnickle S.C., 2005.** Importance of root growth in overcoming planting stress. *New Forests*, 30:273–294
- Grossnickle S.C., D.B. South, 2017.** Seedling Quality of Southern Pines: Influence of Plant Attributes. *Tree Plant. Notes*, 60(2): 29-40
- Hart, M.M., P. M. Antunes, L.K. Abbott, 2017.** Unknown risks to soil biodiversity from commercial fungal inoculants. *Nature Ecology Evolution*, 1(4): 0115.
- Heinonsalo, J., P. Frey-Klett, J.C. Pierrat, J.L. Churin, J. Vairelles, J. Garbaye, 2004.** Fate, tree growth effect and potential impact on soil microbial communities of mycorrhizal and bacterial inoculation in a forest plantation. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(2): 211-216.
- Hobbs S.D., K.A. Wearstler, 1983.** Performance of three Douglas-fir stocktypes on a skeletal soil. *Tree Plant. Notes* 34:11–14.
- Hrynkiewicz, K., C. Baum, P. Leinweber, 2010.** Density, metabolic activity, and identity of cultivable rhizosphere bacteria on *Salix viminalis* in disturbed arable and landfill soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173(5): 747–756.
- Iwanski, M. M. Rudawska, 2006.** Mycorrhizal associations of nursery grown Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings in Poland. *Annals of Forest Science*, 63: 715–723.

- Jiménez-Ruíz, M., 2011.** Estudio etnomicológico y biotecnológico de hongos silvestres comestibles ectomicorrízicos en *Pinus pseudostrobus* y evaluación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México.
- Karkouri, K. E, F. Martin, J.P. Emmanuel-Douzery, D. Mousain, 2005.** Diversity of ectomycorrhizal fungi naturally established on containerised *Pinus* seedlings in nursery conditions. *Microbiological Research*, 160: 47–52
- Karličić, V., V. Golubović Ćurguz, V. Raičević, 2016.** The alleviation of reforestation challenges by beneficial soil microorganisms. *Reforesta*, 1:238-259.
- Kataoka, R., K. Futai, 2009.** A new mycorrhizal helper bacterium, *Ralstonia* species, in the ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus thunbergii* and *Suillus granulatus*. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3): 315–320.
- Lichtenthaler, H. K. 1987.** Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382.
- López-Gutiérrez, A., J. Pérez-Moreno, F. Hernández-Santiago, E. Uscanga-Mortera, A. García-Esteva, V.M. Cetina-Alcalá, M.R. Cardoso-Villanueva, B. Xoconostle-Cázares, 2018.** Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Botanical Sciences*, 96(2): 286–304.
- López-Reyes, L., M.G. Carcaño-Montiel, D. Espinosa-Victoria, R.A. Tapia Hernández, 2018.** Biofertilizantes bacterianos. Un modelo biotecnológico microbiano para el desarrollo agrícola. pp 253-272. En: M.P.G. Sánchez-Alonso, L. López-Reyes, C. Vázquez-Cruz, E. Negrete-Abascal (Coordinadores). Modelos microbianos para la investigación básica y la biotecnología. BUAP, UNAM, FES-Iztacala. México
- Martin, F., A. Kohler, C. Murat, C. Veneault-Fourrey, D.S. Hibbett, 2016.**

Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 14(12): 760.

**Martínez-Reyes, M., J. Pérez-Moreno, L. Villarreal-Ruiz, R. Ferrera-Cerrato, B. Xoconostle-Cázares, J.J. Vargas-Hernández, M. Honrubia-García, 2012.** Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(2): 183–192.

**Marupakula, S., S. Mahmood, R.D. Finlay, 2016.** Analysis of single root tip microbiomes suggests that distinctive bacterial communities are selected by *Pinus sylvestris* roots colonized by different ectomycorrhizal fungi. *Environmental microbiology*, 18(5): 1470-1483.

**Menkis, A. R. Vasiliauskas, A. F. S. Taylor, J. Stenlid, R. Finlay, 2007.** Afforestation of abandoned farmland with conifer seedlings inoculated with three ectomycorrhizal fungi—impact on plant performance and ectomycorrhizal community. *Mycorrhiza*, 12: 337–348.

**Munsell, A. H. 2000.** Munsell soil color charts. New Windsor, NY, Munsell Color.

**Paredes-Cardona, E., M. Carcaño-Montiel, M.A. Mascarúa-Esparza, J. Caballero-Mellado, 1988.** Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 30:351-355.

**Paul, L.R., B.K. Chapman, C.P. Chanway, 2007.** Nitrogen Fixation Associated with *Suillus tomentosus* Tuberculate Ectomycorrhizae on *Pinus contorta* var. *Latifolia*. *Annal of botany*, 99(6): 1101-1109.

**Pérez-Moreno, J., D.J. Read, 2000.** Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist*, 145: 301-309.

**Pérez-Moreno, J., J.D. Read, 2004.** Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes



que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29: 239-247.

**R Core Team, 2018.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

**Ramírez-Razo, K. 2018.** Transferencia nutrimental y crecimiento de *Abies religiosa* (Kunth) Schldl et. Cham con dos inoculos de hongos ectomicorrízicos, en dos sustratos. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México.

**Rentería-Chávez, M.C, J. Pérez-Moreno, V.M. Cetina-Alcalá, R. Ferrera-Cerrato, B. Xoconostle-Cázares, 2017.** Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49: 93-104.

**Rincon, A., I. F. Alvarez, J. Pera, 2001.** Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 11: 265-271.

**Rodríguez, T., D. A. 2008.** Indicadores de calidad de planta forestal. Universidad Autónoma Chapingo. Mundi Prensa México. 156 pp.

**Santos, R.F.D., S.P.D. Cruz, G.R. Botelho, A.V. Flores, 2018.** Inoculation of *Pinus taeda* seedlings with plant-growth promoting rhizobacteria. *Floresta e Ambiente*, 25(1).

**Siddiqui, Z.A., Kataoka, R. 2011.** Mycorrhizal inoculants: progress in inoculant production technology. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J, eds. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. New York: Springer, pp. 489-506.

**Smith, S.E., D.J. Read, 1997.** *Mycorrhizal symbiosis* (2nd ed). Academic Press, London, UK, 605 pp.

- Smith, S.E., D.J. Read, 2008.** Mycorrhizal Symbiosis. 3rd. Edition. Elsevier Academic Press, London, UK, pp 605.
- Sousa, N.R., A.R. Franco, R.S. Oliveira, P.M.L. Castro, 2010.** Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. *Journal of Environmental Management*, 95: S269–S274.
- Sousa, N.R., A.R. Franco, M.A. Ramos, R.S. Oliveira, P.M.L. Castro, 2011.** Reforestation of burned stands: the effect of ectomycorrhizal fungi on *Pinus pinaster* establishment. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(10): 2115-2120.
- Sousa, N.R., A.R. Franco, M.A. Ramos, R.S. Oliveira, P.M.L. Castro, 2015.** The response of *Betula pubescens* to inoculation with an ectomycorrhizal fungus and a plant growth promoting bacterium is substrate-dependent. *Ecological Engineering*, 81: 439-443.
- Tedersoo, L., May, T.W., Smith, M.E. 2010.** Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4): 217-263.
- Teopia, P., M. Kumar, R. Prasar, V. Kumar, N. Tuteja, A. Varma, 2017.** Mobilization of Micronutrients by Mycorrhizal Fungi. In: *Mycorrhiza Function, Diversity, State of the Arte*. Springer. International Publisher.
- Vásquez-Gassibe, P., J.A. Oria-de-Rueda, L. Santos-del-Blanco, P. Martín-Pinto, 2016.** The effects of fire severity on ectomycorrhizal colonization and morphometric features in *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Forest Systems*, 25(1): 5.
- Váldez, C. R., R. M. Villareal, F. G. Galindo, S. G. Morales, S. S. Peña, 2018.** Improved parameters of *Pinus greggii* seedling growth and health after inoculation with ectomycorrhizal fungi. *Southern Forest: a Journal of Forest Science*, 81(1): 23-30.
- Zhang, Z. X. 1986.** Determination of chlorophyll content of plants - acetone and

ethanol mixture method. Liaoning Agricultural Science, 3: 26–28.

**Zida, D., M. Tigabu, L. Sawadogo, P.C. Odén, 2008.** Initial seedling morphological characteristics and field performance of two Sudanian savannah species in relation to nursery production period and watering regimes. *Forest Ecology Management*, 255(7): 2151–2162.

**Zúñiga-Cruz, A.J, 2018.** Inoculación de *Pinus cembroides* Zucc. con un hongo ectomicorrízico comestible y una bacteria auxiliadora de la micorrización en dos sustratos. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México.

## CONCLUSIONES GENERALES

*Pinus maximartinezii* Rzed. es una especie endémica que forma parte de uno de los ecosistemas más productivos en las zonas áridas, además, es una especie de pino piñonero con notoria adaptabilidad a suelos erosionados, poco profundos y pobres, que brinda múltiples servicios ambientales y podría contribuir fundamentalmente en la economía local. No obstante, actualmente es catalogada tanto a nivel nacional como internacional en peligro de extinción, debido a su distribución restringida y baja densidad poblacional. Asimismo, el planteamiento de estrategias y medidas de conservación para el establecimiento y recuperación del área forestal natural ha sido una gran problemática, principalmente por factores de perturbación y por el escaso esfuerzo de investigación sobre su ecología e interacción con el medio. Por consiguiente, es necesario el generar información, con la finalidad de proponer alternativas biotecnológicas que contribuyan a los procesos o estrategias de conservación, recuperación y reproducción de especies forestales de interés ecológico, económico y social, para las que se tenga como objetivo aumentar su población y evitar con ello su extinción, tal como la simbiosis ectomicorrízica.

En el presente estudio, se caracterizó la diversidad y abundancia de la comunidad de hongos EcM asociados a árboles adultos de la especie de pino piñonero *P. maximartinezii*, durante dos épocas de muestreo: temporada de sequía y lluvia, esta última posterior a un incendio forestal. Registrando un total de 18 morfotipos EcM, producto de ambos muestreos, de los cuales tres morfotipos (MZac2, MZac5 y MZac8) representaron aproximadamente el 90% del número total de puntas de ápices ectomicorrizados y seis se presentaron para ambas temporadas de muestreo; con base a las características morfoanatómicas reportadas en la literatura, se considera que el morfotipo MZac1 y MZac14, podría tratarse de la especie *Thelephora terrestris* y *Pseudotomentella tristis*, respectivamente. Sin embargo, se requiere realizar una identificación molecular. Además, de acuerdo al conjunto de características morfoanatómicas distintivas se identificó de forma confiable al morfotipo MZac5 como *Cenococcum geophilum*, complejo de especies más abundante, dado que se registró en el 42.5% del total de raíces

ectomicorrizadas vivas analizadas (18.3 y 24.2% para época seca y de lluvia respectivamente).

Se observó un efecto sinérgico por la coinoculación con los hongos *L. proxima* y *H. lacunosa* con *A. brasilense* en variables como: biomasa, diámetro y altura, aunque en algunos valores fueron similares o superiores cuando se inocularon los hongos sin la bacteria. Las plantas inoculadas con *H. lacunosa* (HI) y *H. lacunosa* + *A. brasilense* (HI+Ab) presentaron la mejor calidad fisiológica, asimismo los mayores contenidos de macronutrientes y micronutrientes, aunque la mayor movilización nutrimental a parte aérea (P, K, Fe, Na y Zn) se observó en las plantas inoculadas con *L. proxima*. La colonización micorrízica varió de 68.69 a 92.73%, registrándose el mayor porcentaje en plantas inoculadas con suelo nativo + *A. brasilense*. Finalmente, se registraron ocho morfotipos EcM asociados a plantas jóvenes de pino azul en las que se implementó como inoculo, suelo nativo. Concluyendo que la inoculación individual de hongos EcM *H. lacunosa*, *L. proxima* y dual de *A. brasilense* mejorar la calidad fisiológica y nutrimental de plantas de *P. maximartinezii*, por lo que su implementación resulta una alternativa para aumentar la supervivencia de esta especie. No obstante, el conocimiento, identificación y manejo de los HEcM y rizobacterias nativas representan una alternativa biotecnológica mayor en la producción de plantas de dicha especie forestal, pues estos podrían potenciar la respuesta y tolerancia de las plantas transportadas a campo, sobre todo bajo las condiciones restrictivas en las que se desarrolla dicha especie en peligro de extinción.

Por lo tanto, se requieren estudios más detallados sobre la composición e identificación de la comunidad de hongos EcM y las bacterias asociadas, así como su dinámica ecológica al conocer los beneficios sobre el desarrollo y establecimiento del hospedero en campo, con la finalidad de proponer estrategias de recuperación y conservación proactiva del hábitat de *P. maximartinezii*, sobre todo frente a cambios climáticos y futuros escenarios adversos producto del calentamiento global.