



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

## MODIFICACIONES FISIOLÓGICAS EN ÁRBOLES NATIVOS DE MÉXICO INOCULADOS CON HONGOS COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS Y BACTERIAS AUXILIADORAS DE LA MICORRIZACIÓN

JOSÉ LUIS BARRAGÁN SORIANO

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

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

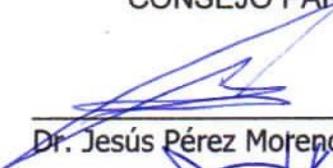
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **MODIFICACIONES FISIOLÓGICAS EN ÁRBOLES NATIVOS DE MÉXICO INOCULADOS CON HONGOS COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS Y BACTERIAS AUXILIADORAS DE LA MICORRIZACIÓN**, realizada por el estudiante: **BARRAGÁN SORIANO JOSÉ LUIS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

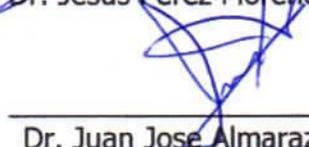
DOCTOR EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA

## CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)

  
Dr. Jesús Pérez Moreno

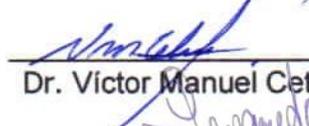
ASESOR (A)

  
Dr. Juan Jose Almaraz Suárez

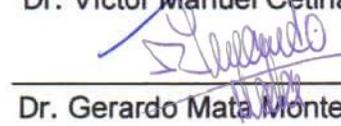
ASESOR (A)

  
Dr. Julián Delgadillo Martínez

ASESOR (A)

  
Dr. Víctor Manuel Cetina Alcalá

ASESOR (A)

  
Dr. Gerardo Mata Montes de Oca

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2022

**La gratitud tiene que ver con la educación, pero también con el estado del alma.  
No es que las personas felices sean agradecidas, sino que son las personas  
agradecidas las que son felices.**



**Esta tesis de Doctorado en Ciencias forma parte del Proyecto 316198  
PRONACES-CONACyT FOP07-2021-03-Soberanía Alimentaria “Los hongos  
comestibles cultivados y silvestres como promotores de desarrollo rural  
sustentable, soberanía alimentaria y sistemas agroecológicos**

**MODIFICACIONES FISIOLÓGICAS EN ÁRBOLES NATIVOS DE MÉXICO  
INOCULADOS CON HONGOS COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS Y BACTERIAS  
AUXILIADORAS DE LA MICORRIZACIÓN**

**Barragán Soriano José Luis, D.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022**

**RESUMEN**

Los hongos ectomicorrízicos (HEM), se asocian con plantas del género *Pinus* con los que establece la simbiosis ectomicorrízica en sus raíces, además existen grupos bacterianos específicos que interactúan con esta asociación, potencializando diversos beneficios como, mejoramiento del crecimiento, modificación de variables fisiológicas como; fotosíntesis y clorofilas, incremento de la adquisición de agua y nutrientes. En el presente trabajo se estudió: i) El efecto de la coinoculación de (HEM) *Laccaria laccata* (L) con bacterias auxiliadoras de la micorrización *Cohnella* sp. (C) y dos cepas de *Azospirillum brasilense*: fijadora de nitrógeno (FN) y solubilizadora de fosfato (SF), en el crecimiento, mejoramiento fisiológico y contenido nutrimental de *Pinus montezumae* Lamb.; ii) coinoculación con (HEM) *Laccaria bicolor* y una bacteria auxiliadora de la micorrización (C) en *Pinus greggii* en la tolerancia al estrés por temperatura, a través del mejoramiento de variables fisiológicas como fotosíntesis y contenido de clorofilas. Como resultado de la coinoculación de *L. laccata* con la bacteria (FN) se registró un incremento de peso seco de parte aérea de hasta 7.84 veces más que las plantas sin inocular, la tasa fotosintética de los tratamientos L+C y L+FN presentó incrementos de hasta 3.83 y 6.83 veces más respectivamente que las plantas sin inocular, el tratamiento L+FN presentando un sinergismo en la cantidad de N presente en parte aérea y raíz. Los resultados obtenidos para las plantas coinoculadas con *L. bicolor* y la bacteria (C) bajo tres distintas temperaturas (baja, media y alta) mostraron un incremento del peso seco, al comparar con las plantas sin inocular presentes en las diferentes condiciones de temperatura de hasta 5.22, 5.0 y 8.84, veces más, la tasa fotosintética, registro incrementos en las plantas inoculadas exclusivamente con el HEM *L. bicolor* y en aquellas coinoculadas con la bacteria (L+C), bajo la condición de temperatura alta, en comparación con las plantas sin inocular que estuvieron bajo las tres diferentes temperaturas, de hasta 7.75, 6.38 y 5.71 veces más, respectivamente. tienen la capacidad de mejorar el estado fisiológico y nutrimental de plantas de *P. montezumae*. La inoculación con *L. bicolor* y coinoculado con la bacteria (C) en plantas de *P. greggii* ayudan a las plantas a tolerar el estrés por temperatura, a través de la modificación de variables fisiológicas como fotosíntesis y variables de crecimiento. Cabe señalar que esta investigación es una de las primeras en México que demuestran la importancia de la inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles, los cuales promueven la tolerancia al estrés por incrementos de temperatura, encaminado al papel que pueden desempeñar los hongos a la tolerancia al calentamiento global.

**Palabras clave:** calentamiento global, cambio climático, estrés, deforestación, termotolerancia.

**PHYSIOLOGICAL MODIFICATIONS IN NATIVE TREES OF MEXICO INOCULATED  
WITH EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL FUNGI AND MYCORRHIZATION HELPER  
BACTERIA**

**Barragán Soriano José Luis, D.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022**

**ABSTRACT**

Ectomycorrhizal fungi (HEM) are associated with plants of the genus *Pinus* with which they establish ectomycorrhizal symbiosis in their roots, in addition there are specific bacterial groups that interact with this association, potentiating various benefits such as growth improvement, modification of physiological variables such as; photosynthesis and chlorophylls, increased acquisition of water and nutrients. In the present work, the following was studied: i) The effect of the coinoculation of (HEM) *Laccaria laccata* (L) with mycorrhization helper bacteria *Cohnella* sp. (C) and two strains of *Azospirillum brasilense*: nitrogen fixer (FN) and phosphate solubilizer (SF), in the growth, physiological improvement and nutritional content of *Pinus montezumae* Lamb.; ii) coinoculation with (HEM) *Laccaria bicolor* and a mycorrhization helper bacterium (C) in *Pinus greggii* in tolerance to temperature stress, through the improvement of physiological variables such as photosynthesis and chlorophyll content. As a result of the coinoculation of *L. laccata* with the bacterium (FN), an increase in the dry weight of the aerial part of up to 7.84 times more than that of the uninoculated plants was recorded. The photosynthetic rate of the L+C and L+FN treatments presented increases of up to 3.83 and 6.83 times more, respectively, than the plants without inoculation, the L+FN treatment presenting a synergism in the amount of N present in the aerial part and root. The results obtained for the plants coinoculated with *L. bicolor* and the bacterium (C) under three different temperatures (low, medium and high) showed an increase in dry weight, when compared with the uninoculated plants present in the different temperature conditions of up to 5.22, 5.0 and 8.84, times more, the photosynthetic rate, recorded increases in plants inoculated exclusively with HEM *L. bicolor* and in those coinoculated with the bacterium (L+C), under the high temperature condition, compared to those uninoculated plants that were under the three different temperatures, up to 7.75, 6.38 and 5.71 times more, respectively. they have the ability to improve the physiological and nutritional status of *P. montezumae* plants. The inoculation with *L. bicolor* and coinoculated with the bacterium (C) in *P. greggii* plants help the plants to tolerate temperature stress, through the modification of physiological variables such as photosynthesis, and growth variables. It should be noted that this research is one of the first in Mexico that demonstrates the importance of inoculation with edible ectomycorrhizal fungi, which promote tolerance to stress due to temperature increases, aimed at the role that fungi can play in tolerance to global warming.

**Keywords:** global warming, climate change, stress, deforestation, thermotolerance.

## AGRADECIMIENTOS

- A **Dios** por permitirme seguir en esta vida día a día superándome y sobre todo por darme la oportunidad de terminar esta etapa en mi vida, habiendo tantas personas que no tienen que comer u otros muriendo en los hospitales.
- A **mis padres** porque gracias a su educación y apoyo incondicional siempre he podido superar cada etapa de la vida, ya que han estado acompañándome en mi camino.
- Al Dr. **Pérez Moreno Jesús** por ser un gran maestro en mi educación y sobre todo un maestro de vida, por esos viajes y esas charlas en busca de los hongos, por su gran amistad.
- Al Dr. **Juan José Almaraz Suarez**, por compartir su conocimiento, asesoría académica y sobre todo por esa amistad a lo largo de esta etapa.
- Al Dr. **Julián Delgadillo Martínez**, por todo su apoyo a lo largo de esta etapa académica, por sus aportaciones a esta investigación.
- Al Dr. **Víctor Manuel Cetina Alcalá**, por su ayuda y asesorías, por permitirme establecer mi experimento en su invernadero, y sobre todo por sus valiosas aportaciones a este trabajo.
- Al Dr. **Gerardo Mata Montes de Oca**, por sus aportaciones a esta investigación, por su apoyo, por brindarme su amistad y confianza.
- Al Dr. **Carlos Ramírez Herrera**, por su ayuda en la etapa de huelga, apoyándome con los riegos de mis plantas y, sobre todo, por su amistad y apoyo.

- Al Dr. **Javier López Upton**, por brindarme un espacio dentro de los invernaderos del Programa Forestal, por su ayuda y por su amistad.
- Al Programa Forestal, porque desde la maestría y ahora doctorado estuve trabajando en sus invernaderos.
- A **Karla Medrano**, por todos esos días largos de trabajo en el invernadero, por su compañía y sobre todo por ese tiempo que hemos pasado juntos a lo largo de más de una década.
- A **Martha Chávez Morales**, por su amistad desde la universidad por estar escuchándome y apoyándome en esta etapa emocional por la que atravesé, sobre todo por ser mi amiga.
- A **Frida Ailen** por enseñarme que a pesar de todo lo malo debemos de ser felices, siempre serás mi niña hermosa.
- A **Darío**, por esas largas charlas en las tardes, por ser casi mi psicólogo y escucharme en mis momentos de crisis y sobre todo por esa amistad que hemos logrado tener.
- Al Dr. **Marco Polo** por su apoyo al termino de este trabajo y por esa comprensión en todo momento.
- A Rosita, Vivian, Chayito, y a mis compañeros del laboratorio de micorrizas, por su amistad y ayuda.
- A la Dra. **Magdalena Martínez Reyes**, por compartir sus conocimientos y ayuda incondicional.
- A **CONACYT**, al **COLEGIO DE POSTGRADUADOS CAMPUS MONTECILLO** y al **POSGRADO EN EDAFOLOGÍA**.

## DEDICATORIA

Esta investigación se la dedico a **Dios** por llenar mi vida de amor, bendiciones y por guiarme cada día de mi vida y hacerme una persona de bien.

Este trabajo está dedicado en memoria de mi hermana **M. Alma Rosa Barragán Soriano**, quien me enseñó que vivir es un privilegio, a pesar de las complicaciones que la vida traiga consigo, te amo hermana donde quiera que te encuentres.

A mi madre **Coti Soriano Huerta**, por todo su amor que me ha brindado día tras día, por su determinación y su apoyo incondicional en este trabajo.

A mi padre **Fernando Barragán Tapia**, por la educación que me ha dado, por su amor y por todo lo que me ha dado.

A mi hermano **Alejandro Barragán Soriano**, por estar al pendiente de mí y acompañarme siempre.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
DEDICATORIA.....	viii
LISTA DE CUADROS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	6
Objetivo General.....	6
Objetivos particulares .....	6
Hipótesis particulares.....	7
<b>CAPITULO I. EL PAPEL DE LA INOCULACION CON UN HONGO COMESTIBLE ECTOMICORRÍZICO Y BACTERIAS AUXILIADORAS DE LA MICORRIZACIÓN EN EL MEJORAMIENTO FISIOLÓGICO DE PLANTAS DE <i>Pinus montezumae</i> Lamb.</b> .....	8
1.1 RESUMEN .....	8
1.2 INTRODUCCIÓN .....	10
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
1.3.1 Preparación del sustrato e inoculación.....	14
1.3.2 Cultivo de cepas bacterianas.....	15
1.3.3 Diseño experimental y variables evaluadas.....	16
1.3.3.1 Diámetro y peso seco.....	16

1.3.3.2 Tasa de asimilación de CO <sub>2</sub> .....	16
1.3.3.3 Contenido de clorofila.....	17
1.3.3.4 Análisis nutrimental .....	17
1.3.3.5 Porcentaje de colonización.....	18
<b>1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>18</b>
1.4.1 Crecimiento de plantas .....	18
1.4.2 Peso seco de plantas inoculadas o no .....	20
1.4.3 Tasa fotosintética .....	22
1.4.4 Contenido de clorofilas y carotenos.....	24
1.4.5 Contenido de macronutrientes.....	27
1.4.6 Porcentaje de raíces micorrizadas.....	31
<b>1.5 CONCLUSIONES .....</b>	<b>34</b>
 <b>CAPITULO II. EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON UN HONGO COMESTIBLE</b>	
<b>ECTOMICORRÍZICO Y UNA BACTERIA AUXILIADORA DE LA</b>	
<b>MICORRIZACIÓN EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS POR AUMENTO DE</b>	
<b>TEMPERATURA.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 RESUMEN .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
2.3.1 Diseño de módulos de temperatura.....	41
2.3.2 Material vegetal e inóculo .....	42
2.3.3 Establecimiento del experimento.....	43
2.3.4 Cultivo bacteriano .....	43

2.3.5 Diseño experimental y variables evaluadas.....	44
2.3.5.1 Variables diamétricas .....	44
2.3.5.2 Tasa fotosintética .....	45
2.3.5.3 Contenido de clorofila.....	45
2.3.5.4 Colonización ectomicorrízica .....	46
<b>2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
2.4.1. Peso seco de plantas de <i>P. greggii</i> .....	48
2.4.2 Altura de plantas de <i>P. greggii</i> .....	52
2.4.3 Diámetro de plantas de <i>P. greggii</i> .....	55
2.4.4 Tasa fotosintética .....	57
2.4.5 Contenido de clorofilas a, b, totales y carotenos .....	60
2.4.6 Porcentaje de raíces micorrizadas.....	63
2.4.7 Contenido de Nitrógeno.....	66
<b>2.5 CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>71</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.1.** Materia seca de plantas *Pinus montezumae* con distintos tratamientos de inoculación con un hongo comestible ectomicorrízico, una bacteria auxiliadora de la micorrización y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal ..... 22
- Cuadro 1.2.** Tasa fotosintética de plantas de *Pinus montezumae* inoculados con un hongo ectomicorrízico comestible, una bacteria auxiliadora de la micorrización y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal. .... 23
- Cuadro 1.3.** Contenido de clorofila a, b, total y carotenos en plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con un hongo ectomicorrízico comestible, una cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización y dos cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. .... 26
- Cuadro 1.4.** Contenido total de macronutrientes en raíz parte aérea y raíz, N, P, K, Ca y Mg de plantas de *Pinus montezumae* inoculadas o no con un hongo ectomicorrízico comestible, una cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización y dos cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal..... 29
- Cuadro 1.5.** Porcentaje de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas, muertas y vivas de plantas de *Pinus montezumae* y un hongo ectomicorrízico comestible, una cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización y dos cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. .... 32
- Cuadro 2.1.** Materia seca de plantas de *Pinus greggii* con distintos tratamientos de inoculación con un hongo comestible ectomicorrízico, una cepa de

bacteria auxiliadora de la micorrización y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal. ....	50
<b>Cuadro 2.2.</b> Tasa fotosintética en plantas de <i>Pinus greggii</i> bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico y una bacteria auxiliadora de la micorrización. ....	58
<b>Cuadro 2.3.</b> Contenido de clorofilas y carotenos en plantas de <i>Pinus greggii</i> bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y una bacteria auxiliadora de la micorrización bajo tres condiciones de temperatura .....	62
<b>Cuadro 2.4.</b> Colonización micorrízica de plantas de <i>Pinus greggii</i> bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y una cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización, bajo tres condiciones diferentes de temperatura. ....	64
<b>Cuadro 2.5.</b> Contenido total de N en raíz parte aérea y raíz de plantas de <i>L. bicolor</i> inoculadas o no con un hongo ectomicorrízico comestible y una bacteria auxiliadora de la micorrización. ....	67

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Esporomas de *Laccaria*, un género de hongos comestibles ectomicorrízicos. Tomado de: (micoex.org). ..... 13
- Figura 1.2.** El diámetro de plantas *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas con un hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* y bacterias auxiliaadoras de la micorrización. Psi= Plantas sin inocular; L=*Laccaria laccata*; C=*Cohnella* sp.; FN=*Azospirillum brasilense* fijadora de nitrógeno, SF= *Azospirillum brasilense* solubilizadora de fosfato. Medias con la misma letra para cada etapa de tiempo no son significativamente diferentes. .... 19
- Figura 1.3.** Imágenes generales del experimento. A) Efecto de la coinoculación de *Pinus montezumae* con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* (L) y la bacteria *A. brasilense* (FN) después de un año .... 33
- Figura 2.1.** Estructuras características de *Pinus greggii* como conos y acículas. Tomado de (Arboleslacalma). ..... 40
- Figura 2.2.** Módulos de las diferentes temperaturas. a) Modulo de temperatura ambiente; b) Modulo temperatura media; c) Modulo temperatura alta; d) Dataloggers utilizado en los módulos. .... 42
- Figura 2.3.** Temperaturas registradas en un periodo de 365 días, son el promedio anual de temperaturas, dentro de cada uno de los módulos; T1, 27°C; T2, 29°C y T3, 32°C. Las letras representan cada mes del año; e=enero; f=febrero; m=marzo; a=abril; m=mayo; j=junio; j=julio; a=agosto; s=septiembre; o=octubre; n=noviembre; d=diciembre. .... 48

**Figura 2.4.** Altura de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria bicolor* y una bacteria auxiliadora de la micorrización. Psi= Plantas sin inocular; L=*Laccaria bicolor*; C=*Cohnella* sp., barras con la misma letra son iguales según la prueba de Tukey (0.05). ± Error estándar de la media..... 53

**Figura 2.5.** Diámetro de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con un hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria bicolor* y una bacteria auxiliadora de la micorrización. Psi= Plantas sin inocular; L=*Laccaria bicolor*; C=*Cohnella* sp. Barras con la misma letra son iguales según la prueba de Tukey (0.05). ± Error estándar de la media..... 56

**Figura 2.6.** Imágenes generales del experimento. A) Efecto de la coinoculación de *P. greggii* con el hongo comestible ectomicorrízico *L. bicolor* (L) y la bacteria *Cohnella* sp. (C) después de un año. Plantas sin inocular y coinoculación L+C; B) Raíces micorrizadas de *P. greggii* con *L. bicolor*; C) Morfotipo característico de *L. bicolor*, raíces diferenciadas por el hongo ectomicorrízico; D) Corte transversal de raíz secundaria micorrizada; E) Estructuras diagnosticas de una raíz ectomicorrizada: rh) red de Hartig, m) manto, me) micelio externo..... 69

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las actividades humanas tienen efecto en el clima y ambiente generando la pérdida de la biodiversidad, poniendo en peligro la vida animal y vegetal en la tierra (Cavicchioli *et al.*, 2019). Los eventos naturales han producido cambios climáticos durante la historia que han pasado de etapas glaciares hasta eventos cálidos. De esta manera, el efecto invernadero naturalmente beneficia permitiendo la vida en el planeta, pero ahora está siendo afectado por las actividades antrópicas (Barbosa, 2013). El efecto invernadero es generado por un grupo minoritario de gases que forman parte de la atmósfera, estos son los más comunes: dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), ozono (O<sub>3</sub>) y clorofluorocarbonos (CHCIF<sub>2</sub>) y hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>), los tres últimos gases son de origen industrial y los primeros tres pueden ser de origen natural o provienen de actividades humanas, por lo que el incremento de estos gases modifica el clima del planeta (Mendoza y Jiménez, 2017).

El calentamiento provocado por las emisiones antropogénicas desde el periodo preindustrial durará de siglos a milenios y seguirá causando nuevos cambios a largo plazo en el sistema climático (IPCC, 2018). Las manifestaciones en los ecosistemas terrestres son evidentes con la anticipación de las primaveras y el desplazamiento hacia los polos y hacia mayores alturas del ámbito geográfico de la flora y de la fauna; hay migraciones de especies, lo cual está vinculado al reciente calentamiento (Díaz, 2012).

Los regímenes de los disturbios han cambiado profundamente en muchos ecosistemas forestales en años recientes, siendo el clima un impulsor del cambio de perturbaciones, consecuencia de esto se ha documentado la ocurrencia y severidad de las

perturbaciones en grandes partes del mundo, por ejemplo: incendios, brotes de insectos, y sequías. Tales alteraciones de los regímenes de perturbación tienen el potencial de impactar fuertemente la capacidad de los bosques para proporcionar servicios ecosistémicos a la sociedad (Seidl *et al.*, 2017).

Los bosques sustentan una amplia gama de bienes y servicios necesarios para el bienestar humano, como: recursos naturales (comida, agua, madera, bio-energéticos, plantas medicinales, etc.) y purificación del agua potable (Rodríguez *et al.*, 2016). A escala global, los bosques templados (BT) ocupan  $1 \times 10^7$  km<sup>2</sup>, lo cual representa 25 % del área forestal mundial y 8 % de la superficie continental libre de hielo. En México, los bosques templados constituyen 20 % de la cobertura forestal que los hace la clase de bosques más ampliamente distribuidos. De esta proporción, 5% es ocupado por bosques de encinos (BE), 14% por bosques de pino (BP) y pino-encino (BPE) y 1% por otras coníferas. Los BPE están caracterizados por contener una elevada riqueza de especies debido a que son el centro de diversificación de los géneros *Pinus* y *Quercus* a escala mundial. Históricamente, los BP y BE poseen una tasa de deforestación anual promedio mayor a 0.5% y en algunas regiones tienen mayor tasa de deforestación y de cambio de uso de suelo que las selvas; esto ha repercutido en la disminución de su extensión y del número de especies que albergan (Galicia *et al.*, 2008).

Los bosques de coníferas en México son de suma importancia ya que se distribuyen 49 especies del género *Pinus* de las 120 descritas en el mundo (Sandoval-García *et al.*, 2020). Se estima que el valor económico de los bosques de *Pinus* en México para el año 2016 fue de \$7 266 111 524.00 y esto contribuyó al 75.1% de producción maderable anual (Moctezuma y Flores, 2020). La importancia de la utilización del

género *Pinus* radica en su rapidez de crecimiento, características anatómicas, facilidad de maquinado, su química y costos de su madera (De la Paz-Pérez y Davalos-Sotelo, 2016).

*Pinus montezumae* presenta amplia distribución natural en la república mexicana y es una especie de aprovechamiento maderable sobre todo en el Eje Neovolcánico, se utiliza en la construcción, para la obtención de chapa, celulosa, papel, durmientes, postes, muebles, duelas y resina, así como para la reforestación en la recuperación de suelos degradados (Zamora-Campos *et al.*, 2007).

En los bosques los microorganismos del suelo son importantes reguladores de la salud y la función de los ecosistemas, mejorando la productividad de las plantas movilizand o nutrientes del suelo y mediando el carbono a través de su interacción con plantas (afectando la aceleración de la descomposición de la materia orgánica) (Van *et al.*, 2020). Un gramo de suelo puede albergar miles de metros de hifas de hongos, billones de bacterias y miles de especies de bacterias (Fernández *et al.*, 2021). Las raíces de las plantas albergan riqueza de comunidades de hongos y bacterias del suelo circundante y la identificación de estas comunidades seleccionadas por las plantas es importante, ya que influyen en la salud de las plantas como en la promoción del crecimiento (Marupakula *et al.*, 2017).

La mayoría de las especies de plantas vasculares (94%) posee una relación mutualista entre las raíces de las plantas y un hongo, esta simbiosis da forma al funcionamiento de las comunidades vegetales y microbianas (Soudzilovskaia *et al.*, 2015). De acuerdo con la forma de penetración del hongo en la raíz, por las estructuras características

que desarrolla y las especies de hongos y de plantas involucradas, se han agrupado en micorriza con manto fúngico y micorrizas sin manto fúngico, la ectomicorriza se caracteriza por formar esa asociación con los principales grupos de hongos Basidiomycetes y Ascomycetes (Camargo-Ricalde et al., 2012; Domínguez-Núñez *et al.*, 2019). Dentro de la raíz, el hongo ectomicorrízico se ramifica entre las células externas formando una estructura compleja llamada red de Hartig, la cual proporciona una gran superficie de contacto entre el hongo y el huésped, lo que permite una transferencia eficiente de metabolitos. En el exterior de la raíz, se desarrolla una estructura hifal de varias capas llamado manto (Taylor y Alexander, 2005).

Los ecosistemas forestales son, estabilizados principalmente por la simbiosis mutualista entre las raíces y los principales hongos Basidiomycetes y Ascomycetes, formando la simbiosis ectomicorrízica, que mejora la adquisición de nutrientes, la toma de agua y a cambio recibe productos derivados de la fotosíntesis (Wagner *et al.*, 2019). Las asociaciones con hongos ectomicorrízicos pueden beneficiar a los árboles mejorando el crecimiento y la supervivencia (Birch *et al.*, 2021). En adición, los hongos ectomicorrízicos permiten que las plantas toleren varios factores decreméntales ambientales tales como, sequedad, metales pesados, salinidad y altas concentraciones de contaminación (Cho *et al.*, 2021). Además, la simbiosis ectomicorrízica tiene la capacidad de mejorar el crecimiento y modificar la fisiología de las plántulas, por ejemplo, mejorando su capacidad fotosintética (Chahboub *et al.*, 2021). Los hongos ectomicorrízicos pueden alterar la anatomía de las hojas de sus hospedadores, alterando el tamaño, largo y ancho, lo cual permite incrementar las capacidades fotosintéticas de las plantas, además, influyen en el estado del nitrógeno de las hojas y

en las proteínas involucradas en el proceso fotosintético, generando una respuesta al estrés generado por factores climáticos (Szuba *et al.*, 2019).

Los hongos ectomicorrízicos, interactúan con comunidades bacterianas, ellos proveen de elementos minerales que toman directamente de los suelos circundantes y productos fotosintéticos o metabolitos que se obtienen de las plantas hospedantes (Yu *et al.*, 2020). Existe un grupo de bacterias simbióticas denominadas bacterias auxiliadoras de la micorrización (BAM), se caracterizan por interactuar específicamente con los hongos micorrízicos, estimulando la extensión del micelio, aumentando la colonización y el contacto de las raíces del huésped, así como reduciendo los cambios ambientales para lograr las condiciones óptimas para el crecimiento del micelio (Reis *et al.*, 2020, Pineda-Mendoza *et al.*, 2019). Múltiples aspectos del ambiente global influyen en gran medida en el funcionamiento de las plantas micorrizadas y sus asociados fúngicos con posibles implicaciones en los ambientes forestales (Wang *et al.*, 2019). Las plantas pueden responder directamente a los cambios globales a través de la modificación de la fisiología, salud y fenología (Kivlin *et al.*, 2013).

Esta investigación tuvo como objetivo mejorar la calidad fisiológica de crecimiento y nutrimentales de plantas del género *Pinus* a través de la inoculación con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* y coinoculados con bacterias auxiliadoras de la micorrización, en segundo plano se evaluó el efecto de la coinoculación con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria bicolor* y la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp. en *Pinus greggii* bajo condiciones de estrés en tres diferentes temperaturas, (T1=Temperatura baja (27°C); T2=Temperatura media (29°C); T3=Temperatura alta (32°C)).

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### Objetivo General

Evaluar las características fisiológicas, de crecimiento y nutrimentales en plantas de *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* o coinoculadas con el hongo ectomicorrízico comestible y tres cepas de bacterias auxiliaadoras de la micorrización, así como la tolerancia al incremento de temperatura en *Pinus greggii* Engelm. ex Parl., mediante la coinoculación con hongos comestibles ectomicorrízicos y una bacteria auxiliadora de la micorrización, en tres diferentes condiciones de temperatura.

### Objetivos particulares

- Evaluar las variables fisiológicas, contenido de clorofilas y carotenos en plantas de *Pinus montezumae*, inoculadas o coinoculadas con el hongo comestible *L. laccata* y con tres cepas de bacterias auxiliaadoras de la micorrización.
- Evaluar el potencial sinérgico en términos de crecimiento y contenido nutrimental de plantas de *P. montezumae*, a través de la inoculación o coinoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y tres bacterias auxiliaadoras de la micorrización.
- Evaluar si existe termotolerancia en árboles inoculados o coinoculados con hongos comestibles ectomicorrízicos y bacterias, crecidos en tres diferentes temperaturas.

## Hipótesis particulares

- Existe incremento en términos de las variables fisiológicas, crecimiento y contenido nutrimental en la especie de importancia forestal *P. montezumae* inoculada con el hongo comestible ectomicorrízico *L. laccata* y tres cepas de bacterias promotoras de la micorrización.
- Existe un sinergismo en términos de crecimiento, variables fisiológicas y contenido nutrimental en plantas de *Pinus montezumae* coinoculadas con el hongo comestible ectomicorrízico *L. laccata* y la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp.
- La inoculación o coinoculación de plantas de *Pinus greggii* con el hongo comestible ectomicorrízico *L. bicolor* y bacterias auxiliadoras de la micorrización origina termotolerancia.

# **CAPITULO I. EL PAPEL DE LA INOCULACION CON UN HONGO COMESTIBLE ECTOMICORRÍZICO Y BACTERIAS AUXILIADORAS DE LA MICORRIZACIÓN EN EL MEJORAMIENTO FISIOLÓGICO DE PLANTAS DE *Pinus montezumae* Lamb.**

## **1.1 RESUMEN**

Las coníferas establecen simbiosis obligadas con hongos ectomicorrízicos, además, existen otros grupos microbianos especializados como bacterias auxiliaadoras de la micorrización, que interviene en la simbiosis ectomicorrízica aportando diversos beneficios entre la que destaca el mejoramiento de la simbiosis micorrízica a través del incremento del micelio. México es un país con un alto índice de endemismos del género *Pinus*, y algunos se encuentran en peligro de extinción, ya que existe una alta tasa de deforestación en el mundo y en el país, aunado a esto hay un bajo número de supervivencia de las plantas utilizadas en la reforestación ya que carecen de la inoculación con hongos ectomicorrízicos en la etapa de vivero. Además, son escasas las investigaciones sobre especies de pinos mexicanos coinoculados con hongos ectomicorrízicos comestibles y grupos bacterianos. En este trabajo se evaluó el efecto de la coinoculación con un hongo comestible ectomicorrízico y cepas de bacterias auxiliaadoras de la micorrización y promotoras del crecimiento vegetal, en el mejoramiento de variables fisiológicas como, fotosíntesis, clorofilas y contenido de N, P y K en plantas de *Pinus montezumae* Lamb. Se inocularon plantas de *P. montezumae* con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke. Además, se coinoculó con la cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp. y dos cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg et Dobereiner, una con capacidad de solubilizar nitrógeno (FN) y otra con

capacidad de solubilizar fosfato (SF). Esta investigación se realizó en los invernaderos del programa forestal del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo. La coinoculación de hongos ectomicorrízicos incrementó el peso seco hasta 7.8 veces y la tasa fotosintética hasta 29.9 veces que, las plantas sin inocular, además, se registró un sinergismo en el contenido de nitrógeno. Este trabajo demuestra la importancia de la coinoculación de hongos ectomicorrízicos comestibles y bacterias en el mejoramiento de la fisiología, de una especie de importancia forestal mexicana.

**Palabras clave:** bacterias clorofilas fisiología, micorriza, simbiosis.

## 1.2 INTRODUCCIÓN

Los bosques representan una fuente de alimentos, medicinas y combustibles, además intervienen en la mitigación del cambio climático, protegen los suelos, el agua y albergan tres cuartas partes de la biodiversidad terrestre mundial (FAO, 2018). Actualmente los bosques se ven amenazados por la intensa deforestación, se estima que tan solo en el año 2013 se perdieron 2.3 millones de km<sup>2</sup> de bosques a nivel mundial, aunado a esto la deforestación incrementó entre el 10 y el 20% los gases de efecto invernadero, afectando de forma negativa al planeta (Pacheco *et al.*, 2012; Hansen *et al.*, 2013; Monjardín *et al.*, 2017).

México forma parte de los diez países megadiversos, posee una superficie arbolada de 64.8 millones de hectáreas de las cuales el 52% pertenece a bosques templados (López *et al.*, 2017). En México los pinos tienen gran importancia ecológica, económica y social, junto con América Central se localizan alrededor de 46 especies de pinos con diversas variedades y formas. México es un centro secundario de diversidad de *Pinus* al contar con cerca de 42% de las especies y un alto porcentaje de endemismos concentrado en las islas biogeográficas (Gonzales, 2008).

Sin embargo, la deforestación es una problemática de gran relevancia. De 2005 al 2010 se perdieron 775 000 ha de bosques y selvas en el país (FAO, 2010). En México los programas de reforestación utilizan diversas especies de *Pinus*; sin embargo, su establecimiento ha fallado porque en este proceso y durante su crecimiento son dependientes de la ectomicorriza, la cual no se incorpora tradicionalmente en la producción de planta en el país (Pérez-Moreno, 2016; Valdés *et al.*, 2010). Aunado a

esta serie de problemas existe la baja supervivencia de plantas reforestadas, para el caso de México se estima que existe un promedio de 37.8% de supervivencia de las plantas reforestadas, se cree que los principales factores podrían ser la deficiente calidad de la planta (Sáenz y Lindig, 2004).

Los microorganismos del suelo juegan papeles cruciales en los ciclos de nutrientes del bosque, realizando procesos elementales como los ciclos biogeoquímicos del carbono, azufre y nitrógeno (Kennedy *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2020). Además, tiene la capacidad de generar una respuesta reguladora a la temperatura asociada al calentamiento global (Szuba *et al.*, 2020).

Los hongos son uno de los grupos más diversos de organismos en la tierra, éstos son esenciales ya que interactúan con el ambiente biótico y abiótico, regulando los ciclos de carbono y de nutrientes; los macro hongos son cuerpos fructíferos visibles. Ecológicamente los macro hongos pueden ser clasificados en saprobios, parásitos y simbioses como especies micorrízicas (Yu *et al.*, 2020).

Los hongos ectomicorrízicos son los simbioses claves de numerosas plantas leñosas en muchos ecosistemas de todo el mundo (Smith y Read, 2008; Tedersoo, 2017). La simbiosis ectomicorrízica es de gran importancia ecológica que se establece con más de 20 000 especies de hongos y con las raíces de más de 5 000 especies de angiospermas y gimnospermas (Pérez-Moreno *et al.*, 2010; Rinaldi, 2008). El beneficio principal de la simbiosis ectomicorrízica en las plantas es proveer de nutrientes esenciales como nitrógeno (N), fósforo (P) y la protección contra factores de estrés, mientras que la planta provee al hongo de fotoasimilados como fuentes disponibles de

carbono (C) (Smith y Read, 2008). Además de los hongos ectomicorrízicos y sus beneficios en la simbiosis micorrízica, existen algunos grupos bacterianos específicos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal y bacterias auxiliaadoras de la micorrización que aportan beneficios de la asociación ectomicorrízica y a la planta, destacando el mejoramiento en la formación de la ectomicorriza y en la generación de fito-hormonas que estimulan el desarrollo de las plantas (Yu *et al.*, 2020; Pohjanen *et al.*, 2014). Las bacterias auxiliaadoras de la micorrización juegan un rol importante en la micorrización, dado que pueden incrementar la supervivencia, la tasa de germinación de las esporas y estimular el crecimiento de las hifas, dado que antes de llevarse a cabo la simbiosis mejora el reconocimiento de las señales de la raíz hacia el hongo (Chu *et al.*, 2021).

A nivel internacional uno de los criterios de selección de los hongos ectomicorrízicos es su comestibilidad, lo cual los convierte en otro recurso aprovechable de los ambientes forestales; además de existir un enorme potencial de inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles y bacterias auxiliaadoras de crecimiento (Sousa *et al.*, 2015). Por otra parte, el género *Laccaria* ha sido utilizado ampliamente, por ser un hongo cosmopolita. Las especies de *Laccaria* forman ectomicorrizas con un amplio rango de hospederos (*Pinaceae*, *Pinus*, *Larix*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Dipterocarpaceae*, *Dipterocarpus*, *Fagaceae*, *Betula*, *Myrtaceae*, *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Picea*, *Tsuga*, *Abies*, *Fagus*, *Nothofagus*, *Quercus*, *Tiliaceae*, *Tilia*, *Salicaceae* y *Salix*) (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010) (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Esporomas de *Laccaria*, un género de hongos comestibles ectomicorrízicos. Tomado de: (micoex.org).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inoculación de un hongo ectomicorrízico comestible y bacterias auxiliadoras de la micorrización *Cohnella* sp. y *Azospirillum brasilense* en el mejoramiento del crecimiento, fisiología y contenido nutrimental de *Pinus montezumae* Lamb.

### 1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Micorrizas e invernaderos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, estado de México. El germoplasma utilizado de *Pinus montezumae* provino de la comunidad de San Rafael Ixtapaluca, municipio de Tlalmanalco, estado de México. Las semillas fueron esterilizadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 % durante 20 minutos, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril previo a la siembra. Para la preparación del inóculo, se utilizaron esporomas provenientes de bosque de pinos del municipio de Ozumba, estado de México. El inóculo se obtuvo a partir de píleos de *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, los cuales se cortaron de los estípites y se deshidrataron a 35 °C en un deshidratador de frutas Jersa®. Posteriormente, se molieron en un molino eléctrico (Thomas Scientific®, Model 4 Wiley Mill, Nueva Jersey, EUA), para obtener un tamaño de partícula homogéneo se pasó a través de un tamiz de 1mm de apertura. El inóculo a si obtenido se almacenó a una temperatura de 5 °C.

#### 1.3.1 Preparación del sustrato e inoculación

El sustrato utilizado para el experimento consistió en una mezcla de arena, corteza y suelo forestal, en una proporción 2:2:1, el cual se esterilizó en tres ocasiones con vapor de agua a una presión de 1.3 kg·cm<sup>2</sup> a 125 °C durante cinco horas. Las semillas se sembraron en tubetes de plástico negro de 125 cm<sup>3</sup> que contenían el sustrato descrito anteriormente. Cada planta se inoculó a una concentración de entre 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> esporas de *Laccaria laccata*. La concentración de dichas esporas se evaluó con un hematocitómetro, siguiendo la metodología propuesta por (Carrasco et al., 2018). Se

realizaron dos inoculaciones con las esporas del hongo, se pesaron 1.5 g de inóculo y se colocaron en tubos ependorf, los cuales fueron almacenados a 5°C hasta su utilización: la primera inoculación se efectuó depositando el contenido del tubo simultáneamente con la siembra y la segunda inoculación se realizó 90 días después.

### **1.3.2 Cultivo de cepas bacterianas**

Se usó la cepa bacteriana *Cohnella* sp. (C), la cual fue aislada de la raíz de *P. montezumae*, obtenida del cepario del área de Microbiología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, y dos cepas de *Azospirillum brasilense* una con la capacidad de solubilizar fosfatos (SF) y otra con la capacidad de fijar nitrógeno (FN), ambas fueron 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. Las cepas fueron cultivadas en caldo nutritivo Merck®, en movimiento constante a 28 °C hasta alcanzar una concentración de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colonias por mililitro). El cultivo bacteriano se centrifugó a 7000 rpm y se eliminó el sobrenadante, al concentrado bacteriano se le dieron tres lavados con agua destilada estéril para eliminar los restos del medio de cultivo y después se resuspendió en agua destilada estéril para dejarlo a la misma concentración de  $10^8$  UFC/mL. Se aplicaron tres mililitros de la suspensión bacteriana a cada planta en las primeras horas del día y no se regaron en tres días para evitar la pérdida de las bacterias con el riego. El experimento se mantuvo en condiciones de invernadero durante 420 días.

### **1.3.3 Diseño experimental y variables evaluadas**

Se realizó un diseño en bloques al azar con tratamientos: 1) Plantas sin inocular y plantas inoculadas con: 2) *L. laccata* (L); 3) *Cohnella* sp.(C); 4) *A. brasilense* (FN); 5) *A. brasilense* (SF); 6) L+C; 7) L+FN; y 8) L+SF. Cada tratamiento tuvo 21 repeticiones, por lo que en total se tuvieron 126 unidades experimentales, cada una constituida por una planta. Los datos de las variables evaluadas se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico (Statistical Analysis System [SAS Institute Inc.], 2009). Los valores de colonización micorrízica, expresados como porcentajes, se transformaron y se utilizó el logaritmo natural en los análisis de varianza.

#### **1.3.3.1 Diámetro y peso seco**

Se midió el diámetro del tallo con un vernier digital en milímetros (mm), a los 30, 120 y 420 días después de la siembra (dds) para esto se seleccionaron siete plantas al azar por tratamiento. Para la evaluación de biomasa se tomaron siete plantas al azar por tratamiento para determinar peso seco de raíz parte aérea y total, las muestras se deshidrataron durante tres días a una temperatura de 70 °C hasta tener valores constantes, se pesó por separado la parte aérea y la parte radical en gramos (g).

#### **1.3.3.2 Tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>**

La asimilación de CO<sub>2</sub> se evaluó a 240, 300 y 360 días después de la siembra, en tres plantas por tratamiento, las evaluaciones fueron realizadas utilizando el analizador de gases infrarrojo (IRGA) PP-Systems® modelo Ciras-3 y la cámara de asimilación de gases CPY-4 en invernadero (g CO<sub>2</sub>·m<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>).

### 1.3.3.3 Contenido de clorofila

El contenido de clorofila a, b, total y carotenos, se determinó por el método Zhang (1986). Se tomaron 7 plantas por tratamiento, posteriormente se pesaron 0.05 g de acículas por pino, se cortaron en pequeños trozos, los cuales se colocaron en un mortero, se le agregaron 10 mL de acetona, se maceraron y se filtraron con papel filtro Whatman número 42. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de muy baja luminosidad. Finalmente, la solución obtenida se colocó en una celda de cuarzo de 3.5 mL para su análisis en el espectrofotómetro Hewlett Packard® 8453, siguiendo la metodología propuesta por Zhang (1986). Se realizaron lecturas de absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 663 nm, 647 nm y 470 nm y mediante las ecuaciones de Lichtenthaler (1987) se obtuvieron la concentración de clorofilas y carotenos:

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

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

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

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

198

### 1.3.3.4 Análisis nutrimental

Los análisis de nutrimentos se realizaron en cuatro plantas de cada tratamiento; el Nitrógeno (N) se determinó por el método de semimicro-Kjeldahl (Bremner, 1965); el fósforo total (P), según el método de Allen *et al.* (1997); y el Potasio (K), mediante extracción con acetato de amonio por fotometría de llama.

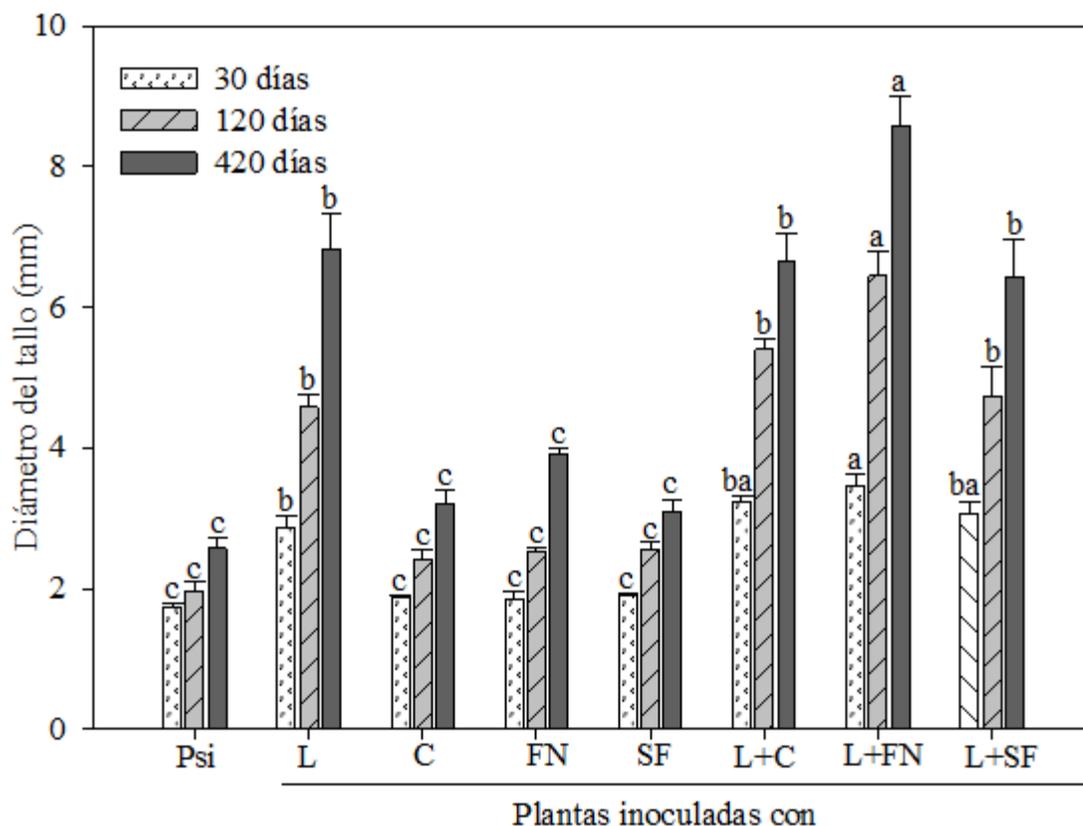
### **1.3.3.5 Porcentaje de colonización**

Se tomaron tres plantas de cada tratamiento para la evaluación del porcentaje de micorrización. Los cepellones se extrajeron de los tubetes y la parte radical se lavó bajo chorro de agua con baja presión y con tamices de diferente diámetro de abertura (1.19, 0.180 y 0.085 mm), para reducir la pérdida de raíces cortas. La identificación de raíces vivas micorrizadas se realizó con un microscopio estereoscópico (Leica®, DM1000, EUA). Se contaron todas las raíces cortas del cepellón y se efectuaron cortes a mano para su análisis micromorfológico. Adicionalmente se realizó toma de fotografías de las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza: manto, red de Hartig y micelio externo siguiendo la técnica propuesta por (Agerer 1994).

## **1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1.4.1 Crecimiento de plantas**

En esta investigación se registró incremento en el diámetro del tallo de plantas de *P. montezumae* coinoculadas con el hongo ectomicorrízico comestibles *Laccaria laccata* y la bacteria *Azospirillum brasilense* (L+FN) en comparación con las plantas sin inocular, estos resultados fueron más evidentes a partir de los 120 días después de la inoculación bacteriana (ddib). En contraste las plantas inoculadas exclusivamente con cualquier de las tres bacterias, C, FN y SF no presentaron diferencias significativas en comparación con las plantas sin inocular, en ninguno de los tres periodos donde se realizaron las evaluaciones (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** El diámetro de plantas *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas con un hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* y bacterias auxiliaadoras de la micorrización. Psi= Plantas sin inocular; L=*Laccaria laccata*; C=*Cohnella* sp.; FN=*Azospirillum brasilense* fijadora de nitrógeno, SF= *Azospirillum brasilense* solubilizadora de fosfato. Medias con la misma letra para cada etapa de tiempo no son significativamente diferentes.

Las plantas establecen interacciones simbióticas con microorganismos que mejoran el crecimiento y condición vital, se benefician de la interacción con hongos y otros microorganismos. Previamente se ha documentado el papel de la coinoculación con hongos ectomicorrízicos y diversos grupos bacterianos que tienen la capacidad de potencializar los beneficios de la simbiosis ectomicorrízica, principalmente en el crecimiento de las plantas inoculadas (Obase, 2019). En esta investigación registramos incrementos en el diámetro del tallo de plantas de *P. montezumae* coinoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *L. laccata* y la bacteria *A. brasilense* (FN).

Previamente, Barragán-Soriano *et al.* (2018) demostraron al coinocular el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* con la bacteria *Cohnella* sp., se incrementó el diámetro en plantas de *Pinus montezumae* Lamb en comparación con plantas sin inocular. en tres diferentes periodos de evaluación 30, 120 y 420 días después de coinocular las bacterias. Así mismo, Xiao-Qin *et al.* (2012) documentaron el efecto de la coinoculación de *Boletus edulis* y dos cepas de bacterias auxiliaadoras de la micorrización *Bacillus cereus* HB12 y HB59 en plantas de *Pinus thunbergii*, mostraron un incremento en el diámetro de las plantas de 1.48 veces más que las plantas sin inocular.

#### **1.4.2 Peso seco de plantas inoculadas o no**

Se registró un incremento significativo (Tukey  $p \leq 0.05$ ) del peso seco de raíz en plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. laccata* y en plantas coinoculadas con cualquiera de las tres bacterias, L+C, L+FN y L+SF en comparación con las plantas sin inocular, los mayores incrementos en la parte radical se presentaron en las plantas coinoculadas con L+FN con un incremento significativo de 7.68 veces más que las plantas sin inocular. Las plantas, inoculadas exclusivamente con las bacterias, no presentaron diferencias significativas en la parte radical (Tukey  $p \leq 0.05$ ) al compararlas con las plantas sin inocular. La parte aérea registró un sinergismo en las plantas coinoculadas con L+FN con biomasa de 7.8 veces más que las plantas sin inocular; por otro lado, las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. laccata* presentaron incrementos al igual que las plantas coinoculadas con L+C y L+FN en comparación con las plantas sin inocular y las plantas inoculadas con las bacterias en la parte aérea.

Los resultados obtenidos para el peso seco total fueron en las plantas coinoculadas con L+FN con valores de hasta 7.7 veces más alto que las plantas sin inocular, las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico presentaron incrementos significativos de peso seco en comparación con las plantas sin inocular, para el caso de las plantas inoculadas exclusivamente con cualquiera de las bacterias no presentaron incrementos significativos al comparar con las plantas sin inocular (Cuadro 1.1).

En el presente estudio se mostró que la coinoculación con hongos comestibles ectomicorrízicos y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, potencializó el aumento en biomasa tanto en parte aérea como de raíz de plantas del género *Pinus*, estos resultados mostraron similitud con investigaciones realizadas previamente por Araujo *et al.* (2018) quienes coinocularon *Pinus pinea* L. con la bacteria *Bacillus subtilis* y el hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* observando un incremento favorable en biomasa seca tanto de tallo y de raíz de hasta 1.4 y 1.6, respectivamente, en comparación con plántulas inoculadas exclusivamente con el hongo ectomicorrízico. Adicionalmente, Horimai *et al.* (2020) observaron que al inocular *Pinus densiflora* con el hongo *Tricholoma matsutake*, incrementó la biomasa seca en parte aérea como en raíz al compararlo con plantas sin inocular. Cabe señalar que en la actualidad existe una tendencia hacia la inoculación con hongos comestibles ectomicorrízicos como el antes mencionado debido que algunas especies de hongos ectomicorrízicos presentan alto valor económico y comestible, como producto forestal no maderable (Vaario *et al.*, 2017).

**Cuadro 1.1.** Materia seca de plantas *Pinus montezume* con distintos tratamientos de inoculación con un hongo comestible ectomicorrízico, una bacteria auxiliadora de la micorrización y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Tratamientos	Peso (g)		
	Raíz	Parte aérea	total
Plantas sin inocular	0.22±0.02b	0.26±0.02c	0.48±0.04c
Plantas inoculadas			
<i>L. laccata</i> (L)	1.51±0.09a	1.6±0.04b	3.11±0.09b
<i>Cohnella</i> sp. (C)	0.38±0.05b	0.34±0.02c	0.72±0.07c
<i>A. brasilense</i> (FN)	0.50±0.06b	0.42±0.04c	0.92±0.10c
<i>A. brasilense</i> (SF)	0.44±0.06b	0.38±0.02c	0.81±0.07c
L+C	1.53±0.12a	1.62±0.01b	3.15±0.12b
L+FN	1.69±0.20a	2.04±0.11a	3.73±0.14a
L+SF	1.48±0.12a	1.71±0.02b	3.19±0.13b

Los datos son medias ± error estándar de la media n=7. Los valores en la misma columna con la misma letra no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 1.4.3 Tasa fotosintética

A partir de 180 ddib se registraron diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) en la tasa fotosintética en los tratamientos L+C y L+FN de 3.83 y 6.83 veces más, respectivamente, que las plantas sin inocular. Las plantas inoculadas exclusivamente con el tratamiento (L) y coinoculadas con cualquiera de las tres bacterias, L+C, L+FN y L+SF registraron diferencias significativas a los 240 días (Tukey  $p \leq 0.05$ ) con valores de hasta 10.4, 8.1, 10.8 y 8.15 veces más altos, respectivamente que las plantas sin inocular, cabe señalar que a los 360 ddib se registró un incremento en el tratamiento

L+FN de hasta 29.93 veces mayor que las plantas sin inocular (Cuadro 1.2); por otro lado, los tratamientos de plantas inoculadas exclusivamente con cualquiera de las bacterias no presentaron diferencias estadísticas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) en comparación con las plantas sin inocular.

**Cuadro 1.2.** Tasa fotosintética de plantas de *Pinus montezumae* inoculados con un hongo ectomicorrízico comestible, una bacteria auxiliadora de la micorrización y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

	Tasa fotosintética (g CO <sub>2</sub> ·m <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup> )			
	180 ddib	240 ddib	300 ddib	360 ddib
Plantas sin inocular	0.24±0.13b	0.20±0.03b	0.17±0.06c	0.16±0.06c
<i>Laccaria laccata</i> (L)	0.57±0.19b	2.09±0.38a	2.28±0.18ba	2.07±0.08b
<i>Cohnella</i> sp. (C)	0.32±0.10b	0.39±0.05b	0.28±0.06c	0.33±0.06c
<i>Azospirillum brasilense</i> (FN)	0.24±0.06b	0.43±0.05b	0.21±0.02c	0.40±0.06c
<i>Azospirillum brasilense</i> (SF)	0.35±0.04b	0.49±0.15b	0.29±0.07c	0.39±0.09c
L+C	0.92±0.18ba	1.63±0.08a	2.13±0.19ba	2.06±0.12b
L+FN	1.64±0.38a	2.16±0.16a	3.66±1.01a	3.83±0.36a
L+SF	0.54±0.18b	1.63±0.10a	1.52±0.17bc	2.32±0.07b

ddib: días después de la inoculación bacteriana. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Error estándar de la media (n=3).

Son escasas las investigaciones sobre el papel que desempeña la coinoculación de hongos ectomicorrízicos y bacterias enfocadas en el mejoramiento de variables fisiológicas de cómo es la tasa fotosintética. Actualmente no existe información completa acerca del papel que desempeña la inoculación con hongos ectomicorrízicos; por ejemplo Xiao-Qin *et al.* (2012) reportaron que al coinocular plantas de *Pinus*

*thunbergii* con el hongo ectomicorrízico *Boletus edulis* y la bacteria *Bacillus cereus* HB12 o HB59 incrementa la actividad fotosintética cuando se inocula solo el hongo o con la bacteria; aunado a esto Shi *et al.* (2017) reportaron que al coinocular tres hongos ectomicorrízicos, *Cenococcum geophilum*, *Laccaria amethystea* y *Pisolithus* sp. en *Pinus thunbergii* se incrementó hasta 3.8, 2.5, y 1.7 la tasa fotosintética que en aquellas plantas que no fueron inoculadas. Wang *et al.* (2021) demostraron que la inoculación con hongos ectomicorrízicos incrementa la tolerancia al estrés por desecación crítica y estimula la fotosíntesis incrementando la producción de azúcares no estructurales (los cuales funcionan como buffer en la tolerancia a la desecación), el hongo ectomicorrízico inoculado fue *Suillus variegatus* en *Pinus tabulaeformis* en dos condiciones de desecación (40 y 20 % de humedad), el hongo incrementó la tasa fotosintética 133 y 100% respectivamente, al compararse con aquellos tratamientos sin inocular. Aunado a esto existe un tiempo en el que se comenzó a observar un incremento en la tasa fotosintética, autores como Zhang *et al.* (2019) observaron que existe un tiempo para que se presenten diferencias en la tasa fotosintética y este lo registraron a partir de los 62 días al inocular *Pinus densiflora* con los hongos ectomicorrízicos *Laccaria japonica*, *Cenococcum geophilum*, *Pisolithus* sp. y *Suillus luteus*.

#### **1.4.4 Contenido de clorofilas y carotenos**

El presente trabajo presentó un incremento significativo (Tukey  $p \leq 0.05$ ) en el contenido de clorofila a, en las plantas inoculadas con *Laccaria laccata* y en las coinoculadas con L+FN, con incrementos de 1.47 y 1.62 veces más, respectivamente, que las plantas sin inocular; las plantas inoculadas exclusivamente con cualquiera de

las tres bacterias (C, FN y SF), no presentaron diferencias significativas al ser comparadas con las plantas sin inocular. Para el caso de la clorofila b, las plantas que presentaron diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) fueron aquellas plantas bajo los tratamientos, L, L+C y L+FN, presentaron incrementos de 1.36, 1.34 y 1.60 veces más respectivamente en comparación con las plantas sin inocular. Las clorofilas totales presentaron diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) en las plantas coinoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. Laccata* y la bacteria *A. brasilense* FN con incrementos de 1.61 veces más que las plantas sin inocular, las plantas inoculadas exclusivamente con cualquiera de las tres bacterias C, FN y SF, no presentaron diferencias al comparar con las plantas sin inocular (Cuadro 1.3).

El contenido de carotenos presentó diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) en las plantas con el tratamiento L+FN con diferencias de 1.42 veces más que las plantas sin inocular. Cuando se inocularon las plantas exclusivamente con cualquiera de las tres bacterias C, FN y SF, no existieron diferencias significativas (Cuadro 3.3).

La coinoculación del hongo ectomicorrízico y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, incrementaron el contenido de pigmentos fotosintéticos como: clorofila a, b, clorofilas totales y carotenos en acículas de *P. montezumae*. Son escasas las investigaciones realizadas sobre el papel de la coinoculación con hongos ectomicorrízicos y bacterias en el incremento del contenido de clorofilas y carotenos. Szuba *et al.* (2019) inocularon plantas de *Populus canescens* con el hongo ectomicorrízico *Paxillus involutus*, y registraron incrementos de clorofila a y un incremento significativo de clorofila b de 1.67 veces más que las plantas sin inocular.

**Cuadro 1.3.** Contenido de clorofila a, b, total y carotenos en plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con un hongo ectomicorrízico comestible, una cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización y dos cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Tratamientos	Clorofila(mg·g <sup>-1</sup> )			Carotenos (µg·g <sup>-1</sup> )
	a	b	Total	
Plantas sin inocular	30.23±1.60c	31.9±1.03c	62.1±2.63c	11.4±0.08c
<i>Laccaria laccata</i> (L)	44.6±1.32ba	43.7±0.20ba	88.3±1.55b	14.3±0.30b
<i>Cohnella</i> sp. (C)	36.6±1.66bc	34.9±0.94c	71.7±2.60c	11.3±0.57c
<i>Azospirillum brasilense</i> (FN)	36.6±2.25bc	38.5±2.41bc	75.1±4.66c	11.8±0.48c
<i>Azospirillum brasilense</i> (SF)	36.2±0.76bc	37.3±0.79bc	73.5±1.55c	11.3±0.42c
L+C	38.5±2.28bc	43.0±0.61ba	81.6±2.89bc	14.1±0.10b
L+FN	49.0±2.48a	51.1±2.63a	100.1±5.10a	16.23±0.45a
L+SF	39.6±1.48b	42.7±0.42b	82.3±2.26bc	13.0±0.39bc

Valores con la misma letra en la misma columna son iguales, según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ± el error estándar de la media (n=7).

Yin *et al.* (2020) mencionan que cuando se coinocula *Pinus sylvestris* var. mongolica con el hongo ectomicorrízico *Suillus luteus* en condiciones de estrés por salinidad, disminuye la concentración de estos pigmentos fotosintéticos en plantas micorrizadas comparado con las plantas sin inocular. Actualmente se tiene conocimiento que los hongos ectomicorrízicos confieren tolerancia al estrés por salinidad y estos a su vez incrementan la concentración de clorofilas; Bay *et al.* (2021) inocularon plantas de *Quercus mongolica* con dos especies de hongos ectomicorrízicos, *Gomphidius viscidus* y *Suillus luteus* bajo condiciones de estrés por NaCl, las plantas incrementaron la

concentración de clorofilas de 1.29 y 1.09 veces más que las plantas sin inocular, principalmente en plantas inoculadas con *G. viscidus*.

#### **1.4.5 Contenido de macronutrientes**

Se registró un incremento en la cantidad de N presente en *P. montezumae* coinoculado con *A. brasilense* (FN), tanto en parte aérea, raíz y total con resultados de 6.26, 9.24 y 7.73 veces más que las plantas sin inocular (Tukey  $p \leq 0.05$ ). Los tratamientos de L, L+C y L+FN presentaron incrementos superiores que las plantas sin inocular (Cuadro 3.4). Se presentó un incremento de P en los tratamientos de L, L+C, L+SF y L+FN siendo este último el que presentó un incremento superior en parte aérea, radical y total de 6.54, 7.18 y 6.82 respectivamente, más que las plantas sin inocular. El contenido de K estuvo presente en los tratamientos L, L+C, L+SF y principalmente en L+FN presentando un incremento en parte aérea, raíz y total de 18.78, 11.0 y 15.8 veces respectivamente más que las planta sin inocular. Para el contenido de Ca las plantas que se encontraban inoculadas con los tratamientos L, L+C, L+SF y L+FN solo o coinoculado con cualquiera de las bacterias L+C, L+SF y L+FN mostraron altos contenidos, en comparación con las plantas sin inocular (Tukey  $p \leq 0.05$ ) (cuadro 1.4). Las plantas inoculadas exclusivamente con alguna de las tres bacterias no presentaron diferencias significativas en el incremento de nutrientes N, P y K, al compararlas con las plantas sin inocular. Cabe resaltar que el tratamiento L+ FN presentó un sinergismo en la cantidad de N en parte aérea y raíz, cuyo valor fue de 6.2 y 9.2 veces mayor que las plantas sin inocular respectivamente (Cuadro 1.4).

En el caso de Ca se registró un sinergismo en el tratamiento L+FN en parte aérea, radical y total de 6.83, 6.58 y 6.64 veces respectivamente más que las plantas sin

inocular, para el caso de Mg los tratamientos que se encontraban inoculados exclusivamente con el hongo comestible *L. laccata* (L) y aquellos coinoculados con el hongo y la bacteria, L+C, L+FN y L+SF mostraron las mejores diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 3.4). La mayoría de los nutrientes están disponibles sólo después de la descomposición de la materia orgánica, ya que se encuentran unidos a formas orgánicas. Este proceso involucra la participación de los hongos ectomicorrízicos y bacterias (Haas *et al.*, 2018). Previamente se ha investigado y demostrado la importancia de la adquisición de N, P y K en plantas ectomicorrizadas (Smith y Read, 2008). En esta investigación se obtuvo incremento de nitrógeno y fósforo en plantas de *P. montezumae* que se inocularon con el hongo *Laccaria laccata* o coinoculado con la cepa bacteriana FN. La inoculación con hongos ectomicorrízicos y bacterias incrementa la absorción de nutrientes principalmente de nitrógeno y fósforo en diversas especies de plantas, esto también fue demostrado por Araújo *et al.* (2018) ya que coinocularon *Quercus suber* L. con dos tipos de bioinoculantes, compuestos por hongos ectomicorrízicos y bacterias promotoras del crecimiento vegetal. El primero estaba constituido por dos hongos ectomicorrízicos, *P. tinctorius* y *Sclerotinia* sp. junto con, cepas de *Bacillus* y *Streptomyces*; el segundo inoculante contenía el hongo ectomicorrízico *Suillus granulatus* y la bacteria *Mesorhizobium* sp, como resultado obtuvieron un incremento en la eficiencia del N de hasta 2.4 veces mayor que el registrado en las plantas control, para el caso del fósforo (P), el tratamiento de *Suillus granulatus* y la bacteria *Mesorhizobium* sp. incrementó en la eficiencia del fósforo hasta 2.5 veces más que las plantas control.

**Cuadro 1.4.** Contenido total de macronutrientes en raíz parte aérea y raíz, N, P, K, Ca y Mg de plantas de *Pinus montezumae* inoculadas o no con un hongo ectomicorrízico comestible, una cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización y dos cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

	N	P	K	Ca	Mg
	mg				
Plantas sin inocular	1.96±0.29c	0.48±0.07c	0.37±0.05c	0.75±0.11c	0.86±0.13b
Aérea	1.4±0.20c	0.37±0.05b	0.23±0.03d	1.16±0.17c	0.97±0.14c
Raíz	3.36±0.48d	0.85±0.12c	0.6±0.09d	1.92±0.28c	1.83±0.26b
total					
<i>L. laccata</i> (L)					
Aérea	9.59±0.05b	2.28±0.11ba	5.17±0.024b	3.73±0.17ba	4.77±0.22a
Raíz	9.43±0.40b	2.53±0.11a	1.88±0.08b	6.26±0.26ba	5.72±0.24ba
total	19.01±0.39b	4.82±0.17ba	7.05±0.27b	9.99±0.35b	10.49±0.37a
<i>Cohnella</i> sp. (C)					
Aérea	1.82±0.08c	0.35±0.02c	0.67±0.03c	1.39±0.06c	1.72±0.08b
Raíz	2.65±0.29c	0.53±0.06b	0.82±0.09c	1.68±0.19c	1.62±0.18c
total	4.48±0.32d	0.88±0.06c	1.49±0.10dc	3.07±0.21c	3.34±0.21b
<i>A. brasilense</i> (FN)					
Aérea	2.08±0.29c	0.56±0.08c	1.48±0.21c	1.47±0.20c	1.89±0.26b
Raíz	2.45±0.29c	0.88±0.10b	0.9±0.11c	2.52±0.30c	2.17±0.26c
total	4.53±0.57d	1.44±0.18c	2.38±0.31c	3.99±0.49c	4.06±0.51b
<i>A. brasilense</i> (SF)					
Aérea	2.14±0.19c	0.57±0.05c	0.90±0.08c	1.26±0.11c	1.54±0.14b
Raíz	2.03±0.37c	0.81±0.15b	0.65±0.12dc	2.16±0.39c	1.87±0.34c
total	4.17±0.56d	1.38±0.20c	1.55±0.20dc	3.42±0.51c	3.41±0.48b
L+C					
Aérea	7.16±0.99b	2.36±0.32ba	4.73±0.25b	4.21±0.58ba	5.66±0.78a
Raíz	2.02±0.14b	2.46±0.17a	1.99±0.15ba	5.35±0.37b	5.26±0.36b
total	9.18±1.11c	4.82±0.48ba	6.72±0.34b	9.56±0.92b	10.92±1.11a
L+FN					
Aérea	12.28±0.92a	3.14±0.29a	6.95±0.65a	5.13±0.48a	5.38±0.50a
Raíz	12.94±0.96a	2.66±0.20a	2.53±0.19a	7.64±0.57a	7.06±0.53a
total	25.22±0.30a	5.8±0.21a	9.48±0.53a	12.76±0.41a	12.44±0.39a
L+SF					
Aérea	8.57±0.50b	2.14±0.13b	3.80±0.22b	3.43±0.20b	4.38±0.26a
Raíz	8.95±0.88b	2.07±0.20a	1.99±0.20ba	5.48±0.57ba	5.69±0.56ba
total	17.52±1.17b	4.2±0.28b	5.79±0.34b	9.27±0.68b	10.08±0.70a

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=4).

Resultados similares se obtuvieron en esta investigación, en la que se registró incrementos de nitrógeno en plantas inoculadas con el hongo comestible *L. laccata* y la bacteria *A. brasilense* (FN). Pohjanen *et al.* (2014), observaron que al inocular plantas de *Pinus sylvestris* L. con dos hongos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* (Pt), *Suillus variegatus* y la bacteria *Methylobacterium extorquens* DSM13060 (MB) incrementó la concentración de P, cuando se inocula exclusivamente (Pt) o cuando se coinoculó Pt+MB, tanto en parte aérea como en raíz, en comparación con el control. Además, Rodríguez-Gutiérrez *et al.* (2019) demostraron que al inocular *Laccaria bicolor* y la bacteria *Pseudomonas fluorescens* en *P. montezumae* se incrementa la concentración de K total, con resultados de 51.4 mg en comparación de las plantas no inoculadas que presentaron un total inferior de 32.1 mg. De igual manera en investigaciones previas como las realizadas por Domínguez-Núñez *et al.* (2015) observaron que al inocular hongos ectomicorrízicos comestibles como las Trufas negras *Tuber melanosporum* Vitt. co-inoculada con *Pseudomonas fluorescens* CECT 844 en *Pinus nigra*, potencializa la concentración de fósforo en plantas coinoculadas con el hongo y la bacteria en comparación con aquellas que no se inocularon; resultados similares se obtuvieron para K.

En esta investigación se reporta la transferencia e incremento de Mg y Ca tanto en parte aérea, radical y total, al coinocular *L. laccata* con la bacteria promotora de la micorrización *A. brasilense*. Ahonen *et al.* (2003), mencionan que al inocular los hongos ectomicorrízicos de *Laccaria bicolor* y *Hebeloma cf. longicaudum* (Pers.: Fr.) en *Pinus sylvestris* se incrementa la presencia de Mg sólo en plantas inoculadas con *Laccaria bicolor*. Aunado a esto Arteaga-León *et al.* (2018), mencionan que al inocular

*Helvella cf. lacunosa* y *Hebeloma mesophaeum* en *Pinus ayacahuite* se incrementa el contenido de Ca en la parte aérea, esta fue de 3.30, 2.64 y 2.37 veces en plantas inoculadas con *H. lacunosa*, pero no existieron diferencias en comparación con aquellas plantas sin inocular.

#### **1.4.6 Porcentaje de raíces micorrizadas**

Al inocular el hongo ectomicorrízico o coinoculado con cualquiera de las tres bacterias C, FN y SF en *P. montezumae* se registró un mayor porcentaje de raíces finas vivas micorrizadas, principalmente en los tratamientos L+C, L+FN y L+SF en comparación con las plantas sin inocular; con porcentajes de 54 %, 60 %, 59 % y 53 % respectivamente, que en aquellas plantas que se inocularon exclusivamente con cualquiera de las tres bacterias y las plantas sin inocular (Cuadro 1.5). Las plantas inoculadas con cualquiera de las tres bacterias C, FN, SF y plantas sin inocular presentaron los mayores porcentajes de las raíces cortas no micorrizadas vivas y muertas. Cabe señalar que las plantas vivas micorrizadas presentaron morfotipos característicos de *Laccaria laccata* y estructuras diagnósticas, como red de Hartig, manto y micelio externo (Cuadro 1.5) (Figura 1.3 B, C, D y E).

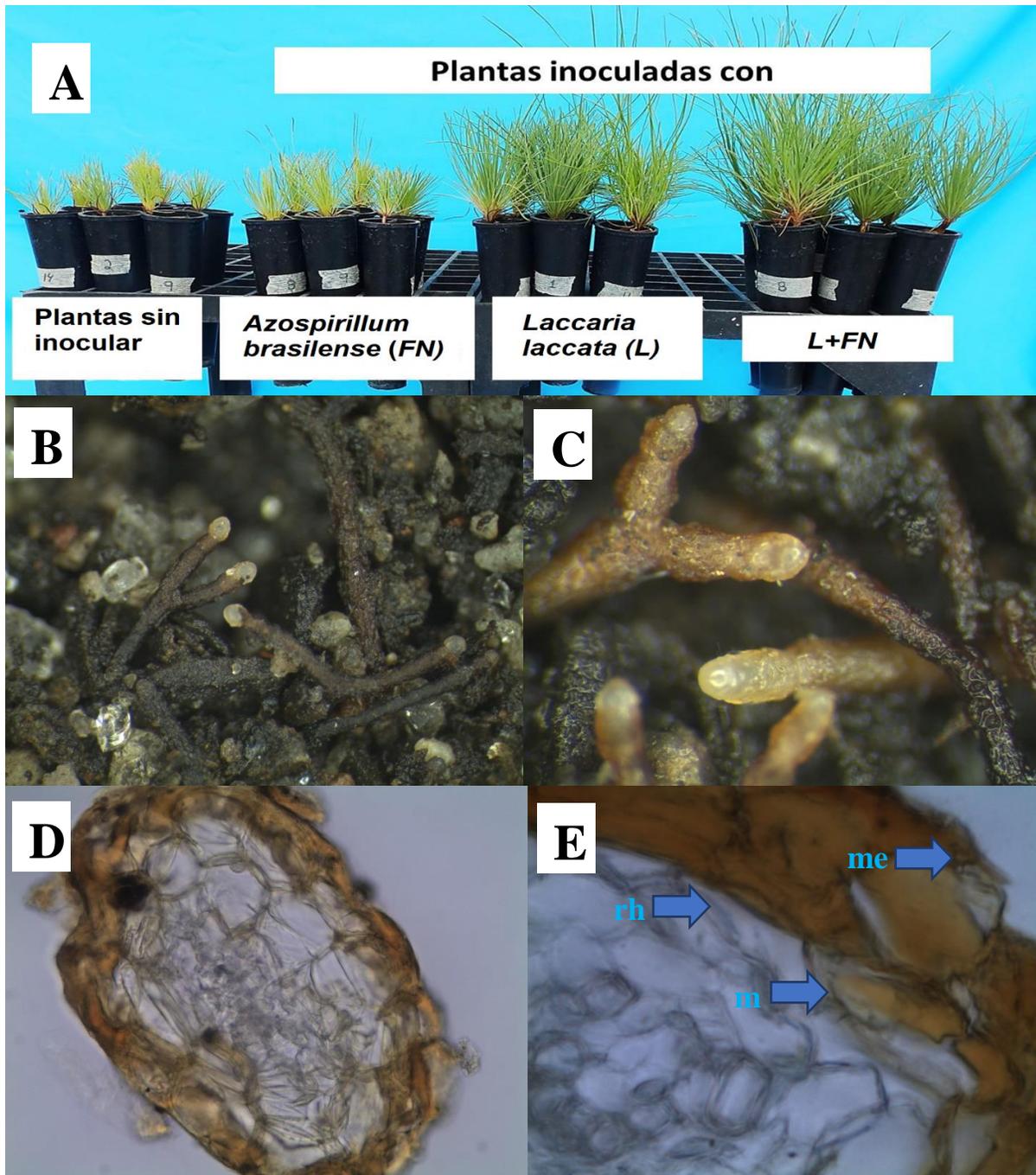
La presencia de colonización ectomicorrízica en las raíces de las plantas a consecuencia de la interacción con hongos ectomicorrízicos y bacterias es un componente clave de los efectos benéficos sobre el desarrollo de las plantas (Noirot-Gros *et al.*, 2018). El porcentaje de micorrización fue alto cuando se inoculó con *L. laccata* y también cuando se coinoculó con el hongo ectomicorrízico y las tres bacterias.

**Cuadro 1.5.** Porcentaje de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas, muertas y vivas de plantas de *Pinus montezumae* y un hongo ectomicorrízico comestible, una cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización y dos cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Tratamientos	Raíces vivas (%)		Raíces muertas (%)	
	Micorrizadas	No micorrizadas	Micorrizadas	No micorrizadas
Plantas sin inocular	2.75±0.25b	84.60±0.77a	1.88±0.27b	10.74±0.96ba
<i>L. laccata</i>	54.54±2.49a	12.08±2.59c	24.33±3.57a	7.52±2.41ba
<i>Cohnella</i> sp. (C)	12.89±7.85b	66.8±6.27ba	1.82±0.59b	18.35±8.79ba
<i>A. brasilense</i> (FN)	12.95±5.37b	71.2±5.95ba	4.57±0.98b	11.27±1.77ba
<i>A. brasilense</i> (SF)	5.27±1.29b	58.58±4.31b	5.19±1.37b	27.47±5.19a
L+C	60.79±0.48a	5.87±0.88c	26.51±1.96a	5.94±1.11ba
L+FN	59.1±3.23a	12.4±21.89c	20.5±4.34a	8.06±1.72b
L+SF	53.38±7.30a	11.68±2.87c	23.66±2.72a	11.12±1.94ba

Valores con la misma letra en la misma columna son iguales, según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).  $\pm$  el error estándar de la media (n=3).

La presencia de raíces micorrizadas es indicio de la presencia de la simbiosis micorrízica. Shinde *et al.* (2019) registraron que la coinoculación con la bacteria *Pseudomonas fluorescens* y *Laccaria bicolor* en *Populus tremuloides* incrementó la cantidad de raíces finas micorrizadas hasta 1.7 veces más que las plantas sin inocular. Araujo *et al.* (2018), observaron incrementos en el porcentaje de micorrización en *Pinus pinea* L. en los tratamientos inoculados con *Pisolithus tinctorius* y cuando se encontraban coinoculados *P. tinctorius* con *Bacillus subtilis* existieron diferencias significativas de hasta 1.45 y 1.37 mayores que las plantas sin inocular respectivamente.



**Figura 1.3.** Imágenes generales del experimento. A) Efecto de la coinoculación de *Pinus montezumae* con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* (L) y la bacteria *A. brasilense* (FN) después de un año. Plantas sin inocular y coinoculación con L+FN; B) Raíces micorrizadas de *P. montezumae* con *L. laccata*; C) Morfotipo característico de *L. laccata*, raíces diferenciadas por el hongo ectomicorrízico; D) Corte transversal de raíz secundaria micorrizada; E) Estructuras diagnósticas de una raíz ectomicorrizada: rh) Red de Hartig, m) manto y me) micelio externo.

## 1.5 CONCLUSIONES

El presente trabajo demostró que la coinoculación con el hongo ectomicorrízico comestible *L. laccata* con dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal *A. brasilense* solubilizadora de nitrógeno (FN), *A. brasilense* solubilizadora de fosfato (SF) y la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp. en *Pinus montezumae* mejoraron el crecimiento y estado fisiológico como, tasa fotosintética, clorofila a, b y carotenos e incremento del contenido de N, P y K. El tratamiento L+FN presentó un sinergismo en el contenido de N, tanto en parte área, raíz y total; igual en las variables fisiológicas como tasa fotosintética donde mostro resultados de hasta 29.93 superiores a las plantas sin inocular. El efecto se atribuye al porcentaje de micorrización que va del 53 al 60 % y a la coinoculación con la bacteria *A. brasilense* (FN), por lo que proponemos que la coinoculación con hongos comestibles ectomicorrízicos y bacterias auxiliadoras de la micorrización *A. brasilense* (FN), como una alternativa viable en la producción de plantas de vivero y mejoramiento fisiológico de *P. montezumae*, el cual es una de las especies más utilizadas para la reforestación en México.

## CAPITULO II. EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON UN HONGO COMESTIBLE ECTOMICORRÍZICO Y UNA BACTERIA AUXILIADORA DE LA MICORRIZACIÓN EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS POR AUMENTO DE TEMPERATURA

### 2.1 RESUMEN

Los hongos ectomicorrízicos establecen interacciones simbióticas con las raíces de los pinos y grupos de bacterias específicos. Estos microorganismos tienen la capacidad incrementar la adquisición de nutrientes y de modificar la fisiología de las plantas a través del incremento de la fotosíntesis, clorofilas. Además, ayudan a las plantas a tolerar diversos tipos de estrés. Actualmente el calentamiento global está propiciando la pérdida de la biodiversidad, en el planeta y principalmente los bosques de *Pinus* de México y del mundo, debido al posible incremento de temperatura en el planeta de hasta 2 °C según lo predicho por diversos modelos, por lo que al coinocular un hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria bicolor* y una bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohenlla* sp., se incrementó la tolerancia al estrés por calor. Los resultados obtenidos para las plantas inoculadas y coinoculadas con HEM *L. bicolor* y la bacteria auxiliadora de la micorrización (C) bajo tres distintas temperaturas (T1=Temperatura baja (27°C); T2=Temperatura media (29°C); T3= Temperatura alta (32°C)). mostraron un incremento de la materia seca al coinocular el HEM comestible *L. bicolor* y la bacteria (L+C) al comparar con las plantas sin inocular de hasta 5.2, 5.0 y 8.8, veces más respectivamente para cada una de las tres condiciones de temperatura; para el caso de la tasa fotosintética, se registraron incrementos en las plantas inoculadas exclusivamente con el HEM *L. bicolor* y en aquellas coinoculadas con la bacteria (C), registramos un incremento en plantas coinoculadas con L+C que

estuvieron bajo la condición de temperatura alta en comparación con las plantas sin inocular que estuvieron bajo las tres diferentes temperaturas, de hasta 7.7, 6.3 y 5.7 veces más respectivamente. Con esta investigación demostramos la importancia de la inoculación con hongos ectomicorrízicos en el mejoramiento de las características fisiológicas de crecimiento y nutrimentales de plantas de *Pinus greggii* bajo estrés por aumento de temperatura.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos de la rizosfera pueden ser benéficos, nocivos o neutros para el crecimiento y salud de las plantas (García-Lemos *et al.*, 2019). Solo un gramo de suelo puede albergar cientos de metros de micelio de hongos, billones de bacterias y miles de especies, además existe un conocimiento de las acerca de los microorganismos del suelo y su funcionamiento en los ecosistemas (Fernández *et al.*, 2021).

Las funciones de los ecosistemas boscosos están determinadas por, la descomposición de la materia orgánica, la adquisición de nutrientes y la protección contra las enfermedades de las plantas, las cuales están determinadas por microorganismos del suelo, principalmente los hongos del suelo, (Likulanga *et al.*, 2021).

El 90% las especies de plantas superiores establecen una simbiosis denominada micorriza (Gorka *et al.*, 2019; Read *et al.*, 2000). La ectomicorriza es una simbiosis que se establece entre las raíces de las plantas y hongos específicos del suelo, las plantas hospederas proporcionan carbono a los socios fúngicos a través de fotoasimilados (exudados radicales). A cambio, reciben una variedad de servicios como: mejoramiento de la absorción de agua y nutrientes, protección contra patógenos del suelo y metales

pesados (Pickles *et al.*, 2012). Existe un gran número de bacterias que interactúan con los hongos ectomicorrízicos, estas son denominadas bacterias auxiliadoras de la micorrización. Algunas han sido aisladas dentro del manto de diversos hongos ectomicorrízicos (Poole *et al.*, 2001) y se caracterizan por presentar diversos beneficios para la simbiosis ectomicorriza-planta como son: producción de hormonas, vitaminas, ácidos orgánicos y además propician el desarrollo del micelio (Krupa y Kozdroj, 2007).

Además de los microorganismos existen otros factores externos que afectan el desarrollo de las plantas, el clima influencia, el crecimiento de las especies, siendo un factor determinante, en la distribución y la función de los ecosistemas, por lo que es probable que en el futuro los cambios del clima generen la pérdida de la biodiversidad, provocando cambios en la distribución del hábitat, propiciando un mayor riesgo en la extinción de plantas en peligro (Guo *et al.*, 2017).

El clima del planeta tierra es determinado por complejas interacciones entre el sol, el océano, la atmosfera, la criósfera, la superficie de la tierra y la biósfera, siendo el sol la principal fuerza impulsora del tiempo y el clima, la energía del sol se distribuye desigual en la superficie de la tierra debido a la inclinación del eje de rotación de la tierra (Ebi *et al.*, 2003; Querejeta *et al.*, 2021).

El cambio climático está ejerciendo presión en, plantas y animales debido a un posible incremento en la temperatura global (0.2 °C) y en la concentración de CO<sub>2</sub>, lo que generara cambios en la atmosfera y regímenes de precipitación, lo que generara efectos en la estructura y función de los árboles del planeta (Pandey, 2021; Querejeta *et al.*, 2021). La Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático

(CMNUCC), en su artículo uno, define el cambio climático como “cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera global y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante períodos de tiempo comparables” (IPCC, 2013).

Desde la revolución industrial, las emisiones de gases de efecto invernadero han aumentado significativamente debido las actividades humanas como producción de energía, manufacturación industrial y a las emisiones de gases por el uso de vehículos (Wang y Gu, 2021). Esto está generando profundos efectos en los procesos ecológicos y de biodiversidad, por lo tanto, en el funcionamiento de los ecosistemas y el bienestar humano (Zellweger et al., 2020).

El calentamiento del clima impacta la productividad y función de los ecosistemas boscosos del mundo con temperatura limitada, mientras esto ha causado una mortalidad generalizada, relacionada con la sequía en la mayoría de los biomas. La sequía está generando una importante inestabilidad temporal sobre los bosques durante las últimas décadas (Camarero *et al.*, 2021). Aunado a esto las constantes altas temperaturas pueden causar cambios morfoanatómicos en las plantas, afectando su desarrollo y crecimiento. Los efectos negativos del estrés por aumento de temperatura promueven la desnaturalización de las proteínas, incrementando los fluidos de la membrana lipídica lo que ocasiona la pérdida de la integridad de la membrana (Nogales *et al.*, 2020).

La mortalidad de los árboles del bosque está relacionada con el calentamiento global del clima, esto ocurre ampliamente, afectando los procesos involucrados en la

producción de semillas de los árboles directa e indirectamente por perturbaciones ambientales, incluyendo cambios en la temperatura (Moler *et al.*, 2021). Se espera que los climas extremos (sequías, olas de calor y tormentas de lluvia) se vuelvan más comunes en el futuro, aunque la alta productividad y biodiversidad primaria de los bosques puede ayudar a mitigar el cambio del clima y los climas extremos (Zhou *et al.*, 2021).

México es el segundo centro de diversificación del género *Pinus* con 49 especies de las 120 registradas a nivel mundial entre las cuales el 55 % son endémicas. Actualmente las especies nativas de *Pinus* han ganado mucho interés y gradualmente se han incorporado a los programas de reforestación, por estar mejor adaptadas a las condiciones nativas y muchas de ellas están en peligro de extinción (López-Gutiérrez *et al.*, (2018).

*Pinus greggii* es una especie endémica de México y es uno de los árboles de mayor valor económico para las poblaciones humanas que habitan en zonas aledañas. Se aprovecha para la obtención de madera para la industria del aserrío y localmente para la obtención de postes para cercas, leña y combustible (Figura 2.1) (Ramírez-Herrera *et al.*, 2005).



**Figura 2.1.** Estructuras características de *Pinus greggii* como conos y acículas. Tomado de (Arboleslacalma).

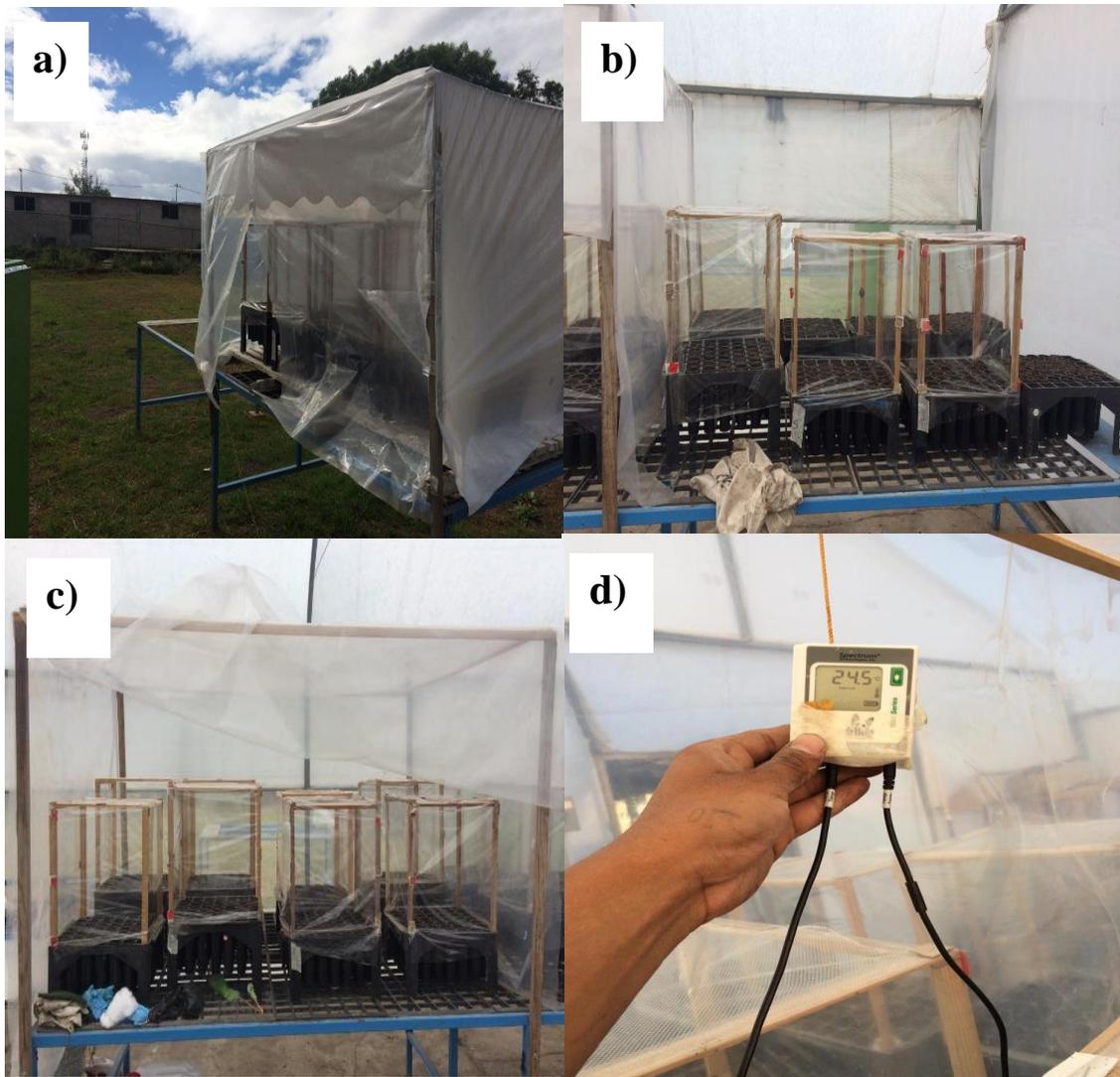
El calentamiento global puede alterar las comunidades y estructuras de varios organismos, estos pueden dar lugar a efectos de retroalimentación positivos o negativos sobre el crecimiento de las plantas (Kitagami y Matzuda, 2020). El trabajo tuvo como objetivo principal evaluar el efecto de la inoculación con un hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria bicolor* y una bacteria auxiliadora *Cohnella* sp. en plantas de *Pinus greggii* Englem. bajo condiciones de estrés por temperatura.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1 Diseño de módulos de temperatura

La investigación se realizó en el Laboratorio de Micorrizas e invernaderos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. Se elaboraron tres diferentes módulos con la finalidad de alcanzar diferentes temperaturas: temperatura ambiente, temperatura media y temperatura alta. El Módulo de temperatura ambiente, se fabricó sobre una cama forestal, en cada extremo se colocaron postes de madera delgada, con una altura de un metro cada uno, se cubrieron de madera a madera con hule transparente con la finalidad de generar tres paredes externas y un techado, este módulo se mantuvo a la intemperie, permitiendo que estuvieran solo en contacto de la temperatura ambiente (Figura 2.2, a)). El Módulo de temperatura media sólo constó de una cama forestal, la cual estaba dentro de un invernadero con cubierta de hule (Figura 2.2, b)). El módulo de temperatura alta se instaló en el interior de un invernadero cubierto por hule, se realizó sobre una cama forestal, se le colocaron en cada extremo de la cama forestal unos postes, con la finalidad de crear un módulo cubierto en su totalidad de hule con paso de aire, el cual incremento la temperatura (Figura 2.2 c)).

Para evaluar la temperatura generada en cada módulo se colocaron dataloggers marca Watch Dog® con sensor de temperatura, durante 365 días, con evaluaciones cada dos horas. La temperatura presentada es el promedio diario de los 365 días.



**Figura 2.2.** Módulos de las diferentes temperaturas. a) Modulo de temperatura ambiente; b) Modulo temperatura media; c) Modulo temperatura alta; d) Dataloggers utilizado en los módulos.

### 2.3.2 Material vegetal e inóculo

Las semillas de *Pinus greggii* Englem provenían de la zona limítrofe el estado de Morelos y el estado de México. Las semillas se esterilizaron con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30 % durante 20 minutos, posteriormente se enjuagó tres veces con agua destilada estéril previo a la siembra. Para la preparación del inóculo, se utilizaron esporomas del hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria bicolor* colectados en

bosque de Pino-Encino del municipio de Ozumba Estado de México de la siguiente manera: se cortaron los estípites, se deshidrataron a 35 °C durante 48 horas en un deshidratador de frutas Jersa®. Posteriormente, se molieron en un molino eléctrico y para obtener un tamaño de partícula homogéneo se pasó a través de un tamiz de 1mm de apertura. El inóculo así obtenido se almaceno a una temperatura de 5 °C.

### **2.3.3 Establecimiento del experimento**

La siembra del material vegetativo se efectuó de forma directa y se realizó a una profundidad de dos centímetros para *Pinus greggii*. Se utilizaron contenedores forestales tipo tubete de plástico negro de 13.0 cm<sup>3</sup>. El sustrato utilizado fue una mezcla de arena de río, corteza de pino y suelo forestal en una proporción de 2:2:1; este se esterilizó con vapor de agua a una presión de 1.3 kg·cm<sup>2</sup> y una temperatura de 125 °C durante 5 horas, esto se realizó en dos ocasiones. La inoculación se realizó con el inóculo fúngico deshidratado, con 1.5 g por planta; la inoculación se realizó en dos ocasiones, la primera 15 días antes de la siembra y la segunda 90 días después de la primera inoculación. Cada planta se inoculó con una concentración de 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> esporas de *Laccaria bicolor*.

### **2.3.4 Cultivo bacteriano**

La cepa bacteriana *Cohnella sp.* (C) fue obtenida del cepario del área de Microbiología del Colegio Postgraduados, Campus Montecillo La cepa fue cultivada en caldo nutritivo Merck®, en movimiento constante a 28 °C hasta alcanzar una concentración de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. El cultivo bacteriano se centrifugó a 7000 rpm y se eliminó el sobrenadante, al concentrado bacteriano se le dieron tres lavados con agua destilada estéril para

eliminar los restos del medio de cultivo y después se resuspendió en agua destilada estéril para dejarlo a la misma concentración de  $10^8$  UFC/mL. Se aplicaron tres mililitros de la suspensión bacteriana a cada planta en las primeras horas del día y no se regaron en tres días para evitar la pérdida de las bacterias con el riego.

### **2.3.5 Diseño experimental y variables evaluadas**

Se utilizó un diseño de bloques al azar que consta de cuatro tratamientos: i) plantas sin inocular (PSI) y plantas inoculadas con; ii) *Laccaria bicolor* (L); iii) *Cohnella* sp. (C); iv) coinoculación (L+C). Cada tratamiento constó de 24 réplicas, por lo que en total se tuvieron 96 unidades experimentales, cada una constituida por una planta. Los datos de las variables evaluadas se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey  $p \leq 0.05$ ), con base en un modelo factorial 3x4 Tukey con el paquete estadístico Statistical Analysis System [SAS Institute Inc.], 2009.

#### **2.3.5.1 Variables diamétricas**

Se midió el diámetro del tallo con un vernier digital a los 180 y 360 días después de la siembra (dds), para ello se seleccionaron 20 plantas al azar por tratamiento. En el caso de la altura se midió en tres periodos 60, 180 y 360 días (dds) y se tomaron 20 plantas al azar por tratamiento. Para la evaluación de biomasa se tomaron ocho plantas al azar por tratamiento para determinar peso seco de raíz, parte aérea y total; las muestras se deshidrataron durante tres días a una temperatura de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta tener valores constantes, se pesó por separado la parte aérea y la parte radical.

### 2.3.5.2 Tasa fotosintética

La asimilación de CO<sub>2</sub> se evaluó en siete plantas al azar por tratamiento, las evaluaciones fueron realizadas utilizando el analizador de CO<sub>2</sub> y temperatura (TELAIRE TEL-7001) en invernadero.

### 2.3.5.3 Contenido de clorofila

El contenido de clorofila a, b, total y carotenos, se determinó por el método de Zhang (1986). Se tomaron 7 plantas por tratamiento, posteriormente se pesaron 0.05 g de acículas por pino, se cortaron en pequeños trozos, los cuales se colocaron en un mortero, se le agregaron 10 mL de acetona, se maceraron y se filtraron con papel filtro Whatman número 42. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de muy baja luminosidad. Finalmente, la solución obtenida se colocó en una celda de cuarzo de 3.5 mL para su análisis en el espectrofotómetro Hewlett Packard® 8453, siguiendo la metodología propuesta por Zhang (1986). Se realizaron lecturas de absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 663 nm, 647 nm y 470 nm y mediante las ecuaciones de Lichtenthaler (1987) se obtuvieron la concentración de clorofilas y carotenos:

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

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

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

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

#### **2.3.5.4 Colonización ectomicorrízica**

Para evaluar la colonización ectomicorrízica, se tomaron al azar tres plantas inoculadas con *Laccaria laccata* y tres plantas sin inocular. Posteriormente, se separó la parte aérea de los cepellones con la parte radical. El cepellón se lavó para obtener la raíz. El conteo de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas muertas se realizó con la ayuda de un estereoscopio Leica EZ4. El porcentaje de micorrización se obtuvo calculando la proporción de raíces cortas micorrizadas, con relación al número total de raíces cortas de cada planta. Los valores de colonización micorrízica, expresados como porcentajes, se transformaron y se utilizó el logaritmo natural en los análisis de varianza.

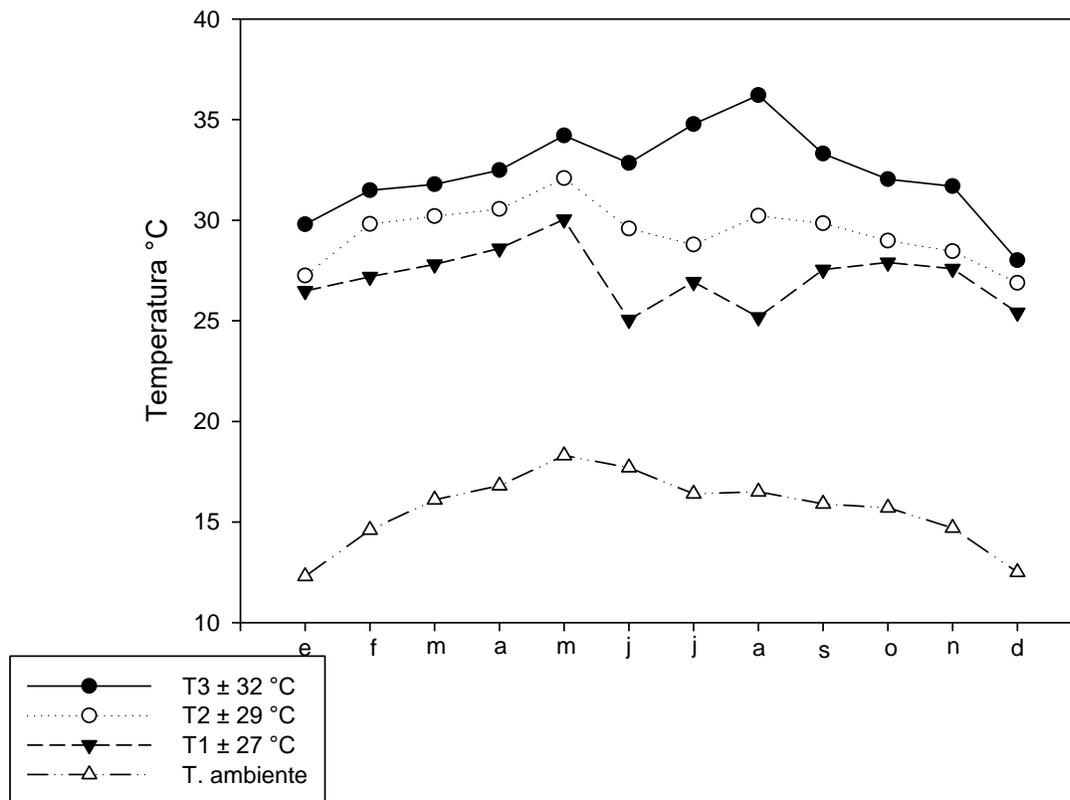
### **2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se registraron variaciones en la temperatura dentro de cada uno de los módulos que varían según el mes en el que se evaluaron, de acuerdo con la estacionalidad anual. En el módulo de alta temperatura se registró una temperatura promedio anual de 32°C (T3), en el módulo de temperatura media se registró una temperatura promedio anual de 29°C (T2) y en el módulo de temperatura ambiente, se registró un promedio anual de 27°C (T1) (Figura 2.1).

Los organismos en la naturaleza están sujetos a estrés por calor debido a las fluctuaciones de temperaturas diarias y estacionales, la temperatura afecta el crecimiento, la reproducción y la distribución de los organismos (Ferreira *et al.*, 2005). Los modelos del cambio climático predicen grandes aumentos de la temperatura y déficit de presión de vapor atmosférico, como consecuencia del calentamiento global

antropogénico que irá acompañado de reducciones en la cantidad y frecuencia de las precipitaciones (Querejeta *et al.*, 2021).

En el caso de la temperatura registrada se presentaron diferentes temperaturas que van desde los 27°C a los de 32°C dependiendo del módulo, simulando los modelos de temperatura que marcan aumentos en la temperatura del planeta, estos aumentos son mencionados por el Panel Intergubernamental para el Cambio Climático, por sus siglas en inglés (IPCC) menciona, que el calentamiento global antropógeno estimado aumenta actualmente a 0.2 °C (rango probable entre 0.1 °C y 03 °C) por decenio como consecuencia de las emisiones anteriores y actuales; con un nivel de confianza alto, estos incrementos se simularon en esta investigación en un lapso de 365 días.



**Figura 2.3.** Temperaturas registradas en un periodo de 365 días, son el promedio anual de temperaturas, dentro de cada uno de los módulos; T1, 27°C; T2, 29°C y T3, 32°C. Las letras representan cada mes del año; e=enero; f=febrero; m=marzo; a=abril; m=mayo; j=junio; j=julio; a=agosto; s=septiembre; o=octubre; n=noviembre; d=diciembre.

#### 2.4.1. Peso seco de plantas de *P. greggii*

Se registró un incremento significativo del peso seco de parte aérea de plantas de *P. greggii* coinoculadas con la bacteria *Cohnella* sp. y el hongo ectomicorrízico comestible *L. bicolor* bajo tres diferentes de temperaturas, con valores de hasta 5.22, 5.0 y 8.84, veces más respectivamente que las plantas sin inocular. Las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria no presentaron diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) entre las diferentes temperaturas. Con respecto al peso seco de la parte radical

se registró un incremento en las plantas coinoculadas con L+C en las condiciones de temperatura T1 y T3 al ser comparado con las plantas sin inocular. Las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria que estuvieron bajo las tres condiciones de temperatura no presentaron diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) al ser comparadas con las plantas sin inocular. Se presentó un aumento significativo de la materia seca total en las plantas coinoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. bicolor* y la bacteria *Cohnella* sp. en las tres diferentes temperaturas T1, T2 y T3 con valores de 5.48, 3.64 y 5.97 veces más respectivamente que las plantas sin inocular, para las plantas que se encontraban inoculadas exclusivamente con la bacteria *Cohnella* sp. no presentaron diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) entre las diferentes condiciones de temperatura ni al comparar con las plantas sin inocular de T1, T2 y T3 (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1.** Materia seca de plantas de *Pinus greggii* con distintos tratamientos de inoculación con un hongo comestible ectomicorrízico, una cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Tratamientos	Peso (g)		
	Parte aérea	Raíz	Total
Plantas sin inocular			
T1	0.22±0.02ef	0.32±0.03d	0.54±0.04f
T2	0.23±0.01ef	0.27±0.02d	0.50±0.02f
T3	0.13±0.01f	0.32±0.02d	0.44±0.03f
Pi con <i>Cohnella</i> (C)			
T1	0.23±0.01ef	0.28±0.01dc	0.5±0.01f
T2	0.17±0.02ef	0.32±0.02d	0.5±0.03f
T3	0.15±0.01ef	0.29±0.03d	0.43±0.03f
Pi con <i>L. bicolor</i> (L)			
T1	0.57±0.03ed	0.72±0.06dc	1.28±0.09de
T2	0.66±0.09ef	0.66±0.03dc	1.32±0.10bc
T3	1.02±0.10bac	1.06±0.01bc	2.08±0.20bc
Pi con L+C			
T1	1.44±0.20a	1.50±0.18a	2.96±0.36a
T2	0.78±0.06bdc	1.04±0.16bc	1.82±0.21ba
T3	1.15±0.18ba	1.48±0.18ba	2.63±0.29ba

La inoculación bacteriana se realizó 90 días después de la siembra de *P. greggii*, las plantas estuvieron bajo tres diferentes condiciones de temperatura T1, 27 °C, T2, 29°C y T3, 32°C. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey (0.05). ± Error estándar de la media (n=8).

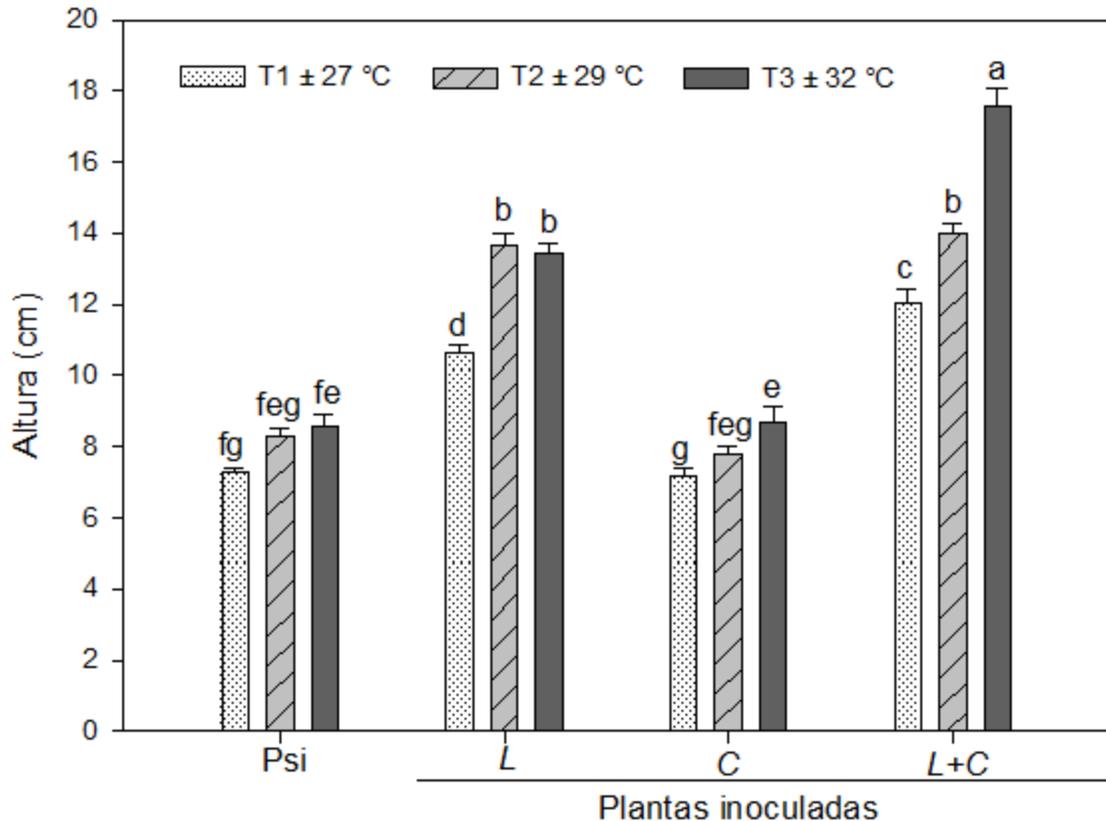
Esta investigación es una de las primeras en México en evaluar el efecto de la inoculación de plantas de *Pinus* con un hongo ectomicorrízico y una bacteria auxiliadora de la micorrización bajo tres diferentes temperaturas, en este trabajo las plantas estuvieron expuestas bajo un periodo de tiempo a temperaturas de 32 °C. Atribuimos incremento de biomasa en las plantas de *Pinus greggii* al efecto de la inoculación con el hongo ectomicorrízico *L. bicolor* y la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp. El calentamiento global es un factor que impacta significativamente las especies residentes de los bosques lo que está generando la

perdida y desplazamiento de las especies debido al incremento de las temperaturas (Castaño et al., 2017). En investigaciones previas se ha demostrado que la inoculación con un hongo ectomicorrízico y una bacteria incrementan la biomasa seca en especies del género *Pinus*, bajo condiciones de temperatura ambiente. Autores como, Koele et al. (2009) demostraron que la coinoculación de *Pinus sylvestris* con el hongo ectomicorrízico *L. bicolor* y dos bacterias *Burkholderia glathei* y *Collimonas* sp. incrementó la biomasa seca en parte radical, comparado con plantas sin inocular. Mucha et al. (2018), registraron que al incrementar la temperatura de 1.7 a 3.4 °C afectó la composición de las especies de hongos ectomicorrízicos que interactúan con plantas de *Picea glauca*, *Pinus banksiana*, *Abies balsamifera*, *Betula papyrifera* y *Populus tremuloides*, *Acer sacharum*, *A. rubrum*, *P. strobus*, *Quercus macrocarpa*, y *Q. rubra*, así mismo observaron que estos incrementos de temperatura también propiciaron la presencia de hongos ectomicorrízicos como, *Wilcoxina* sp. y *Laccaria* sp., por lo que la presencia de los hongos ectomicorrízicos resulta crucial para la supervivencia de las plantas. Franco et al. (2014) reportaron que la supervivencia de plantas depende de la presencia de los hongos ectomicorrízicos. Castaño et al., (2017) mencionan que los hongos ectomicorrízicos *Lactarius* del grupo *deliciosus* y principalmente *Lactarius vinosus* Bataille incrementan su biomasa a altas temperaturas y bajo alta humedad. Rainer et al. (2015) observaron que al inocular *Pinus cembra* con los hongos ectomicorrízicos *Suillus placidus*, *S. plorans* y *S. sibircus* en un suelo con temperatura alta, las plantas inoculadas, incrementan la biomasa seca en parte radical en comparación con plantas sin inocular, lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación. Los hongos ectomicorrízicos tiene la capacidad de

ayudar a las plantas a tolerar diferentes tipos de estrés al como el generado por el aumento de temperatura. Yin *et al.* (2021) inocularon plantas de *Pinus sylvestris* var. mongolica con el hongo ectomicorrízico *Suillus luteus* bajo condiciones de estrés por salinidad y estas incrementaron su biomasa hasta 18%, 13% y 7% más que las plantas sin inocular. Existen otros tipos de interacciones micorrízicas que tienen la capacidad de incrementar la biomasa de sus hospedantes en condiciones de estrés por altas temperaturas, por ejemplo, Cabral *et al.* (2016) registraron que al inocular plantas de *Triticum aestivum* L. con hongos micorrizicos arbusculares como, *Rhizophagus irregularis*, *Funneliformis mosseae*, *F. geosporum*, *Claroideoglossum claroideum*, en condiciones de temperatura de 35°C generó un incremento de la biomasa en las plantas inoculadas en comparación de las plantas sin inocular.

#### **2.4.2 Altura de plantas de *P. greggii***

Se observó un incremento significativo en la altura en aquellas plantas que estaban coinoculadas con el hongo ectomicorrízico y la bacteria auxiliadora de la micorrización, en las plantas que se encontraban bajo la condición de temperatura de T3, en comparación con cualquiera de las plantas sin inocular que se encontraban bajo las otras condiciones de temperatura y las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria. Las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. bicolor* presentaron un incremento de la altura en aquellas plantas que se encontraban bajo las temperaturas T2 y T3. Por otro lado, las plantas que se encontraban sin inocular y en aquellas que estaban inoculadas exclusivamente con la bacteria no presentaron diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) en ninguna de las tres diferentes temperaturas (Figura 2.2).



**Figura 2.4.** Altura de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria bicolor* y una bacteria auxiliadora de la micorrización. Psi= Plantas sin inocular; L=*Laccaria bicolor*; C=*Cohnella* sp., barras con la misma letra son iguales según la prueba de Tukey (0.05). ± Error estándar de la media.

El estímulo en el crecimiento de plantas es atribuible a la inoculación con hongos comestibles ectomicorrízicos, esto ha sido reportado previamente para el género *Pinus*. Casique *et al*, (2019) demostraron que las plantas de *Pinus greggii* incrementan la altura cuando se encuentran inoculadas con *Lactarius Deliciosus*, *Russula xerampelina* y *Suillus caeruleus*, estas diferencias estadísticas se observaron al comparar con las plantas control. Previamente se ha registrado el papel que desempeña la inoculación con hongos ectomicorrízicos en plantas de *Pinus* y cómo influye en su desarrollo; López-Gutiérrez *et al*, (2018) inocularon plantas con *Pinus pringlei* una especie nativa de México con los hongos ectomicorrízicos *Hebeloma alpinum*, *Laccaria*

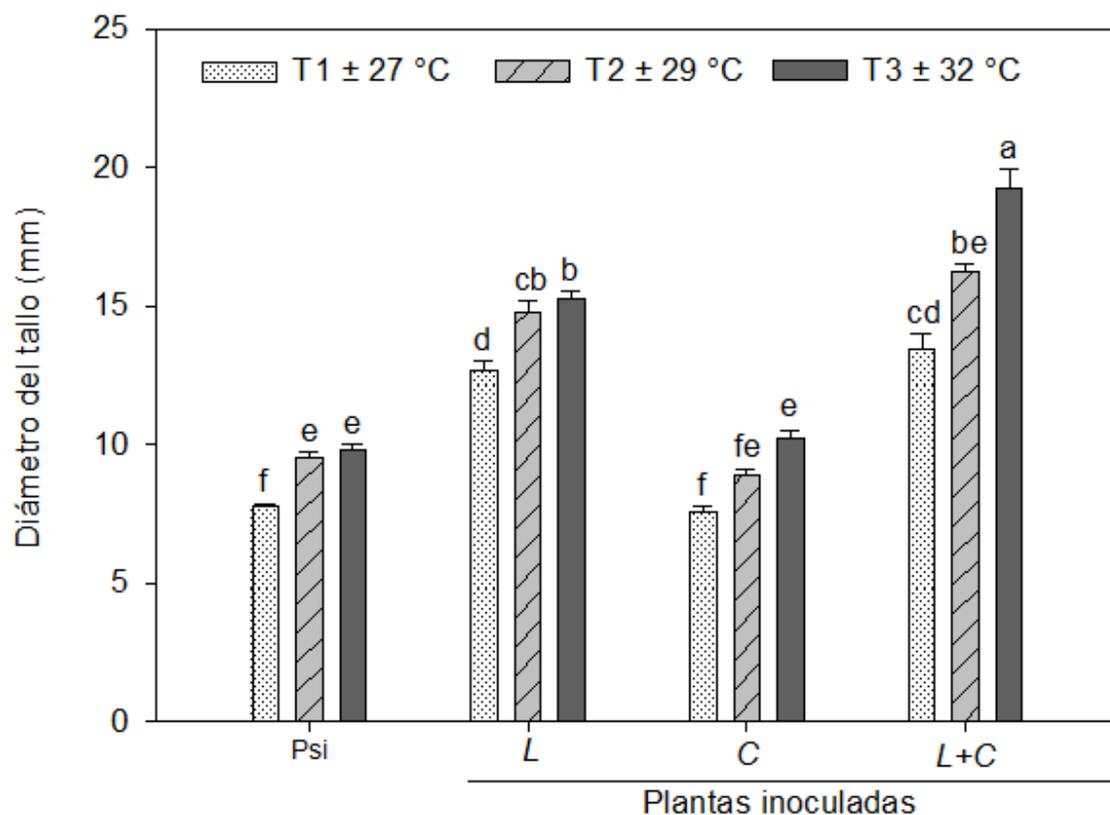
*trichodermophora*, *Thelephora terrestris*, y registraron incrementos en la altura de hasta dos veces más que las plantas no inoculadas. Wang *et al.* (2021) registraron un incremento en la altura al inocular plantas de *Pinus tabulaeformis* con el hongo ectomicorrízico *Suillus variegatus* bajo estrés hídrico. Estas diferencias se notaron en comparación con aquellas plantas bajo un estrés hídrico severo, aunado a esto la coinoculación con hongos ectomicorrízicos y bacterias incrementa también la altura en plantas. Esto también lo demuestra Heredia-Acuña *et al.* (2019) quienes coinocularon *Pinus pseudostrobus* Lindl. con el hongo ectomicorrízico *Suillus* sp. y las bacterias *Rhodococcus qingshengii*, *R. erythropolis*, *Pseudomonas* spp., *P. gessardii*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Cohnella* sp. y se registró un incremento en la altura, principalmente al coinocular con la bacteria *Cupriavidus basilensis* hasta 68.9%, más que las plantas sin inocular.

Aunado al estrés por temperatura al que fueron sometidas las plantas de esta investigación, existe el estrés generado por la sequía. Ambos tipos de estrés están relacionados con el calentamiento global. Li *et al.* (2021) observaron que al inocular *Pinus massoniana* Lamb. con el hongo ectomicorrízico *Suillus placidus* bajo condiciones de sequía, (70%–80% de humedad bajo capacidad de campo, 60%–70% de la capacidad de campo y 50%–60% de la capacidad de campo) observaron un incremento en la altura de las plantas en todos los tratamientos de sequía al comparar con las plantas sin inocular. Actualmente existe poco conocimiento de la inoculación con hongos ectomicorrízicos y bacterias en el crecimiento de plantas de *Pinus*. Barragán-Soriano *et al.* (2018), inocularon plantas de *Pinus montezumae* con el hongo

ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* y la bacteria *Azospirillum brasilense* y registraron incrementos en la altura en comparación con las plantas sin inocular.

#### **2.4.3 Diámetro de plantas de *P. greggii***

Los datos del diámetro del tallo se muestran en la Figura 2.3, el mayor incremento en el diámetro del tallo se presentó en las plantas coinoculadas con el hongo ectomicorrízico y la bacteria (L+C) que estuvieron bajo la temperatura T3 (32 °C) en comparación con las plantas sin inocular (Psi) que estuvieron bajo las tres diferentes temperaturas, las plantas que se encontraban inoculadas exclusivamente con la bacteria auxiliadora de la micorrización no presentaron incrementos significativos en comparación con las plantas sin inocular, las plantas inoculadas exclusivamente con el hongo comestible ectomicorrízico (L) presentaron un incremento solo en las plantas que se encontraban bajo la temperatura T2 y T3. Las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria *Cohnella* sp. en cualquiera de las tres temperaturas, no presentaron diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) en comparación con las plantas sin inocular (Figura 4.3).



**Figura 2.5.** Diámetro de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con un hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria bicolor* y una bacteria auxiliadora de la micorrización. Psi= Plantas sin inocular; L=*Laccaria bicolor*, C=*Cohnella* sp. Barras con la misma letra son iguales según la prueba de Tukey (0.05). ± Error estándar de la media.

Los hongos ectomicorrízicos son considerados necesarios para sustentar la vida de los bosques (Walker *et al.*, 2013). La inoculación con el hongo ectomicorrízico tuvo efectos en el crecimiento del diámetro de plantas de *Pinus greggii*, bajo tres diferentes temperaturas, (T1, 27 °C; T2, 29°C y T3, 32°C); en algunas investigaciones se ha estudiado el papel que desempeña la inoculación con hongos ectomicorrízicos en *Pinus* para tolerar diversos tipos de estrés, Yin *et al.* (2018) observaron que al inocular *Pinus sylvestris* var. mongólica bajo condiciones de estrés hídrico, bien regado 75-80%, y estrés de 35-40% de riego, registraron incrementos en el diámetro de las plantas, bajo la condición de bien regado y estrés bajo de riego, más que aquellas

plantas sin inocular en ambas condiciones de riego. En investigaciones recientes sobre la inoculación del género *Pinus* inoculado con hongos ectomicorrízicos y bacterias se ha registrado que estos ayudan a incrementar el crecimiento de plantas. Barragán-Soriano *et al.* (2018) registraron incremento del diámetro en plantas de *Pinus montezumae* con el hongo ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* y la bacteria *Azospirillum brasilense* en comparación con las plantas sin inocular.

#### **2.4.4 Tasa fotosintética**

Se registraron diferencias significativas en la tasa fotosintética de plantas de *P. greggii* inoculadas con el hongo comestible ectomicorrízico *L. bicolor* y en aquellas coinoculadas con la bacteria *Cohnella* sp. que estuvieron bajo las tres diferentes temperaturas, las principales diferencias se presentaron en aquellas plantas coinoculadas L+C que estuvieron bajo la condición de temperatura T3, (32°C) en comparación con las plantas sin inocular que estuvieron bajo las tres diferentes temperaturas, de hasta 7.7, 6.3 y 5.7 veces más respectivamente; cabe señalar que las plantas inoculadas con el hongo *L. bicolor* también presentaron diferencias significativas en comparación con las plantas sin inocular, pero no presentaron diferencias entre las diferentes temperaturas al igual que las plantas coinoculadas L+C. Las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria en cualquiera de las tres condiciones de temperatura no presentaron diferencias entre las diferentes temperaturas ni al comparar con las plantas sin inocular (Cuadro 2.2)

**Cuadro 2.2.** Tasa fotosintética en plantas de *Pinus greggii* bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico y una bacteria auxiliadora de la micorrización.

Tratamientos	Tasa fotosintética μmol/m <sup>2</sup> /seg
Plantas sin inocular	
T1	0.56±0.07c
T2	0.68±0.10c
T3	0.76±0.08c
Pi con <i>Cohnella</i> sp. (C)	
T1	0.63±0.07c
T2	0.75±0.03c
T3	1.23±0.16c
Pi con <i>L. bicolor</i> (L)	
T1	3.33±0.28ba
T2	2.44±0.20b
T3	2.62±0.18b
Pi con L+C	
T1	3.35±0.26ba
T2	3.21±0.42ba
T3	4.34±0.18a

La inoculación bacteriana se realizó 90 días después de la siembra de *P. greggii*, las plantas estuvieron bajo tres diferentes condiciones de temperatura T1, 27 °C; T2, 29°C y T3, 32°C. Pi=Plantas inoculadas. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey (0.05). ± Error estándar de la media (n=7).

La tasa fotosintética se incrementó en aquellas plantas inoculadas con el hongo comestible ectomicorrízico *L. bicolor* y en aquellas coinoculadas con el hongo y la bacteria auxiliadora de la micorrización en las tres condiciones de temperatura T1, T2 y T3; en investigaciones previas se han registrado incrementos en la fotosíntesis a temperatura ambiente al inocular hongos ectomicorrízicos en plantas de *Pinus*. Esto fue registrado el Wang *et al.*, (2021), quienes inocularon *Suillus variegatus* en plantas de *Pinus tabulaeformis* bajo condiciones de estrés por sequía (T1 sin sequía: 80% de la capacidad de campo, T2 sequía moderada: 40% de la capacidad de campo, y T3

sequía severa: 20% de la capacidad de campo), ellos registraron un incremento de hasta 133 y 100% de la tasa fotosintética para los tratamientos T2 y T3 respectivamente en comparación con las plantas sin inocular. Como se sabe, las altas temperaturas generadas por el calentamiento global están causando estrés, el cual está influenciando cambios en las características fisiológicas y químicas en las plantas (Reva *et al.*, 2021). Previamente se han registrado cambios en la tasa fotosintética bajo diversas condiciones de temperaturas, al inocular microorganismos diferentes a los hongos ectomicorrízicos como las micorrizas arbusculares en especies diferentes de a los *Pinus*. Yan *et al.* (2021), registraron un incremento en la tasa fotosintética en plantas inoculadas con el hongo micorrízico arbuscular *Funneliformis mosseae* en *Lactuca sativa* L. cv. *Shuangzi* (Lechuga) observaron que, al producir lechugas bajo una temperatura de 35 °C, se presentó un incremento de la tasa fotosintética de 7% más que las plantas sin inocular, generalmente ellos mencionan que las lechugas crecen a temperatura ambiente. Existen investigaciones sobre el papel que desempeñan diferentes tipos de micorrizas como las endomicorrizas inoculadas con especies diferentes a los pinos y el papel que desempeña esta simbiosis en la tolerancia al estrés por calor. Zhu *et al.* (2011) inocularon plantas de *Zea mays* con *Glomus etunicatum* bajo tres diferentes temperaturas 25, 35 y 40°C, observando un incremento de 24.68% – 50.48% veces más que las plantas sin inocular. Estos resultados son similares a los obtenidos en esta investigación, que sugiere que los microorganismos como hongos ectomicorrízicos son fundamentales para tolerar los cambios en el clima ocasionados por el calentamiento global, los resultados que obtuvieron los diferentes investigadores son similares a los que obtuvimos al someter

plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. bicolor* y la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp. bajo estrés por diferentes temperaturas.

#### **2.4.5 Contenido de clorofilas a, b, totales y carotenos**

Existieron diferencias significativas de clorofila a en las plantas inoculadas exclusivamente con el hongo ectomicorrízico *L. bicolor* que estuvieron bajo la temperatura T3, al comparar con las plantas sin inocular que se encontraban bajo las tres diferentes temperaturas. Las plantas coinoculadas con el hongo y la bacteria presentaron incrementos significativos bajo las condiciones de temperatura T2 y T3 al comparar con las plantas sin inocular. Las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria no presentaron diferencias significativas en ninguna de las tres condiciones al comparar con plantas sin inocular. En cuanto a la Clorofila b, las plantas inoculadas con el hongo comestible ectomicorrízico *L. bicolor* que estuvieron bajo la condición de temperatura T3 presentaron un incremento significativo de 2.1, 1.8 y 1.8 veces más respectivamente, que las plantas sin inocular de las tres diferentes temperaturas T1, T2 y T3. Las plantas coinoculadas L+C, que estuvieron bajo la temperatura T3 presentaron un incremento de clorofila b, al compararse con las plantas sin inocular y las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria bajo las tres diferentes temperaturas. Por otro lado, las plantas inoculadas con las bacterias que estuvieron bajo las tres diferentes temperaturas no presentaron diferencias significativas al comparar con las plantas sin inocular. Las clorofilas totales presentaron un incremento en las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. bicolor*, que se encontraban a una temperatura de T3, 32 °C, en comparación con las plantas sin inocular. Los resultados del contenido de carotenoides, presentaron diferencias significativas con las

plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. bicolor* que estaban bajo la temperatura T3 en comparación con las plantas sin inocular que estaban bajo las tres temperaturas. Aunado a esto las plantas coinoculadas de las temperaturas T2 y T3 también presentaron incrementos en la cantidad de carotenos al compararlas con las plantas sin inocular; por otro lado las plantas inoculadas exclusivamente con las bacterias no presentaron diferencias significativas al compararlas con las plantas sin inocular de las tres diferentes temperaturas (Cuadro 2.3)

El incremento de clorofilas se presentó en aquellas plantas que estuvieron inoculadas exclusivamente con el hongo ectomicorrízico o coinoculado con la bacteria *Cohnella* sp., en plantas que estuvieron bajo las condiciones de temperatura T2 y T3, lo que sugiere que el hongo ectomicorrízico tiene efecto positivo sobre la concentración de clorofilas. Previamente, el efecto de la inoculación ha sido reportado por autores como Wang *et al.* (2021) quienes registraron un incremento en la concentración de clorofilas al inocular *Suillus variegatus* en *Pinus tabuliformis* en comparación con plantas sin inocular, esto lo registraron en tres diferentes temporadas del año: primavera verano y otoño, principalmente. Este incremento de la concentración de clorofila se observó más en verano en comparación con plantas sin inocular, también la inoculación con el hongo ectomicorrízico incrementó la concentración de clorofila a esto ha sido demostrado por Szuba *et al.* (2019) quienes al inocular *Populus canescens* con el hongo *Paxillus involutus* registraron un incremento de clorofila a y clorofila b de 1.26 veces más que las plantas sin inocular; de igual forma registraron incrementos en la clorofila b de hasta 1.67 veces más que las plantas sin inocular, este efecto es

adjudicado al efecto de la inoculación de un hongo ectomicorrízico, el cual modifica la fisiología de las hojas de plantas inoculadas.

**Cuadro 2.3.** Contenido de clorofilas y carotenos en plantas de *Pinus greggii* bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y una bacteria auxiliadora de la micorrización bajo tres condiciones de temperatura

Tratamientos	Clorofilas mg/L			Carotenos
	a	b	Total	
Plantas sin inocular				
T1	3.69±0.15d	1.53±0.03d	5.48±0.12d	1.59±0.08d
T2	4.25±0.25dc	1.82±0.09dc	6.64±0.29dc	1.90±0.09dc
T3	4.39±0.31dc	1.81±0.09dc	6.22±0.42dc	1.84±0.08dc
Pi con <i>Cohnella</i> (C)				
T1	3.54±0.33d	1.52±0.05d	5.08±0.37d	1.52±0.09d
T2	3.79±0.19d	1.59±0.03d	5.38±0.21d	1.54±0.05d
T3	4.62±0.30dc	2.21±0.13bdc	6.62±0.38dc	1.85±0.07dc
Pi con <i>L. bicolor</i> (L)				
T1	5.54±0.81bdc	2.44±0.20bdac	8.10±1.00bdac	2.09±0.23bdac
T2	5.51±0.73bdc	2.06±0.07bdc	7.57±0.81dc	2.01±0.13bdc
T3	8.25±0.84a	3.30±0.29a	11.47±1.24a	2.72±0.21a
Pi con L+C				
T1	5.36±0.54bdc	2.06±0.11bdc	7.42±0.66dc	1.99±0.16bdc
T2	6.54±0.28bac	2.70±0.09bac	9.31±0.40bac	2.29±0.04bac
T3	8.07±1.03ba	3.00±0.31ba	11.06±1.42ba	2.57±0.25ba

La inoculación bacteriana se realizó 90 días después de la siembra de *P. greggii*, las plantas estuvieron bajo tres diferentes condiciones de temperatura T1, 27 °C; T2 29°C y T3, 32°C. Pi=plantas inoculadas. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey (0.05). ± Error estándar de la media (n=6).

La inoculación con hongos ectmicorrízicos incrementa la concentración de clorofilas aun cuando las plantas se encuentran bajo estrés, lo que sugiere que la ectomicorriza confiere resistencia a algunos tipos de estrés a través del incremento de clorofilas. Yin *et al.* (2020) demostraron que la inoculación de *Pinus sylvestris* var. *mongolica* con el

hongo ectomicorrízico *Suillus luteus* incrementó la concentración de clorofilas en comparación con plantas sin inocular bajo condiciones de estrés por salinidad. Se sabe que los hongos ectomicorrízicos confieren resistencia al estrés, en esta investigación se sometieron plantas de *Pinus greggii* inoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. bicolor* bajo diversas temperaturas, lo cual presentó incrementos en la concentración de clorofilas; actualmente es poca la información que existe sobre el incremento de clorofilas en plantas inoculadas con hongos ectomicorrízicos bajo estrés de temperatura. Existe conocimiento acerca de la capacidad de hongos ectomicorrízicos para modificar la anatomía de las hojas de sus hospedantes, alterando el tamaño, largo y ancho, lo cual permite incrementar las capacidades fotosintéticas de las plantas. Existe evidencia de que la micorriza y la simbiosis con otros microorganismos confiere tolerancia al aumento de temperatura, incrementando la concentración de clorofilas. Esto fue demostrado por Yan *et al.* (2021) que inocularon el hongo micorrízico arbuscular *Funneliformis mosseae* en *Lactuca sativa* L. cv. Shuangzi bajo temperaturas de 35°C y registraron un incremento de 5.3% en clorofilas y de 4.3% en carotenos, lo que demuestra que los hongos ectomicorrízicos estimulan la generación de clorofilas y carotenos en la planta, estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación, lo que nos sugiere que la inoculación de las micorrizas tiene la capacidad de incrementar las clorofilas aún bajo estrés de temperatura.

#### **2.4.6 Porcentaje de raíces micorrizadas**

Los valores altos en el porcentaje de raíces vivas micorrizadas se presentaron en aquellas plantas que estaban inoculadas exclusivamente con el hongo ectomicorrízico, con 93.95% en aquellas plantas que estuvieron bajo la condición de temperatura T2.

Estos resultados fueron similares en los tratamientos de las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico, en aquellas coinoculadas con el hongo *L. bicolor* y la bacteria en las tres diferentes temperaturas T1, T2 y T3 presentando resultados superiores de hasta 90.15% en comparación con las plantas sin inocular las cuales presentaron valores de, 6.01, 3.17 y 5.83 % de raíces micorrizadas vivas, en las tres diferentes temperaturas T1, T2 y T3 respectivamente.

**Cuadro 2.4.** Colonización micorrízica de plantas de *Pinus greggii* bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y una cepa de bacteria auxiliadora de la micorrización, bajo tres condiciones diferentes de temperatura.

Tratamientos	vivas (%)		muertas (%)
	micorrizadas	no micorrizadas	no micorrizadas
<b>Plantas sin inocular</b>			
T1	6.01±1.65c	76.5±2.65a	17.16±1.34ba
T2	3.17±0.53c	80.17±1.71a	16.09±1.70bc
T3	5.83±1.43c	19.69±1.53a	19.69±1.53a
<b>Plantas inoculadas con;</b>			
<i>Cohnella</i> sp. (C)			
T1	3.78±0.74c	70.86±0.32a	19.6±0.74a
T2	5.20±0.64c	70.03±7.78a	25±6.53a
T3	7.74±1.45c	76.4±1.50a	19.08±1.05a
<i>L.bicolor</i> (L)			
T1	86.10±0.95b	4.45±0.72b	4.54±1.16d
T2	93.95±2.68a	3.08±1.44b	2.63±0.95d
T3	90.40±1.81ba	5.54±0.93b	7.08±0.48bdc
<b>Pi con L+C</b>			
T1	87.17±0.93ba	5.1±1.32b	5.28±1.33dc
T2	91.76±1.01ba	3.94±0.53b	3.71±0.73d
T3	87.82±2.93ba	5.46±0.43b	6.02±0.60dc

La inoculación bacteriana se realizó 90 días después de la siembra de *P. greggii*. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey (0.05). ± Error estándar de la media (n=3).

Las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de raíces vivas micorrizadas en ninguna de las tres diferentes condiciones de temperatura en las que se desarrollaron en comparación con las plantas sin inocular. Las plantas que presentaron los valores más altos y diferencias significativas en el porcentaje de raíces vivas no micorrizadas, fueron las plantas sin inocular en comparación con las inoculadas con el hongo ectomicorrízico y aquellas coinoculadas con el hongo y la bacteria (L+C), en las tres diferentes condiciones de temperatura. Aunado a esto las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria *Cohnella* sp. presentaron altos porcentajes de raíces vivas no micorrizadas en las tres diferentes condiciones de temperatura (Cuadro 2.4). Se realizaron cortes transversales de raíces micorrizadas, donde observamos las estructuras diagnosticas de la micorrización, red de Hartig, micelio externo y manto fúngico (Figura 2.4, C y E).

Este estudio es uno de los primeros en evaluar el desarrollo de plantas de *Pinus greggii* inoculadas y coinoculadas con un hongo ectomicorrízico y una bacteria auxiliar de la micorrización bajo tres diferentes temperaturas, los resultados registraron un incremento en el porcentaje de raíces vivas micorrizadas, al igual que las raíces muertas micorrizadas, en las tres diferentes temperaturas en comparación con aquellas plantas sin inocular; en trabajos previos se ha registrado el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de colonización y cómo la temperatura influye en el desarrollo de las plantas. Leonardi *et al.* (2017) inocularon *Quercus robur* con cepas del hongo ectomicorrízico *Tuber borchii thioresoxin* y observaron que la temperatura tiene efecto sobre el porcentaje de micorrización donde el grado de colonización aumentó de un 8 a 9% en los primeros dos meses a una temperatura de 22°C y

cuando se incrementó la temperatura a 34 °C, disminuyó de 8 a 10% la micorrización; por otra parte Li *et al.* (2015) mencionan que el calentamiento global no induce efectos significativos en la colonización ectomicorrízica, pero en algunos casos puede causar disminución de 16.1% y 70.2%.

#### **2.4.7 Contenido de Nitrógeno**

Se registró un incremento significativo de nitrógeno presente en la parte aérea, en aquellas plantas inoculadas con HEM y coinoculadas con la bacteria (C) que estuvieron bajo la condición de temperatura T3, 32°C de hasta 13.62, 9.08 y 9.08 más que las plantas sin inocular que estuvieron bajo las tres diferentes temperaturas. El nitrógeno en la raíz presentó incrementos significativos en aquellas plantas coinoculadas con la bacteria (C) y el hongo *L. bicolor* en las tres diferentes temperaturas, con diferencias de hasta 7.4, 5.7 y 5.4 veces más que las plantas sin inocular respectivamente. Las plantas inoculadas exclusivamente con las bacterias que estuvieron en cualquiera de las tres condiciones de temperatura no presentaron diferencias significativas al comparar con las plantas sin inocular. En cuanto al contenido de nitrógeno en toda la planta (parte aérea y raíz), se registraron diferencias significativas en aquellas plantas coinoculadas con el hongo *L. bicolor* y la bacteria *Cohnella* sp. principalmente en las que estuvieron bajo la condición de temperatura T3, 32°C registrándose diferencias significativas de 9.6, 7.1 y 6.8 veces más respectivamente, que las plantas sin inocular que estuvieron presentes bajo las tres diferentes temperaturas (Cuadro 2.5).

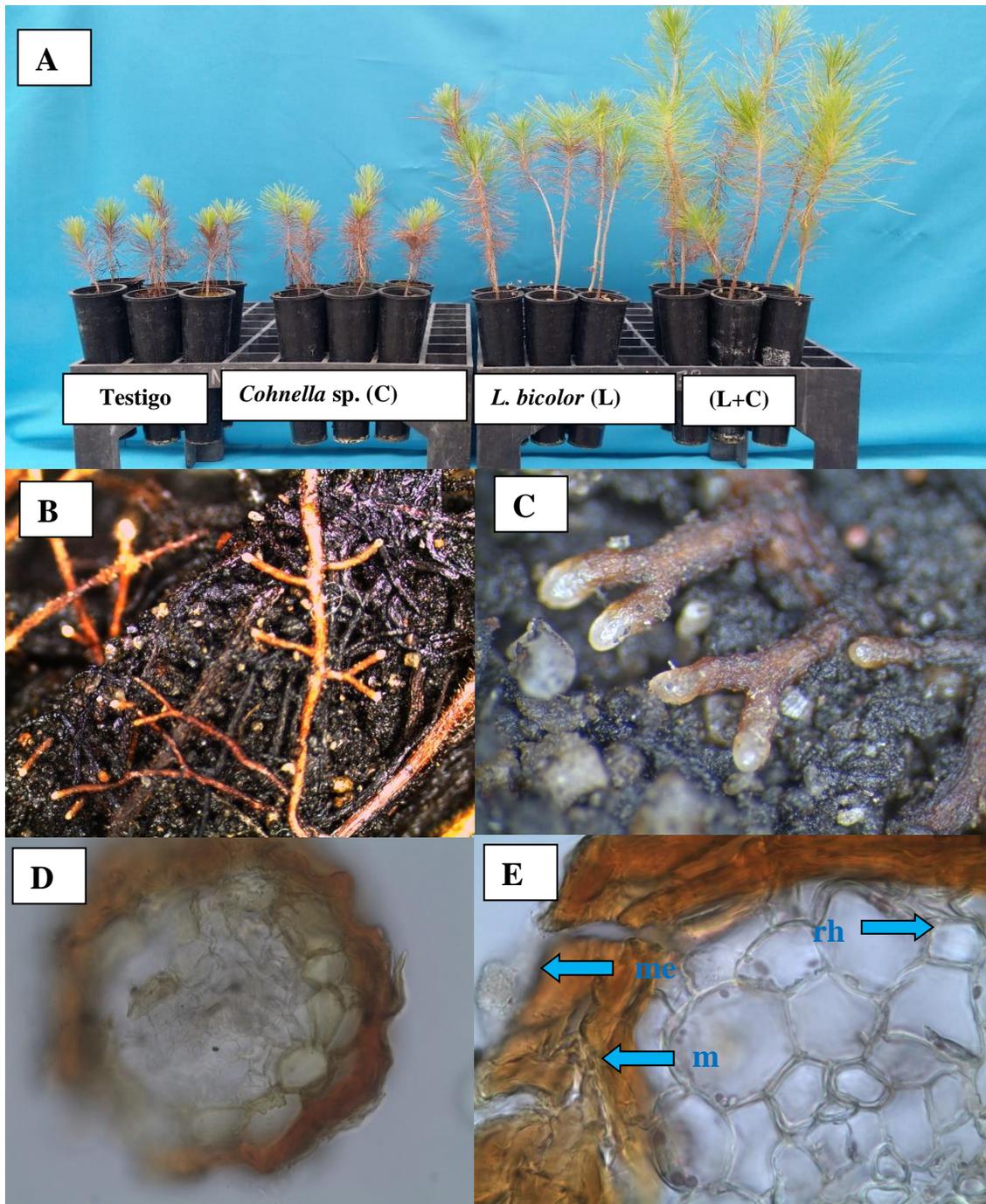
**Cuadro 2.5.** Contenido total de N en raíz parte aérea y raíz de plantas de *L. bicolor* inoculadas o no con un hongo ectomicorrízico comestible y una bacteria auxiliadora de la micorrización.

Tratamientos	Nutriente N (g)		
	Parte aérea	Raíz	Total
Plantas sin inocular			
T1	0.08±0.01b	0.14±0.02c	0.22±0.03d
T2	0.12±0.01b	0.18±0.01c	0.30±0.02d
T3	0.12±0.02b	0.19±0.04c	0.31±0.06dc
Pi con <i>Cohnella</i> (C)			
T1	0.15±0.02b	0.11±0.02c	0.26±0.04d
T2	0.12±0.01b	0.16±0.02c	0.28±0.01dc
T3	0.15±0.01b	0.13±0.01c	0.29±0.01dc
Pi con <i>L. bicolor</i> (L)			
T1	0.46±0.07b	0.56±0.07bac	1.02±0.06dc
T2	0.36±0.03b	0.40±0.07bc	0.76±0.07dc
T3	0.32±0.03b	0.49±0.08bac	0.81±0.11bc
Pi con L+C			
T1	1.01±0.19a	0.98±0.18a	1.99±0.26ba
T2	0.43±0.08b	0.75±0.22ba	1.18±0.29bc
T3	1.09±0.24a	1.04±0.24a	2.13±0.47a

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=4). Pi= plantas inoculadas.

Previamente ha sido documentado el papel de la inoculación con hongos ectomicorrízicos los cuales producen efectos positivos en el crecimiento y estado nutricional, la importancia de la adquisición de N en las plantas micorrizicas ha sido demostrada y estudiada por Smith y Read (2008). En investigaciones previas se ha registrado el efecto de la inoculación de hongos ectomicorrízicos y bacterias en el contenido de nitrógeno en condiciones de temperatura ambiente, esto fue registrado por Barragán-Soriano *et al.* (2018) quienes encontraron incrementos en el contenido de nitrógeno en parte aérea y radical, en plantas de *Pinus montezumae* inoculadas con el hongo ectomicorrízico comestible *Hebeloma mesophaeum* y la bacteria *Azospirillum*

*brasiliense* con incrementos de 5.36 y 4.3 respectivamente más que las plantas sin inocular. El papel de los hongos ectomicorrízicos es fundamental para el desarrollo de las plantas, Arteaga-León *et al.* (2018) inocularon plantas de *Pinus ayacahuite* con los hongos ectomicorrízicos *Helvella cf. lacunosa* y *Hebeloma mesophaeum*, registrando incrementos de nitrógeno en la parte aérea en todos los grupos de inoculación con respecto al control. En esta investigación se sometieron plantas inoculadas con un hongo ectomicorrízico y una bacteria bajo estrés de temperatura y se registraron incrementos en el contenido de nitrógeno. Existen distintos tipos de micorrizas como las micorrizas arbusculares las cuales tiene la capacidad de tolerar el estrés por calor, autores como Cabral *et al.* (2016) inocularon plantas de *Triticum aestivum* L con los hongos micorrizicos *Rhizophagus irregularis*, *R. irregularis*, *Funneliformis mosseae* y *F. geosporum* y *Claroideoglobus claroideum* bajo estrés por temperatura a 35 °C registrando un incremento en la cantidad de nitrógeno en las plantas, en comparación con las plantas control.



**Figura 2.6.** Imágenes generales del experimento. A) Efecto de la coinoculación de *P. greggii* con el hongo comestible ectomicorrízico *L. bicolor* (L) y la bacteria *Cohnella* sp. (C) después de un año. Plantas sin inocular y coinoculación L+C; B) Raíces micorrizadas de *P. greggii* con *L. bicolor*; C) Morfotipo característico de *L. bicolor*, raíces diferenciadas por el hongo ectomicorrízico; D) Corte transversal de raíz secundaria micorrizada; E; Estructuras diagnosticas de una raíz ectomicorrizada: rh) red de Hartig, m) manto, me) micelio externo.

## 2.5 CONCLUSIONES

Los hongos ectomicorrízicos, tienen la capacidad de incrementar la tolerancia a diversos tipos de estrés a través de la modificación de la fisiología de los árboles asociados en el bosque además incrementa la toma de agua y nutrientes, en este capítulo demostramos que la inoculación con hongos ectomicorrízicos como *Laccaria bicolor* solo o coinoculado con la bacteria *Cohnella* sp auxiliadora de la micorrización, en plantas de *Pinus greggii* incremento variables fisiológicas como, tasa fotosintética, contenido de clorofilas, además, propio a generar un sinergismo en el contenido de nitrógeno tanto en raíz como en parte aérea.

Actualmente el planeta está siendo sometido bajo diversos factores, uno de los más importantes es el calentamiento global que está ejerciendo cambios sobre la fisiología de las especies vegetales o acelerando su perdida. Esta es una de las primeras investigaciones en México que demuestran la importancia de la inoculación con hongos ectomicorrízicos y bacterias auxiliadoras de la micorrización y su papel que desempeñan en la tolerancia al calentamiento global. Los hongos ectomicorrízicos modificaron la fisiología de las plantas como tasa fotosintética y Clorofila a, b y Carotenos. Además, incrementaron la adquisición de agua y nutrientes, por lo que la utilización de hongos ectomicorrízicos y bacterias en la producción de plantas en vivero con fines de reforestación es una alternativa para aportar beneficios a las plantas para resistir los efectos del calentamiento global en las plantas.

## CONCLUSIONES GENERALES

Se demostró que la inoculación con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* con la bacteria *Azospirillum brasilense* (FN) o coinoculado con cualquiera de dos bacterias mejoró el crecimiento y calidad fisiológica de plantas de *Pinus montezumae* Lamb., dado que incrementa la biomasa, fotosíntesis, concentración de clorofilas, carotenos y contenido de N, P, K Ca y Mg; en contraste la inoculación de plantas exclusivamente con las bacterias C, SF y FN, no originó incrementos en ninguna de las variables evaluadas en comparación con plantas no inoculadas. Se registró un sinergismo en términos de materia seca, tasa fotosintética, concentración de clorofilas y nitrógeno en parte aérea y raíz en plantas coinoculadas con *L. laccata* y *Azospirillum brasilense*. En los tratamientos donde se inóculo el hongo comestible ectomicorrízico, presentaron valores significativos en las variables de crecimiento y estos los atribuimos a la presencia del hongo, el cual se vio reflejado en el alto porcentaje de raíces vivas micorrizadas, que fueron de 50 a 60%. La presente investigación es una de las primeras en demostrar que la inoculación con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata*, con las bacterias auxiliaadoras de la micorrización, posee potencial para la producción de plantas en invernadero, ya que *Pinus montezumae* es una de las especies utilizadas en la restauración de zonas deforestadas y de suelos degradados.

Se demuestra el papel que desempeñan los hongos comestibles ectomicorrízicos en la tolerancia al estrés por temperatura, registrándose incrementos en términos de materia seca, crecimiento y variables fisiológicas, así como contenido de clorofilas y contenido de nitrógeno en plantas inoculadas con el hongo comestible ectomicorrízico solo o

coinoculado con la bacteria, bajo temperaturas de 32°C, las plantas inoculadas exclusivamente con la bacteria no presentaron incrementos en ninguna de las variables evaluadas ni en ninguna de las temperaturas. Estos resultados son atribuibles al porcentaje de raíces micorrizadas de 86 al 91% en plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico comestible. Se registró un sinergismo en las plantas coinoculadas L+C en el contenido de nitrógeno tanto en parte aérea radical y total en los tratamientos que estuvieron bajo la temperatura de 32°C. Finalmente, se documenta por primera ocasión en México, la importancia del papel de la inoculación con hongos ectomicorrízicos en la tolerancia al estrés por temperatura, el cual puede ser generado por el calentamiento global. Así se demuestra que los hongos ectomicorrízicos tienen el potencial para incrementar la calidad de plantas de *Pinus greggii*, aun estando bajo altas temperaturas. *Pinus greggii* es una especie endémica de México que es utilizada para fines maderables y de restauración, por lo que es de gran importancia y puede verse amenazada su existencia debido al calentamiento global.

## LITERATURA CITADA

- Agerer, R. (1994). Characterization of ectomycorrhizal. In J. R. Norris, D. J. Read, & A. K. Varma (Eds.), *Techniques for mycorrhizal research* Pp. 25-73. London: Academic Press.
- Ahonen-Jonnarh, U., Göransson A y D. Finlay R. (2003). Growth and nutrient uptake of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings in a natural substrate treated with elevated Al concentrations. *Tree Physiol*, 23(3), 157-67. doi: 10.1093/treephys/23.3.157.
- Araujo, G., C., Sousa, N., R., y Castro, M., L., P. (2018). Performance of *Quercus suber* L. at nursery stage—application of two bio-inoculants under two distinct environments. *Annals of Forest Science* 75: 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13595-018-0700-3>
- Araujo, G., C., Sousa, N., R., y Castro, M., L., P. (2018). The effect of fungal-bacterial interaction on the phenolic profile of *Pinus pinea* L. *Plant Growth Regulation*, 86(11), 465–475. DOI:10.1007/s10725-018-0445-x
- Arteaga-León, C., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Victoria D., Almaraz-Suárez, J. J., Silva-Rojas, H. y Delgado-Alvarado, A. (2018). Ectomycorrhizal inoculation with edible fungi increases plant growth and nutrient contents of *Pinus ayacahuite*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89(4), 1089 – 1099. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.4.2235>.
- Bai X-N., Hao H., Hu Z-H. y Leng. (2021). Ectomycorrhizal Inoculation Enhances the Salt Tolerance of *Quercus mongolica* Seedlings. *Plants*, 10(9), 1-17. doi: 10.3390/plants10091790.
- Barboza, L. Ó. Calentamiento global: “La máxima expresión de la civilización petrolfósil” *Revista del CESLA*, núm. 16, (2013), pp. 35-68 Uniwersytet Warszawski Varsovia, Polonia.
- Barragán-Soriano, J. L., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suarez, J. J., Carcaño-Montiel, M. G., y Medrano-Ortiz, K. I. (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), 5-16. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.01.010>.
- Birch, J. D., Lutz, J. A., Turner, B. L. y Karst, J. (2021). Divergent, age-associated fungal communities of *Pinus flexilis* and *Pinus longaeva*. *Forest Ecology and Management*, 494, 1-11. <https://doi.10.1016/j.foreco.2021.119277>.
- Bremner, J. M. (1965). Total, nitrogen. *Agronomy*, 9, 1149–1178. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.c32>

- Cabral, C., Ravnskov, S., Tringovska, I., y Wollenwever, B. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi modify nutrient allocation and composition in wheat (*Triticum aestivum* L.) subjected to heat-stress, *Plant Soil*, 408(1), 385–399. doi 10.1007/S11104-016-2942-X
- Camarero, J., J., Gazol A., Sangüesa-B, G., Vergarechea, M., Alfaro-S. R., Cattaneo, N., y M. Vicente S. M. (2021). Tree growth is more limited by drought in rear-edge forests most of the times. *Forest Ecosystem*, 8(25), 2-15. <https://doi.org/10.1186/s40663-021-00303-1>.
- Camargo-Ricalde, S. L., N. M. Manuel, C. J. De la Rosa-Mera y S. A. A. Montaña. (2012). Micorrizas una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria* 13: 1-19.
- Canton, C. C., Bertolazi, A. A., Cogo, A. J. D., Eutrópico, J. F., Melo, J., de Souza, B. S., y Ramos, C. A. (2016). Biochemical and ecophysiological responses to manganese stress by ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and in association with *Eucalyptus grandis*. *Mycorrhiza*, 26(5), 475–487. doi: 10.1007/s00572-016-0686-3.
- Carrasco, H. V., D. A. T. Rodríguez, M. J. Pérez, S. J. L. Navarros, Z. V. M. Duarte y L. R. Quintero. 2018. Evaluación del costo de producción de inoculantes ectomicorrízicos neotropicales a base de esporas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9: 417-429.
- Casique, V., R., Mendoza, V. R., Galindo, G. F., González, M. S., y Sánchez, P. S. (2019). Improved parameters of *Pinus greggii* seedling growth and health after inoculation with ectomycorrhizal fungi, *Southern Forests*, 82(3), 23–30. <https://doi.org/10.2989/20702620.2018.1474415>.
- Castaño, C., Alday, J. G., Parlade, J., Perea, J., Martínez, de A., J., y Bonet, J. A. (2017). Seasonal dynamics of the ectomycorrhizal fungus *Lactarius vinosus* are altered by changes in soil moisture and temperatura. *Soil Biology y Biochemistry*, 115, 253-260. DOI:10.1016/j.soilbio.2017.08.021.
- Cavicchioli, R., Ripple, W. J., Timmis, K. N., Azam, F., Bakken, L. R., Baylis, M., Behrenfeld, M. J., Boetius, A. Boyd, P. W., Classen, A. T., Crowther, T. W., Danovaro, R., Foreman, C. M., Huisman, J., Hutchins, D. A., Jansson, J. K., Karl, D. M., Koskella, B., Welch, D. B. M., Martiny, J. B. H., Moran, M. A., Orphan, V. J., Reay, D. S., Remais, J. V., Rich, V. I., Singh, B. K., Lisa, Y. Stein, Stewart, F. J., Sullivan, M. B., Madeleine, J. H., Oppen V., Weaver, S. C., Webb, E. A., y Webster, N. S. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 569-586. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>.
- Chahboub, H. G., M. L. Sghir y A.-B. Ouzna. (2021). Implications of ectomycorrhizal inoculation for drought stress tolerance of Atlas cedar (*Cedrus atlantica* (Endl.) Carrière) seedlings. *New Zealand Journal of Forestry Science* 51: 1-11 DOI: <https://doi.org/10.33494/nzjfs512021x131x>

- Cho, Y., Yoo, S., Park, M. S., Kim, J. S., Kim, C. S., y Lim, Y. W. (2021). Ectomycorrhizal Fungi Associated with *Pinus densiflora* Seedlings under Flooding Stress. *Sustainability*, 18(13), 1-10. <https://doi.org/10.3390/su13084367>
- Chu, H., Wang, H., Zhang, Y., Li Z., Wang, C., Dai, D., y Tang., M. (2021). Inoculation With Ectomycorrhizal Fungi and Dark Septate Endophytes Contributes to the Resistance of *Pinus* spp. to Pine Wilt Disease, *Frontiers in microbiology*, 12(21), 1-15. DOI=10.3389/fmicb.2021.687304
- De la Paz-Pérez, C. y R. Davalos-Sotelo. (2016). Anatomical characteristics of the wood of six *Pinus* (*Pinaceae*) species of the state of Durango, México. *Madera y bosques* 3: 113-132. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2016.2231460>
- Díaz Cordero, G. d EL CAMBIO CLIMÁTICO Ciencia y Sociedad, vol. XXXVII, núm. 2, abril-junio, (2012), pp. 227-240.
- Díaz, C. G. 2012. El cambio climático. *Ciencia y Sociedad*, 37(2), 227-240. <https://doi.10.22206/CYS.2012.V37I2.PP227-240>
- Domínguez-Núñez, J. A., Berrocal-Lobo M., y Albanesi, S. (2019). Ectomycorrhizal Fungi: Role as Biofertilizers in Forestry, *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment* 55: 67-82.
- Ebi, K. L., Mearns, L. O. y Nyenzi, B. (2003). Chapter 2. Weather and climate: changing human exposures. ED World Health Organization. *Climate change and human health risks and responses*. 133 pp.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (FAO). (2010). *Global Forest resources assessment 2010*. Rome, Italy: FAO
- Fernández, N., N., Maggia, L., Pierre-Louis S., Lelivre M., Letellier K., Gigante S., Manez A., Mournet P., Ripoll J. y Carriconde F. (2021). Potential of high-throughput eDNA sequencing of soil fungi and bacteria for monitoring ecological restoration in ultramafic substrates: The case study of the New Caledonian biodiversity hotspot. *Ecological engineering*, 173, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2021.106416>.
- Ferreira, A. S., Totola, M. R., Kasuya, M. C. M., Araujo, E. F., y Borges, A. C. (2005). Small heat shock proteins in the development of thermotolerance in *Pisolithus* sp. *Journal of Thermal Biology* 30: 595–602.
- FOOD and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2018). *El estado de los bosques del mundo, las vías forestales hacia el desarrollo sostenible*. Rome, Italy: FAO
- Galicia, L., Chávez-Vergara, B. M., Kolb, M., Jasso-Flores, R. I. Rodríguez, B. L. A., Elizabeth, S. L., Guerra, de la C. V., Pérez-Campuzano, E., y Villanueva, A. (2018). Perspectives of the socioecological approach in the preservation, utilization and the payment of environmental services of the temperate forests of

- México. Madera y bosques, 24(2), 1-18.  
<https://doi.org/10.21829/myb.2018.2421443>.
- Galicia, L., Chávez-Vergara, B. M., Kolb, M., Jasso-Flores, R. I., Rodríguez, B. L. A., Solís L. E., Guerra, de la C. V., Pérez-Campuzano, E., y Villanueva A. (2018). Perspectives of the socioecological approach in the preservation, utilization and the payment of environmental services of the temperate forests of México. *Madera y bosques*, 24(2), 1-18. doi: 10.21829/myb.2018.2421443.
- García-Lemos A. M., Dominik K. Großkinsky D. K., Stokholm, M. S., Lund O. S., Nicolaisen, M. H., Roitsch, T. G., Veierskov B., y Nybroe O. (2019). Root-Associated Microbial Communities of *Abies nordmanniana*: Insights Into Interactions of Microbial Communities With Antioxidative Enzymes and Plant Growth. *Frontiers in Microbiology*. 10, 1-16  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01937>.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M., y Flores-García, A. (2013). Morphologic and genetic characterization of ectomycorrhizae formed by *Pinus montezumae* and spore bank fungi in the Transmexican Volcanic Belt, *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84(1), 153-169.  
<https://doi.org/10.7550/rmb.29839>.
- Gonzales, S. A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Maderas y Bosques*, 14(1), 107-120.  
<https://doi.org/10.21829/myb.2008.1411222>.
- González, H. A., Pérez M. R., Moreno. S. F., Ramírez O. G., Rosales, M. S., Cano P. A., Guerra de la C. V., y Torres E. del C. M. (2015). Variability of local temperature in conifer forests as a consequence of de forestation, *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(31), 22-39.
- Gorka, S., Dietrich M., Mayerhofer, W., Gabriel R., Weisembauer, J., Martin, V. Zheng. Q., Imai B., Prommer, J., Weidinger, M., Schweiger, P. Eichorst, S., Wagner, M., Richter, A., Schintlmeister, A., Woebken, D., y Kaiser C. (2019). Rapid Transfer of Plant Photosynthates to Soil Bacteria via Ectomycorrhizal Hyphae and Its Interaction With Nitrogen. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-20. DOI=10.3389/fmicb.2019.00168.
- Haas, J., C., Street, N., R., Sjödin, A., Lee, N., M., Högberg, M., N., Näsholm, T., y Hurry, V. (2018). Microbial community response to growing season and plant nutrient optimisation in a boreal Norway spruce forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 125, 197–209. doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.005.
- Hansen, M. C., Potapov, P. V., Moore, R., Hancher, M., Turubanova, S. A., Tyukavina, A., Thau D., y Stehman, S. V. (2013). High-Resolution Global Maps of 21st-Century Forest Cover Change. *Science*, 342(6160), 850–853. doi: 10.1126/science.1244693.

- Heredia-Acuña C., Almaraz-Suarez J. J., Arteaga-Garibay R., Ferrera-Cerrato R. y Pineda-Mendoza D. Y. (2019). Isolation, characterization and effect of plant-growth-promoting rhizobacteria on pine seedlings (*Pinus pseudostrobus* Lindl.). *Journal of Forestry Research*, 30(2), 1727–1734. DOI:10.1007/s11676-018-0723-5.
- Horimai, Y., Misawa, H., Suzuki, K., Fukuda, M., Furukawa H., Masuno, K., Yamanaka, T., y Yamada A. (2020). Sibling spore isolates of *Tricholoma matsutake* vary significantly in their ectomycorrhizal colonization abilities on pine hosts in vitro and form multiple intimate associations in single ectomycorrhizal roots. *Fungal Ecology*, 43, 1-12. doi: 10.1016/j.funeco.2019.100874.
- IPCC, (2018): Resumen para responsables de políticas. En: Calentamiento global de 1,5 °C, Informe especial del IPCC sobre los impactos del calentamiento global de 1,5 °C con respecto a los niveles preindustriales y las trayectorias correspondientes que deberían seguir las emisiones mundiales de gases de efecto invernadero, en el contexto del reforzamiento de la respuesta mundial a la amenaza del cambio climático, el desarrollo sostenible y los esfuerzos por erradicar la pobreza [Masson-Delmotte V., P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor y T. Waterfield (eds.)].
- IPCC, 2013: Glosario [Planton, S. (ed.)]. En: Cambio Climático 2013. Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex y P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, Estados Unidos de América.
- Kennedy, N., M., Robertson, S., J., Robertson, S. J., Green, S. D., Scholefield, S., R., Arocena, J., M., Tackaberry, L., E., Massicotte, H., B., y Egger, K., N. (2015). Site properties a stronger influence than fire severity on ectomycorrhizal fungi and associated N-cycling bacteria in regenerating post-beetle-killed lodgepole pine forests. *Folia Microbiol*, 60(5), 399–410. doi: 10.1007/s12223-014-0374-7.
- Kitagami, Y. y Matzuda Y. (2020). Temperature changes affect multi-trophic interactions among pines, mycorrhizal fungi, and soil nematodes in a microcosm experiment. *Pedobiologia - Journal of Soil Ecology*, 78, 1-9. doi:10.1016/j.pedobi.2019.150595.
- Krupa, P., y Kozdroj J. (2007). Ectomycorrhizal Fungi and Associated Bacteria Provide Protection Against Heavy Metals in Inoculated Pine (*Pinus Sylvestris* L.) Seedlings. *Water Air Soil Pollut*, 182, 83–90. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9323-7>.

- Labbe, L. J., Weston J. D., Dunkir, N., Pelletier, A. D., y Tuskan, A. G. (2014). Newly identified helper bacteria stimulate ectomycorrhizal formation in *Populus*. *Frontiers in Plant Science*, 24(5), 1-10. doi: 10.3389/fpls.2014.00579.
- Leonardi, P., Lotti, M., Donati, Z. S., Lancellotti, E., Amicucci, A., y Zambonelli, A. (2017). Morphological and functional changes in mycelium and mycorrhizas of *Tuber borchii* due to heat stress. *Fungal Ecology*, 29, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.05.003>.
- Li M., Wang, H., Zhao X., Lu, Z., Sun, X., y Ding, G. (2021). Role of *Suillus placidus* in Improving the Drought Tolerance of Masson Pine (*Pinus massoniana* Lamb.) Seedlings. *Forest*, 12,1-18. <https://doi.org/10.3390/f12030332>.
- Li Y., Sun D., Xu Z., Zhao C. Lin H. y Liu Q. (2015). Effects of warming on ectomycorrhizal colonization and nitrogen nutrition of *Picea asperata* seedlings grown in two contrasting forest ecosystems. *Scientific Reports* 5,1-10. <https://doi.org/10.1038/srep17546>.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).
- Likulanga, L. E., Rivera, P. C. A., Schneider, D., Daniel R., y Polle A. (2021). Tree species composition and soil properties in pure and mixed beech-conifer stands drive soil fungal communities. *Forest ecology management*, 502, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119709>.
- López, H., J. A., Aguirre, C., O. A., Alanís, R., E., Monárrez, G., J. C., González, M. A. y Jiménez P. J. (2017). Composición y diversidad de especies forestales en bosques templados de Puebla, México. *Madera y Bosques*, 23(1), 39-51. Doi: [10.21829/myb.2017.2311518](https://doi.org/10.21829/myb.2017.2311518).
- López-Gutiérrez, A., Pérez-Moreno J., Hernández-Santiago, F., Uscanga-Mortera, E., García-Esteva, A., Cetina-Alcalá, V. M., Cardoso-Villanueva, M. del R., y Xoconostle-Cazares, B. (2018). Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Botanical Sciences*, 96(2), 286-304. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.1239>.
- Marupakula, S., Mahmood S., Jernberg, J., Nallanchakravarthula, S., Fahad Z. A., y Roger D. Finlay (2017). Bacterial microbiomes of individual ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* roots are shaped by soil horizon and differentially sensitive to nitrogen addition. *Microbiol*, 11,4736-4753. doi: 10.1111/1462-2920.13939.
- Mendoza, de A. C., y Jiménez, N. G. (2017). Relación entre el efecto invernadero y el cambio climático desde la perspectiva del sector agrario. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 70(2), 1-5.

- Moctezuma, L. G., y Flores, A. (2020). Importancia económica del pino (*Pinus* spp.) como recurso natural en México. *Mexicana de Ciencias Forestales*, (60)11, 161-185. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v11i60.720>.
- Moler E. R. V., Page G., Rentería R. L., Garms C. G., Hull J. B., Cooper H. F., J. Swenson J., S. Perks S., Waring K. M. y A. V. Whipple A. V. (2021). A method for experimental warming of developing tree seeds with a common garden demonstration of seedling responses. *Plant Methods*, 17(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00700-7>.
- Monjardin, A., S., Pacheco, A., C. E., Plata, R., W., y Corrales, B., G. (2017). La deforestación y sus factores causales en el estado de Sinaloa, México. *Madera y bosques*, 23(1), 7-22. <https://doi.org/10.21829/myb.2017.2311482>.
- Nogales A., Ribeiro H., Nogales-Bueno J., Hansen L. D., Goncalves E. F. Coito J. L., Rato A. E., Peixe A., Viegas W. Cardoso H. (2020). Response of Mycorrhizal 'Touriga Nacional Variety Grapevines to High Temperatures Measured by Calorespirometry and Near-Infrared Spectroscopy. *Plants*, 9(11), 1-24. <https://doi.org/10.3390/plants9111499>.
- Noirot-Gros, Marie-Francoise, Shinde, S., Larsen P. E., Zerbs, S., Korajczyk, P. J., Kemner, K. M., y Noirot, P. H. (2018). Dynamics of Aspen Roots Colonization by Pseudomonads Reveals Strain-Specific and Mycorrhizal-Specific Patterns of Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*, 3(9), 1-16. doi: 10.3389/fmicb.2018.00853.
- Obase, K. (2019). Bacterial community on ectomycorrhizal roots of *Laccaria laccata* in a chestnut plantation. *Mycoscience*, 60(1), 40-44. DOI: 10.1016/j.myc.2018.08.002.
- Pacheco, C., Aguado, I., y Mollicone, D. (2012). Las causas de la deforestación en Venezuela: un estudio retrospectivo. *Biollania*, 10, 281-292.
- Pandey, S. (2021). Climatic influence on tree wood anatomy: a review. *J Wood Sci*, 67(1), 1-7. DOI:10.1186/s10086-021-01956-w.
- Pérez-Moreno, J., (2016). Los hongos silvestres y el cambio climático global y bosques. In M. L. de la Isla de Bauer (Ed.), *Producción de alimentos en casa: Agricultura urbana y periurbana*. México Comité de Acción para el Saneamiento Ambiental. Pp.153–176.
- Pérez-Moreno, J., Lorenzana, F. A., Carrasco, H. V., y Yescas- Pérez, A. (2010). Aspectos biotecnológicos de los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. México: Colegio de Postgraduados-SEMARNAT- CONACyT.
- Pickles. J. B., Egger N. K., Massicotte B, H. y Green S. D. (2012). Ectomycorrhizas and climate change. *Fungal ecology*. 5(1), 73-84. DOI:10.1016/j.funeco.2011.08.009.

- Pineda-Mendoza, D.Y., Almaraz, J. J., Lara-Hernández, M. E., Arteaga-Garibay, R., y Silva-Rojas, H. V. (2019). Cepas de bacterias aisladas de esporomas de hongos ectomicorrízicos promueven el crecimiento vegetal. -Información Técnica Económica Agraria 115(1): 4-17. <https://doi.org/10.12706/itea.2018.027>.
- Pohjanen, J., Koskimäki, J., J., Sutela, S., Ardanov, P., Suorsa, M., Niemi, K., Sarjala, T., Hely Häggman, H., y Pirttilä, A., M. (2014). Interaction with ectomycorrhizal fungi and endophytic *Methylobacterium* affects nutrient uptake and growth of pine seedlings in vitro. *Tree Physiology*, 34(9), 993–1005. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu062>.
- Poole, E. J., Bending, G. D., Whipps, J. M. y Read, D. J. (2001). Bacteria associated with *Pinus sylvestris* – *Lactarius Rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytologist*, 151(3), 743–751. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00219.x>.
- Querejeta, J. I., Schlaeppi K., Lopez-Garcia, A., Ondoño S., Prieto, I., Van, der Heijden, M. G. A., y del Mar, A. M. (2021). Lower relative abundance of ectomycorrhizal fungi under warmer and drier climate is linked to enhanced soil organicmatter decomposition. *New Phytologist*, 232(3), 1399–1413. doi: 10.1111/nph.17661.
- Rainer, G., Kuhnert, R., Unterholser, M., Dresch, P., Gruber, A., y Peitner, U. (2015). Host-Specialist Dominated Ectomycorrhizal Communities of *Pinus cembra* are not Affected by Temperature Manipulation. *Journal. Fungi*, 1(1), 55-75. doi: 10.3390/jof1010055.
- Ramírez-Herrera, C., Vargas-Hernández J. J., y López-Upton. (2005). Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. *Acta Botánica Mexica*. 72, 1-16.
- Read, D. J., Duckett, J. G., Francis, R., Ligrone, R., y Russell, A. (2000). Symbiotic fungal associations in 'lower'land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*, 355(1398), 815–831.
- Reis, F., Magalhaes, A. P., Tavares, R. M., Baptista, P., y Lino-Neto, T. (2021). Bacteria could help ectomycorrhizae establishment under climate variations. *Mycorrhiza*, 31(3), 395-401. doi: 10.1007/s00572-021-01027-4
- Reva, M., Cano, C., Herrera, M. A., y Bago, A. (2021). Arbuscular Mycorrhizal Inoculation Enhances Endurance to Severe Heat Stress in Three Horticultural Crops. *Hort Science*, 55(4), 396–406. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14888-20>
- Rey Benayas, J., M., y Bullock J., M. (2012). Restoration of Biodiversity and Ecosystem Services on Agricultural Land. *Ecosystems*, 15, 883–899. <https://doi.org/10.1007/s10021-012-9552-0>.
- Rinaldi, A. C., Comandini, O., y Kuyper, T. W. (2008). Ectomycorrhizal fungal diversity: Separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*, 33, 1–45.

- Rodríguez, G. L., Curetti, G., Garegnani, G., Grilli, G., Pastorella, F., y Paletto, A. (2016). La valoración de los servicios ecosistémicos en los ecosistemas forestales: un caso de estudio en Los Alpes Italianos. *Bosque*, 37(1), 41-52. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717->.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., Ortega-Larrocea, M., P., y Arellano-Torres, E. (2019). Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90(4), 1-12. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2868>.
- Sáenz, R., C., y Lindig C. R. (2004). Evaluación y Propuestas para el Programa de Reforestación en Michoacán. *Ciencia Nicolaita*. 37. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México Pp. 107-120.
- Sandoval-García, R., R. González-Cubas y A. Bautista-Cruz. Asociación ecológica de *Pinus pseudostrobus* (Pinaceae) como respuesta de las variaciones biogeográficas en el Centro-Sur de México. 2020. *Acta Botánica mexicana* 127: e1627. DOI: 10.21829/abm127.2020.1627
- Seidl, R., Thom, D., Kautz, M., Martin-Benito, D., Peltoniemi, M., Vacchiano, G., Wild, J., Ascoli, D., Petr, M., Honkaniemi, J., Lexer, M. J., Trotsiuk, V., Mairota, P., Svoboda, M., Fabrika, M., Nagel, T. A., y Reyer C., P. O. (2017). Forest disturbances under climate change. *Nature Climate Change*, 7, 395-402. <https://doi.org/10.1038/nclimate3303>.
- Shi, L., Wang J., Binhao, L., Nara K., Lian, C., Shen, Z., Xia Y., y Chen Y. (2017). Ectomycorrhizal fungi reduce the light compensation point and promote carbon fixation of *Pinus thunbergii* seedlings to adapt to shade environments. *Mycorrhiza*, 27(8), 823–830. Doi: 10.1007/s00572-017-0795-7.
- Shinde, S., Zerbs, S., Collart, F., R., Cumming, J., R., Noirot, P., y Larsen, P., E. (2019). *Pseudomonas fluorescens* increases mycorrhization and modulates expression of antifungal defense response genes in roots of aspen seedlings. *BMC Plant Biology*, 19(4), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1610-0>.
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd. edition). New York, USA: Academic Press, pp295-320.
- Soudzilovskaia, N. A., Douma, J. C., Akhmetzhanova, A. A., van Bodegom, P. M., Cornwell, W. K. Moens, E. J., Treseder, K. K., Tibbett M., Ying-Ping W., y Cornelissen J. H. C. (2015). Global patterns of plant root colonization intensity by mycorrhizal fungi explained by climate and soil chemistry. *Global Ecology and Biogeography*, 23(3), 371-382. <https://doi.org/10.1111/geb.12272>.
- Sousa, R. N., Franco, R. A., Ramos, A. M., Oliveira, S. R., y Castro, L. M. P. (2015). The response of *Betula pubescens* to inoculation with an ectomycorrhizal fungus and a plant growth promoting bacterium is substrate-dependent. *Ecological Engineering*, 81, 439–443. doi:10.1016/j.ecoleng.2015.04.024.

- Szuba A., Marczak L. y Ratajczak I. (2020). Metabolome adjustments in ectomycorrhizal *Populus x canescens* associated with strong promotion of plant growth by *Paxillus involutus* despite a very low root colonization rate, *Tree Physiology*, Volume 40, Issue 12, December, Pages 1726–1743,
- Szuba, A., L. Marczak, L. Karliński, J. Mucha y Tomaszewski D. (2019). Regulation of the leaf proteome by inoculation of *Populus canescens* with two *Paxillus involutus* isolates differing in root colonization rates. *Mycorrhiza* 29:503–517. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00910-5>
- Taylor, A. F. S., y Alexander, I. (2005). The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist*, 19(3), 102–112. <https://doi.org/10.1017/S0269915X05003034>.
- Tedersoo, L. (2017). Global biogeography and invasions of ectomycorrhizal plants: Past, present and future (Pp. 469–531). *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Cham, Switzerland: Springer International.
- Useros, F. J. L. (2013). Climate Change: causes and environmental effects. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, 50, 71-98.
- Vaario, L. M. X. Yang., y A. Yamada, L. Tedersoo. (2017). (Ed.) *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*, vol. 230, Springer, Cham, Pp. 319-344.
- Valdés, R. M., Ambriz, P. E., Camacho, V. A., y Fierros, G. A. M. (2010). Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 1(2), 53–64. doi:10.29298/rmcf.v1i2.637.
- Van, N. M. E., Smith, D. P., Bhatnagar, J. M., Stefanski, A., Hobbie, S. E., Reich P. B., y Kabir, G. Peay, K. G. (2020). Warming and disturbance alter soil microbiome diversity and function in a northern forest ecotone. *Microbiology Ecology*, 96(7), 1-13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa108>
- Wagner, K., Katrin Ramses, K., Gallegos-Monterrosa, R., Sammer, D., Ákos T. Kovács and Erika Kothe. (2019). The Ectomycorrhizospheric Habitat of Norway Spruce and *Tricholoma vaccinum*: Promotion of Plant Growth and Fitness by a Rich Microorganismic Community. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00307>.
- Walker, J. K. M., Cohen, H., Higgins, L. M., y Kennedy, P. G. (2013). Testing the link between community structure and function forectomycorrhizal fungi involved in a global tripartite symbiosis. *New Phytologist*, 202(1), 287–296. <https://doi.org/10.1111/nph.12638>.
- Wang, C., Zong, S., y Li, M. H. (2019). The contrasting Responses of mycorrhizal fungal mycelium associated with woody plants to multiple environmental factors. *Forest*, 10(11), 2-18. 973; <https://doi.org/10.3390/f10110973>

- Wang, J., Zhang, H., Gao J., Zhang, Y., Liu, Y., y Tang, M. (2021). Effects of ectomycorrhizal fungi (*Suillus variegatus*) on the growth, hydraulic function, and non-structural carbohydrates of *Pinus tabulaeformis* under drought stress. *BMC Plant Biology*, 21(171), 2-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02945-3>.
- Wang, J., Zhang, H., Gao, J., Zhang, Y., Liu, Y., y Tang, M. (2021). Contribution of *Suillus variegatus* to the ecological restoration of 10-year-old *Pinus tabuliformis* on the Loess Plateau. *Applied Soil Ecology*, 167, 1-10. doi:10.1016/j.apsoil.2021.104044.
- Wang, J., Zhang, H., Gao, J., Zhang, Y., Liu, Y., y Tang, M. (2021). Effects of ectomycorrhizal fungi (*Suillus variegatus*) on the growth, hydraulic function, and non-structural carbohydrates of *Pinus tabulaeformis* under drought stress. *BMC Plant Biology*, 21(171), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02945-3>.
- Wang, Y., S., y Gu J. D. (2021). Ecological responses, adaptation and mechanisms of mangrove wetland ecosystem to global climate change and anthropogenic activities. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 162,1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105248>,
- Xiao-Qin, W., Liang-Liang, H., Jiang-Mei, S., Jia-Hong, R., Ling Z., Dan, C. y Jian-Ren, Y. (2012). Effects of ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* and mycorrhiza helper *Bacillus cereus* on the growth and nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. *Biol ferti soil*, 48(4), 385-395. doi: 10.1007/s00374-011-0638-1.
- Yan Z., Ma T., Guo, S., Liu, R., y Li M. (2021). Leaf anatomy, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of lettuce as influenced by arbuscular mycorrhizal fungi under high temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 280, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109933>.
- Yanlong, Guo, Y., Li, X., Zhao, Z., Wei, H., Gao, B., y Gu, W. (2017). Prediction of the potential geographic distribution of the ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake* under multiple climate change scenarios. *scientific reports*, 7(46221), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep46221>.
- Yin D., Song R., Qi J., y Deng X. (2018). Ectomycorrhizal fungus enhances drought tolerance of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seedlings and improves soil condition. *Journal of Forestry Research*, 29, 1775–1788. DOI:10.1007/s11676-017-0583-4.
- Yin, D., Halifu, S., Song, R., Qi, J., Deng, X., y Deng, J. (2020). Effects of an ectomycorrhizal fungus on the growth and physiology of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seedlings subjected to saline–alkali stress. *Journal of Forestry Research*, 3(1),781–788. DOI:10.1007/s11676-019-01007-7.
- Yu, F., Liang, J., F., Song, J., Wang, S., K., y Lu, J. K. (2020). Bacterial Community Selection of *Russula griseocarnosa* Mycosphere. *Soil. Front. Microbiol* 11: 1-16. Doi.org/10.3389/fmicb.2020.00347.

- Yu, H., Wang, T., Skidmore, A., Heurich, M., y Bassler, C. (2020). The critical role of tree species and human disturbance in determining the macrofungal diversity in Europe. *Global ecology and biogeography*, 30(10), 2084-2100. <https://doi.org/10.1111/geb.13372>.
- Yu, P., Sun Y., Zhonglian, H., Huang, Z., Zhu F., Sun, Y., y Jiang L. (2020). The effects of ectomycorrhizal fungi on heavy metals transport in *Pinus massoniana* and bacteria community in rhizosphere soil in mine tailing area. *Journal of Hazardous Materials*, 5, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121203>.
- Yuan, Z., Wang, Y., y Xu, J. (2021). Effects of climatic factors on the net primary productivity in the source region of Yangtze River, China. *Sci Rep*, 11(1376), 1-11.
- Zamora-Campos, E. M., Vázquez-Cuecuecha, O. G., Pérez-Ahuatzi, A., Cano-Flores, R., Aparicio-Rentería, A., y Fernández-Pedraza, E. (2007). Variación natural de la densidad de la madera en *Pinus montezumae* Lamb. en tres altitudes del parque nacional la malinche, Tlaxcala, México. *Foresta Veracruzana*, 9(2), 33-37.
- Zellweger, F., De Frenne, P., Lenoir, J., Vangansbeke, P., Verheyen, K., Bernhardt-Römermann, M., ... Coomes, D. (2020). *Forest microclimate dynamics drive plant responses to warming*. *Science*, 368(6492), 772–775. doi:10.1126/science.aba6880
- Zhang, S., Vaario, L., M., Xia, Y., Matsushita, N., Geng, Q., Tsuruta, M., Kurokochi, H., y Lian, C. (2019). The effects of co-colonising ectomycorrhizal fungi on mycorrhizal colonisation and sporocarp formation in *Laccaria japonica* colonising seedlings of *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza*, 9(3), 207–218. doi: 10.1007/s00572-019-00890-6.
- Zhang, Z. X. (1986). Determination of chlorophyll content of plants - acetone and ethanol mixture method. *Liaoning Agricultural Science*, 3, 26–28.
- Zhou Q., Li D., Xia S., Chen Z., Wang B. y Wu J. (2021). Plant–rodent interactions after a heavy snowfall decrease plant regeneration and soil carbon emission in an old-growth forest. *Forest Ecosystem*, 8(30), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40663-021-00310-2>.
- Zhu, Xian-Can, Song Feng-Bin, Liu Sheng-Qun y Liu Tie-Dong. (2011). Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on photosynthesis and water status of maize under high temperature stress. *Plant Soil*, 346, 189–199. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0809-8>.