



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA DEL MICROBIOMA
ASOCIADO A ECTOMICORRIZAS Y SUPERVIVENCIA EN
CAMPO DE DOS PINOS INOCULADOS CON
Suillus pungens y *Thelephora terrestris***

MARÍA DEL ROSARIO CARDOSO VILLANUEVA

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: **Caracterización metagenómica del microbioma asociado a ectomicorrizas y supervivencia en campo de dos pinos inoculados con *Suillus pungens* y *Thelephora terrestris***, realizada por la alumna: MARÍA DEL ROSARIO CARDOSO VILLANUEVA, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

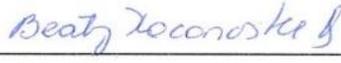
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESORA



DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES

ASESOR

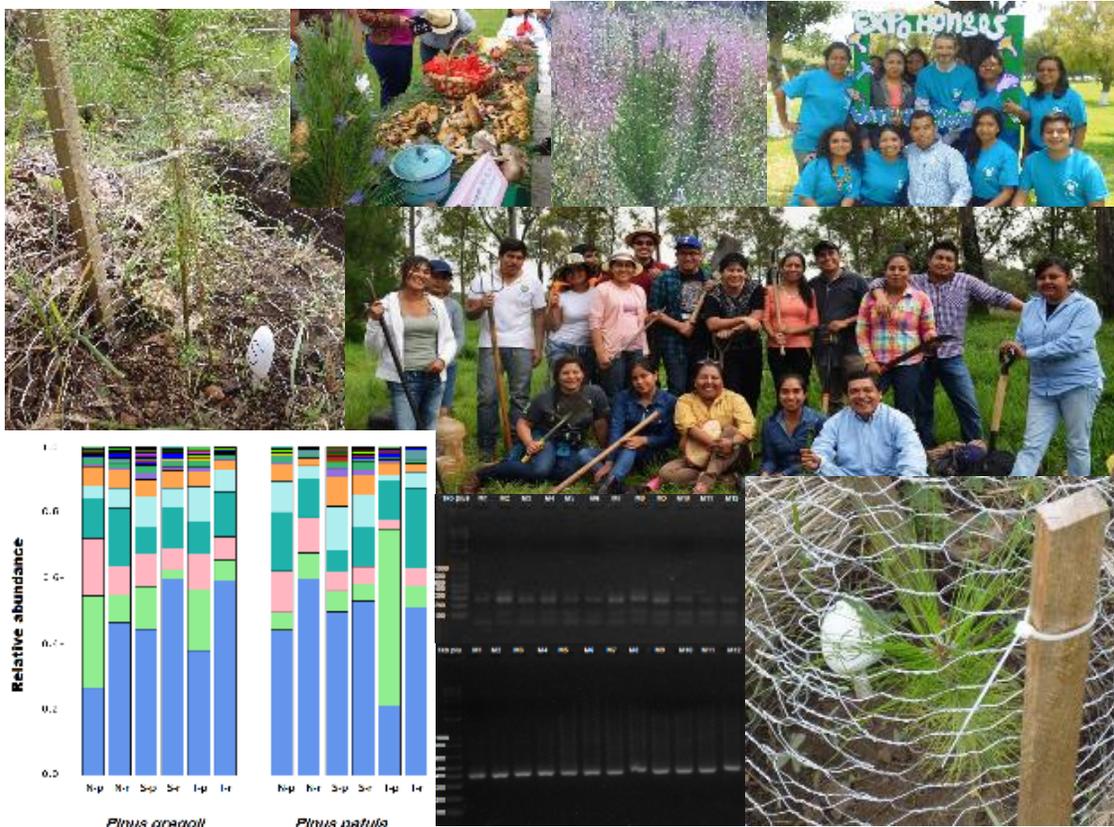


DR. VÍCTOR MANUEL CETINA ALCALÁ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2017



Esta tesis formó parte del **Proyecto CONACyT 2014-Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales 246674 “Biotecnologías de los hongos comestibles ectomicorrízicos y su impacto en la mitigación del cambio climático y desarrollo forestal sustentable”**, al cual se agradece su apoyo.



**CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA DEL MICROBIOMA ASOCIADO A
ECTOMICORRIZAS Y SUPERVIVENCIA EN CAMPO DE DOS PINOS
INOCULADOS CON *Suillus pungens* y *Thelephora terrestris***

María del Rosario Cardoso Villanueva, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Existe un gran número de microorganismos en el suelo los cuales desempeñan una función importante dentro de los ecosistemas. Los hongos se involucran en diferentes procesos que regulan el reciclaje de nutrientes, al mismo tiempo establecen relaciones con diferentes componentes del ecosistema. La simbiosis ectomicorrízica es una asociación establecida entre hongos y especies forestales que son de gran importancia y son fundamentales para el establecimiento de los árboles en campo. Dada la complejidad en la estructura de comunidades microbianas en el suelo, en la actualidad no se conoce en su totalidad su composición, sin embargo cada vez se diseñan métodos que promueven dicho conocimiento. La metagenómica es una herramienta de la biología molecular que permite conocer la riqueza de especies no cultivables. En el presente trabajo se evaluó la composición del microbioma asociado a ectomicorrizas de dos pinos neotropicales por medio de métodos metagenómicos. La composición mostró diferencias dependientes del fitobionte, el micobionte y el área de muestreo. Por otra parte, se evaluó la supervivencia en campo de árboles micorrizados en invernadero durante un año, en un área con presencia de eucaliptos maduros. Estos resultados señalaron un efecto alelopático, ya que las plantas establecidas en el área donde estaba presente *Eucalyptus camaldulensis* mostró un menor crecimiento y menor porcentaje de supervivencia en comparación con áreas sin eucalipto. La micorriza asimismo fue un factor de atenuación de dicha alelopatía. Es de gran importancia realizar trabajos que permitan conocer la riqueza de especies microbianas asociadas a ectomicorrizas ya que en un futuro se puede detectar cuales son las mejores combinaciones fitobionte-micobionte para la restauración de áreas con árboles exóticos como el eucalipto y sustituirlos a futuro con árboles nativos.

Palabras clave: hongos ectomicorrízicos, biotecnología, hongos comestibles, supervivencia en campo, alelopatía.

**METAGENOMIC CHARACTERIZATION OF MICROBIOMA ASSOCIATED TO
ECTOMYCORRHIZAE AND SURVIVAL OF TWO PINES IN FIELD
INOCULATED WITH *Suillus pungens* and *Thelephora terrestris***

María del Rosario Cardoso Villanueva, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

There is a large number of microorganisms in the soil which play an important role within ecosystems. Fungi are involved in different processes that regulate the recycling of nutrients, while establishing relationships with different components of the ecosystem. The ectomycorrhizal symbiosis is an association established between fungi and forest species that is of great importance and is fundamental for the establishment of trees in the field. Given the complexity in the structure of microbial communities in the soil, at present its composition is not fully known, however, methods are increasingly being developed to promote this knowledge. Metagenomics is a tool of molecular biology that allows knowing the richness of non-cultivable species. In the present work the composition of the microbiome associated to ectomycorrhizae of two neotropical pines was evaluated by means of metagenomics. The composition showed differences depending on the phytobiont, the mycobiont and the sampling area. On the other hand, the survival in field of mycorrhizal trees in greenhouse during a year, in an area with mature eucalyptus was evaluated. These results indicated an allelopathic effect, since the plants established in the area where *Eucalyptus camaldulensis* was present showed lower growth and lower percentage of survival compared to areas without eucalyptus. Interestingly, mycorrhiza was also a factor attenuating this allelopathy. It is of great importance to carry out works that allow to know the richness of microbial species associated to ectomycorrhizae since in the future it might be possible to detect which are the best combinations phytobiont-mycobiont for the restoration of areas with exotic trees like the eucalyptus; and to replace them with native trees.

Key words: ectomycorrhizal fungi, biotechnology, edible fungi, field survival, allelopathy.



AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mi investigación.

Al Colegio de Postgraduados, por incluirme en su lista de alumnos y colaborar en la generación de conocimiento útil para el campo mexicano.

Al DR. Jesús Pérez Moreno, por ser una extraordinaria persona, por brindarme su valiosa amistad, y por inspirarme a disfrutar cada día el conocimiento que la vida nos pone enfrente.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, por su ayuda fundamental en la realización de este trabajo, y por abrirme las puertas de su Laboratorio en el CINVESTAV, Zacatenco.

Al DR. Víctor Manuel Cetina Alcalá, por su colaboración en este trabajo de investigación y por siempre mostrar disponibilidad.

Al Dr. Enrique Ojeda Trejo, por sus contribuciones a este trabajo de investigación.

Al M. en C. Eduardo Sánchez García por su ayuda fundamental para la realización del análisis metagenómico.

A los alumnos del área de Microbiología de suelo, por siempre ayudarme en lo que les solicitaba.





DEDICATORIA

A mis padres, por haberme dado la vida y por demostrarme que con esfuerzo y sacrificio se pueden lograr grandes cosas.

A mi esposo Jahir, por siempre apoyarme en todo lo que necesito, por su amor, comprensión y paciencia, y por demostrarme cada día que con amor se pueden superar todos los obstáculos.

A mi pequeño Santiago, por ser desde su primer instante la inspiración de mi vida y el motivo por el que quiero seguir realizando grandes cosas.

A mis hermanos y sobrinos por ayudarme a entender que la familia es indispensable para realizar todo lo que la vida nos tiene preparado.

A mis amigos: Paulina, Natalie, Araceli, Faustino, Karla, Abigail, Claudia por estar siempre a mi lado y por compartir momentos maravillosos el tiempo que estuve en el Colegio de Postgraduados.



CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
CONTENIDO	viii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2 LITERATURA CITADA.....	3
CAPÍTULO 2	5
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	5
2.1 Objetivo general.....	5
2.2 Objetivos particulares.....	5
2.3 Hipótesis particulares.....	6
CAPÍTULO 3	7
CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA DEL MICROBIOMA ASOCIADO A ECTOMICORRIZAS.....	7
3.1 RESUMEN.....	7
3.1 ABSTRACT.....	8
3.2 INTRODUCCIÓN.....	9
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.3.1 Toma de muestras de suelo y raíz.....	11
3.3.2 Inoculación de pinos.....	11
3.3.3 Extracción de ADN.....	12
3.3.4 Generación de librerías para secuenciación.....	12
3.3.5 Variables evaluadas.....	13
3.4 RESULTADOS.....	13
3.4.1 Generación de librerías 16S y 18S.....	15
3.4.2 Secuenciación de muestras.....	16
3.4.3 Distribución taxonómica.....	16
3.4.3.1 Bacterias.....	16
3.4.3.2 Hongos.....	19
3.4.4 Abundancia relativa basada en heatmaps.....	22
3.4.4.1 Bacterias.....	22
3.4.4.2 Hongos.....	25
3.4.5 Diversidad.....	29
3.4.5.1 Bacterias.....	29
3.4.5.2 Hongos.....	32
3.5 DISCUSIÓN.....	34

3.6	CONCLUSIONES.....	41
3.7	LITERATURA CITADA.....	42
	CAPÍTULO 4.....	45
	SUPERVIVENCIA EN CAMPO DE DOS PINOS INOCULADOS CON <i>Suillus</i> <i>pungens</i> y <i>Thelephora terrestres</i>	45
4.1	RESUMEN.....	45
4.2	INTRODUCCIÓN.....	47
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
4.3.1	Zona de estudio.....	48
4.3.2	Material vegetativo.....	49
4.3.3	Diseño experimental.....	49
4.3.4	Montaje del experimento.....	50
4.3.5	Crecimiento vegetal.....	51
4.3.5.1	Altura.....	51
4.3.5.2	Diámetro de tallo.....	52
4.3.6	Supervivencia.....	52
4.4	RESULTADOS.....	53
4.4.1	Altura.....	53
4.4.1.1	Primer bioensayo.....	53
4.4.1.2	Segundo bioensayo.....	54
4.4.1.3	Tercer bioensayo.....	55
4.4.2	Diámetro de tallo.....	56
4.4.2.1	Primer bioensayo.....	56
4.4.2.2	Segundo bioensayo.....	57
4.4.2.3	Tercer bioensayo.....	58
4.4.3	Supervivencia.....	59
4.4.3.1	Primer bioensayo.....	59
4.4.3.2	Segundo bioensayo.....	60
4.4.3.3	Tercer bioensayo.....	60
4.5	DISCUSIÓN.....	61
4.6	CONCLUSINES.....	63
4.7	LITERATURA CITADA.....	64
	CAPÍTULO 5.....	67
	CONCLUSIONES GENERALES.....	67

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 3.1 Índices de diversidad de familias de bacterias calculadas a partir de datos normalizados en dos especies de pino, ectomicorrizados o no con dos hongos en dos áreas.....	29
Cuadro 3.2 Índices de diversidad de familias de hongos calculadas a partir de datos normalizados en dos especies de pino, ectomicorrizados o no con dos hongos en dos áreas.....	32
Cuadro 4.1 Porcentajes de supervivencia de <i>Pinus greggii</i> y <i>P. patula</i> en áreas con presencia de árboles maduros de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> en campo, durante 12 meses con evaluaciones bimensuales. n=7.....	59

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 3.1	Raíces ectomicorrizadas utilizadas en los tratamientos: a) Raíz de <i>Pinus greggii</i> micorrizada con <i>Thlephora terrestris</i> , b) Raíz de <i>Pinus patula</i> micorrizada con <i>Suillus pungens</i>	14
Figura 3.2	Diferenciación de áreas de muestreo: A) raíz no micorrizada y B) raíz ectomicorrizada.....	14
Figura 3.3	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR 16SV3 de las muestras evaluadas.....	15
Figura 3.4	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR 18S de las muestras evaluadas.....	15
Figura 3.5	Abundancias relativas de bacterias agrupadas a nivel de orden. La primera letra se refiere al tratamiento (N=No micorrizado, S= <i>Suillus pungens</i> y T= <i>Thelephora terrestris</i>) y la segunda señala la zona de muestreo (r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera).....	17
Figura 3.6	Abundancias relativas de hongos identificados a nivel de orden, excepto en dos casos o no identificadas. La letra debajo de cada barra se refiere al tratamiento (N= plantas no micorrizadas, S= plantas micorrizadas con <i>Suillus pungens</i> y T= plantas micorrizadas con <i>Thelephora terrestris</i>) y la letra minúscula a la zona de muestreo (r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera).....	19
Figura 3.7	Distribución de abundancias relativas de OTUs de bacterias a nivel de familia. La primera letra se refiere al tratamiento (N=No micorrizado, S= <i>Suillus pungens</i> y T= <i>Thelephora terrestris</i>) y la segunda señala la zona de muestreo ((r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera).....	22
Figura 3.8	Distribución de abundancias relativas de OTUs de hongos a nivel de familia. La primera letra se refiere al tratamiento (N=No micorrizado, S= <i>Suillus pungens</i> y T= <i>Thelephora terrestris</i>) y la segunda señala la zona de muestreo (r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera).....	25
Figura 4.1	Sitio donde se realizó la plantación de los árboles para el experimento: A) Vista del área del jardín botánico donde plantaron los árboles, B) Zona con eucalipto y C) Zona sin eucalipto.....	49
Figura 4.2	Proceso de selección de plantas y plantación en campo: A) Selección de plantas con más de un 80% de micorrización, B) y C) Árboles micorrizados y no micorrizados para cada tratamiento, D) y E) Plantación en campo y F) Tina de Nezahualcóyotl para captación de agua de lluvia.....	51

Figura 4.3	Crecimiento de plantas de <i>Pinus greggii</i> no micorrizadas y micorrizadas con <i>Suillus pungens</i> en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones bimensuales. n=7.....	53
Figura 4.4	Crecimiento de plantas de <i>Pinus patula</i> no micorrizadas y micorrizadas con <i>Suillus pungens</i> y <i>Thelephora terrestris</i> en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones bimensuales. n=7.....	55
Figura 4.5	Crecimiento de plantas de <i>Pinus greggii</i> no micorrizadas y micorrizadas con <i>Thelephora terrestris</i> en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones bimensuales. n=7.....	55
Figura 4.6	Desarrollo de diámetro de tallo de plantas de <i>Pinus greggii</i> no micorrizadas y micorrizadas con <i>Suillus pungens</i> en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones cuatrimestrales. n=7.....	56
Figura 4.7	Desarrollo de diámetro de tallo de plantas de <i>Pinus patula</i> no micorrizadas y micorrizadas con <i>Suillus pungens</i> y <i>Thelephora terrestris</i> en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones cuatrimestrales. n=7.....	57
Figura 4.8	Desarrollo de diámetro de tallo de plantas de <i>Pinus greggii</i> no micorrizadas y micorrizadas con <i>Suillus pungens</i> en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones cuatrimestrales. n=7.....	58

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La biodiversidad del suelo juega un papel muy importante en el funcionamiento de los ecosistemas, algunos de los componentes del suelo forman asociaciones simbióticas con especies de árboles de bosques templados y boreales. Existen hongos del suelo que establecen una relación con las raíces de los árboles que ahí se encuentran, esta asociación se conoce como ectomicorriza y funciona como reguladora de la productividad de los bosques (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010).

Los hongos ectomicorrízicos desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas forestales, dado que se facilita la absorción de nutrimentos de la planta, particularmente mejoran la absorción vegetal de nutrientes inorgánicos, permiten el uso de nutrientes orgánicos y pueden proteger a la planta frente a altas concentraciones de metales pesados y frente a patógenos (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012; Sell *et al.*, 2005; Szuba, 2015). El beneficio que obtienen los hongos simbiotes se basa en la protección física ofrecida por la raíz y en la translocación de compuestos carbonados de la planta al hongo. De hecho, una fracción relevante de los asimilados fotosintéticos, que puede llegar hasta el 30% en el caso de plántulas, es transferida a los hongos ectomicorrízicos (Buscardo *et al.* 2009). La supervivencia y el crecimiento de los árboles que presentan esta asociación, está directamente relacionado con la colonización ectomicorrízica (Mestre *et al.*, 2011).

En los ecosistemas naturales sin perturbar, la presencia de una asociación micorrízica no sólo influye sobre la habilidad de la planta hospedera para utilizar con mayor eficacia el agua y los nutrimentos almacenados en el suelo, sino que los especímenes vegetales que forman

micorrizas tienden a ser más competitivas, y por lo tanto, aseguran su permanencia dentro del ecosistema, en comparación con otras especies donde no se entabla este tipo de asociación (Zulueta *et al.* 2007). Las micorrizas confieren a las plantas una mayor capacidad de resistencia/tolerancia a estreses ambientales, tanto de tipo biótico como abiótico (Reisa *et al.*, 2012).

El estudio ecológico de poblaciones ectomicorrícicas de especies nativas es limitado, por lo que es necesario realizar análisis de estas poblaciones en relación con sus ambientes edáficos (Serralde y Ramírez, 2004). La composición de especies ectomicorrizas en suelos forestales no se han desarrollado de forma completa, debido a que la mayoría de estas especies fúngicas no puede ser cultivada en el laboratorio. Además de que su estudio solo se ha basado en el análisis de los esporomas, que se logran observar solo en la fase sexual del organismo, y en algunas especies estas estructuras se encuentran debajo del suelo (Rodríguez-Tovar, *et al.*, 2004). El estudio molecular de ectomicorrizas puede complementar el análisis de la metagenómica del suelo, ya que actualmente la mayoría de las especies que habitan en el suelo es desconocida, esto debido a que es difícil su cultivo en laboratorio. La metagenómica utiliza marcadores de ADN que son segmentos de ADN cuyo polimorfismo se puede determinar utilizando métodos de laboratorio (Robledo-Arnuncio y González, 2009).

El presente trabajo pretende evaluar el efecto de la micorrización en árboles de importancia forestal, enfocándose principalmente en la supervivencia que presentan al ser establecidos en campo, de igual forma se espera observar un posible efecto alelopático producido por árboles de eucalipto presentes en la zona de plantación.

Por otra parte se pretende también realizar un estudio metagenómico de las comunidades microbianas asociadas a las ectomicorrizas de dos especies de pino de importancia forestal en México, y detectar los factores que influyen en la composición de estas comunidades.

1.2 LITERATURA CITADA

Buscardo, E., Rodríguez-Echeverría, S., De Angelis, P., Freitas, H. 2009. Comunidades de hongos ectomicorrízicos en ambientes propensos al fuego: compañeros esenciales para el restablecimiento de pinares mediterráneos. *Ecosistemas*. Vol.18. No 2. 55-63.

Camargo-Ricalde, S. L., N. M. Montaña, C. J. De la Rosa-Mera y S. A. Montaña A. 2012. Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria* 13: 1-19.

Carrasco-Hernández, V., J. Pérez-Moreno, V. Espinosa-Hernández. J. J. Almaraz-Suárez, R. Quintero-Lizaola y M. Torres-Aquino. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4: 567-577.

Mestre, M. C., I. C. A. Rosa, S.V.B. Safar, D. Libkind, y S. B. Fontenla. 2011. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *Microbiology Ecology* 78: 531–541.

Reisa, F. S., I. C.F.R. Ferreira y A. Martinsb. 2012. Effect of the mycorrhizal symbiosis time in the antioxidant activity of fungi and *Pinus pinaster* roots, stems and leaves. *Industrial Crops and Products* 35: 211– 216.

- Robledo-Arnuncio, J. J. y S. C. González Martínez. 2009. Marcadores moleculares y ecología del movimiento. *Ecosistemas* 18: 44-51.
- Rodríguez-Tovar, A., B. Xoconostle-Cásarez y M. Valdés. 2004. Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 267 – 278.
- Sell, J., Kayser, A., Schulin, R., Brunner, I., 2005. Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant Soil*. 277, 245–253
- Serralde O., A. M. y Ramírez G., M. M. 2004. Análisis de Poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica* 5: 31-40.
- Szuba, A. 2015, Ectomycorrhiza of *Populus*. *Forest Ecology and Management* 347: 156–169.
- Zulueta, R. R, Trejo, A. D., Trigos, L. A. 2007. El maravilloso mundo de los Hongos. Universidad Veracruzana. Xalapa Veracruz. México. 179 p.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Caracterizar a nivel metagenómico el microbioma asociado a raíces ectomicorrizadas o no con *Suillus pungens* y *Thelephora terrestris* de *Pinus greggii* Engelm y *Pinus patula* Schl. et Cham y evaluar su supervivencia en campo.

2.2 Objetivos particulares

- Realizar la extracción de ADN metagenómico asociado a las raíces ectomicorrizadas o no, en distintas áreas de dos especies de pino.
- Generar librerías 16S y 18S para el estudio de las comunidades microbianas asociadas a ectomicorrizas.
- Identificar las poblaciones microbianas de bacterias y hongos a nivel de orden y familia a partir de los datos de secuenciación.
- Efectuar una plantación de pinos micorrizados y no micorrizados para evaluar su supervivencia en campo en un área con y sin presencia de eucaliptos maduros (*Eucalyptus camaldulensis*).
- Evaluar características de crecimiento de los pinos durante un año en el ensayo en campo.
- Determinar las diferencias de supervivencia relacionadas con los fitobiontes y micobiontes estudiados en presencia o ausencia de árboles de eucalipto.

2.3 Hipótesis particulares

- El ADN metagenómico presentará una composición diferente influenciada por los fitobiontes, micobiontes y áreas de estudio.
- La generación de librerías presentará diferencias en cuanto al número de secuencias tanto para la región 16S como para la 18S.
- Las plantas micorrizadas tendrán un mayor desarrollo, crecimiento y supervivencia en campo en comparación a las no micorrizadas.
- Existirá un efecto alelopático en campo originado por los eucaliptos, en plantas micorrizadas o no de *Pinus greggii* y *Pinus patula*.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA DEL MICROBIOMA ASOCIADO A ECTOMICORRIZAS

3.1 RESUMEN

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista establecida entre más de 20,000 especies de hongos y 5,000 especies de plantas. Esta asociación regula el reciclaje nutrimental en los ecosistemas naturales. Las raíces ectomicorrizadas se asocian con comunidades bacterianas y fúngicas que desempeñan una función importante para la salud, supervivencia y el crecimiento de especies forestales. Sin embargo, se han realizado pocos estudios relacionados con los factores que modifican dichas comunidades microbianas asociadas con las ectomicorrizas, principalmente en el Neotrópico. En este trabajo se evaluó con técnicas metagenómicas, la influencia de dos fitobiontes (*Pinus patula* y *Pinus greggii*) y dos micobiontes (*Suillus pungens* y *Thelephora terrestris*) en la composición del microbioma asociado con sus ectomicorrizas. Las muestras evaluadas pertenecieron a dos áreas, para las plantas no micorrizadas se utilizó la raíz y la rizosfera; y para las plantas micorrizadas las ectomicorrizas y la ectomicorrizosfera. En la comunidad bacteriana se observó la presencia de 8 OTUs dominantes que ocuparon alrededor de 90%, que incluyeron: Bacillales, Gemmatimonadales y 6 grupos no clasificados. Para la comunidad fúngica se observó que 95% de la abundancia relativa estuvo compuesta por 3 OTUs: Hypocreales, Sordariales y Eurotiales. Se identificaron 79 OTUs a nivel de familia para bacterias y 32 OTUs para hongos, los cuales presentaron una abundancia relativa superior a 1% en al menos uno de los tratamientos. En general, se observó una mayor diversidad bacteriana en *Pinus greggii* que

en *Pinus patula*, mientras que en la diversidad fúngica se observó una tendencia contraria. Los micobiontes presentaron diferencias al asociarse con los fitobiontes, *Suillus pungens* incrementó la diversidad microbiana en *Pinus greggii*, mientras que *Thelephora terrestris* favoreció la de *Pinus patula*. Este trabajo demuestra que la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas asociada a ectomicorrizas Neotropicales es influenciada por los fitobiontes, los micobiontes y las áreas.

Palabras clave: Metagenómica, microbioma, simbiosis ectomicorrízica, Neotropico.

3.1 ABSTRACT

The ectomycorrhiza is a mutualist symbiosis established between more than 20,000 species of fungi and 5,000 species of plants. This association regulates the nutrient cycling in natural ecosystems. Ectomycorrhizal roots are associated with bacterial and fungal communities that play an important role in the health, survival and growth of forest species. However, few studies have been done related to the factors that modify these microbial communities associated with ectomycorrhizae, mainly in the Neotropics. The influence of two phytobionts (*Pinus patula* and *Pinus greggii*) and two mycobionts (*Suillus pungens* and *Thelephora terrestris*) in the composition of the microbiome associated with their ectomycorrhizae were evaluated with metagenomics. The evaluated samples belonged to two areas, for the non-mycorrhizal plants the root and rhizosphere were used, and for the mycorrhizal plants the ectomycorrhizae and the ectomycorrhizosphere. In the bacterial community we observed the presence of 8 dominant OTUs that comprised about 90%, which included: Bacillales, Gemmatimonadales and 6 unclassified groups. For the fungal community, 95% of the relative abundance was composed of 3 OTUs: Hypocreales, Sordariales and Eurotiales. We identified

79 OTUs at the family level for bacteria and 32 OTUs for fungi, which had a relative abundance greater than 1% in at least one of the treatments. It was observed a greater bacterial diversity in *Pinus greggii* than in *Pinus patula*, whereas in the fungal diversity an opposite tendency was observed. Mycobionts showed differences when associated with phytobionts, for example *Suillus pungens* increased microbial diversity in *Pinus greggii*, while *Thelephora terrestris* favored that of *Pinus patula*. This work demonstrates that the structure of bacterial and fungal communities associated with Neotropical ectomycorrhizae is influenced by phytobionts, mycobionts and areas.

Key words: Metagenomics, microbiome, ectomycorrhizal symbiosis, Neotropics.

3.2 INTRODUCCIÓN

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista que se establece entre más de 20,000 especies de hongos y unas 5,000 especies de plantas (Comandini *et al.*, 2012). La importancia de estas plantas es su enorme distribución biogeográfica, la cual incluye áreas boreales, templadas, subtropicales y tropicales (Smith and Read, 2008; McGuire *et al.*, 2013). La simbiosis ectomicorrízica regula el reciclaje nutrimental en los ecosistemas en los cuales se encuentra. Los hongos ectomicorrízicos son un grupo filogenéticamente diverso, que incluye Basidiomycetes, Ascomycetes y Zygomycetes principalmente incluidos en los órdenes Pezizales, Agaricales, Helotiales, Boletales, y Cantharellales (Tedersoo *et al.*, 2010).

Es de gran importancia realizar estudios de la riqueza biológica y genética microbiana, ya que aunque es la más abundante dentro de los ecosistemas, en la actualidad la mayoría de los estudios se enfocan en el estudio de las especies de flora y fauna (Herrera y Castellanos, 2007). El estudio de los microorganismos sólo ha sido enfocado a las especies que

representan in interés antropocéntrico, ya que estos pueden ser aislado y cultivados con métodos tradicionales en microbiología. Sin embargo, la gran mayoría de microorganismos son cultivables, por lo que el estudio de especies nativas es limitado (González *et al.*, 2012; Martínez-Alonso y Gaju, 2005). Una forma de estudiar la diversidad microbiana es mediante estudios moleculares como la secuenciación de ARN ribosomal. La metagenómica es una aplicación de la biología molecular que permite aislar, identificar y caracterizar material genético que proviene de muestras ambientales. El metagenoma es el conjunto de información genética de los microorganismos que se desarrollan en un hábitat determinado. El estudio metagenómico se basa en marcadores moleculares como ácidos grasos de fosfolípidos y ácidos nucleicos. Ambos se encuentran en todas la células y se pueden extraer directamente de las muestras de suelo (Herrera y Castellanos, 2007; Nogales, 2005). Los estudios metagenómicos permiten la identificación de genes en los microorganismos que son clave para conocer su importancia metabólica y funcional dentro del ecosistema. Usando técnicas moleculares se pueden identificar genes funcionales clave en los procesos importantes del suelo (Nogales, 2005). Aunque las comunidades bacterianas juegan un papel importante en el estado de salud, crecimiento y supervivencia se sus huéspedes, no se ha investigado de gran manera investigaciones que relacionen la estructura del microbioma asociado a las raíces de plantas perenes en zonas naturales (Shakya *et al.* 2013).

Las comunidades bacterianas y fúngicas presentes en las raíces ectomicorrizadas juegan un papel central en la salud, supervivencia y crecimiento de árboles de importancia forestal. Sin embargo, los factores que modulan la estructura de dichas comunidades han recibido escasa atención a la fecha, principalmente en árboles Neotropicales. En el presente trabajo se estudió el efecto de los micobiontes, los fitobiontes y dos áreas de influencia de las raíces

ectomicorrizadas en las comunidades bacterianas y fúngicas, esperando encontrar una diferencia entre la composición de bacterias y hongos asociados a los diferentes fitobiontes y micobiontes utilizados en el estudio.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Toma de muestras de suelo y raíz

Se recolectaron muestras compuestas de suelo rizosférico de plantas ectomicorrizadas y no ectomicorrizadas, procedentes de tres árboles en total para cada caso. Las muestras consistieron en dos áreas diferentes. En las plantas no micorrizadas se muestreó la raíz y el suelo adherido a la misma (abreviada como r) y el suelo en el área de influencia de la raíz (en los 3 mm aledaños) denominado rizosfera (abreviada como rz). En el caso de las plantas ectomicorrizadas, se muestrearon las mismas áreas, a las cuales se les denominó ectomicorriza (abreviada como ec) y ectomicorrizosfera (ez), respectivamente. Los tratamientos incluyeron adicionalmente dos especies de pinos, *Pinus greggii* Engelm (Pg) y *Pinus patula* Schl. et Cham. (Pp); los cuales se encontraban micorrizados con dos especies de hongos cada uno *Suillus pungens* (Sp) y *Thelephora terrestris* (Tt).

3.3.2 Inoculación de pinos

Los pinos fueron inoculados con 106 a 108 esporas por planta de cada especie ectomicorrízica. Para la toma de muestras de suelo se seleccionaron aquellas plantas con porcentajes de micorrización superiores al 80% de acuerdo con los métodos utilizados por Carrasco-Hernández *et. al.* (2011) y mantenidos en invernadero durante 2 años y medio. En total se evaluaron entonces muestras de 12 tratamientos, seis para cada especie de pino: i) rizosfera de plantas no micorrizadas; ii) raíz de plantas no micorrizadas; iii)

ectomicorrizosfera de plantas micorrizadas con Sp; iv) ectomicorriza de plantas micorrizadas con Sp; v) ectomicorrizosfera de plantas micorrizadas con Tt; y vi) ectomicorriza de plantas micorrizadas con Tt.

3.3.3 Extracción de ADN

El ADN genómico se aisló de la raíz, rizosfera, ectomicorriza y ectomicorrizósfera, utilizando 200 mg molidos de muestra en nitrógeno líquido. Se utilizó el Kit Power Soil DNA Isolation kit marca Mo Bio (McGuire et al. 2013) con número de catálogo 12888-50, se extrajo el ADN total y se almacenó a -20 °C. Después de la extracción se realizó una evaluación de la calidad del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó la concentración por espectrometría en el NANODROP (Thermo Fisher Scientific).

3.3.4 Generación de librerías para secuenciación

Se desarrollaron librerías 16s y 18s para la evaluación del microbioma asociado a las raíces ectomirrizadas. Se utilizaron oligos diferentes para las amplificaciones tanto de 16s como de 18s. De igual manera para la diferenciación de las muestras se utilizó un barcode diferente. Las muestras se amplificaron en volúmenes de 50 µL por cuadruplicado teniendo como total 200 µL para cada muestra.

La amplificación por PCR se realizó utilizando el equipo Biometra TProfesional Termocycler. El programa empleado para la amplificación de las librerías de 16s por PCR fue: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95 °C, seguido de 25 ciclos (1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 30 segundos a 72 °C), con una extensión final de 72 °C por 5 minutos. Para las librerías 18s el programa utilizado fue: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95

°C, seguido de 25 ciclos (1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 62 °C y 30 segundos a 72 °C), con una extensión final de 72 °C por 5 minutos.

Se realizó la purificación de las secuencias y para la secuenciación se utilizó la muestra necesaria para tomar 1 µg de ADN por muestra. La secuenciación se realizó en un secuenciador Ion Torrent.

3.3.5 Variables evaluadas

El análisis de la secuencias se realizó un análisis de calidad y depuración de datos, posteriormente se acondicionaron los datos, se realizó un filtrado de homopolímeros y la selección de secuencias únicas. Una vez detectadas las secuencias únicas se realizó el alineamiento de secuencias con la base de datos de Silva en su versión 123.1, misma que contiene secuencias de subunidad pequeña ribosomal y tiene un total de 172,412 secuencias diferentes. Posteriormente se realizó la depuración de quimeras en donde se eliminaron secuencias formadas durante la amplificación por polimerización. La clasificación filogenética se realizó utilizando archivos de referencia incluidos en la base de datos de Silva. Para los procesos anteriores se utilizó la plataforma GALAXY, el Programa R y la plataforma Mothur (Kozich *et al.*, 2013).

3.4 RESULTADOS

Se realizó una análisis de la composición microbiana que incluye bacterias y hongos asociados a la raíz, rizosfera de plantas de *Pinus greggii* y *Pinus patula* no micorrizadas y las asociadas con la ectomicorriza y ectomicorrizosfera de los mismos pinos micorrizados con los hongos *Thelephora terrestris* y *Suillus pungens* (Figura 3.1).



Figura 3.1. Raíces ectomicorrizadas utilizadas en los tratamientos: a) Raíz de *Pinus greggii* micorrizada con *Thelephora terrestris*, b) Raíz de *Pinus patula* micorrizada con *Suillus pungens*.

Como definición de las áreas de estudio se tiene lo siguiente (Figura 3.2); i) rizosfera: suelo que rodea y está influenciado por las raíces de las plantas, ii) rizoplano: Superficie externa de las raíces junto con partículas y residuos de suelo, iii) ectomicorrizosfera: el suelo que rodea y está influenciado por raíces ectomicorrizadas y iv) ectomicorrizoplano: Superficie externa de la ectomicorriza junto con las partículas y residuos del suelo.

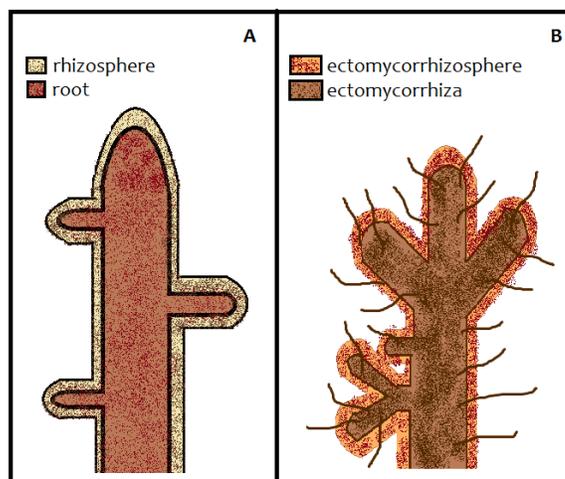


Figura 3.2. Diferenciación de áreas de muestreo: A) raíz no micorrizada y B) raíz ectomicorrizada.

3.4.1 Generación de librerías 16S y 18S

Después de realizada la amplificación por PCR, se realizó un gel de agarosa para corroborar que el fragmento amplificado correspondiera a las regiones útiles para la evaluación de las comunidades bacterianas y fúngicas. Para el caso de bacterias el fragmento amplificado corresponde a 300 pares de bases (Figura 3.3) y para el de hongo el fragmento es de 400 pb (Figura 3.4)

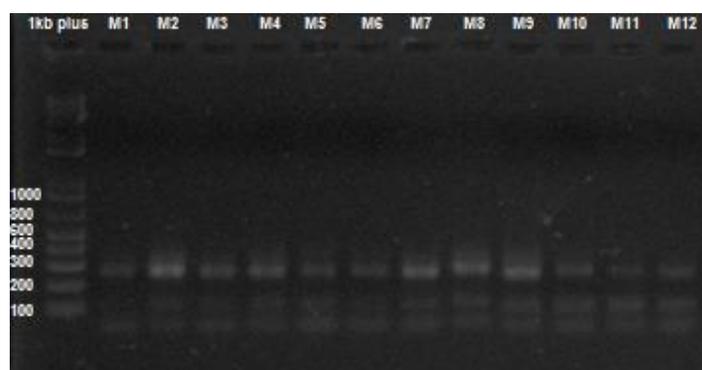


Figura 3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR 16SV3 de las muestras evaluadas.

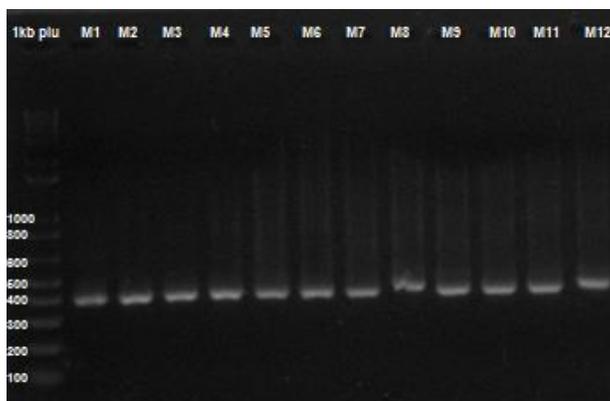


Figura 3.4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR 18S de las muestras evaluadas.

3.4.2 Secuenciación de muestras

Para el caso de bacterias de las 12 muestras totales para el estudio se contabilizaron un total de 3'132,496 secuencias crudas a las que se le evaluó la calidad de secuenciación, Durante el análisis de amplicones 16S la cantidad de secuencias se redujo a 2'182,556, después de esto se realizaron los procesos necesarios para la eliminación de secuencias inclasificables para quedar un total al final de 90,927 secuencias únicas que fueron utilizadas en los análisis posteriores.

Por otra parte, para los hongos de las 12 muestras totales para el estudio se contabilizaron un total de 1'271,750 secuencias crudas a las que se le evaluó la calidad de secuenciación, Durante el análisis la cantidad de secuencias se redujo a 862,244, después de esto se realizaron los procesos necesarios para la eliminación de secuencias inclasificables para quedar un total al final de 22,616 secuencias únicas que fueron utilizadas en los análisis posteriores.

3.4.3 DISTRIBUCIÓN TAXONÓMICA

3.4.3.1 Bacterias

El análisis del microbioma bacteriano asociado a las plantas ectomicorrizadas permitió observar abundancias relativas diferentes para cada grupo clasificado (Figura 3.5). Los OTUs del 1 al 6 estuvieron presentes en todos los tratamientos, entre estos se encuentran los Bacillales, el grupo bacteriano denominado subgrupo_6 y cuatro OTUs no clasificados.

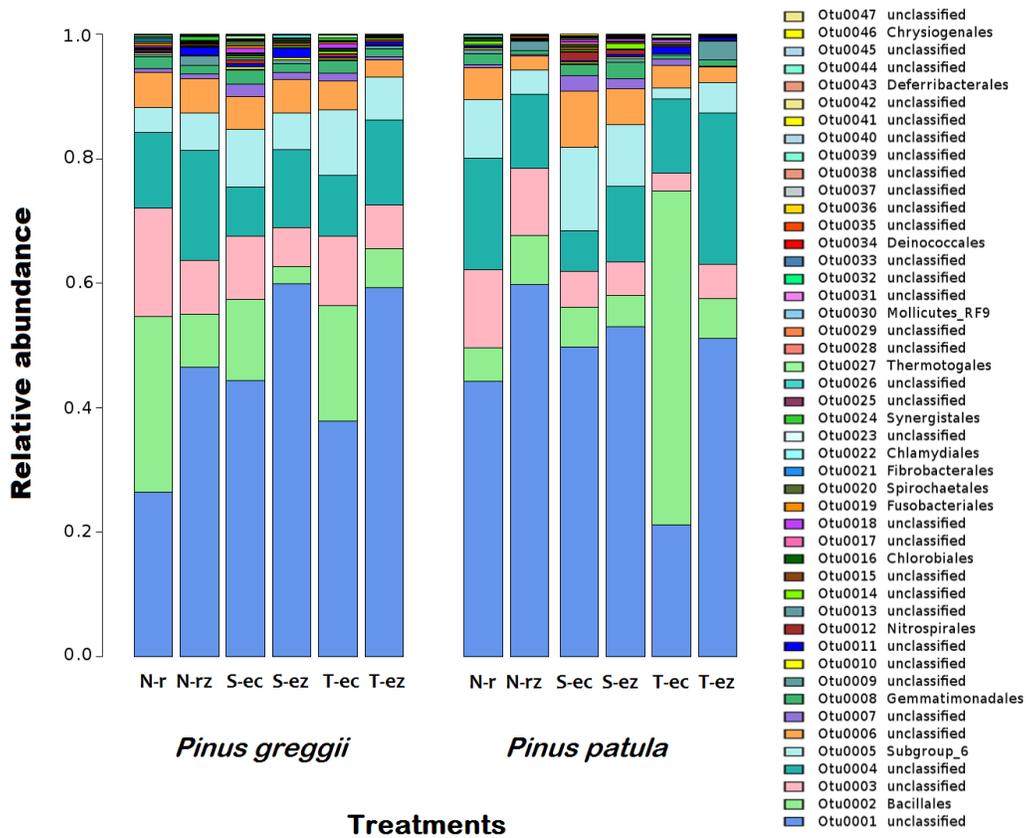


Figura 3.5. Abundancias relativas de bacterias agrupadas a nivel de orden. La primera letra se refiere al tratamiento (N=No micorrizado, S=*Suillus pungens* y T=*Thelephora terrestris*) y la segunda señala la zona de muestreo (r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera).

Los OTUs del 1 al 8, dentro de los que se incluyeron Bacillales, Gemmatimonadales, el grupo denominado subgrupo_6 y cinco grupos no clasificados ocuparon 90% o más de la abundancia relativa en todos los tratamientos. El restante 10% de la abundancia relativa estuvo ocupados por los OTUs 9 a 26, dentro de los que se incluyeron Nitrospirales, Chlorobiales, Fusobacteriales, Spirochaetales Fibrobacteriales Chamydiales, Synergistales y 11 OTUs no clasificados. Los OTUs 27 a 47 tuvieron una abundancia relativa muy baja y

dentro de ellos se encuentran Thermotogales, Mollicutes_RF9, Deinococcales, Deferribacteriales Chrysiogenales y 16 OTUs no clasificados (Figura 3.5).

FITOBIONTE

La mayor abundancia de OTUs fue registrada en el tratamiento de plantas micorrizadas con Sp tanto en *Pinus greggii* como en *Pinus patula*. En ambos fitobiontes se registraron 19 OTUs, sin embargo para cada especie vegetal se observó una composición distinta de OTUs. El OTU 7 fue detectado en todos los tratamientos de *Pinus greggii*, sin embargo no se detectó en dos tratamientos de *Pinus patula*, estos fueron la er de las plantas no micorrizadas y la er de las plantas inoculadas con Tt (Figura 2).

MICOBIONTE

En el caso del grupo Bacillales se observó una dramática diferencia en la abundancia relativa asociada con los micobiontes evaluados. Particularmente en el tratamiento de *Pinus patula* inoculado con Tt se observó que la proporción de este grupo fue hasta diez veces mayor comparado con el registrado en las plantas no micorrizadas. Sin embargo, en las plantas del mismo fitobionte inoculadas con Sp, aunque existe la presencia de este grupo la proporción fue similar a la registrada en las plantas no micorrizadas (Figura 3.5).

ÁREA

El OTU 1 no clasificado se presentó en mayor abundancia en la rizosfera de todos los tratamientos, independientemente del fitobionte y del micobionte. El OTU 4 tuvo una mayor abundancia en la r de las plantas micorrizadas con cualquiera del dos micobiontes, independientemente del fitobionte (Figura 3.5).

3.4.3.2 Hongos

Para el caso de los hongos asociados a las plantas ectomicorrizadas, de igual manera se analizaron el área de la ectomicorrizosfera y el ectomicorrizoplaneo y se observó una abundancia relativa distinta para cada grupo clasificado (Figura 3.6).

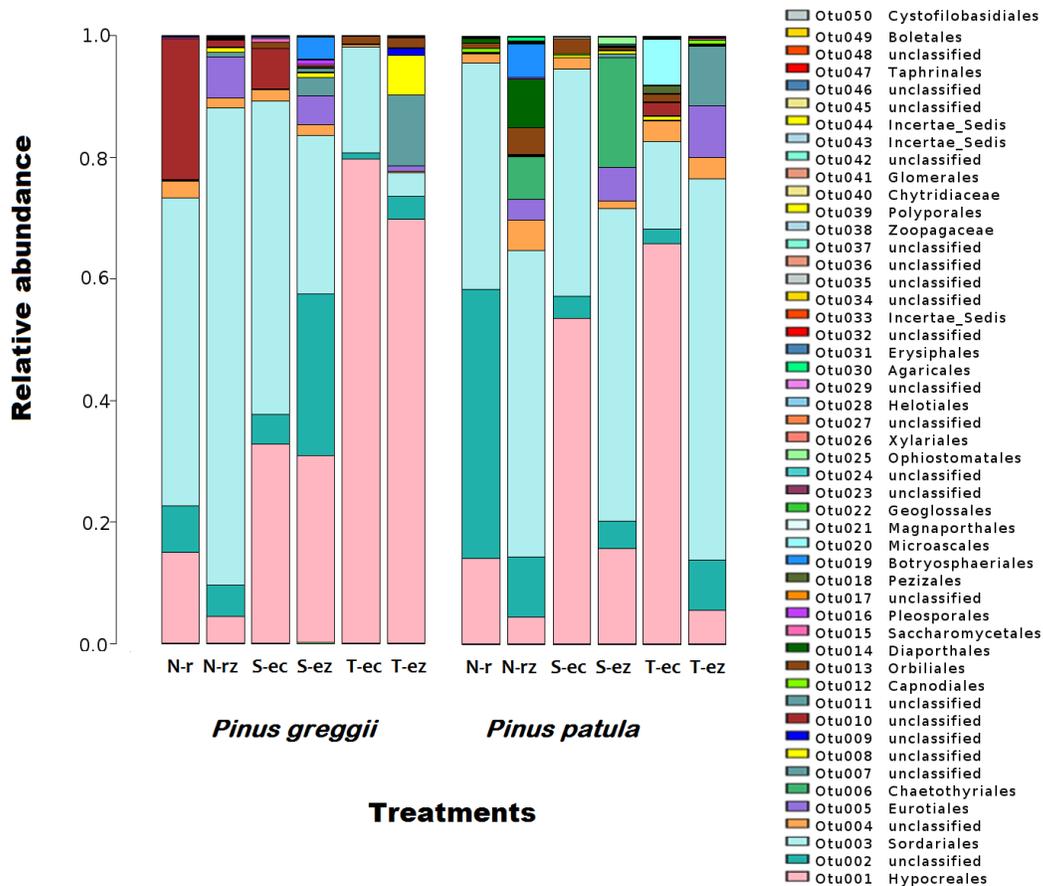


Figura 3.6. Abundancias relativas de hongos identificados a nivel de orden, excepto en dos casos o no identificadas. La letra debajo de cada barra se refiere al tratamiento (N= plantas no micorrizadas, S= plantas micorrizadas con *Suillus pungens* y T= plantas micorrizadas con *Thelephora terrestris*) y la letra minúscula a la zona de muestreo ((r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera).

Los OTUs del 1 al 4 estuvieron presentes en todos los tratamientos, estos fueron identificados como Hypocreales, Sordariales y dos OTUs no clasificados.

Los OTUs del 1 al 3, dentro de los que se incluyeron Hypocreales, Sordariales y Eurotiales constituyeron del 75 al 95% de la abundancia relativa en todos los tratamientos. El restante 25 a 5% de la abundancia relativa estuvo constituido por los OTUs 4 al 25, dentro de los que se incluyeron Chaetothyriales, Capnodiales, Orbiliales, Diaprrthales, Saccharomycetales, Pleosporales, Pezizales, Botryosphaeriales, Microascales, Geoglossales, Ophiostomatales y 10 OTUs no clasificados. Los OTUs 26 a 50 tuvieron una abundancia relativa muy baja y dentro de ellos se registraron Xylariales, Helotiales, Agaricales, Erysiphales, Incertae_Sedis1, Zoopagaceae, Polyporales, Chytridiaceae, Glomerales, Incertae_Sedis2, Incertae_Sedis3, Taprhinales, Boletales Cystofilobasidiales y 12 OTUs no clasificados (Figura 3.6).

FITOBIONTE

El fitobionte de igual manera determinó la distribución de algunos grupos de hongos. El OTU 11 solo se registró en *Pinus greggii* en el ep de plantas micorrizadas con Tt. Los Capnodiales solo fueron registrados en *Pinus patula* y no en *Pinus greggii*. Por otra parte el filo de los Saccaromycetales se registró sólo en plantas de *Pinus greggii* que estuvieron inoculadas con Sp, tanto en el ep como en la er. El grupo de Pleosporales de igual manera se registró sólo en plantas de *Pinus greggii*, en este caso se detectó en el ep de las plantas no micorrizadas y en la er de las plantas inoculadas con Sp. Los Orbiliales solo fueron registrados en plantas de *Pinus patula*, en este caso se presentaron sólo en el ep tanto de la de las plantas no micorrizadas como de las plantas micorrizadas con Sp y Tt. Los Chaetothyriales solo fueron

detectados en dos tratamientos de *Pinus patula*: la er de plantas inoculadas con Sp y la er de las no micorrizadas, y no se registraron en *Pinus greggii* (Figura 3.6).

MICOBIONTE

El OTU 4 estuvo presente en todos los tratamientos excepto en *Pinus greggii* inoculado con Tt. El OTU 7 solo fue detectado en 3 tratamientos de er, de *Pinus greggii* micorrizado con cualquiera de los 2 micobiontes y *Pinus patula* micorrizado con Tt (Figura 3.6).

ÁREA

De acuerdo con los resultados se observó que la presencia de algunos grupos estuvo determinada por el área en donde se realizó el muestro, es decir, la ectomicorrizosfera o el ectomicorrizoplaneo. La abundancia relativa de Hypocreales registrada en la er de *Pinus patula* fue dramáticamente menor en comparación con la observada en *Pinus greggii*. Un fenómeno similar se observó para dicho grupo de hongos en la ar de plantas inoculadas con Sp. Mientras tanto la abundancia relativa de dicho grupo fue similar en *Pinus greggii* y *Pinus patula* para ambas áreas evaluadas. En el caso de Sordariales se observó una abundancia relativa conspicuamente mayor en la er de *Pinus patula* micorrizada con Tt comparada con la er del mismo tratamiento en *Pinus greggii*. Una tendencia similar se observó para la misma área en plantas de *Pinus patula* micorrizadas con Sp en comparación con plantas de *Pinus greggii*, micorrizadas con el mismo hongo (Figura 3). Los Eurotiales fueron detectados exclusivamente en la er y no en ep para ambos micobiontes y fitobiontes evaluados. El OTU 8 fue registrado en *Pinus greggii* en los 3 tratamientos de er y en *Pinus patula* en la misma área inoculada con Tt. El OTU 10 solo estuvo presente en 4 tratamientos: en ambas áreas de *Pinus greggii* no inoculadas y en la er de plantas inoculadas con Sp (Figura 3.6).

3.4.4 ABUNDANCIA RELATIVA BASADA EN HEATMAPS

3.4.4.1 Bacterias

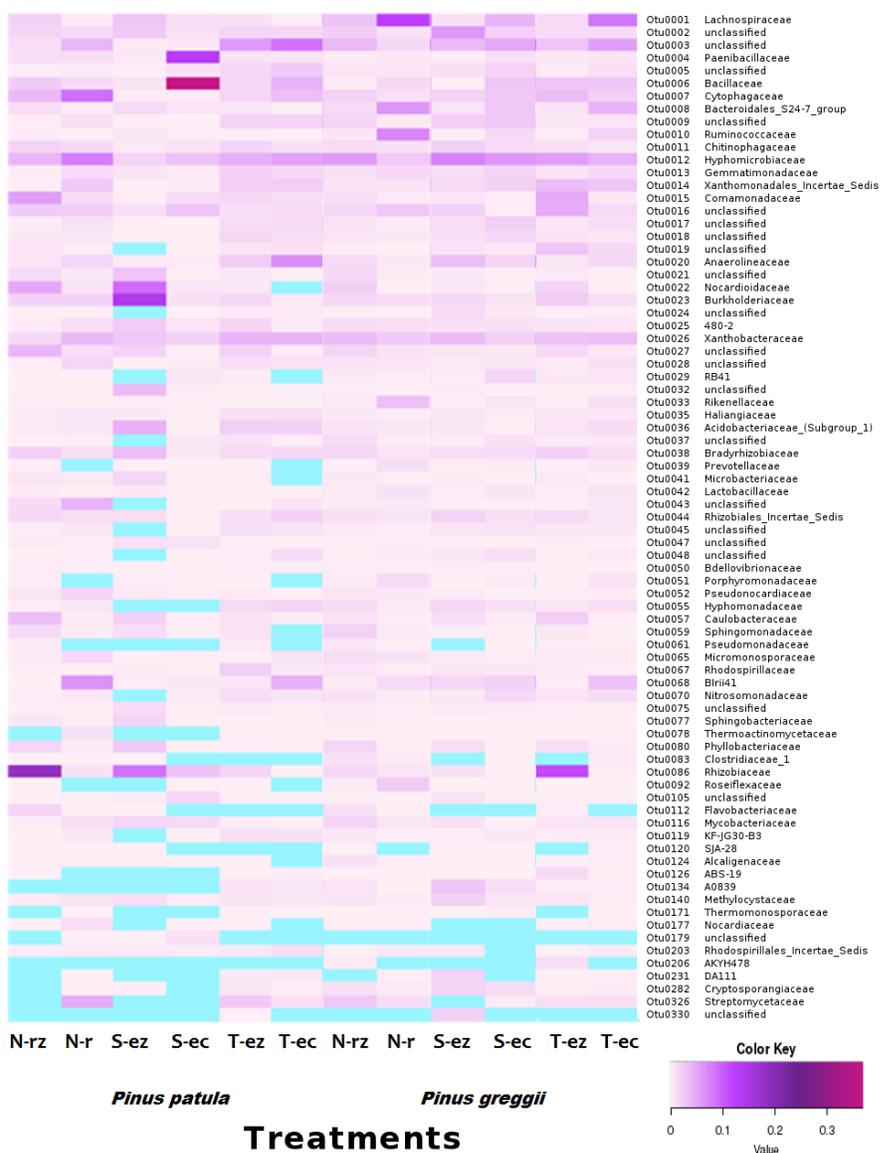


Figura 3.7. Distribución de abundancias relativas de OTUs de bacterias a nivel de familia.

La primera letra se refiere al tratamiento (N=No micorrizado, S=*Suillus pungens* y T=*Thelephora terrestris*) y la segunda señala la zona de muestreo ((r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera).

A nivel de familia se determinaron 330 OTUs de los cuales 79 presentaron una abundancia relativa superior al 1% en al menos una de las muestras (Figura 3.7).

Los OTUs que muestran una abundancia relativa por encima del 20% de acuerdo al Heatmap fueron los que corresponden a los números 1,4, 6, 8, 10,12, 20, 23, 26 y 86, y se muestran a continuación. El OTU 1 clasificado como Lachnospiraceae fue el más abundante para todos los tratamientos abarcando una abundancia relativa de 10 hasta 25%. El OTU 26 correspondiente a Xanthobacteraceae presentó una abundancia relativa uniforme alrededor del 10% en todos los tratamientos (Figura 3.7).

FITOBIONTE

Los OTUs 8 (Bacteroidales_S24-7_group) y 10 (Rumminococcaceae), aunque estuvieron presentes en todos los tratamientos, solo en uno tuvieron una abundancia relativa alta cercana a 25%, esto fue en el tratamiento de plantas de *Pinus greggii* control, particularmente en el ep (Figura 3.7).

MICOBIONTE

El OTU 4 clasificado como Paenibacillaceae presentó una abundancia relativa alta cercana al 30% sólo en un tratamiento que corresponde a plantas de *Pinus patula* inoculadas con *Suillus pungens*, es este caso particular asociado al ep. El OTU 6 clasificado como Bacillaceae presentó una abundancia relativa muy alta por encima del 30% en plantas de *Pinus patula* inoculadas con *Suillus pungens* en el ep (Figura 3.7).

ÁREA

El OTU 12 correspondiente a Hyphomicrobiaceae tuvo un comportamiento uniforme en todos los tratamientos los cuales abarcaron una abundancia relativa desde el 10 hasta el 25%, notándose la más alta en el tratamiento de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con Sp en er. El OTU 20 (Anaerolineaceae) aunque tuvo una abundancia relativa baja, presentó una abundancia relativa alta cercana al 25% en un tratamiento fue en plantas de *Pinus patula* inoculadas con Tt en el ep. El OTU 23 presentó una abundancia relativa alta por encima del 25% en el tratamiento de plantas de *Pinus patula* inoculadas con Sp en la er. El OTU 86 que corresponde a Rhizobiaceae presento una abundancia relativa alta en tres tratamientos; en la er de plantas de *Pinus patula* no micorrizadas y micorrizadas con Sp, y en plantas de *Pinus greggii* micorrizadas con Tt en la er (Figura 3.7).

3.4.4.2 Hongos

En el caso de hongos a nivel de familias se determinaron 45 OTUS de los cuales 32 presentaron una abundancia relativa superior al 1% en al menos uno de los tratamientos (Figura 5).

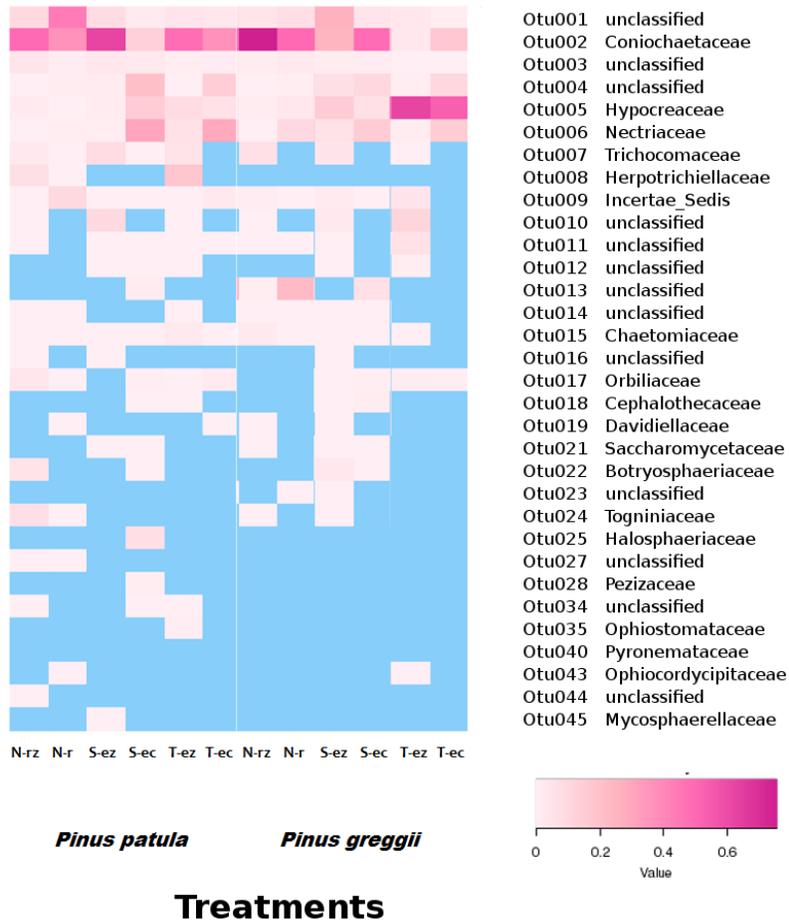


Figura 3.8. Distribución de abundancias relativas de OTUs de hongos a nivel de familia. La primera letra se refiere al tratamiento (N=No micorrizado, S=*Suillus pungens* y T=*Thelephora terrestris*) y la segunda señala la zona de muestreo (r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera).

De los 45 OTUs presentes un 40% fue identificado a nivel de familia, dentro de ellos el 100% se compuso de Ascomycotina. Los OTUS que presentaron, una abundancia relativa superior al 40% fueron los correspondientes a los números 2, 5 y 6, y se muestran a continuación. Uno de los más abundantes fue el OTU 2 el cual presentó una abundancia relativa desde el 10 hasta al 95%. En los tratamientos en donde se observó por encima del 90% fue en plantas de *Pinus patula* inoculadas con Sp en la er y en plantas no micorrizadas de *Pinus greggii* en la er. El OTU 5 correspondiente a la familia Hypocreaceae presentó una abundancia relaiva superior al 60% en dos tratamientos de plantas de *Pinus greggii*, estos casos fueron ambas zonas de las plantas inoculadas con Tt. El OTU 6 Nectriaceae presentó una abundancia relativa cercana al 40% en solo dos tratamientos, estos fueron la er de plantas de *Pinus patula* inoculadas tanto con Sp como con Tt (Figura 3.8).

FITOBIONTE

De acuerdo al heatmap se observaron diferencias en las abundancia relativas de las OTUs presentes en *Pinus patula* y aquellas observadas en *Pinus greggii*. En el caso de plantas de *Pinus patula* micorrizadas o no, se observó un mayor número de OTUs en comparación con *Pinus greggii*, independiente del área y del micobionte, excepto en *Pinus greggii* inoculado con Sp. Plantas de *Pinus greggii* micorrizadas con Tt presentaron una mayor abundancia en el caso del OTU 5, identificado como Hypocreaceae en comparación con plantas de *Pinus patula* micorrizadas con el mismo hongo. Una tendencia contraria se observó para el OTU 6 identificado como Nectriaceae, en donde se registró una abundancia relativa más alta en *Pinus patula* inoculado con Tt en comparación a *Pinus greggii* inoculado con el mismo hongo. Se observó una ausencia total de los OTUs 25, 27, 28, 34, 35, 40, 44 y 45 en el caso de plantas de *Pinus greggii*, independientemente del área y del micobionte. En contraste, de

estos OTUs sólo el 40 identificado como Pyronemataceae estuvo totalmente ausente en *Pinus patula* (Figura 3.8).

MICOBIONTE

Plantas micorrizadas con Sp, presentaron un mayor número de OTUs en comparación con aquellas micorrizadas con Tt, independientemente del área, excepto en la er de *Pinus patula* micorrizado con Tt. En el caso de la OTU 2 identificada como Coniochaetaceae en plantas de *Pinus greggii* micorrizadas con Sp tuvieron una mayor abundancia relativa independientemente del área en comparación con las micorrizadas con Tt. Una tendencia contraria se registró en la OTU 5 identificada como Hypocreaceae en *Pinus greggii*, en donde la mayor abundancia relativa, se observó en plantas micorrizadas con Tt en comparación con aquellas micorrizadas con Sp (Figura 3.8). En el caso de plantas de *Pinus greggii* micorrizadas con Tt se observó una ausencia de las OTUs 14, 18, 21 y 22 independientemente del área. En contraste estas cuatro OTUs estuvieron presentes en *Pinus greggii* micorrizado con Sp en ambas áreas. En el caso de *Pinus patula* este patrón sólo se observó para la OTU 21 identificada como Saccharomycetaceae, la cual estuvo presente en plantas micorrizadas con Sp pero ausente en las micorrizadas con Tt (Figura 3.8).

ÁREA

Existió una mayor cantidad de OTUs en la er en comparación con el ep, independientemente del fitobionte y del micobionte en plantas micorrizadas o no, excepto en la er de *Pinus patula* micorrizado con Sp.

El ep de plantas de *Pinus greggii* presentó un número mayor de OTUs en plantas micorrizadas, en comparación con la er. El OTU 4 no clasificado presentó una mayor

abundancia en plantas de *Pinus patula* en el ep de plantas micorrizadas con Tt, en comparación con la er. En la ep de Pg inoculado con Tt, el número de OTUs registradas fue el doble que el de la er del mismo tratamiento.

Para las plantas de *Pinus greggii* se observó que el OTU 5 identificado como Hypocreaceae, presentó una mayor abundancia en la er y el ep del plantas micorrizadas con Tt en comparación con las micorrizadas con Sp. Para plantas de *Pinus greggii* se observó que el OTU 7 sólo se presentó en la er de plantas micorrizadas con Tt en comparación con el ep en donde estuvo ausente. Para plantas de *Pinus greggii*, los OTUs 10, 11 y 12 se presentaron sólo en la er de plantas micorrizadas con cualquiera de los dos micobiontes. En plantas de *Pinus patula* el OTU 10 no clasificado, se presentó solo en la er de plantas micorrizadas o no.

En ambas áreas evaluadas en los dos fitobiontes micorrizados o no, existió una escasa diversidad de hongos identificados como Glomeromycota, Phycomycota, Zoophagomycotina y Basidiomycota, comparada con una gran diversidad de Ascomycota. De acuerdo con el heatmap, la diversidad fúngica identificada asociada con la er y ep de ambos simbiontes micorrizados, o no, con cualquiera de los fitobiontes estudiados incluyó exclusivamente miembros de Ascomycota pertenecientes a 18 familias. Dicho análisis de heatmap no detectó ningún Basidiomycota. En el caso del análisis de bar plots se identificaron 52% de los taxa, correspondientes a 26 OTUs, mientras que 48% no fueron identificados. Dentro de las OTUs clasificadas se identificó una gran proporción de Ascomycota (73%), seguida de Basidiomycota (15%), y Glomeromycota (4%), Phycomycota (4%) y Zoophagomycotina (4%). Estos últimos grupos fueron registrados en abundancias apenas detectables.

3.4.5 DIVERSIDAD

3.4.5.1 Bacterias

Cuadro 3.1. Índices de diversidad de familias de bacterias calculadas a partir de datos normalizados en dos especies de pino, ectomicorrizados o no con dos hongos en dos áreas.

Tratamiento	Índice de Shannon	Sobs ¹	S.Chao1 ²	% de cobertura ³	Cobertura de Good ⁴
<i>Pinus greggii</i>					
No micorrizado- r	4.3	342	381	89.8	0.99884
No micorrizado- rz	4.6	339	362	93.5	0.99909
Sp- ec	4.5	362	393	92.1	0.99897
Sp- ez	4.4	318	387	82.2	0.99889
Tt- ec	4.5	367	441	83.3	0.99856
Tt- ez	4.1	299	318	94.0	0.99925
<i>Pinus patula</i>					
No micorrizado- r	4.1	293	328	89.2	0.99906
No micorrizado- rz	3.9	290	321	90.4	0.99899
Sp- ec	3.1	296	347	85.3	0.99873
Sp- ez	3.7	241	307	78.4	0.99884
Tt- ec	4.2	328	381	86.0	0.99882
Tt- ez	4.5	340	387	87.9	0.99887

¹ Indica el número de OTUs registrados para cada tratamiento; ² estima la riqueza potencial; ³ calculado tomando en cuenta Sobs y S. Chao1; ⁴ determinada por el método de Good utilizando los valores mostrados en Sobs.; r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera. Sp=inoculado con *Suillus pungens*; Tt=inoculado con *Thelephora terrestris*.

FITOBIONTE

De acuerdo con el índice de diversidad de Shannon el fitobionte afecta la diversidad bacteriana a nivel de familia, independientemente de los micobiontes involucrados y las áreas evaluadas. En general, se observó una mayor diversidad bacteriana en *Pinus greggii* en comparación con *Pinus patula*. Según el índice de S.Chao1 el número máximo estimado de familias bacterianas fue de 441 en el ep de *Pinus greggii* inoculado con Tt, de las cuales 367 fueron registradas. Un número menor de OTUs fue registrado en *Pinus patula*, con un máximo estimado de 387 familias de las cuales 340 fueron registradas en la er de plantas inoculadas con Tt. El porcentaje estimado de cobertura de las familias de bacterias en *Pinus greggii* varió de 82.2% en la er de plantas inoculadas con Sp a 94.0% en la er de plantas de la misma especie inoculadas con Tt. Un menor porcentaje estimado de cobertura fue registrado en *Pinus patula*, en donde se observó una variación de 78.4 en la er de plantas inoculadas con Sp a 90.4% en la er de plantas no inoculadas. La cobertura mayor y menor de Good estimada para las familias de bacterias se registró en plantas de *Pinus greggii* inoculadas con Tt, en la er y el ep con 0.99925 y 0.99856, respectivamente (Cuadro 3.1).

MICOBIONTE

De acuerdo con el índice de Shannon la diversidad bacteriana asociada con los micobiontes Sp y Tt varió de acuerdo al fitobionte. En árboles de *Pinus greggii* ectomicorrizados con Sp se observó una mayor biodiversidad en comparación a aquellas ectomicorrizadas con Tt. Una tendencia opuesta fue registrada en árboles de *Pinus patula* en donde la diversidad bacteriana asociada con Tt fue mayor que aquella registrada con Sp. Según el índice de S. Chao1 los valores más altos se registraron en el ep de *Pinus greggii* con 393 y 441 familias bacterianas,

en plantas inoculadas con Sp y Tt, respectivamente. Se observó en la er un mayor porcentaje de cobertura en el caso de plantas micorrizadas con Tt en comparación con las micorrizadas con Sp, independientemente del fitobionte (Cuadro 3.1).

ÁREA

De acuerdo con el índice de Shannon la diversidad bacteriana a nivel de familia asociada con las áreas evaluadas dependió del fitobionte. Mientras que en *Pinus greggii* ectomicorrizado con cualquiera de los dos micobiontes se registró una mayor diversidad en el ep comparada con la er, en *Pinus patula* se observó la tendencia contraria. Según el índice de S.Chao 1, existió una mayor diversidad en el ep en comparación con la er independientemente de los fitobiontes y de los micobiontes. Esta misma tendencia se registró en el número de OTUs observado. La cobertura de Good estimada para las familias de bacterias de plantas micorrizadas fue mayor en la er en comparación con el ep en *Pinus patula*, independientemente del micobionte. Mientras que en *Pinus greggii* no se observó dicha tendencia (Cuadro 3.1).

3.4.5.2 Hongos

Cuadro 3.2. Índices de diversidad de familias de hongos calculadas a partir de datos normalizados en dos especies de pino, ectomicorrizados o no con dos hongos en dos áreas.

Tratamiento	Índice de Shannon	Sobs ¹	S.Chao1 ²	% de cobertura ³	Cobertura de Good ⁴
<i>Pinus greggii</i>					
No micorrizado- r	1.5	41	67.2	60.1	0.99950
No micorrizado- rz	1.1	44	57.8	76.2	0.99963
Sp- ec	1.7	41	47.0	87.2	0.99970
Sp- ez	2.1	49	52.5	93.3	0.99977
Tt- ec	1.3	29	32.0	90.6	0.99977
Tt- ez	1.5	41	45.2	90.7	0.99977
<i>Pinus patula</i>					
No micorrizado- r	1.4	40	40.4	99.0	0.99990
No micorrizado- rz	1.9	48	53.6	89.5	0.99973
Sp- ec	2	46	50.0	92.0	0.99973
Sp- ez	1.4	43	46.5	92.5	0.99977
Tt- ec	1.7	36	40.1	88.4	0.99973
Tt- ez	1.8	43	44.0	97.7	0.99987

¹ Indica el número de OTUs registrados para cada tratamiento; ² estima la riqueza potencial; ³ calculado tomando en cuenta Sobs y S. Chao1; ⁴ determinado por el método de Good utilizando los valores mostrados en Sobs r=raíz, rz=rizosfera, ec=ectomicorriza y ez=ectomicorrizosfera. Sp=inoculado con *Suillus pungens*; Tt=inoculado con *Thelephora terrestris*.

FITOBIONTE

En términos generales, de acuerdo con el índice de diversidad de Shannon el fitobionte afecta la diversidad fúngica a nivel de familia independientemente de los micobiontes y las áreas evaluadas, observándose una mayor diversidad fúngica en *Pinus patula* comprada con *Pinus greggii*, excepto en el caso de la er de *Pinus patula* inoculado con Sp. El índice de S.Chao1 mostró una tendencia similar, excepto en el caso de la er de *Pinus greggii* inoculado con Sp y el ep de *Pinus patula* inoculado con Tt. El porcentaje estimado de cobertura de familias fúngicas también fue mayor en *Pinus patula* en comparación con *Pinus greggii*, excepto en el caso de la er de plantas de *Pinus patula* ectomicorrizadas con Sp y en el ep de *Pinus greggii* inoculada con Tt. Una tendencia similar fue registrada en la cobertura de Good (Cuadro 3.2).

MICOBIONTE

De acuerdo con el índice de Shannon en el caso de *Pinus greggii* existió una mayor diversidad de familias fúngicas en plantas inoculadas con Sp en comparación con aquellas inoculadas con t. independientemente del área. En el caso de *Pinus patula* se registró la misma tendencia en el ep, sin embargo la tendencia contraria fue observada en la er. La tendencia de una mayor diversidad de familias fúngicas en plantas inoculadas con Sp en comparación con aquella inoculadas con Tt se registró también de acuerdo con el índice de S. Chao1, independientemente del fitobionte y del área. Una tendencia similar se registró en el número de OTUs observado (Cuadro 3.2).

ÁREA

De acuerdo con el índice de Shannon se presentó una mayor diversidad de familias fúngicas en la er en comparación con el ep, excepto en las plantas no micorrizadas de *Pinus greggii* y en las plantas de *Pinus patula* inoculadas con Sp, en donde se observó una mayor diversidad en el ep. Una tendencia similar se observó según el índice de S. Chao1 y de las OTUs observadas. En el caso del porcentaje de cobertura, se registró igualmente una mayor diversidad en la er en comparación con el ep, excepto en el ep de *Pinus patula* no micorrizada (Cuadro 3.2).

3.5 DISCUSIÓN

FITOBIONTE

Kawasaki et al. (2016) señalan que el microbioma de la rizósfera está regulado por el genotipo de la planta, los exudados de la raíz y el medio ambiente. En su estudio encontraron que los Burkholderiales eran dominantes en la rizósfera de *Brachypodium distachyo*. Tedersoo et al. (2009) registraron que las plantas hospederas tuvieron un conspicuo efecto en la frecuencia de especies de Ascomycetes asociados con ectomicorrizas individuales. Nam et al. (2015) efectuaron un estudio en dos islas volcánicas en Asia Oriental con diferentes riquezas de especies vegetales. Dichos autores registraron que la isla que poseía una mayor riqueza vegetal tenía un mayor número de OTU's de hongos del suelo, demostrando que dicho componente fue afectado por la riqueza vegetal. Las relaciones simbióticas que se presentan entre plantas y hongos en zonas naturales presentan una especificidad para la formación de las estructuras comunitarias de hongos asociadas a sus raíces. Esta relación hongo-planta se influye mutuamente. Toju et al.

(2013), en un estudio realizado en un bosque dominado por Robles en Japon, investigaron la comunidad fúngica de 33 especies de árboles asociadas a la raíz. En el estudio encontraron que de los 387 OTUS encontrados, solo 153 (39.5%) fueron compartidos por al menos dos especies, lo que destaca una especificidad en la comunidad fúngica con cada especie vegetal, lo anterior también concuerda con el hallazgo de que en las 5 especies de plantas más abundantes en la comunidad, tenían una especificidad con taxones de hongos. De igual forma se observó una variación en su especificidad de asociación en dentro de mismos grupos filogenéticos o ecológicos de plantas. Una clara especificidad se detectó al encontrar que algunos hongos de la familia *Russulaceae* fue casi exclusiva de *Quercus*, mientras que otros miembros de la misma familia se detectaron en plantas incluso no ectomicorrízicas. Otro de los grupos que mostraron variación en su especificidad fueron los pertenecientes a los órdenes *Helotiales* y *Chaetothyrales* los cuales se encontraron tanto en especies vegetales como en simbiontes principales. Todo lo anterior indica que la estructura de las comunidades establecidas entre plantas y hongos no es aleatoria de huéspedes, ni por el tipo micorrizico, sino que es una característica importante del enlace subterráneo entre comunidades vegetales y fúngicas.

MICOBIONTE

Aunque las comunidades bacterianas juegan un papel importante en el estado de salud, crecimiento y supervivencia se sus huéspedes, no se ha investigado de gran manera investigaciones que relacionen la estructura del microbioma asociado a las raíces de plantas perenes en zonas naturales (Shakya *et al.* 2013).

En el presente trabajo se encontró una abundancia de Ascomycotina en relación a otros grupos de hongos. El análisis de bar plot mostró exclusivamente miembros de este grupo fúngico en todos los tratamientos evaluados. Shakya *et al.* (2013) reportaron que las poblaciones fúngicas asociadas a las raíces de *Populus deltoides* estuvieron de manera similar dominadas por Ascomycota. De manera similar Tedersoo *et al.* (2009) al caracterizar las comunidades asociadas con ectomicorrizas de bosques húmedos esclerófilos en Tasmania encontró una gran diversidad de Ascomycetes. Los órdenes dominantes fueron Helotiales, Hypocreales, Chaetothyriales y Sordariales. Hypocreales y Sordariales fueron igualmente detectados en todos los tratamientos en el presente trabajo.

En el presente trabajo se detectó una conspicua influencia de los micobiontes en la estructura de comunidades microbianas asociadas. Nguyen y Bruns (2015) estudiaron las comunidades bacterianas presentes en el interior de raíces ectomicorrizadas de los cinco micobiontes más abundantemente asociados naturalmente con *Pinus muricata*. Estos hongos fueron *Rhizopogon salebrosus*, *Russula cerolens*, *Tricholoma imbricatum*, *Tomentella sublilacina*, and *Clavulina* sp. Dichos autores encontraron que encontraron que los micobiontes asociados con dicho árbol tuvieron un conspicuo efecto en la estructura de comunidades bacterianas, la cual fue consistente a lo largo de tres años de muestreo. Los Burkholderiales y Rhizobiales fueron los grupos registrados con mayor abundancia, lo cual sugiere que son simbioses de los micobiontes estudiados. En conjunto dichos grupos representaron 55% del total de las bacterias identificadas. Siendo *Burkholderia phenazinium* la OUT más abundante seguida de *Leptothrix* sp., *Burkholderia sordidicola*, and *Bradyrhizobium elkanii*.

En el caso de los micobiontes, no solo se han detectado diferencias en la estructura de comunidades microbianas asociadas con diferentes especies de hongos ectomicorrízicos, sino incluso en algunos micobiontes se han registrado diferencias en el microbioma asociado con las diferentes áreas miceliales de algunas especies fúngicas en condiciones naturales. *Tricholoma matsutake* es un hongo de gran importancia económica cuyo comercio internacional anual es de alrededor de USD150 millones, y alcanza precios de hasta USD1200 por Kg en Japón (Pérez-Moreno and Martínez-Reyes, 2014). Dicho hongo forma en su base una estructura denominada “shiro”, la cual significa blanco en japonés, y usualmente crece formando “anillos de hadas”, los cuales son ya sea anillos o arcos de esporomas. Kim *et al.* (2013) evaluaron la diversidad microbiana en tres áreas del matsutake creciendo en condiciones naturales en Korea del Sur: i) dentro de la zona del anillo de hadas; ii) debajo de los esporomas, en el anillo de hadas; y iii) fuera de la zona del anillo de hadas. Dichos autores encontraron que la zona del anillo de hadas presentó el menor número de OTUs, mientras que la zona del interior, en donde se encuentra micelio más viejo, se presentó una mayor diversidad, constituyendo el doble del número de OTUs registradas en el anillo. La prueba de que el micelio del matsutake fue un factor que influye en la diversidad del microbioma edáfico estuvo constituida por el hecho de que fuera del anillo de hadas se registró solamente 1.5 veces número de OTUs en comparación con las registradas en el anillo. Adicionalmente, al realizar el análisis taxonómico se observó que estas áreas de muestreo presentaron una composición microbiana distinta. En total se registraron 209 géneros, de los cuáles 6 fueron exclusivos de la zona del anillo de hadas, tales como *Hemimycena*, *Eurotium*, *Myriangium*, *Nigrosora*, y *Verrucaria*. Tanto en la zona interna del anillo como en la zona externa, se lograron identificar 31 géneros

exclusivos para ambas áreas, dentro de los cuales se incluyeron *Mycena*, *Boletopsis*, *Bionectria*, *Repetophragma*, *Gomphidius*, *Hypomyces* y *Tomentellopsis*. Basados en estos resultados dichos autores concluyeron que la composición del microbioma es fundamental para la formación de esporomas del valioso hongo *T. matsutake*, conocido a nivel mundial simplemente como matsutake.

Nam *et al.* (2015) efectuaron un estudio de los hongos rizosféricos asociados con plantas en dos islas volcánicas del Pacífico. Dichos autores encontraron que la riqueza y diversidad de plantas vasculares influyó en la abundancia de hongos ectomicorrízicos. Un mayor número de miembros del phylum Basidiomycota fueron registrados en la isla con mayor diversidad vegetal, mientras que miembros de Ascomycota fueron más abundantes en la isla con menor diversidad vegetal.

REGIONES

En el presente trabajo se observaron diferencias en las comunidades microbianas presentes en la ectomicorrizosfera y el ectomicorrizoplano. Vik *et al.* (2013) estudiaron la comunidades bacterianas del suelo adyacente y la raíces ectomicorrizadas, de la planta herbácea alpina *Bistorta vivipara* (L.) Ronse Decr. creciendo en condiciones naturales en Noruega. Los simbiontes ectomicorrízicos solo fueron identificados como pertenecientes a Ascomycota y Basidiomycota. Dichos autores reportaron que la estructura de comunidades entre los dos ambientes estudiados fue conspicuamente distinta. Las Actinobacterias, Armatimonadetes y Chloroflexi se encontraron en abundancias significativamente mayores en las raíces ectomicorrizadas en comparación con el suelo. Nguyen y Bruns (2015) estudiaron las comunidades bacterianas presentes en el interior de raíces ectomicorrizadas de *Pinus*

muricata, en el interior de raíces no micorrizadas y en el suelo a distancia (bulk soil). Dichos autores encontraron que las comunidades bacterianas registradas en estos tres ambientes fueron sustancialmente distintas. Adicionalmente, encontraron que las comunidades de bacterias del interior de las raíces no micorrizas fueron más similares a las encontradas en el suelo a distancia que aquellas presentes en las raíces ectomicorrizadas. En la presente investigación 6 OTUs (Operational Taxonomic Units por sus siglas en inglés) fueron detectadas en los 12 tratamientos evaluados. En contraste en el estudio de Vik *et al.* (2013) ninguna OTU se encontró presente en todas sus muestras correspondientes a 4 tratamientos: raíces no micorrizadas, suelo rizosférica, raíces ectomicorrizadas y ectomicorrizosfera. Vik *et al.* (2013) efectuaron muestreos de suelo a diferentes distancias de la raíz, llegando hasta 2 m de distancia. Encontraron que la estructura de comunidades presente hasta los 60 cm fue similar a la encontrada en el suelo en contacto con las ectomicorrizas. Asumieron entonces que las bacterias ocuparon a las hifas ectomicorrizicas como un vector de transporte. En estos estudios se observa una poca o nula especificidad de bacterias en huéspedes fúngicos, sin embargo, se encontró que la comunidades habitantes dentro de las puntas de raíces ectomicorrizadas son diferentes a las comunidades que se presentan en el suelo (Vik *et al.* 2013). Shaky *et al.* (2013) reportaron que las poblaciones microbianas de Chytridiomycota y de Acidobacteria mostraron una abundancia conspicuamente mayor en la rizosfera en relación a las registradas en la endosfera radical de *Populus deltoides*.

Uroz *et al.* (2012) encontraron que las ectomicorrizosferas tanto de *Xerocomus pruinatus* y *Scleroderma citrinum* presentaron una mayor abundancia de Alpha-, Beta-, y Gammaproteobacteria en comparación con el suelo a distancia.

Uroz *et al.* (2007) registraron que las bacterias asociadas a la ectomicorrizosfera de *Scleroderma citrinum* poseen mayor capacidad de intemperización de biotita, comparadas con aquellas presentes en el suelo a distancia. Identificaron a dichas bacterias como miembros de los géneros Burkholderia, Collimonas, Pseudomonas y Sphingomonas. Dichos autores señalaron entonces que dicha diferencia funcional soporta la hipótesis, de una complementación entre hongos ectomicorrízicos y su comunidad bacteriana asociada para la promoción de sus árboles hospederos asociados.

Al igual que en el presente trabajo Uroz *et al.* (2013) al estudiar bacterias asociadas con las raíces ectomicorrizadas, la ectomicorrizosfera y el suelo a distancia de ectomicorrizas de *Scleroderma citrinum* con *Quercus petraea* encontraron que las áreas tuvieron una conspicua influencia en la estructura de comunidades bacterianas. Adicionalmente, dichos autores registraron que existen diferencias funcionales en los grupos microbianos en las distintas áreas, por ejemplo en la ectomicorrizosfera abundaron las bacterias capaces de hidrolizar quitina y glucopiranosida, mientras que el suelo a distancia estuvo enriquecido con bacterias capaces de hidrolizar celobiosa y N-acetilglucosamida. En el suelo a distancia no existieron bacterias quitinolíticas. Previamente, utilizando técnicas de cultivo en placa, Timonen *et al.* (1998) encontraron que en la micorrizosfera de *Pinus sylvestris* con *Suillus bovinus* existían abundantes poblaciones bacterianas que preferían manitol; mientras que *Paxillus involutus* favorecía la diversidad de bacterias que preferían fructosa, como fuentes carbonadas. Adicionalmente, dichos autores encontraron que existió un mayor número de unidades formadoras de colonia en ectomicorrizas maduras de plantas crecidas en invernadero, en comparación con las detectadas en el suelo a distancia, independientemente del micobionte.

3.6 CONCLUSIONES

- La diversidad bacteriana de *Pinus greggii* fue mayor que la de *Pinus patula*, independientemente del micobionte y del área. Mientras que la diversidad fúngica tuvo una tendencia opuesta.
- Dentro de los grupos de bacterias identificadas se observó una abundancia de Bacillales, particularmente en ectomicorrizas de *Pinus patula* colonizadas con *Thelephora terrestris*.
- En el caso de los grupos fúngicos, el análisis de heatmap detectó exclusivamente hongos del grupo Ascomycetes, independientemente del fitobionte, micobionte y del área. Los grupos de Hypocreales y Sordariales fueron los más abundantes.
- Cada especie de árbol mostró una diferente diversidad microbiana, observándose una mayor diversidad en *Pinus greggii* ectomicorrizado con *Suillus pungens* y en *Pinus patula* micorrizado con *Thelephora terrestris*.
- En total se determinaron 330 y 45 OTUs de bacterias y hongos a nivel de familias, respectivamente. De ellos 79 y 32 OTUs bacterianos y fúngicos presentaron una abundancia relativa superior al 1% en al menos uno de los tratamientos.
- Estas conclusiones se basan en el análisis de un total de 90,927 y 22,616 secuencias únicas de bacterias y hongos, respectivamente de un total inicial de 3'132,496 y 1'271,750 secuencias crudas de bacterias y hongos, respectivamente.
- El presente trabajo demuestra que los fitobiontes, micobiontes y las áreas son factores que influyen conspicuamente en la estructura de comunidades bacterianas y fúngicas.

3.7 LITERATURA CITADA

- Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Espinosa-Hernández V, Almaraz-Suárez JJ, Quintero-Lizaola R y Torres-Aquino M. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural*. 2011; 84: 83-96
- Comandini O, Rinaldi A, Kuyper TW. Fungal diversity: a continuous challenge. In: *Mycorrhiza: Occurrence in Natural and Restored Environments*. Editor: Marcela Pagano; 2012. pp. 165-200
- González, A., M. Cárdenas y S. Restrepo. Metagenómica, revelación de comunidades microbianas. *Hipótesis, Apuntes científicos uniandinos*. 2012; 12: 20-24.
- Herrera E., A. y F. Castellanos. Análisis metagenómico de la microbiota edáfica de la reserva de la biósfera de Calakmul. *Ide@s CONCYTEG*. 2007; 29: 802-823.
- Kawasaki A, Donn S, Ryan PR, Mathesius U, Devilla R, Jones A, et al. Microbiome and Exudates of the Root and Rhizosphere of *Brachypodium distachyon*, a Model for Wheat. 2016; *PLoS ONE* 11(10): e0164533. doi:10.1371/journal.pone.0164533
- Kim M, Yoon H, Youl YH, Kim YE, Woo JR, Seo Y, et al. Metagenomic Analysis of Fungal Communities Inhabiting the Fairy Ring Zone of *Tricholoma matsutake* J. *Microbiol. Biotechnol*. 2013; 23(10), 1347–1356
- Kozich JJ, Westcott LS, Baxter NT, Highlander SH, and Patrick D. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79(17): 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13

- Martínez-Alonso, M. y N. Gaju. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistemas*. 2005; 14: 79-91
- McGuire KL, Allison SD, Fierer N, Treseder KK. Ectomycorrhizal-Dominated Boreal and Tropical Forests Have Distinct Fungal Communities, but Analogous Spatial Patterns across Soil Horizons. 2013; *PLoS ONE* 8(7): e68278. doi:10.1371/journal.pone.0068278
- Nam YJ, Kim H, Lee JH, Yoon H, and Kim JG. Metagenomic analysis of soil fungal communities on Ulleungdo and Dokdo Islands. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2015; 61: 67–74
- Nguyen NH and Bruns TD. The Microbiome of *Pinus muricata* Ectomycorrhizae: Community Assemblages, Fungal Species Effects, and Burkholderia as Important Bacteria in Multipartnered Symbioses. *Microbial Ecology*; 69; 1576-1588
- Nogales, B. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. 2005; 14: 41-51
- Pérez-Moreno J, and Martínez-Reyes M. Edible ectomycorrhizal mushrooms: Biofactories for sustainable development. En: *Biosystems engineering: Biofactories for food production in the century XXI*. R. Guevara-Gonzales, I. Torres-Pacheco (Eds.), Springer International Publishing; 2014. pp. 151–233
- Shakya M, Gottel N, Castro H, Yang ZK, Gunter L, Labbé , et al. A Multifactor Analysis of Fungal and Bacterial Community Structure in the Root Microbiome of Mature *Populus deltoides* Trees. 2013; *PLoS ONE* 8(10): e76382. doi:10.1371/journal.pone.0076382

- Smith SE and Read DJ. Mycorrhizal symbiosis. Third edition. Academic Press, New York, USA. (3^a Ed.) 2008; pp. 349–385
- Tedersoo L, Pärtel K, Jairus T, Gates G, Põldmaa K and Tamm H. Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. 2009; doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02020.x
- Tedersoo L, May TW, Smith ME. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages; 2010. *Mycorrhiza*. 2010 Apr; 20(4):217-63. doi: 10.1007/s00572-009-0274-x.
- Toju H, Sato H, Yamamoto S, Kadowaki K, Tanabe AS, Yazawa S, et al. How are plant and fungal communities linked to each other in belowground ecosystems? A massively parallel pyrosequencing analysis of the association specificity of root-associated fungi and their host plants. *Ecology and Evolution*. 2013; 3(9): 3112– 3124
- Vik U, Logares R, Blaali R, Halvorsen R, Carlsen T, Bakke I, et al. Different bacterial communities in ectomycorrhizae and surrounding soil. *Scientific Report*. 2013; 3:3471

CAPITULO 4

SUPERVIVENCIA EN CAMPO DE DOS PINOS INOCULADOS CON *Suillus*

pungens y *Thelephora terrestris*

4.1 RESUMEN

Una de las razones de la baja supervivencia de los pinos plantados en campo, es la ausencia de ectomicorrización, dado que la ectomicorriza facilita la absorción nutrimental, y adaptación a condiciones de estrés biótico y abiótico. Por lo que es fundamental la inoculación con hongos ectomicorrízicos en la producción de plantas nativas de México. Adicionalmente, no se ha evaluado el efecto de la ectomicorrización en áreas previamente plantadas con eucaliptos exóticos. En el presente trabajo se evaluó la supervivencia en campo de *Pinus greggii* y *P. patula* inoculados con hongos ectomicorrízicos, en zonas con o sin eucalipto. Se hipotetizó que las plantas micorrizadas presentarían una mayor supervivencia, y que la ectomicorrización incrementaría la tolerancia a la alelopatía originada por eucaliptos. Para lo anterior se produjeron plantas en invernadero durante 2 años, se seleccionaron plantas con porcentajes de colonización superiores a 80%. El experimento se estableció en un área con dos zonas: una con eucalipto y la otra con la ausencia de este árbol, para cada zona se establecieron 3 bioensayos: 1) *P. greggii* micorrizado con *Suillus pungens* y plantas no micorrizadas; 2) *P. patula* micorrizado con *Suillus pungens* y con *Thelephora terrestris* y plantas no micorrizadas y 3) *P. greggii* micorrizado con *Thelephora terrestris* y plantas no micorrizadas. La altura, diámetro del tallo y supervivencia se evaluaron cada dos meses después del trasplante durante 12 meses. Desde las primeras evaluaciones, hasta la última, se observó que el porcentaje de supervivencia, la altura y el diámetro del tallo, fueron mayores

en plantas ectomicorrizadas en relación a las no micorrizadas. A partir de la tercera evaluación, se observó una menor supervivencia en *P. greggii* comparado con *P. patula*, La supervivencia fue mayor en las áreas sin eucalipto en comparación con áreas con eucalipto, probablemente por un efecto alelopático. La ectomicorrización fue un factor que originó mayor supervivencia en áreas con eucalipto.

Palabras clave: ectomicorriza, alelopatía, supervivencia.

4.2 INTRODUCCIÓN

La mayoría de las plantas desarrollan en su hábitat natural las llamadas micorrizas, asociaciones simbióticas entre hongos del suelo y las raíces de plantas, mutuamente beneficiosas para el hongo y la planta (Brearley, 2012). Los hongos micorrízicos colonizan las raíces, sin causarles daño alguno y desarrollan una red de hifas externas que se extienden y ramifican en el suelo. Este micelio externo actúa como un sistema radical complementario, muy efectivo y de extraordinaria importancia para la adquisición de nutrientes y agua por las plantas (García-Rodríguez *et al.*, 2006). Por otra parte, las micorrizas confieren a las plantas una mayor capacidad de resistencia y/o tolerancia a estrés ambiental, tanto de tipo biótico como abiótico. Se ha demostrado que las micorrizas están presentes en todos los biomas y ecosistemas terrestres desde hace más de 400 millones de años, siendo la simbiosis vegetal más extendida en la naturaleza (Smith y Read, 2008; DeBellis *et al.*, 2006).

La mayoría de las plantas de vivero se micorrizan a través de esporas que provienen del aire o del agua de riego. Las técnicas actuales permiten estudiar y seleccionar las especies fúngicas que proporcionen el máximo rendimiento a las plantas (Domínguez *et al.*, 2001). El objetivo principal de la aplicación de técnicas de inoculación con hongos ectomicorrízicos en viveros forestales, es la mejora de la calidad de la planta destinada a la repoblación forestal. Las plantas micorrizadas se desarrollan mejor que las no micorrizadas y además contienen mayores cantidades de los principales nutrientes por unidad de masa (Pera y Parladé, 2005). En países como México, esta biotecnología ha recibido escasa atención, a pesar de su enorme potencial. Por tal motivo, es necesaria la generación de conocimientos vinculados con la utilización de hongos ectomicorrízicos nativos, con plantas de interés forestal (Martínez-Reyes *et al.*, 2012).

En México una de las causas del poco éxito en las reforestaciones es la utilización de plantas de baja calidad producidas en los viveros. La calidad de las plantas depende del manejo que se les da en vivero y esta debe ser controlada y medida antes de llevarlas a campo. Esta planta debe cumplir con valores estándar que le permitan sobrevivir previo a su plantación, de no ser así es probable que no se adapten a las condiciones del sitio (Sigala *et al.*, 2012).

La actividad forestal en México está centrada en el género *Pinus*, dado que este representa el 60% de las especies maderables comerciales debido a su amplia distribución geográfica y su alto valor económico. Una de las características que se debe de tomar en cuenta al momento de la selección de plantas utilizadas en reforestaciones es la tolerancia a las condiciones del sitio en donde se llevará a cabo la plantación. La supervivencia de los árboles en campo depende de distintas variables ambientales tales como la temperatura, la luz, la humedad, y los nutrientes presentes en el sitio. Otro factor determinante es la disponibilidad de agua, durante el primer año este factor es el responsable de la supervivencia y el desarrollo de especies arbóreas utilizadas en reforestaciones (Gómez-Romero *et al.*, 2012).

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Zona de estudio

El experimento se realizó en condiciones de campo en un terreno situado dentro del Parque Nacional Molino de Flores, Texcoco, Estado de México (Figura 4.1). Esta área es de gran interés para el municipio de Texcoco debido a que provee una gran variedad de servicios recreativos y ambientales. Sin embargo enfrenta diferentes problemáticas que incluyen: pérdida de cobertura vegetal, contaminación por descarga de aguas residuales, altas tasas de erosión hídrica deforestación y extracción de recursos forestales (Tudela *et al.*, 2011).



Figura 4.1. Sitio donde se realizó la plantación de los árboles para el experimento: A) Vista del área del jardín botánico donde plantaron los árboles, B) Zona con eucalipto y C) Zona sin eucalipto.

4.3.2 Material vegetativo

Los árboles utilizados en el experimento pertenecen a dos especies neotropicales nativas de México, las cuales son de gran importancia forestal y son utilizadas con fines de reforestación. Las plantas utilizadas para la plantación estuvieron en condiciones de invernadero hasta obtener condiciones morfológicas y de micorrización útiles para la plantación en campo. Las plantas utilizadas se seleccionaron de acuerdo al criterio de presentar un porcentaje mayor al 80% de micorrización para ser trasplantados en campo.

4.3.3 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar. Se evaluaron dos especies de pinos, *Pinus greggii* y *Pinus patula*. Se establecieron tres bioensayos, que fueron diferentes en el número de unidades experimentales y edad de la planta. En el primero se utilizaron 7

plantas de *P. greggii* micorrizadas con *S. pungens* y 7 no micorrizadas, las plantas tenían 2 años y medio de edad. El segundo bioensayo fue con *P. patula* inoculado con dos hongos ectomicorrízicos: *S. pungens* y *T. terrestris*, 7 plantas micorrizadas con el primero, 5 con el segundo y 10 plantas sin micorrizar, la edad de las plantas fue de 2 años y medio. El tercer bioensayo consistió en plantas de *P. greggii* inoculado con *T. terrestris*, se utilizaron 7 plantas micorrizadas y 7 no micorrizadas, las plantas tenían 1 año y cuatro meses de edad. Estos bioensayos se establecieron en dos zonas del área de estudio. La primera, una zona en donde la vegetación es dominante por Eucalipto y la segunda, en donde esta especie arbórea está ausente, siendo la vegetación dominante plantas herbáceas, en total se evaluaron 100 unidades experimentales, 50 en la zona de eucalipto y 50 en la zona sin eucalipto.

4.3.4 Montaje del experimento

Para el establecimiento del experimento se trazaron tres cuadrantes en cada zona de estudio. En cada uno se estableció un bioensayo diferente. Las plantas se establecieron de acuerdo al sistema tres bolillos dejando 3 m de separación entre cada árbol. Se realizaron cajetes de 40 cm x 40cm y se utilizó composta al momento del trasplante. Los árboles después de plantados se cubrieron con una malla de acero para protegerla de la fauna de los alrededores. Adicionalmente, al lado de cada árbol se estableció una “Tina de Nezahualcóyotl”, método que permite la retención de agua de lluvia que favorece el crecimiento de las plantas (Figura 4.2).



Figura 4.2. Proceso de selección de plantas y plantación en campo: A) Selección de plantas con más de un 80% de micorrización, B) y C) Árboles micorrizados y no micorrizados para cada tratamiento, D) y E) Plantación en campo y F) Tina de Nezahualcōyotl para captación de agua de lluvia.

4.3.5 Crecimiento vegetal

4.3.5.1 Altura

Se realizó una medida de la altura de los árboles en campo a los 62, 124, 186, 248, 308 y 365 días después del trasplante, teniendo al final un total de seis medidas durante un año.

4.3.5.2 Diámetro de tallo

El diámetro de tallo se realizó cada 4 meses evaluando al final cuatro medidas totales.

4.3.6 Supervivencia

La supervivencia al igual que la altura se evaluó cada dos meses, teniendo como total seis medidas de supervivencia durante un año.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Altura

4.4.1.1 Primer bioensayo

En la evaluación de las plantas de *Pinus greggii* micorrizadas con *Suillus pungens* se observó que el crecimiento fue mayor en plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas, ya que para las plantas micorrizadas se registraron valores de hasta 68 cm mientras que las no micorrizadas presentaron alturas máximas de 26 cm. Otro de los resultados importantes fue que se observó un mayor crecimiento de las plantas en el área donde el eucalipto estuvo ausente, lo que puede suponer un posible efecto alelopático generado por esta especie sobre el crecimiento de los pinos (Figura 4.3)

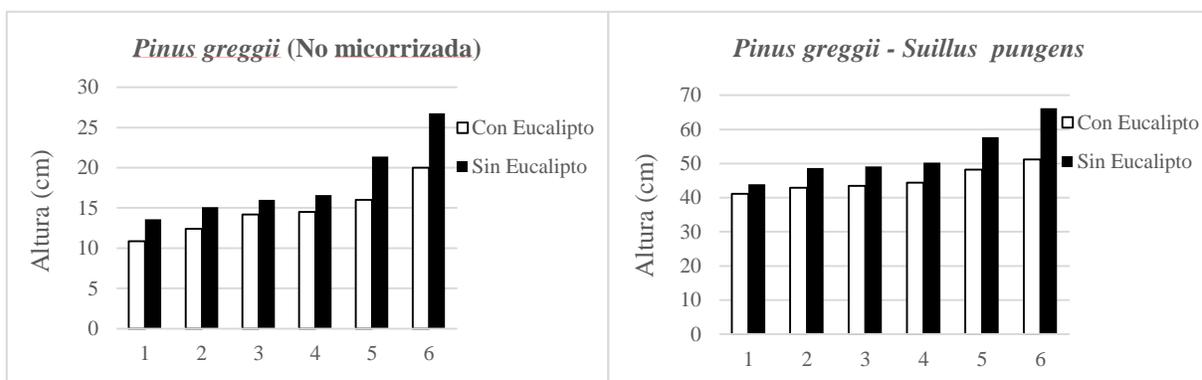


Figura 4.3. Crecimiento de plantas de *Pinus greggii* no micorrizadas y micorrizadas con *Suillus pungens* en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones bimensuales. n=7.

4.4.1.2 Segundo bioensayo

Para las plantas de *Pinus patula*, se observó una diferencia dramática en cuanto a las plantas no micorrizadas con respecto a las micorrizadas, ya que la no micorrizadas desaparecieron en su totalidad al final de las evaluaciones, lo que su pone que esta especie es totalmente dependiente de una asociación ectomicorrízica.

Se observó también que esta especie de pino tiene una preferencia por un micobonte ya que al evaluar el efecto producido port dos especies de hongo diferentes, se registró un mayor crecimiento en las plantas micorrizadas con *Suillus pungens* en comparación con las micorrizadas con plantas que también al final de la evaluación experimental desaparecieron.

En cuanto a la zona, igual que en el primer bioensayo se observó un mejor crecimiento de las planats en donde no se presentó la existencia de eucalipto (Figura 4.4).

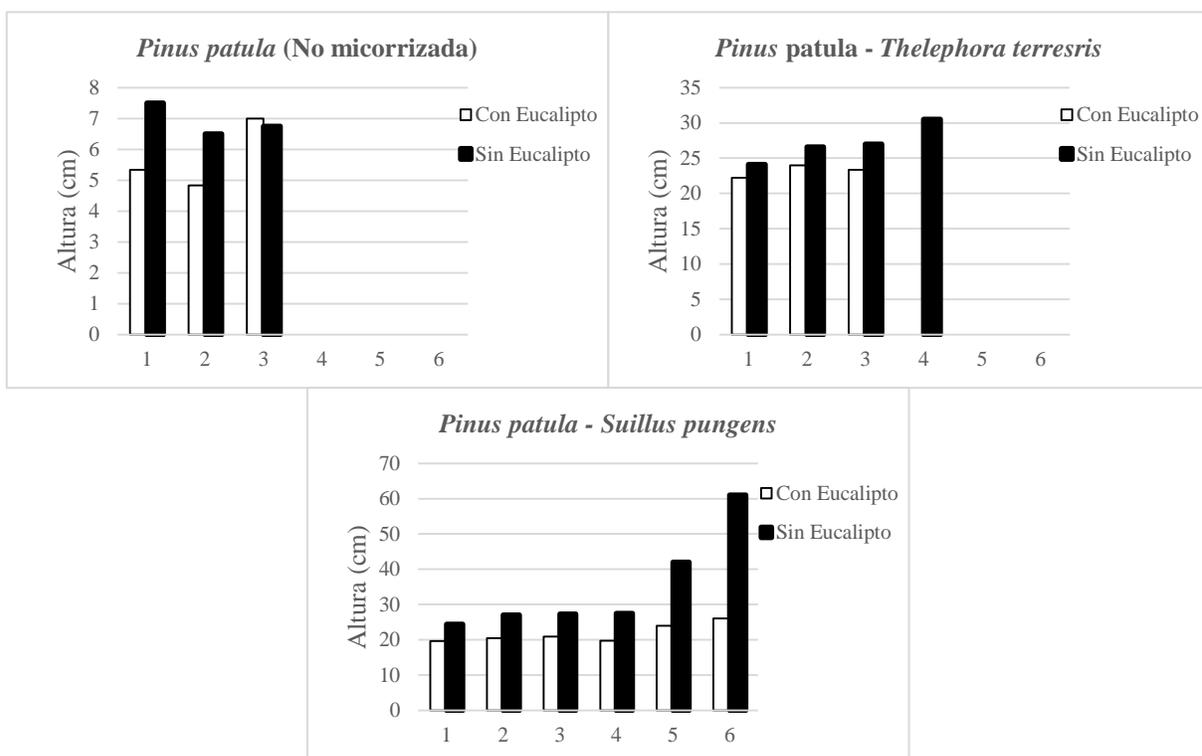


Figura 4.4. Crecimiento de plantas de *Pinus patula* no micorrizadas y micorrizadas con *Suillus pungens* y *Thelephora terrestris* en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones bimensuales. n=7.

4.4.1.3 Tercer bioensayo

Las plantas de *Pinus greggii* micorrizadas con *Thelephora terrestris* mostraron un crecimiento similar que las no micorrizadas, ya que ambas alcanzaron alturas máximas de hasta 80 cm. La principal diferencia se observó al comparar las alturas alcanzadas entre las plantas de ambas zonas de estudio, observándose que las plantas presentes en la zona de eucalipto alcanzaron alturas más bajas comparadas con las presentes en la zona sin eucalipto (Figura 4.5).

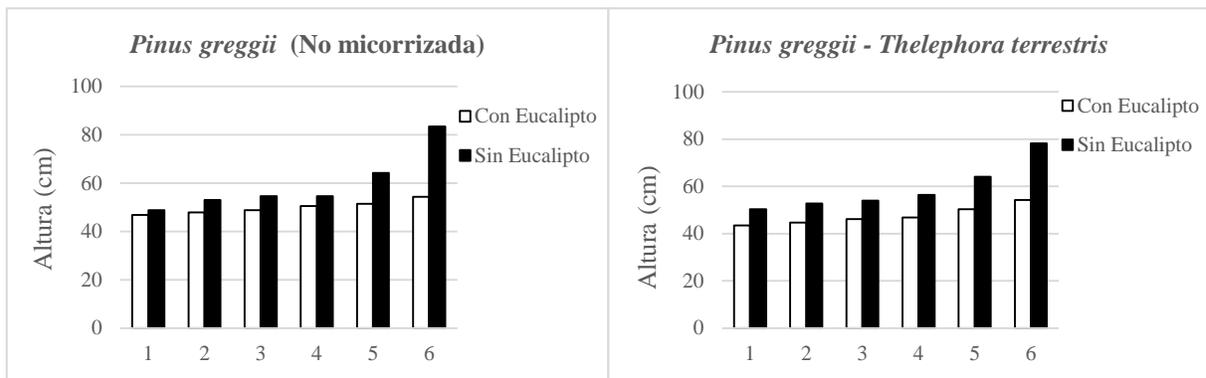


Figura 4.5. Crecimiento de plantas de *Pinus greggii* no micorrizadas y micorrizadas con *Thelephora terrestris* en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones bimensuales. n=7.

4.4.2 Diámetro de tallo

4.4.2.1 Primer bioensayo

Los resultados del desarrollo del diámetro de tallo muestran que las plantas de *Pinus greggii* micorrizadas con *Suillus pungens* presentaron un mayor desarrollo que las plantas no micorrizadas. Los valores máximos de las plantas micorrizadas fueron de hasta 9mm en comparación de los de los valores máximos de las no micorrizadas que fueron apenas de 6mm.

En cuanto a la zona de estudio se observó que las plantas establecidas en la zona sin eucalipto presentaron un mejor desarrollo del diámetro de tallo, que las presentes en la zona con eucalipto, esto tanto para las plantas micorrizadas como para las no micorrizadas. Otro resultado importante que la mayor diferencia en el diámetro de tallo se observó en la última medición del experimento (Figura 4.6).

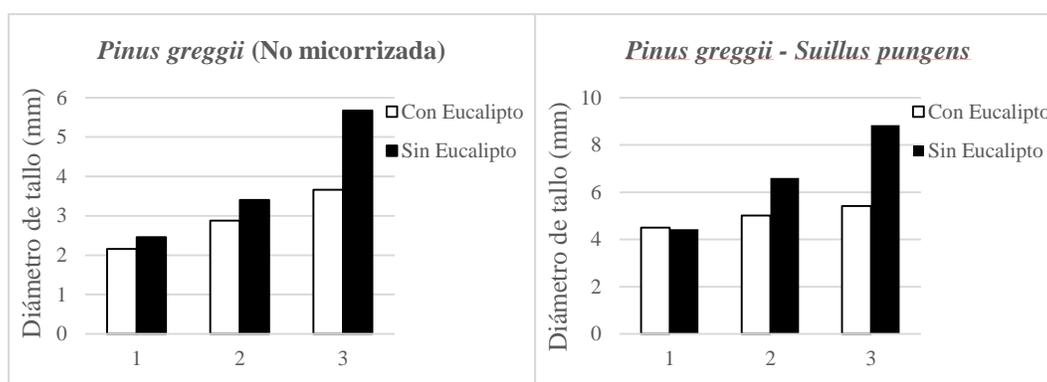


Figura 4.6. Desarrollo de diámetro de tallo de plantas de *Pinus greggii* no micorrizadas y micorrizadas con *Suillus pungens* en áreas con o sin presencia de árboles de eucalipto maduros durante 12 meses, con evaluaciones cuatrimestrales. n=7.

4.4.2.2 Segundo bioensayo

En plantas de *Pinus patula* se observó un mejor desarrollo del diámetro de tallo en las micorrizadas con *Suillus pungens*. Las plantas que no se micorrizaron se murieron al final de la evaluación, El tratamiento micorrizado con *Thelephora terrestris* también desapareció al final de la evaluación.

En cuanto a la zona de estudio se observó un mejor desarrollo de las plantas en la zona sin eucalipto, observándose mejores resultados en las plantas micorrizadas con *Suillus pungens*.

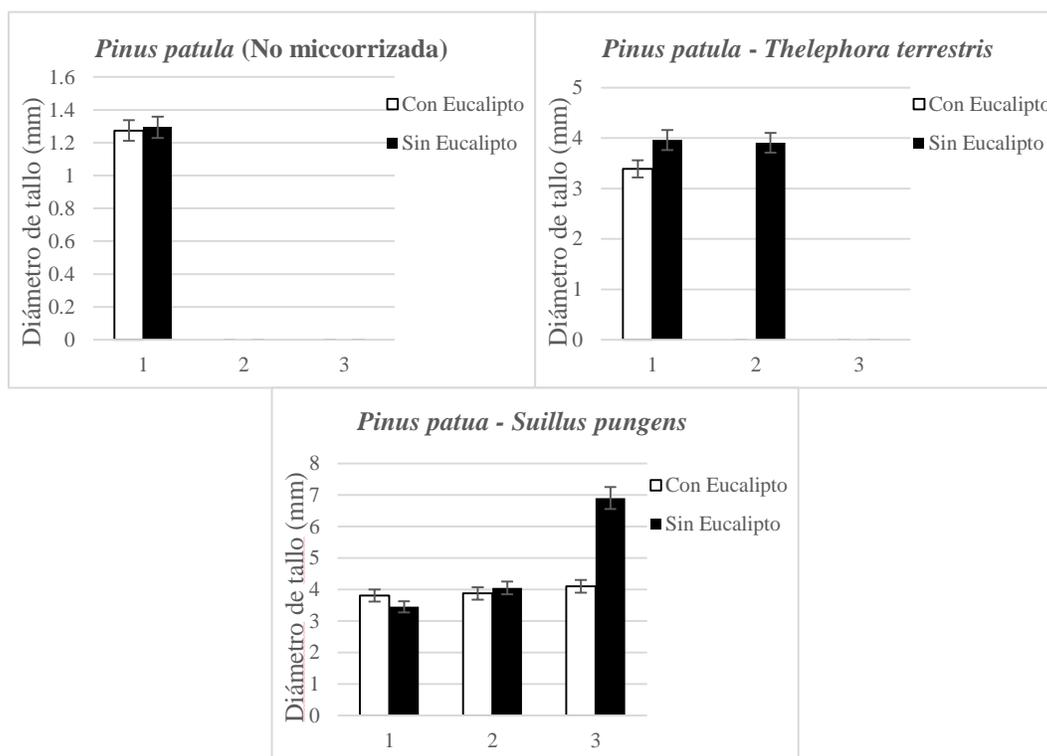


Figura 4.7. Desarrollo de diámetro de tallo de plantas de *Pinus patula* no micorrizadas y micorrizadas con *Suillus pungens* y *Thelephora terrestris* en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones cuatrimestrales. n=7.

4.4.2.3 Tercer bioensayo

El desarrollo del diámetro de tallo de plantas de *Pinus greggii* mostró resultados similares tanto en plantas micorrizadas con *Thelephora terrestris* como en las no micorrizadas. La principal diferencia se observó al comparar los resultados de las plantas presentes tanto en la zona de eucalipto como en la zona sin eucalipto, dado que las plantas presentes en la zona sin eucalipto alcanzaron valores de hasta 9mm, comparadas con los valores máximos de la zona sin eucalipto que fueron de 6 mm, esto independientemente de la presencia del micobionte.

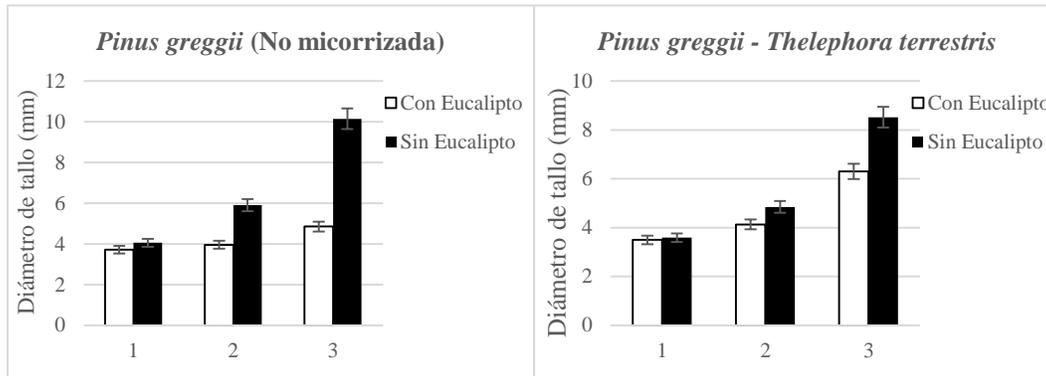


Figura 4.8. Desarrollo de diámetro de tallo de plantas de *Pinus greggii* no micorrizadas y micorrizadas con *Suillus pungens* en áreas con o sin presencia de árboles de eucaliptos maduros durante 12 meses, con evaluaciones cuatrimestrales. n=7.

4.4.3 Supervivencia

Se observaron resultados diferentes para cada bioensayo en cuanto a la supervivencia de los árboles establecidos en campo, observándose de manera general mejores porcentajes en las plantas micorrizadas (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Porcentajes de supervivencia de *Pinus greggii* y *P. patula* en áreas con presencia de árboles maduros de *Eucalyptus camaldulensis* en campo, durante 12 meses con evaluaciones bimensuales. n=7.

Tratamientos	Eucalipto						Sin eucalipto					
	Días después del trasplante											
	62	124	186	248	308	365	62	124	186	248	308	365
Primer bioensayo												
<i>Pinus greggii</i> (No micorrizada)	100	86	71	43	43	43	86	86	86	86	57	57
<i>Pinus greggii-Suillus pungens</i>	100	100	100	86	86	86	100	100	100	100	100	86
Segundo bioensayo												
<i>Pinus patula</i> (No micorrizada)	90	30	10	0	0	0	40	30	20	0	0	0
<i>Pinus patula-Suillus pungens</i>	100	100	100	29	14	14	100	100	100	43	14	14
<i>Pinus patula- Thelephora terrestris</i>	100	100	60	0	0	0	100	100	100	40	0	0
Tercer bioensayo												
<i>Pinus greggii</i> (No micorrizada)	86	86	86	43	29	29	100	100	100	86	86	57
<i>Pinus greggii-Thelephora terrestris</i>	100	100	100	100	86	86	100	100	100	100	71	71

4.4.3.1 Primer bioensayo

En el tratamiento de *Pinus greggii* micorrizado con *Suillus pungens*, se observó que las plantas micorrizadas presentaron mejores porcentajes de supervivencia al final de la evaluación. Sin embargo en un principio se presentaron porcentajes similares tanto para las

plantas micorrizadas como para las no micorrizadas, los resultados determinantes se registraron a partir de los 248 días de evaluación.

Para las plantas micorrizadas se observó un porcentaje de supervivencia al final del experimento, tanto en la zona con eucalipto como en la zona sin eucalipto. Sin embargo para las plantas no micorrizadas se observaron mejores porcentajes de supervivencia en la zona sin eucalipto (Cuadro 4.1

4.4.3.2 Segundo bioensayo

Para las plantas de *Pinus patula* se observó que esta especie es totalmente dependiente de un micobionte para su establecimiento en campo, ya que las plantas no micorrizadas al final del experimento desaparecieron en su totalidad. En un principio se observaron supervivencias similares, sin embargo a los 248 días se observaron diferencias dramáticas.

Se observaron diferencias en cuanto la micobionte utilizado para este tratamiento, mostrándose mejores porcentajes de supervivencia en plantas micorrizadas con *Suillus pungens* en comparación de la micorrizadas con *Thelephora terrestris*.

No existió una diferencia en cuanto a la zona de estudio, ya que al final del experimento se presentaron los mismos porcentajes de supervivencia.

4.4.3.3 Tercer bioensayo

Las plantas de *Pinus greggii* micorrizadas con *Thelephora terrestris* fueron las que mostraron mayores diferencias en cuanto a la supervivencia en campo. Las plantas micorrizadas presentaron porcentajes de hasta 86% en comparación de las no micorrizadas, cuyos valores máximos fueron de 57%.

Los mejores porcentajes de supervivencia se observaron en la zona sin eucalipto, tanto para las plantas no micorrizadas como para las micorrizadas. Las plantas no micorrizadas establecidas en la zona de eucalipto alcanzaron un porcentaje de apenas 29%, en comparación de las presentes en la zona sin eucalipto que fue de 57%. En cuanto a las plantas micorrizadas, en la zona de eucalipto se observó un porcentaje de supervivencia al final de la evaluación de 86%, mientras que en la zona sin eucalipto fue de 71%.

4.5 DISCUSIÓN

Una reforestación exitosa depende de la utilización de plantas de calidad para incrementar su supervivencia y su desarrollo en campo. Esta calidad de planta puede ser evaluada analizando su respuesta en campo, misma que depende de diferentes factores que principalmente son: los atributos genéticos y los adquiridos a nivel de invernadero (Cetina-Alcalá, *et al.* 2002).

Para lograr una reforestación exitosa es necesario concentrarse en la calidad de las plantas y no en la cantidad de plantas producidas para este fin. Para que la reforestación tenga un buen resultado, debe reflejarse una supervivencia en campo por lo menos 3 a 5 años después de su plantación. En los viveros se debe dar importancia a la producción de plantas de calidad que incluyen tanto factores físicos como genéticos y no enfocarse en una meta de una cierta cantidad de plantas producidas. Es decir, se deben producir menos árboles que sean sanos y vigorosos en vez de una gran cantidad de árboles de mala calidad. Esto implica un menor número de árboles plantados pero con la certeza de que desarrollaran un buen crecimiento y supervivencia (Wightman y Cruz, 2003).

En este trabajo se encontró que uno de los factores que favorecen la supervivencia en campo es la micorrización. Pardo *et al.* (2002) encontraron que al aplicar diferentes técnicas de

cultivo como son: el envase, el tipo de sustrato la fertilización y la micorrización, se observaron diferencias en cuanto a la supervivencia de *Quercus suber* L. La micorrización mostró efectos significativos sobre la altura de las plantas y sobre el diámetro de tallo.

En trabajos de reforestación efectuados con *Pinus pseudostrobus* en el sur de Nuevo León, se han registrado bajas tasas de supervivencia relacionadas principalmente con la sequía, misma que causa la mortalidad de plantaciones recién establecidas (Sigala *et. al*, 2015).

En este estudio se encontró que las plantas micorrizadas presentaron valores más altos de diámetro de tallo en comparación de las plantas no micorrizadas. Sigala *et. al* (2015) encontraron que el diámetro de tallo es la característica morfológica más relacionada con la supervivencia de plantas de *Pinus pseudostrobus*, ya que esta característica se relaciona directamente con las reservas de carbohidratos no estructurales y con el desarrollo de las raíces.

En una trabajo realizado en el estado de Michoacán reportado por Gómez-Romero *et al.* (2013), se presenta el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* Lindl. micorrizado con *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch. Se evaluaron la altura, el diámetro a la altura de la base, la cobertura, el número de ramas y el porcentaje de supervivencia. Los resultados mostraron que la supervivencia de los pinos inoculados fue de 86%, la de la misma plantación sin inóculo 62% y la de la segunda reforestación 30%.

4.6 CONCLUSIONES

- En cuanto al crecimiento se observaron mejores resultados tanto para la altura como para el desarrollo del diámetro de tallo en plantas micorrizadas en comparación de las no micorrizadas.
- El mejor tratamiento en cuanto al crecimiento fue el de *Pinus greggii* micorrizado con *Thelephora terrestris*.
- Se observó un mejor crecimiento para todos los tratamientos en la zona sin eucalipto en comparación de la zona de eucalipto.
- Los mejores porcentajes de supervivencia se observaron en plantas micorrizadas en comparación de las no micorrizadas.
- El tratamiento que presentó una mejor supervivencia al final de la evaluación fue el de plantas de *Pinus greggii* micorrizadas con *Suillus pungens*.
- Los mejores resultados de supervivencia para todos los tratamientos se observaron en la zona sin eucalipto.
- Dado que tanto el crecimiento como la supervivencia presentaron mejores resultados en la zona sin eucalipto, esto se puede atribuir a un efecto alelopático de esta especie sobre los pinos establecidos en campo.

4.7 LITERATURA CITADA

- Brearley, F. Ectomycorrhizal Associations of the Dipterocarpaceae. 2012; Biotropica: 637-648.
- Cetina-Alcalá VM, González H, VA, Ortega D, ML, Vargas H, J y Villegas M, Á. Supervivencia y crecimiento en campo de *Pinus greggii* Engelm. previamente sometido a podas o sequía en vivero. 2002; Agrociencia: 233-241.
- Debellis, T., G. Kernaghan, R. Bradley y P. Widden. Relationships between Stand Composition and Ectomycorrhizal Community Structure in Boreal Mixed-Wood Forests. 2006; Microbial Ecology: 114-126.
- Domínguez C. P. A., J. de J. Návar, J. A. Loera O. Comparación del rendimiento de pinos en la reforestación de sitios marginales en Nuevo León. 2001; Madera y Bosques: 27-35.
- García-Rodríguez, J. L., J. Pérez-Moreno, A. Aldrete, V. M. Cetina-Alcalá y H. Vaquera-Huerta. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con Eucalipto y Pino. 2006; Agrociencia: 665-676.
- Gómez-Romero M, Soto-Correa JC, Blanco-García JA, Sáenz-Romero C, Villegas J y Lindig-Cisneros R. Estudio de especies de pino para restauración de sitios degradados. 2012; Agrociencia: 795-807

- Gómez-Romero, M., J. Villegas, C. Sáenz-Romero y R. Lindig-Cisneros. Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. 2013; Madera y Bosques: 51-63.
- Martínez-Reyes M., J. Pérez-Moreno, L. Villarreal-Ruíz, R. Ferrera-Cerrato, B. Xoconostle-Cázares, J. Vargas-Hernández y M. Honrubia-García. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus gregii* inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. 2012; Ciencias forestales y del ambiente 18: 183-192.
- Pardos M, M, Cañellas RV, L y Montero G, G. Seguimiento en campo de un ensayo sobre calidad de planta de alcornoque (*Quercus suber* L.). 2002; Cuad. Soc. Esp. Cien. For.:83-88.
- Pera J y Parladé J. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: Estado actual en España. 2005; Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales: 419-433.
- Sigala R, JA, Sosa P, G, Martínez S, M, Albarrán A, D y Jacinto S, R. Influencia de la calidad de planta en la supervivencia y crecimiento de plantaciones forestales en chihuahua. Primera Edición. 2012. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias: 46 pp.
- Sigala R, JA, González T, MA Y Jiménez P, J. Análisis de supervivencia para una reforestación con *Pinus pseudostrobus* Lindl. en el sur de Nuevo León. 2015;CIENCIA UANL: 61-66.
- Smith, S.E. & Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Elsevier, New York. 780 p.

Tudela M, JW, Martínez D, MA, Valdivia A, R, Romo L, JL, Portillo V, M y Ventura R, R.

Valoración económica de los beneficios de un programa de Recuperación y conservación en el Parque Nacional Molino de Flores, México. 2011; Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente: 231-244.

Wightman, KE y Cruz BS. La cadena de la reforestación y la importancia en la calidad de las plantas. 2003; Foresta Veracruzana: 45-51.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

Hasta donde se conoce, este es el primer trabajo que evalúa a nivel metagenómico la composición de las comunidades microbianas, tanto bacterianas como fúngicas, asociadas a ectomicorrizas de los pinos neotropicales *Pinus greggi* y *Pinus patula*.

Se observó que existieron tres factores que modifican el microbioma bacteriano y fúngico de raíces ectomicorrizadas y no ectomicorrizadas: el fitobionte, el micobionte y el área estudiada.

La composición microbiana se comporta de manera diferente en cuanto a la estructura de comunidades de bacterias y hongos, dado que las bacterias presentaron una mayor diversidad en plantas de *Pinus greggi* en comparación de *Pinus patula*, independientemente del micobionte y del área, mientras que los hongos se comportaron de manera opuesta.

De igual forma este es el primer trabajo donde se reportan los primeros resultados de supervivencia en campo relacionados con la alelopatía asociada con *Eucalyptus camaldulensis* en árboles micorrizados o no. Para el establecimiento de árboles en campo es necesario que desarrollen en invernadero una micorrización superior al 80%.

La supervivencia en campo es diferente para cada especie de árbol, en este estudio se observó que las plantas de *Pinus greggi* respondieron mejor a las condiciones de campo, por lo que puede ser una especie de gran importancia en programas de reforestación. De la misma forma

se observó que *Suillus pungens* presentó mejores resultados al asociarse con esta especie de pino en comparación con *Thelephora terrestris*.

La alelopatía de algunas especies existentes en las zonas donde se planea una reforestación debe ser tomada en cuenta, ya que la supervivencia de árboles establecidos en campo depende de este factor, observándose menores porcentajes de supervivencia en presencia de especies alelopáticas. Otro factor relevante fue la micorrización dado que indujo cierta tolerancia a la alelopatía originada por eucaliptos.