



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

## *Acacia saligna* INOCULADA CON HONGOS MICORRÍZICOS Y RIZOBIOS, COMO CREADORA DE NICHOS PARA REFORESTACIÓN CON *Pinus greggii* Englem

MARYELI AGUIRRE ZAMORA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis titulada: ***Acacia saligna* inoculada con hongos micorrízicos y rizobios, como creadora de nicho para reforestación con *Pinus greggii* Englem,** realizada por la alumna Maryeli Aguirre Zamora bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Julián Delgadillo Martínez

ASESOR

  
Dr. Jesús Pérez Moreno

ASESORA

  
Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano

***Acacia saligna* INOCULADA CON HONGOS MICORRÍZICOS Y RIZOBIOS, COMO CREADORA DE NICHOS PARA REFORESTACIÓN CON *Pinus greggii* ENGLEM.**

**Maryeli Aguirre Zamora, M.C. Posgrado en Edafología**

**RESUMEN**

Los microorganismos juegan un papel fundamental en el correcto desarrollo de las especies vegetales y en el mejoramiento de las condiciones edáficas. En este trabajo se evaluaron los efectos en la microbiota del suelo por la inoculación de *Laccaria laccata* en *Pinus greggii* y el crecimiento de *P. greggii* bajo el dosel de la leguminosa *Acacia saligna* inoculada con microorganismos benéficos (hongos endo y ectomicorrízicos y rizobios). La inoculación del pino con *L. laccata* estimuló la población de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos; además, se generó mayor actividad metabólica microbiana (AWCD), a pesar de no presentar diferencias en la diversidad. Los grupos de microorganismos funcionales más activos fueron los asimiladores de aminoácidos, carbohidratos y ácidos carboxílicos y cetónicos.

**Palabras clave:** Relación pino-ectomicorriza, leguminosa-rizobio, *Laccaria laccata*, *Lactarius indigo*.

***Acacia saligna* INOCULATED WITH MYCORRHIZAL FUNGI AND RHIZOBIA, AS A  
NICHE CREATOR FOR REFORESTATION WITH *Pinus greggii* ENGLEM.**

**Maryeli Aguirre Zamora, M. Sc. Postgraduate in Soil Science**

**ABSTRACT**

Microorganisms play a critical role in the correct development of plant species and in the improvement of soil conditions. In this work, the Pines-ectomycorrhizae relation was evaluated. Benefits were observed from the inoculation of *Laccaria laccata* in *Pinus greggii*. Since proliferation of nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizers. In addition, greater microbial metabolic activity (AWCD) was generated despite not presenting differences in diversity. The most active functional groups were the assimilators of amino acids, carbohydrates, carboxylic and ketone acids.

**Keywords:** Pine-ectomycorrhizae relationship, legume-rhizobium, *Laccaria laccata*, *Lactarius indigo*.

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis te la dedico a ti mamá...porque a pesar de no recordar tu rostro sé que eres hermosa, porque no hace falta que recuerde tu voz para tener la certeza de que siempre me hablaste con ternura. Has sido mi inspiración siempre y sé que allá donde te encuentras, cerca de Dios, estás feliz de verme cumplir mis metas.*

## AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para cumplir con mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, por permitirme ser parte de su comunidad.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez, por todo su apoyo y dedicación a lo largo de mi formación académica, por permitirme aprender sin limitaciones.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno, por sus buenos consejos y palabras de aliento, así como por su disponibilidad en mi proceso de formación.

A la Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano, por su paciencia y sus aportaciones en el proceso de escritura de mi tesis.

A la Dra. Irma Diaz Aguilar, por su disposición y ayuda en mi proceso de formación.

Al Dr. Faustino Hernández Santiago, por su apoyo y paciencia en la microscopia.

Al grupo de Microbiología del Suelo del postgrado en Edafología por su contribución en mi proyecto de investigación.

A mi esposo, por todo su amor, cariño y comprensión a lo largo de este proceso, por ser mi principal apoyo desde el inicio de esta aventura.

A mi padre, por sus enseñanzas desde la infancia hasta la actualidad, por aconsejarme y enseñarme a luchar por mis objetivos.

A mis abuelas, Marcelina y Cliveria, por todas sus muestras de amor y comprensión a lo largo de mi vida.

A mis hermanitas, por ser una inspiración para superarme día con día.

A mis compañeros y amigos: Orlando, Yuri, Ana, Vivian, Ángel, Luz, Rosita, Deysi, Paty, Santos y Víctor, por llenar de alegría mi estancia en el COLPOS y ayudarme muchas veces en formación.

A Rizobio, mi gatito consentido, por alegrarme en los momentos de estrés durante el proceso de tesis.

## CONTENIDO

|   | <b>Pag.</b> |
|---|-------------|
| RESUMEN .....   | iii         |
| ABSTRACT.....   | iv          |
| LISTA DE CUADROS.....   | x           |
| LISTA DE FIGURAS.....   | xi          |
| INTRODUCCIÓN GENERAL .....  | 1           |
| Literatura citada .....   | 4           |
| Objetivos e Hipótesis .....   | 6           |
| Objetivo general .....  | 6           |
| Objetivos específicos.....  | 6           |
| Hipótesis general.....  | 7           |
| Hipótesis específicas .....   | 7           |
| REVISIÓN DE LITERATURA .....  | 8           |
| El suelo y su degradación.....  | 8           |
| Sucesión y rehabilitación ecológica .....   | 10          |
| Métodos de rehabilitación de suelos .....   | 13          |
| Relación planta-microorganismo .....  | 16          |
| Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y controladoras de enfermedades..... | 19          |
| Microorganismos simbióticos fijadores de nitrógeno atmosférico (rizobios).....    | 20          |
| Fijadoras de N <sub>2</sub> atmosférico de vida libre .....                       | 23          |
| Bacterias solubilizadoras de fosfatos.....  | 24          |
| Hongos micorrízicos.....  | 25          |
| Interacción hongos micorrízicos-rizobacterias .....                               | 30          |
| LITERATURA CITADA.....  | 35          |

|   |    |
|---|----|
| CAPÍTULO I. <i>Pinus greggii</i> INOCULADO CON <i>Laccaria laccata</i> : DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS Y RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA RIZOSFERA ..... | 46 |
| 1.1. RESUMEN.....   | 46 |
| 1.2. ABSTRACT .....   | 47 |
| 1.3. INTRODUCCIÓN .....   | 48 |
| 1.4. MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 49 |
| 1.4.1. Preparación del sustrato e inoculación .....   | 49 |
| 1.4.2. Índice de diversidad y perfil metabólico de comunidades microbianas.....   | 50 |
| 1.4.3. Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos   |    |
| 53  |    |
| 1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 55 |
| 1.5.1. Crecimiento de <i>P. greggii</i> inoculado con <i>L. laccata</i> .....   | 55 |
| 1.5.2. Índice de diversidad y actividad metabólica de las comunidades microbianas   |    |
| 56  |    |
| 1.5.3. Población de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos .....  | 59 |
| 1.6. CONCLUSIONES .....   | 62 |
| 1.7. LITERATURA CITADA.....   | 63 |
| CAPÍTULO II. CRECIMIENTO DE <i>Pinus greggii</i> BAJO EL DOSEL DE <i>Acacia saligna</i> CON LA INOCULACIÓN DE RIZOBIOS, HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y ECTOMICORRÍZICOS .....           | 66 |
| 2.1 RESUMEN.....  | 66 |
| 2.2 ABSTRACT.....   | 67 |
| 2.3 INTRODUCCIÓN .....  | 68 |
| 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 69 |
| 2.4.1 Establecimiento de <i>Acacia saligna</i> .....  | 69 |



|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.4.2  | Preparación de los inóculos .....  | 69 |
| 2.4.3  | Preparación del sustrato e inoculación para el establecimiento preliminar de <i>P. greggii</i> 72  |    |
| 2.4.4  | Establecimiento del experimento .....  | 73 |
| 2.4.5  | Elaboración del sustrato .....   | 73 |
| 2.4.6  | Análisis químico de los suelos: San Miguel Tlaixpan, Estado de México y Cuautla, Morelos .....   | 74 |
| 2.4.7  | Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos .....   | 75 |
| 2.4.8  | Conteo de nódulos.....   | 76 |
| 2.4.9  | Determinación de la colonización micorrízica .....   | 76 |
| 2.4.10 | Extracción de esporas por el método de tamizado y decantado en húmedo .....  | 78 |
| 2.4.11 | Determinación de colonización ectomicorrízica .....  | 79 |
| 2.4.12 | Análisis de resultados.....  | 79 |
| 2.5    | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 80 |
| 2.5.1  | Supervivencia de <i>Pinus greggii</i> bajo el dosel de <i>Acacia saligna</i> y la inoculación de microorganismos benéficos (rizobios, HMA y HE). ..... | 80 |
| 2.5.2  | Altura y peso seco de la parte aérea de los pinos.....   | 81 |
| 2.5.3  | Colonización ectomicorrízica de <i>Laccaria laccata</i> en <i>Pinus greggii</i> .....  | 81 |
| 2.5.4  | Altura y peso seco de <i>Acacia saligna</i> .....  | 84 |
| 2.5.5  | Nodulación de <i>Acacia saligna</i> .....  | 87 |
| 2.5.6  | BFN y BSF en <i>Acacia saligna</i> .....   | 88 |
| 2.5.7  | Colonización micorrízica arbuscular y número de esporas .....  | 89 |
| 2.6    | CONCLUSIONES .....   | 92 |
| 2.7    | LITERATURA CITADA.....   | 93 |
|        | CONCLUSIONES GENERALES.....  | 96 |

## LISTA DE CUADROS

|   | <b>Pag.</b> |
|---|-------------|
| Cuadro 1. Mecanismos de las bacterias benéficas que proporcionan nutrientes a las plantas o el suelo y/o promueven el crecimiento vegetal (Adaptado de Molina-Romero <i>et al.</i> 2015). ..... | 20          |
| Cuadro 2. Interacción entre bacterias promotoras de la micorrización (BPM) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y su beneficio en la colonización. ....                                    | 32          |
| Cuadro 2.1. Características químicas de los suelos. ....  | 75          |
| Cuadro 2.2. Supervivencia de <i>P. greggii</i> bajo el dosel de <i>A. saligna</i> . ....  | 81          |

## LISTA DE FIGURAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| Figura 2. Principales procesos de degradación del suelo en México, 2002 (Tomado de SEMARNAT, 2012). .....  | 10          |
| Figura 3. Esquema de la metodología que puede implementarse para la toma de decisiones al rehabilitar suelos (Adaptado de Fabelo, 2017). .....   | 13          |
| Figura 4. Principales grupos microbianos que influyen en la nutrición de las plantas. 1. Fijadores de nitrógeno atmosférico (N <sub>2</sub> ) de vida libre (FNVL) en la rizósfera de gramíneas y otras angiospermas. 2. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que colonizan el tejido cortical de más del 80 % de las plantas terrestres y favorecer el flujo de nutrimentos hacia estas a cambio de compuestos derivados de la fotosíntesis. 3. Microorganismos solubilizadores de fosfato capaces de transformar el fosfato insoluble en formas aprovechables por las plantas. 4. Fijadores de N <sub>2</sub> atmosférico simbióticos (FNS) con capacidad de formar nódulos en raíces de leguminosas. 5. Microorganismos productores de sideróforos, compuestos generalmente peptídicos con alta afinidad por hierro férrico (Fe <sup>+3</sup> ) y que facilitan la absorción de este metal por las plantas reduciendo el Fe disponible para otros organismos, incluyendo fitopatógenos. 6. Hongos ectomicorrízicos (HE) simbióticos a plantas de interés forestal, que modifican la anatomía micro y macroscópica de las raíces de la planta que colonizan favoreciendo la absorción nutrimental. 7. Hongos saprobios que descomponen la necromasa y propician que los nutrimentos presentes en ella retornen al suelo en formas potencialmente aprovechables (Tomado de Ferrera-Cerrato <i>et al.</i> 2016). ..... | 18          |
| Figura 5. Dinámica de formación de un nódulo. 1) Rizobios libres en el suelo; 2) Rizobios atraídos por los pelos radicales; 3 y 4) Inicio de la infección de los pelos radicales mediante la formación de la forma conocida como “Cayado del pastor”; 5 y 6) Hilo de infección que invade las células corticales; 7) Reproducción de rizobios en células haploides; 8) hipertrofia radical y aparición del nódulo; 9) Rizobio sin pared celular (bacteroide) en las células corticales fijando nitrógeno; 10) Nódulo con leghemoglobina (Tomado de Alexander 1980). .....  | 22          |

|   |    |
|---|----|
| Figura 6. Características de la micorriza arbuscular. 1) Esporas. 2) Hifas. 3) Interacción planta-hongo. 4) Arbúsculos. 5) Vesículas. Formación de la micorriza arbuscular (Tomado de Redes microbianas 2014).....  | 28 |
| Figura 7. Influencia de la simbiosis micorrízica arbuscular en las plantas. a) Rizosfera, hifosfera y micorrizosfera en el suelo. b) Aumento de la absorción de nutrientes. c) Formación de agregados en el suelo (Modificado de Audet 2012). .....   | 31 |
| Figura 8. Papel de las bacterias promotoras de la micorización. 1) La bacteria mejora la conductividad del suelo al hongo. 2) La bacteria mejora la receptividad de la raíz al hongo. 3) La bacteria interactúa con el reconocimiento planta-hongo y el establecimiento de la simbiosis. 4) La bacteria promueve la germinación de propágulos fúngicos, la supervivencia y el crecimiento del micelio. 5) El hongo selecciona poblaciones bacterianas en la rizosfera. 6) El suelo apoya el crecimiento de hongos presimbióticos. 7) El suelo determina la receptividad de la raíz al hongo. 8) Las raíces seleccionan poblaciones bacterianas en la rizosfera (Modificado de Frey-Klett <i>et al.</i> 2007)..... | 33 |
| Figura 1.1. Preparación del sustrato e inoculación de <i>P. greggii</i> . a) Mezcla del sustrato; b) Esterilización del sustrato; c) Inoculación de las plantas.....  | 50 |
| Figura 1.2. Índice de diversidad y perfil metabólico de comunidades microbianas. a) Pesado de la muestra de sustrato; b) Elaboración de la solución madre; c) Diluciones seriadas; d) Viraje de color en las placas Biolog™ EcoPlates.....  | 52 |
| Figura 1. 3. Conteo de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. a) Pesado de la muestra de sustrato; b) Elaboración de la solución madre; c) Diluciones decimales seriadas; d) Medios de cultivo utilizados: fuente combinada de carbono y Pikovskaya; f) Bacterias fijadoras de nitrógeno; g) Bacterias solubilizadoras de fosfatos con halo de solubilización. ....  | 54 |
| Figura 1.4. Influencia de la inoculación de <i>L. laccata</i> sobre la altura y el peso seco de <i>P. greggii</i> (Tukey $p < 0.05$ ) $n = 6$ .....   | 56 |
| Figura 1. 5. Diversidad ( $H'$ ) y actividad metabólica microbiana (AWCD) del sustrato de <i>P. greggii</i> inoculado con <i>L. laccata</i> y no inoculado. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$ ) $n = 6$ . ....  | 57 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.6. Actividad metabólica microbiana expresada en el uso de fuentes de carbono correspondientes a cinco grupos funcionales (ANOVA). Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $\alpha= 0.05$ ) n= 6. ....   | 59 |
| Figura 1. 7. Abundancia de bacterias a) fijadoras de nitrógeno y b) solubilizadoras de fosfatos en <i>P. greggii</i> inoculado con <i>L. laccata</i> y no inoculado (Tukey p < 0.05) n= 6. ....  | 61 |
| Figura 2.1. Elaboración de inóculo de rizobios nativos de <i>A. saligna</i> . a) separación de raíces del suelo; b) corte de los nódulos; c) proceso de desinfección de nódulos; d) siembra de las muestras en Caldo Nutritivo; e) centrifugación de la muestra para la formación del pellet.....  | 71 |
| Figura 2. 2. Rodal de <i>Acacia saligna</i> en un bosque de <i>Pinus greggii</i> .....   | 72 |
| Figura 2.3. Conteo de nódulos. a) Raíces de <i>A. saligna</i> ; b) Observación de Nódulos; c) Conteo de los nódulos.....   | 76 |
| Figura 2.4. Laminillas de raíces para la determinación de colonización micorrízica arbuscular. ....  | 78 |
| Figura 2.5. Aspectos generales de las raíces de <i>Pinus greggii</i> micorrizadas por <i>Laccaria laccata</i> , comparadas con las raíces no micorrizadas. a) Raíz colonizada con un morfotipo monopodial (M) donde se presentan hifas emanentes (he); b) Raíz colonizada con morfotipos monopodiales (M) y dicotómicos (D); c) y d) Raíces no colonizadas con presencia de pelos radicales (PR); e) Manto (m) y red de Hartig (rH) en una raíz colonizada; f) Corte transversal de una raíz no colonizada con pelos radicales (PR)..... | 83 |
| Figura 2.6. Altura de <i>Acacia saligna</i> cultivada junto a <i>Pinus greggii</i> bajo la influencia de diferentes microorganismos. A= <i>Acacia</i> inoculada con <i>Lactarius</i> - Pino inoculado con <i>Laccaria</i> ; B= <i>Acacia</i> sin inocular - Pino inoculado con <i>Laccaria</i> ; C= <i>Acacia</i> sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha= 0.05$ ) n= 4. ....  | 84 |
| Figura 2.7. Crecimiento de <i>Acacia saligna</i> junto con <i>Pinus greggii</i> en distintos tratamientos. ....  | 85 |
| Figura 2.8. Peso seco de <i>Acacia saligna</i> cultivada junto a <i>Pinus greggii</i> bajo la influencia de diferentes microorganismos. a) Parte aérea; b) Raíz. A= <i>Acacia</i> inoculada con  |    |

|   |    |
|---|----|
| <p><i>Lactarius</i> - Pino inoculado con <i>Laccaria</i>; B= Acacia sin inocular - Pino inoculado con <i>Laccaria</i>; C= Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha=0.05</math>) n= 4. ....</p>   | 86 |
| <p>Figura 2.9. Raíces de <i>Acacia saligna</i> pertenecientes a tres tratamientos.....</p>  | 87 |
| <p>Figura 2.10. Nodulación de <i>Acacia saligna</i> cultivada junto a <i>Pinus greggii</i> bajo la influencia de diferentes microorganismos. A= Acacia inoculada con <i>Lactarius</i> - Pino inoculado con <i>Laccaria</i>; B= Acacia sin inocular - Pino inoculado con <i>Laccaria</i>; C= Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha=0.05</math>) n= 4. ....</p>   | 88 |
| <p>Figura 2.11. Tamaño de la población de a) bacterias fijadoras de nitrógeno y b) bacterias solubilizadoras de fosfatos, en la rizósfera de <i>Acacia saligna</i> cultivada junto a <i>Pinus greggii</i> bajo la influencia de diferentes microorganismos. A= Acacia inoculada con <i>Lactarius</i> - Pino inoculado con <i>Laccaria</i>; B= Acacia sin inocular - Pino inoculado con <i>Laccaria</i>; C= Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha=0.05</math>). ....</p> | 89 |
| <p>Figura 2.12. Colonización micorrízica arbuscular en las raíces de <i>Acacia saligna</i> cultivada junto a <i>Pinus greggii</i> bajo la influencia de diferentes microorganismos. A= Acacia inoculada con <i>Lactarius</i> - Pino inoculado con <i>Laccaria</i>; B= Acacia sin inocular - Pino inoculado con <i>Laccaria</i>; C= Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey, <math>\alpha=0.05</math>). ....</p>   | 90 |
| <p>Figura 2.13. Colonización micorrízica arbuscular en las raíces de <i>Acacia saligna</i>. a y b) Tratamiento Acacia inoculada con <i>Lactarius</i>-Pino inoculado con <i>Laccaria</i>, donde observan arbusculos (Ar) y Vesículas (Vs); c y d) Tratamiento Acacia sin inocular-Pino inoculado con <i>Laccaria</i>, donde se observan hifas (H); e y f) Tratamiento Acacia sin inocular-Pino sin inocular (Testigo), con presencia de hifas (H). ....</p>  | 91 |

## GUÍA DE ABREVIATURAS

**ACM:** Aumento de la colonización micorrízica

**APA:** Aumento de la producción de arbusculos

**AWCD:** Actividad metabólica microbiana

**BFN:** Bacterias fijadoras de nitrógeno

**BPM:** Bacterias promotoras de la micorrización

**BSF:** Bacterias solubilizadoras de fosfatos

**C:** Carbono

**CE:** Conductividad eléctrica

**ELMARC:** Extracto de levadura manitol agar rojo congo

**FNS:** Fijadores de nitrógeno simbióticos

**FNVL:** Fijadoras de nitrógeno de vida libre

**HE:** Hongos ectomicorrízicos

**HMA:** Hongos micorrízicos arbusculares

**MO:** Materia orgánica

**N:** Nitrógeno

**Nt:** Nitrógeno total

**Rpm:** Repeticiones por minuto

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El suelo es uno de los reservorios de la vida con mayor diversidad, donde habitan plantas, animales y microorganismos (Orgiazzi *et al.* 2016). Por lo cual, es donde se lleva a cabo, de manera directa o indirecta, la producción de la mayoría de los alimentos que consumimos, pues tiene la capacidad de soportar el desarrollo del sistema radical de las especies vegetales (Orgiazzi *et al.* 2016). En el suelo, las plantas y los microorganismos se encuentran estrechamente relacionados, puesto que ambos aportan sustancias nutritivas uno al otro (Smith y Read 2008). Las relaciones benéficas planta-microorganismo tienen mayor abundancia en la zona de influencia de la raíz, llamada rizósfera (Ferrera-Cerrato *et al.* 2016, Ochoa-Hueso *et al.* 2018), ya que los exudados radicales funcionan como atrayentes, puesto que los organismos edáficos dependen de los aportes de los compuestos carbonatados exudados por las raíces (Bonkowski *et al.* 2009).

Sin embargo, en la actualidad gran parte de los suelos del planeta se encuentran degradados, en su mayoría por causas antrópicas. Lo cual genera cambios en los ecosistemas (SER 2002), pérdida de biodiversidad (Orgiazzi *et al.* 2016) y aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero (Valiente *et al.* 2015). Por ello, es importante la elaboración de estrategias eficaces para la rehabilitación de suelos, donde se puedan observar resultados a corto y mediano plazo. En este sentido, es importante llevar a cabo enmiendas ecológicas en zonas perturbadas, evitando la pérdida de la biodiversidad, que puede originar problemas relacionados con el desabasto alimentario, los servicios ecosistémicos (Orgiazzi *et al.* 2016) y aumento del cambio climático (Maldonado-Chávez *et al.* 2010). La utilización de plantas vivas para la rehabilitación de suelos es un método eficiente, donde pueden participar básicamente la mayoría de las plantas que conocemos; desde briofitas hasta angiospermas. Sin embargo, las especies arbóreas son las más



utilizadas para la rehabilitación de ecosistemas forestales (Cantos-Cevallos *et al.* 2018, Gilmour *et al.* 2000, Lugo 1988).

El uso de leguminosas ha tenido buenos resultados, ya que incrementa la fijación de nitrógeno, por medio de su interacción con las bacterias simbióticas denominadas rizobios (Carrillo-González *et al.* 2017, Gage 2004, Moawad 1998); lo cual propicia un ambiente idóneo para el enriquecimiento de otras poblaciones microbianas benéficas para las plantas (Bonkowski *et al.* 2009). Provocando a su vez efectos positivos en la estructura del suelo, como la formación de agregados (Weil y Brady 2016). Por otro lado, las especies forestales como los pinos, tienen alta importancia en la reforestación de los bosques, ya que en simbiosis con hongos ectomicorrízicos dan pie al mejoramiento de las características físicas, químicas y biológicas del suelo (Mares-Ponce de León *et al.* 2018, Smith y Read 2008). A su vez, un ambiente adecuado para la colonización de microorganismos, como bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Además, los consorcios microbianos, que hacen referencia a la utilización de distintas especies de microorganismos, aumentan el efecto positivo en el crecimiento de las plantas y mejoramiento de las condiciones del suelo, comparados con aquellos estudios donde se utilizan cepas puras ya sea bacterianas o de hongos micorrízicos arbusculares (Rasouli-Sadaghiani *et al.* 2018).

En general, es indispensable implementar técnicas de rehabilitación de los suelos en México, ya que un 45.2 % de estos se encuentra degradado (SEMARNAT 2012). Moncada-de la Fuente *et al.* (2013) mencionan que las acciones de rehabilitación de suelos acordes a la problemática en el país son: la aplicación de abonos verdes, siembra aérea, prácticas mecánicas y exclusión (tierras en descanso). No obstante, en el 2014 la superficie edáfica incorporada a programas de compensación ambiental por cambio de uso de suelos en terrenos forestales y el programa nacional forestal

(ambos de CONAFOR) fue solo el 0.2 % de la superficie nacional degradada (SEMARNAT 2012). Aunado a esto, la mayoría de las estrategias de rehabilitación implementadas en México se encuentran enfocadas a la protección de la vegetación y no en mejorar las condiciones del suelo (Gardi *et al.* 2014).

Por ello, esta investigación presenta una estrategia de rehabilitación de suelos forestales mediante la utilización de *Acacia saligna* y diversos microorganismos (rizobios, hongos micorrízicos arbusculares y hongos ectomicorrízicos) como creadores de nicho para *Pinus greggii*, con la cual además de promover el desarrollo vegetativo, se generan las condiciones idóneas para el mejoramiento de las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo.

## Literatura citada

- Bonkowski M, C Villenave and B Griffiths. 2009. Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant and Soil* 321: 213-233.
- Cantos-Cevallos G, J Sánchez-Fonseca, E González, P Álvarez y L Telo. 2018. Ecología y manejo silvícola para la rehabilitación del bosque pluvisilva de baja altitud sobre complejo metamórfico. *Revista Cubana de Ciencias Forestales* 6: 58-79.
- Carrillo-González R, YS Perea-Vélez y MCA González-Chávez. 2017. Fitorremediación asistida con enmiendas y fitoestabilización de elementos potencialmente tóxicos. *Agroproductividad* 10: 15-20.
- Ferrera-Cerrato R, A Alarcón, J Delgadillo-Martínez, JJ Almaráz-Suárez y J Pérez-Moreno. 2016. Los microorganismos rizosféricos y su impacto en la nutrición vegetal. En: Alcántar-González G, L Trejo-Téllez y F Gómez-Merino eds. Nutrición de cultivos. Texcoco, Estado de México. p. 423-439.
- Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 280-300.
- Gardi C, M Angelini y S Barceló. 2014. Atlas de suelos de América Latina y el Caribe. Comisión Europea-Oficina de Publicaciones de la Unión Europea L-2995 Luxembourg, Luxembourg. 176 p.
- Gilmour DA, X Tsechalicha and N Van-San. 2000. Rehabilitation of degraded forest ecosystems in Cambodia, Lao PDR, Thailand and Vietnam. Pathumthani, Thailand. 36 p.
- Lugo AE. 1988. The future of the forest: ecosystem rehabilitation in the tropics. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development* 30: 16-45.
- Maldonado-Chávez E, MC Rivera-Cruz, F Izquierdo-Reyes y DJ Palma-López. 2010. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia, Trópico Húmedo* 26: 121-136.
- Mares-Ponce de León Y, LN Muñoz-Castellanos, MF Ruiz-Cisneros, DA Pérez-Corral, JJ Ornelas-Paz, CH Acosta-Muñiz, DI Berlanga-Reyes y CC Rios-Velasco. 2018. Identificación morfológica y molecular de especies de *Mortierella* asociados a rizosfera de manzanos con síntomas de enfermedades radiculares. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 185-195.
- Moawad H, SB El-Din and RA Abdel-Aziz. 1998. Improvement of biological nitrogen fixation in Egyptian winter legumes through better management of *Rhizobium*. *Plant and Soil* 204: 95-106.
- Moncada-de la Fuente J, M Anaya-Garduño, C Ortíz-Solorio, P Sánchez-García y J Chacón-Rodríguez. 2013. Suelo, protejamos el suelo que nos da vida. SAGARPA, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 22 p.

- Ochoa-Hueso R, DJ Eldridge, M Delgado-Baquerizo, S Soliveres, MA Bowker, N Gross, M García-Gómez, E Valencia, T Arredondo, L Beinticenco, D Coaguila, AJ Dougill, CI Espinosa, J Gaitán, RT Guuroh, E Guzman, JR Gutiérrez, RM Hernández, E Huber-Sannwald, T Jeffries, A Linstädter, RL Mau, J Moneris, A Prina, E Pucheta, I Stavi, AD Thomas, E Zaady, BK Singh, FT Maestre and T Arredondo. 2018. Soil fungal abundance and plant functional traits drive fertile island formation in global drylands. *Journal of Ecology* 106: 242-253.
- Orgiazzi A, RD Bardgett, E Barrios, V Behan-Pelletier, MJI Briones, JL Chotte, GB De Deyn, P Eggleton, N Fierer, T Fraser, K Hedlund, S Jeffery, NC Johnson, A Jones, E Kandeler, N Kaneko, P Lavelle, P Lemanceau, L Miko, L Montanarella, FMS Moreira, KS Ramirez, S Scheu, BK Singh, J Six, WHvan-der Putten and DH Wall. 2016. Global soil biodiversity atlas. European Commission, Publications Office of the European Union. Luxembourg, Luxembourg. 176 p
- Rasouli-Sadaghiani MH, M Barin, H Khodaverdiloo, S Siavash-Moghaddam, A Damalas and S Kazemalilou. 2018. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobacteria Promote Growth of Russian Knapweed (*Acroptilon repens* L.) in a Cd-Contaminated Soil. *Journal of Plant Growth Regulation* 36: 1-9.
- SEMARNAT. 2012. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México 34 p.
- SER (Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group). 2002. The SER International Primer on Ecological Restoration. Society for Ecological Restoration International, Tucson, Arizona. Consultado 20 mar. 2020. Disponible en <http://www.ser.org>.
- Smith SE and DJ Read. 2008. Mycorrhizal symbiosis. New York, EUA. 803 p.
- Valiente BA, J Aizen, J Alcántara, A Arroyo, M Cocucci y MM Galetti. 2015. Beyond species loss: The extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology* 29: 299-307.
- Weil RR and NC Brady. 2016. The nature and properties of soils. Edinburgh, England. 1086 p.

## **Objetivos e Hipótesis**

### **Objetivo general**

Mejorar el crecimiento de *Pinus greggii* bajo el dosel de *Acacia saligna* mediante la inoculación con rizobios, hongos micorrízicos arbusculares y ectomicorrízicos.

### **Objetivos específicos**

- Estimar el efecto de la inoculación con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* en el crecimiento de *Pinus greggii*, en la diversidad microbiana y en la abundancia de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- Determinar los cambios en el crecimiento y microbioma de *Pinus greggii* bajo el dosel de *Acacia saligna* debido a la inoculación con rizobios, hongos micorrízicos arbusculares y los hongos ectomicorrízicos *Lactarius indigo* y *Laccaria laccata*.

### **Hipótesis general**

La inoculación con rizobios, hongos micorrízicos arbusculares y ectomicorrízicos favorece el crecimiento de *Pinus greggii* bajo el dosel de *Acacia saligna*.

### **Hipótesis específicas**

- El crecimiento de *Pinus greggii*, la diversidad microbiana y la población de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aumentan por la inoculación con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata*.
- La inoculación con rizobios, hongos micorrízicos arbusculares y los hongos ectomicorrízicos, *Lactarius indigo* y *Laccaria laccatta*, favorecen el crecimiento de *Pinus greggii* bajo el dosel de *Acacia saligna*.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **El suelo y su degradación**

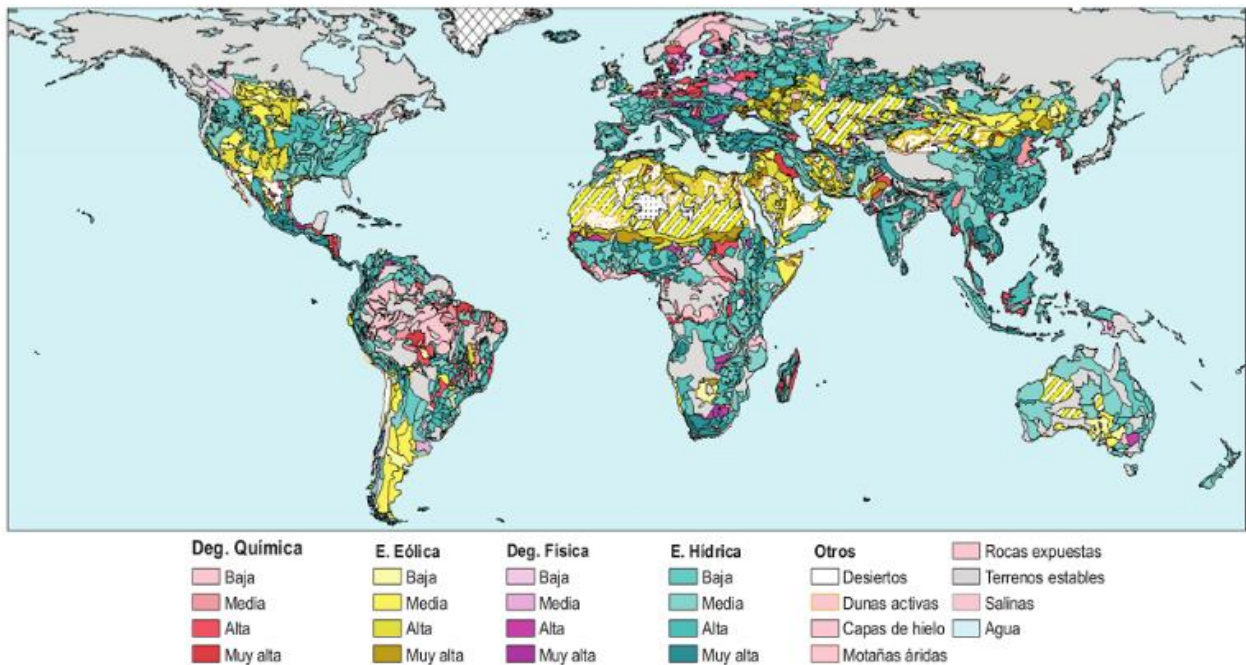
El suelo es un elemento fundamental para el soporte físico y proveedor de nutrimentos para las plantas (Andrades y Martínez 2014, Weil y Brady 2016). Este sistema es el resultado de la interacción que se lleva a cabo entre elementos vivos e inertes, puesto que albergan una diversidad compleja de organismos que varían en tamaño, desde pocos micrómetros (ej. bacterias) hasta varios centímetros (ej. lombrices); los cuales se distribuyen de distintas maneras en tiempo y espacio, formando comunidades del suelo únicas en cada ecosistema. Además, al interactuar entre sí, brindan servicios ecosistémicos esenciales para la vida humana, desde el crecimiento de las plantas, hasta la regulación del clima (Orgiazzi *et al.* 2016).

Sin embargo, la degradación de los suelos es un problema de importancia global, que ha ido en aumento con el transcurso de los años. Este problema, dificulta y en algunas ocasiones hace imposible la utilización de este recurso (Lal y Stewart 1990, Bai *et al.* 2008, Ferrari y Wall 2015). Alrededor de mil millones de hectáreas de suelo se encuentran en estado de degradación en el mundo, donde destacan los problemas por erosión hídrica y eólica, con el 55.7 y 27.9 %, respectivamente; seguidas de la degradación química con 15.9 % y la física con 11.8 % de los suelos afectados (Nkonya *et al.* 2011).

Si bien esta problemática puede generarse de manera natural, se sabe que son las actividades humanas las que dañan en mayor medida los suelos del mundo y se deben proponer alternativas de manejo para detener la degradación y favorecer la rehabilitación de los mismos (Ferrari y Wall 2015, Jadán *et al.* 2016). Entre los factores antrópicos que tienen mayor impacto en la degradación de este recurso se encuentran: las actividades mineras (Salinas y Romaní 2016), la contaminación

con hidrocarburos (Varjani 2017) y el uso de agroquímicos (Newman *et al.* 2016), así como las malas prácticas agrícolas (Etchevers *et al.* 2016).

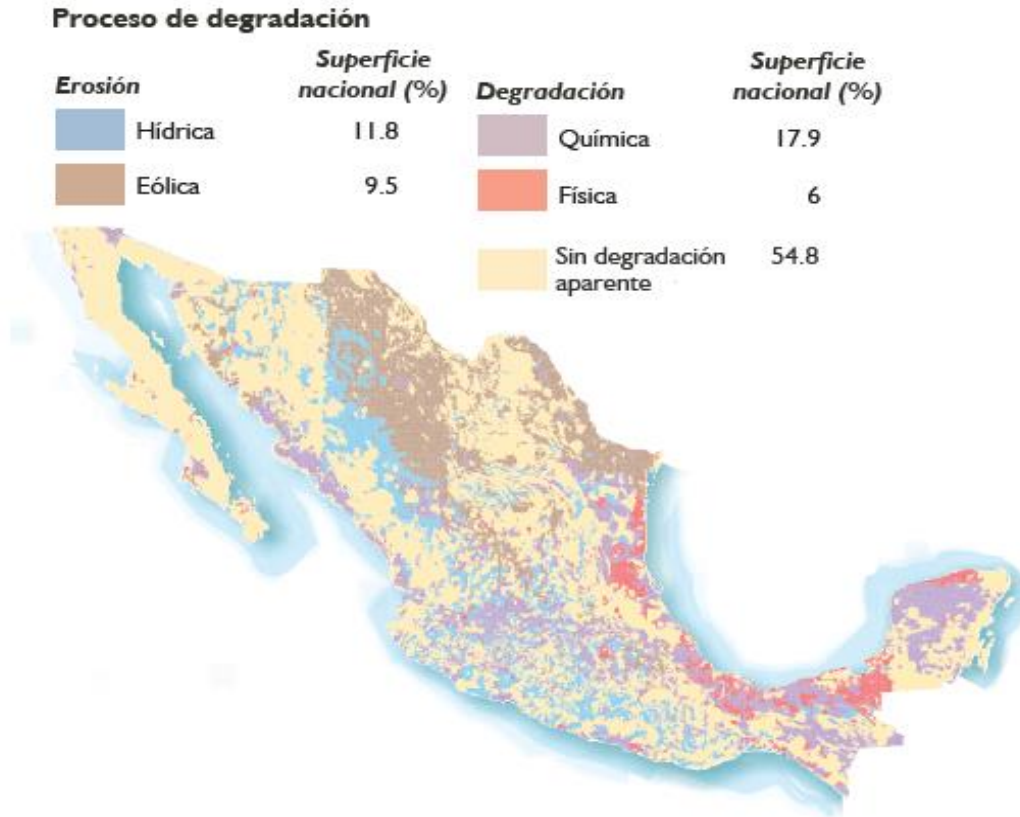
Las zonas con suelos en estado de degradación, de mayor a menor son: Europa 91%; Centro y Sudamérica 77%; Asia-Pacífico 73%; África, Norte y Medio Este 71%; África Sub-Sahariana 67%, Norte de América 48% y Norte de Asia 47% (López-Santos 2016) (Figura 1).



**Figura 1. Degradación de los suelos a nivel mundial, causado por las actividades humanas (Fuente: Leenaars *et al.* 2015. Tomado de López-Santos 2016).**

En México, los suelos se encuentran degradados en un 45.2 % considerando una superficie nacional de 1 909 818.5 km<sup>2</sup> (SEMARNAT, 2012), de los cuales 6 % corresponde a erosión física, 9.5 % erosión eólica, 11.8 % erosión hídrica y 17.9 % degradación química (SAGARPA, 2013), lo que indica que el mal manejo de los suelos es una de las principales causas de su deterioro en el país (Figura 2).





**Figura 1. Principales procesos de degradación del suelo en México, 2002 (Tomado de SEMARNAT, 2012).**

### **Sucesión y rehabilitación ecológica**

Los ecosistemas que conocemos, están formados a partir de sucesiones ecológicas, las cuales llevan al ambiente a un estado de equilibrio, conduciendo a los organismos a formar una comunidad clímax (García y Denegri 2016), donde se encuentran una serie de organismos adaptados al ecosistema formado a lo largo de los años.

Connell y Slatyer (1977), mencionan que existen tres mecanismos de sucesión después de una perturbación: 1) la facilitación, que se lleva a cabo mediante la colonización de especies pioneras que favorecen el crecimiento de las especies tardías para después ser eliminadas por estas últimas debido a la competencia; 2) la tolerancia, donde las especies pioneras no favorecen a las tardías, pero igual que en el primer mecanismo, son eliminadas por la competencia que ejercen las especies

tardías; 3) la inhibición, donde las especies pioneras desfavorecen el establecimiento de las especies tardías, las cuales sólo pueden crecer si las primeras son eliminadas.

Por otro lado, se le denomina restauración ecológica al proceso mediante el que se realiza una alteración intencional del hábitat con la finalidad de establecer un ecosistema natural funcional, imitando de esta forma la diversidad, estructura, función y dinámica del ecosistema (SER 2002). Sin embargo, los objetivos de las estrategias de restauración en la mayoría de los casos no se cumplen debido a la dificultad de regenerar las características originales de un ecosistema. Por ello, se recomienda emplear estrategias de rehabilitación, puesto que estas proponen mejorar la calidad del ambiente sin el objetivo de regresar al ecosistema natural (Barrientos y Monje-Nájera 2010), lo cual es más fácil de conseguir, ya que no es necesario imitar las características iniciales del sistema, pero sí proporcionar un nicho ecológico al que se adapten diversas especies (Buée *et al.* 2007, Dumbrell *et al.* 2010).

En diversos países existen leyes que regulan los proyectos de restauración y rehabilitación de los ecosistemas; sin embargo, en México no se contaba con una política nacional que atendiera este problema (Ceccon y Martínez-Garza, 2016), dejando un panorama lamentable debido a que este país es uno de los reservorios naturales más grandes del mundo. Lo anterior se debe a que la mayoría de las estrategias de rehabilitación implementadas en México se encuentran enfocadas a la protección de la vegetación y no en mejorar las condiciones del suelo (Gardi *et al.* 2014), lo cual consiste en reforestar áreas perturbadas sin el seguimiento necesario para que las plantas tenga un índice alto de supervivencia, por lo que las áreas no logran consolidar un estado de rehabilitación (Carabias *et al.* 2007).

Actualmente, el programa “Sembrando vida” tiene el objetivo recuperar la cobertura forestal de un millón de hectáreas en el país (Secretaría de Bienestar 2019). Después de un año de que este proyecto arrancara, se anunció que se han reforestado 500,000 hectáreas del país. No obstante, se estima que el proceso de rehabilitación de las áreas que se encuentran dentro de este programa sea lento, comparado con estrategias de otros países (Altamirano 2019).

Debe considerarse que antes de implementar una estrategia de rehabilitación se debe determinar el tipo de degradación que se presenta, por lo cual Fabelo (2017) desarrolló una metodología dirigida a la toma de decisiones a realizar ante la necesidad de rehabilitación de suelos (Figura 3).

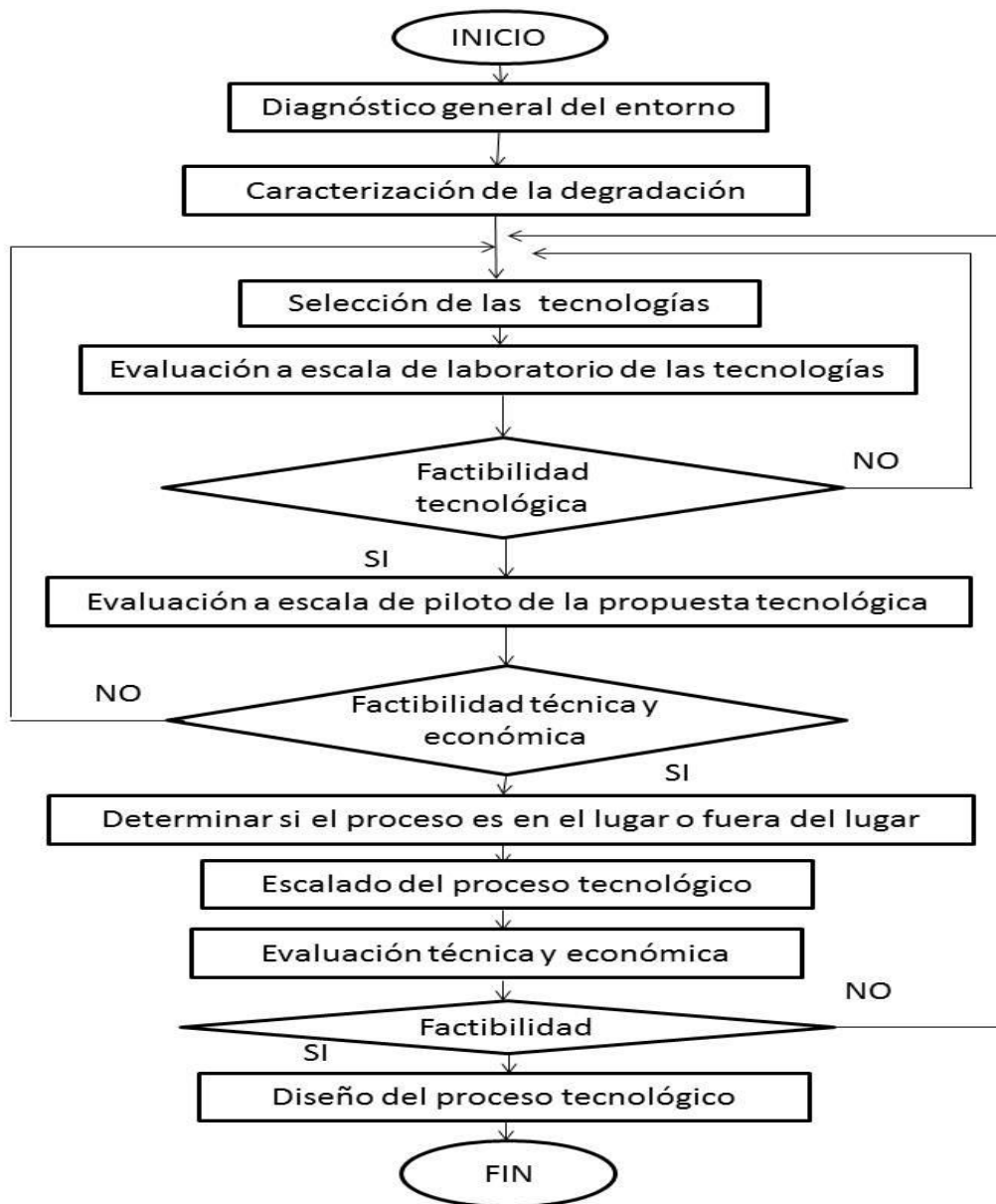


Figura 2. Esquema de la metodología que puede implementarse para la toma de decisiones al rehabilitar suelos (Adaptado de Fabelo, 2017).

### Métodos de rehabilitación de suelos

Considerando que la problemática de la degradación de los suelos tiene gran impacto en la sociedad, es importante fomentar su buen manejo, lo que implica promover estrategias que beneficien tanto a los productores como al ambiente. Las buenas estrategias de manejo del suelo

(como la planificación para el uso y control apropiado de este) aumentan su capacidad regenerativa, mejorando así la vitalidad y la capacidad de rehabilitación parcial o total del mismo.

Dentro de estas estrategias, se encuentran las prácticas agrícolas enfocadas en la conservación y rehabilitación de los suelos, como la rotación de cultivos (Bruns *et al.* 2018), incorporación de abonos verdes (Castro *et al.* 2017), las prácticas de cero labranza (Posada-Ochoa *et al.* 2013), entre otras. Así como la construcción de terrazas, con la finalidad de retención del suelo, evitando su deslave y erosión por el impacto del suelo y agua (Ferro-Vázquez *et al.* 2014).

Aunado a esto, se conocen métodos que se implementan para rehabilitar suelos en estados de degradación altos. Estos son clasificados como físicos, químicos (Nkonya *et al.* 2011) y biológicos (Ceccon y Martínez-Garza 2016). Dentro de los físicos se encuentran la vitrificación (Flores *et al.* 2009), encapsulación, lavado y la electroquímica (González-Chávez y Carrillo-González 2017); en las alternativas químicas están la neutralización (Combatt-Caballero *et al.* 2017), solidificación y estabilización (García-Muñoz y Vargas-Galvis 2017). Mientras que las estrategias biológicas son realizadas mediante la adición de biosólidos (De Quadros *et al.* 2016), biofertilizantes (Perea-Vélez *et al.* 2017), compostas (Galdames *et al.* 2017), así como aquellas donde intervienen las plantas como mejoradoras de las condiciones del suelo. Por medio de las cuales se mejoran las condiciones edáficas (físicas químicas y biológicas) de zonas que sufrieron algún disturbio, para que dichos suelos sean utilizados nuevamente en diversas actividades, como la agricultura, producción forestal, etc.; pero no forzosamente el uso que se le daba antes del disturbio.

Todas estas prácticas pueden ser mejoradas por medio de la inoculación de microorganismos que permiten el intercambio de nutrientes entre el suelo, el agua, la atmósfera y las plantas, y a su vez,

mejoran la productividad de los cultivos y la adaptación de las plantas en los ecosistemas naturales (Návaez *et al.* 2017).

Actualmente se conocen diversas estrategias para mejorar las condiciones edáficas por medio de la utilización de plantas vivas; no obstante, es un tema complejo de abordar debido a que existen vacíos en el conocimiento de estas. Este vacío comienza con el mal uso de los conceptos que se emplean, o bien la confusión que representa utilizar cada una de las técnicas. Dentro de los conceptos más comunes se encuentran los siguientes:

Ecología de la restauración (Bradshaw 1993 y Cairns 1993): Rama de la ecología que estudia las áreas disturbadas en el proceso de restablecimiento de manera natural o asistida.

Restauración ecológica (SER 2004): Proceso de asistir el recubrimiento de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido con la finalidad de restablecer la función y la estructura de las áreas que fueron afectadas utilizando como referencia los ecosistemas antes del disturbio.

Fitorremediación (Salt *et al.* 1998): Uso de plantas vivas para disminuir o eliminar los contaminantes del entorno o para reducir su peligrosidad. En la actualidad se conocen varias aplicaciones de esta técnica, tales como la fitoextracción, fitoestabilización, fitoinmovilización, fitovolatilización, fitodegradación y la rizofiltración (Carpena y Bernal, 2007). Pueden estar acompañadas de organismos microscópicos que incrementan los beneficios de dichas técnicas. En términos generales, a esto se le conoce como fitorremediación asistida por microorganismos (Noguez-Inesta *et al.*, 2017).

Reforestación (Fournier 1989): Actividad encargada de repoblar áreas que anteriormente estuvieron cubiertas por bosque, los cuales fueron eliminados por diversos motivos.

Islas de fertilidad (Bashan *et al.* 2015): Implementación de leguminosas arbóreas como plantas nodriza en zonas áridas, (con posibilidad de ser inoculados con microorganismos), para aumentar las concentraciones de nutrientes que pueden ser aprovechados por las plantas; lo cual, con el paso del tiempo permite que las partículas de suelo se establezcan bajo el dosel y aumente la disponibilidad de materia orgánica para futuras generaciones de plantas. A partir de estas islas, la vegetación se puede ir expandiendo a lo largo del terreno.

A pesar de que los conceptos anteriores tienen un significado específico, puede haber confusión entre ellos, puesto que en todos se encuentra involucrado el uso de plantas para mejorar las características de los suelos. La diferencia consiste en el objetivo concreto de la técnica, así como las condiciones en las que estas son aplicadas. En este estudio se llegó a la conclusión de que ninguno de los conceptos antes mencionados cumple por completo con los objetivos buscados, por lo tanto, decidimos que a lo largo del trabajo usaremos el término “fitorrehabilitación”, que consiste en el uso de plantas que pueden estar inoculadas o no con microorganismos, con la finalidad de mejorar las condiciones edáficas (físicas químicas y biológicas) de zonas que sufrieron algún disturbio, más no se encuentran contaminadas; para que dichos suelos sean utilizados nuevamente en diversas actividades, como la agricultura, producción forestal, etc.; pero no forzosamente el uso que se le daba antes del disturbio.

### **Relación planta-microorganismo**

El suelo es considerado uno de los hábitats microbianos con mayor diversidad y abundancia, un gramo de suelo puede contener entre  $10^9$  microorganismos y  $10^4$  especies diferentes (Foster 1988, González y Fuentes 2017). Donde destacan aquellos microorganismos que se relacionan con la rizósfera de las plantas (Mares-Ponce de León *et al.* 2018), sitio en el que los exudados radicales, que son ricos en compuestos orgánicos, aportan a los microorganismos nutrientes que son

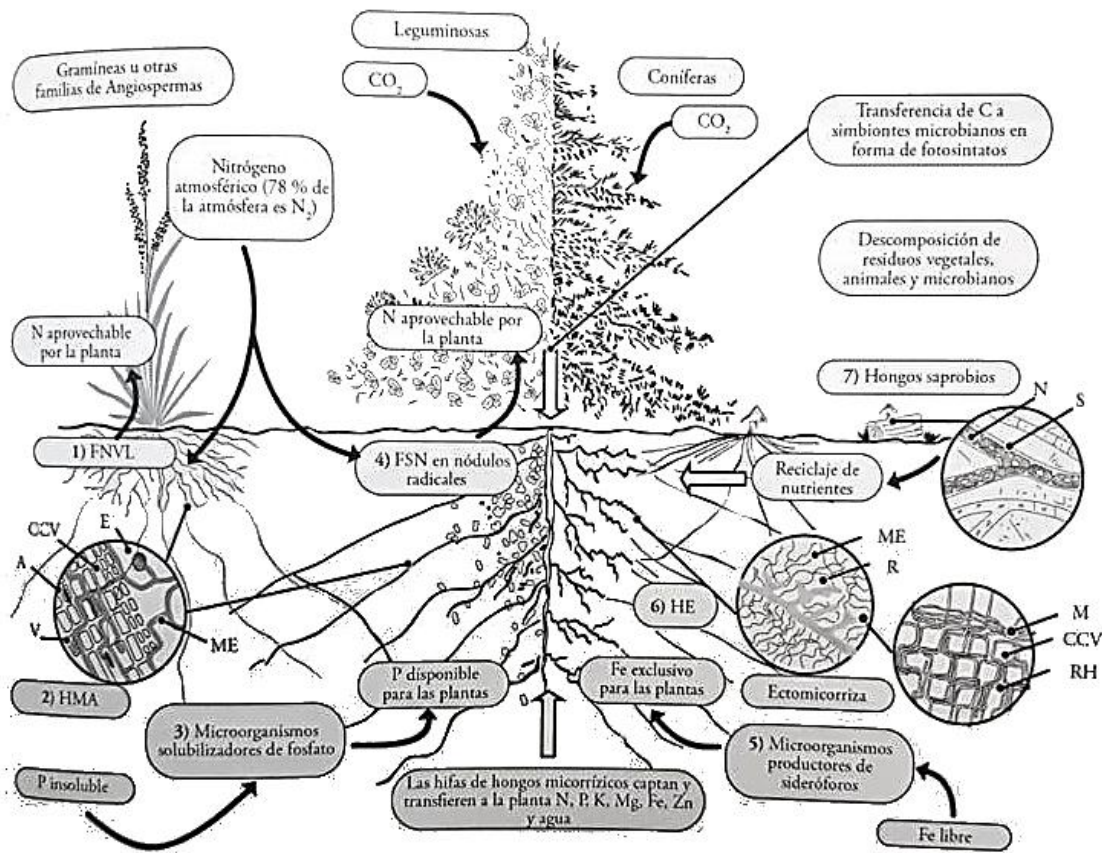
utilizados para llevar a cabo sus actividades metabólicas (Phillips *et al.* 1991, González-Díaz y Cabrera-La Rosa 2017).

Las interacciones bióticas entre plantas y microorganismos pueden ser mutualistas, antagonistas o neutras (Bronstein 1994, Bonkowski *et al.* 2009, Álvarez *et al.* 2018, Ruiz-Cisneros *et al.* 2018). Un cambio en dichas interacciones, a consecuencia de la degradación del suelo, provocada por diversos factores como la deforestación, ocasiona la pérdida de especies importantes, debido a la falta de fuentes de carbono que utilizan para llevar a cabo sus procesos fisiológicos, que a largo plazo originan un ambiente no funcional, por lo que resulta importante entender las respuestas de los suelos ante los disturbios ocasionados (Ochoa-Hueso 2017). Valiente *et al.* (2015) mencionan que ante los cambios mundiales (como el calentamiento global y la degradación de los hábitats) se pierde primeramente la diversidad de interacciones (ya sea planta-microorganismo o microorganismo-microorganismo) fundamentales en el suelo, antes de que se puedan detectar cambios en la biodiversidad; lo que afecta la funcionalidad de las especies y los servicios ecosistémicos a un ritmo más acelerado que la propia extinción de especies.

Dentro de las interacciones mutualistas destacan la relación leguminosas-rizobios (Provorov 1998, Rodríguez-Echeverría *et al.* 2012, Pérez-Fernández *et al.* 2015) la de pinos-hongos ectomicorrízicos (Zhang *et al.* 2018a), así como la interacción plantas vasculares-hongos micorrízicos arbusculares (Keymer y Gutjahr 2018). En todos los casos, tanto el macro como el microsimbionte, obtienen beneficios, tales como, la facilitación de absorción de nutrientes y el aumento en la resiliencia (Ferrera-Cerrato *et al.* 2016). Esta última se evalúa por medio de la capacidad de rehabilitación después de una perturbación y las propiedades que sirven como indicadores de los mecanismos que utilizan para rehabilitarse (Seybold *et al.* 1999). Además de las interacciones directas antes mencionadas, se encuentran las relaciones que llevan a cabo de



forma indirecta con los microorganismos del suelo, como las bacterias de vida libre, que también son conocidas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), que tienen la capacidad de brindarles nutrientes (principalmente NPK), mientras que ellas utilizan como fuente de carbono los exudados radicales (Terrestre *et al.* 2017). Entre ellas sobresalen los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* por su capacidad de fijación de nitrógeno (Zhang *et al.* 2018b, Rodríguez *et al.* 2018), las solubilizadoras de fosfato donde destacan los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Restrepo-Franco *et al.* 2015, García *et al.* 2015) y las productoras de sideróforos, tales como los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Kocuria* (Herrera *et al.* 2018, Mathurot *et al.* 2009, Yu *et al.* 2011) (Figura 4).



**Figura 3. Principales grupos microbianos que influyen en la nutrición de las plantas. 1. Fijadores de nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) de vida libre (FNVL) en la rizósfera de gramíneas y otras angiospermas.**

2. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que colonizan el tejido cortical de más del 80 % de las plantas terrestres y favorecer el flujo de nutrimentos hacia estas a cambio de compuestos derivados de la fotosíntesis. 3. Microorganismos solubilizadores de fosfato capaces de transformar el fosfato insoluble en formas aprovechables por las plantas. 4. Fijadores de N<sub>2</sub> atmosférico simbióticos (FNS) con capacidad de formar nódulos en raíces de leguminosas. 5. Microorganismos productores de sideróforos, compuestos generalmente peptídicos con alta afinidad por hierro férrico (Fe<sup>+3</sup>) y que facilitan la absorción de este metal por las plantas reduciendo el Fe disponible para otros organismos, incluyendo fitopatógenos. 6. Hongos ectomicorrízicos (HE) simbióticos a plantas de interés forestal, que modifican la anatomía micro y macroscópica de las raíces de la planta que colonizan favoreciendo la absorción nutrimental. 7. Hongos saprobios que descomponen la necromasa y propician que los nutrimentos presentes en ella retornen al suelo en formas potencialmente aprovechables (Tomado de Ferrera-Cerrato *et al.* 2016).

### **Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y controladoras de enfermedades**

En términos generales, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son aquellas que por diversos mecanismos tienen la capacidad de proveer a las plantas de nutrientes que no se encuentran disponibles de forma natural (Bach *et al.* 2016, Souza *et al.* 2015). Lo que da como resultado un mayor crecimiento de las plantas cuyas raíces están en contacto con dichas bacterias, en comparación de las que no presentan la relación (Majeed *et al.* 2015). Además, algunas de estas cepas tienen la facultad de controlar enfermedades en algunas plantas, funcionando como control biológico, por medio de diversos mecanismos, como la comunicación célula-célula en bacterias basada en el mecanismo de *quorum sensing*, que producen moléculas que inhiben la señalización entre bacterias patógenas, como la acilhomoserín lactonas (AHLs), puede interrumpir el proceso de señalización bacteria-bacteria, disminuyendo de esta forma la infección de las plantas (Rojas-Badía 2011).

Algunos de los mecanismos que ejercen las bacterias en la zona de influencia de la raíz, así como las especies más sobresalientes, se indican en el Cuadro 1.

### Microorganismos simbióticos fijadores de nitrógeno atmosférico (rizobios)

Se les denomina rizobios a un grupo de bacterias que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico al suelo a través de una simbiosis mutualista que llevan a cabo con la mayoría de las leguminosas (Provorov 1998, Sosa *et al.* 2004). Esta relación es muy específica, por lo que los géneros bacterianos tienden a colonizar solamente algunas leguminosas con las que tienen afinidad (Calvo 2011).

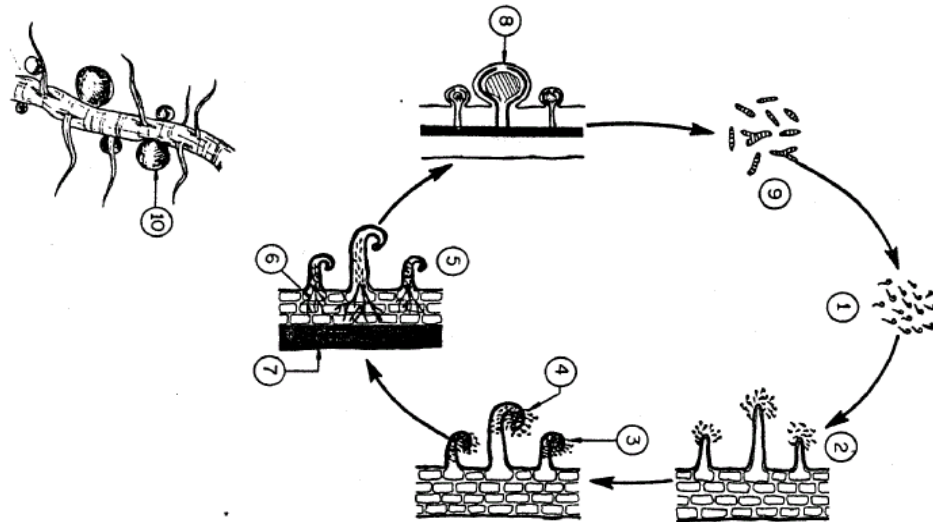
**Cuadro 1. Mecanismos de las bacterias benéficas que proporcionan nutrientes a las plantas o el suelo y/o promueven el crecimiento vegetal (Adaptado de Molina-Romero *et al.* 2015).**

| Mecanismo                                       | Bacterias   | Modo de acción  | Fuente  |
|---|---|---|---|
| Fijación biológica de nitrógeno (Simbiosis)     | <i>Allorhizobium</i> sp.,<br><i>Azorhizobium</i> sp.,<br><i>Bradyrhizobium</i> sp.,<br><i>Mesorhizobium</i> sp.<br><i>Rhizobium</i> sp.<br><i>Frankia</i> sp.   | Actividad nitrogenasa   | Fernández-Aunión <i>et al.</i> 2010                             |
| Fijación biológica de nitrógeno (Vida libre)    | <i>Herbaspirillum</i> spp.<br><i>Azospirillum amazonense</i><br><i>Burkholderia tropica</i>   | Actividad nitrogenasa   | Suman <i>et al.</i> 2008  |
| Solubilización de fosfatos                      | <i>Acinetobacter</i> sp.<br><i>Azospirillum</i> sp.<br><i>Burkholderia</i> sp.<br><i>Flavobacterium</i> sp.<br><i>Micrococcus</i> sp.<br><i>Microbacterium</i> sp.<br><i>Beijerinckia</i> sp.                 | Fosfatasas no específicas<br>Fitasas fosfonatasas<br>C-P liasas | Lugtenberg y Kamilova 2009,<br>Rodríguez <i>et al.</i> 2006     |
| Controladores de estrés                         | <i>Achromobacter</i> sp.<br><i>Alcaligenes</i> sp.<br><i>Azospirillum</i> sp.<br><i>Bacillus</i> sp.<br><i>Burkholderia</i> sp.<br><i>Pseudomonas</i> sp.<br><i>Sinorhizobium</i> sp.<br><i>Rhizobium</i> sp. | 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa              | Onofre-Lemus <i>et al.</i> 2009,<br>Jorquera <i>et al.</i> 2012 |
| Degradación de señales de <i>Quorum sensing</i> | <i>Bacillus</i> sp.   | Producción de AiiA  | Dong <i>et al.</i> 2001, Rojas-Badía 2011                       |

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| Producción de sideróforos                 | <i>Azospirillum</i> sp.<br><i>Klebsiella</i> sp.<br><i>Pseudomonas mendocina</i>                                      | Secreción de ácidos orgánicos<br>Actividad ferredoxina  | Carcaño-Montiel <i>et al.</i> 2006, Dehner <i>et al.</i> 2010                               |
| Producción de reguladores del crecimiento | <i>Azospirillum</i> sp.<br><i>Klebsiella</i> sp.<br><i>Enterobacter soli</i> LF7<br><i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Producción de auxinas (AIA)<br>Producción de ácido-indol-acético<br>Producción de giberilinas | Carcaño-Montiel <i>et al.</i> 2006, Greenhut <i>et al.</i> 2018, Shahzad <i>et al.</i> 2016 |

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), permite que estas crezcan en suelos con déficit de dicho nutriente (Barnet *et al.* 1985, Bueno-López y Camargo-García 2015); ya que gracias a este proceso, la planta utiliza el amonio sintetizado por los rizobios y así se provee de las fuentes de nitrógeno que requiere y los rizobios, a su vez, reciben esqueletos de carbono de la planta para sus funciones vitales (Alexander 1984, Calvo 2011).

Durante la simbiosis, las bacterias inducen la formación de un nuevo órgano en la raíz, llamado nódulo, en el cual se alojan y llevan a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. La organogénesis del nódulo es un proceso de infección que se induce por el intercambio de señales entre ambos organismos, el macrosimbionte (la planta) y el microsimbionte (la bacteria) (Alexander 1984, Quinto y Cárdenas 2007), donde es fundamental la unión del microorganismo a los pelos radicales de la raíz de la planta. Sustancias con efecto mitógeno (factores de nodulación) son sintetizadas por los genes de nodulación del microsimbionte (genes *nod*), en respuesta a la excreción de sustancias de tipo flavonoide por la planta (Soto *et al.* 2000) (Figura 5).



**Figura 4. Dinámica de formación de un nódulo.** 1) Rizobios libres en el suelo; 2) Rizobios atraídos por los pelos radicales; 3 y 4) Inicio de la infección de los pelos radicales mediante la formación de la forma conocida como “Cayado del pastor”; 5 y 6) Hilo de infección que invade las células corticales; 7) Reproducción de rizobios en células haploides; 8) hipertrofia radical y aparición del nódulo; 9) Rizobio sin pared celular (bacterioide) en las células corticales fijando nitrógeno; 10) Nódulo con leghemoglobina (Tomado de Alexander 1980).

Se han definido dos tipos de nódulos en leguminosas: los nódulos determinados e indeterminados (Gualtieri y Bisseling 2000). Los primeros son de forma esférica, mientras que los segundos tienen forma cilíndrica y a menudo con ramificaciones. La estructura y función del nódulo están diseñadas para proporcionar un ambiente microaeróbico para la bacteria (Mylona *et al.* 1995). La corteza externa del nódulo es aeróbica, pero dentro de este hay poco  $O_2$ , lo que es esencial porque la enzima nitrogenasa es lábil al  $O_2$ . Sin embargo, el simbionte rizobiano necesita  $O_2$  para generar ATP (Mylona *et al.* 1995, Calvo 2011). Las células corticales infectadas de la planta producen una proteína portadora de  $O_2$  llamada leghemoglobina, que facilita la transferencia de  $O_2$  al bacterioide. A su vez, el bacterioide produce una citocromo oxidasa terminal especializado que le permite respirar bajo condiciones mínimas de  $O_2$  (Mylona *et al.* 1995).

A medida que los rizobios se transforman de bacterias libres a bacteroides, su metabolismo se modifica para proporcionar energía para la FBN. El malato y/o el succinato son las fuentes de C transportadas al bacteroide y usadas en la producción de energía y como esqueletos de C para los procesos biosintéticos del bacteroide (Nápoles-García *et al.* 2016).

Este proceso que ocurre en el suelo hace parcialmente prescindible el uso de abonos o fertilizantes nitrogenados para las plantas que establecen esta simbiosis, disminuyendo algunos problemas de contaminación ambiental e inversión económica (Quinto y Cárdenas 2007). De esta forma, es posible utilizar esta relación planta-microorganismo en suelos que requieran de rehabilitación.

### **Fijadoras de N<sub>2</sub> atmosférico de vida libre**

Como su nombre lo indica, este tipo de bacterias tiene la capacidad de fijar nitrógeno y transferirlo al suelo sin necesidad de establecer una relación simbiótica con las plantas (Hernández *et al.* 2003). Este proceso tiene ventajas y desventajas. Por un lado, al prescindir de un hospedero obligatorio dichas bacterias pueden ejercer sus mecanismos de FBN en mayor cantidad de ambientes, donde se pueden encontrar diversas plantas, ya que no necesitan ningún grupo específico para desarrollarse (Sánchez-López *et al.* 2019, Steenhoudt y Vanderleyden 2000). Por otro lado, Ferrera-Cerrato *et al.* (2016), mencionan que estas bacterias tienen menor capacidad de fijación de N<sub>2</sub> comparado con los rizobios, debido a que no se encuentran dentro de una estructura que les brinde protección ante el ataque y competencia que ejercen otros organismos, lo cual resulta energéticamente caro.

Dentro de este grupo bacteriano, los géneros más conocidos son *Azospirillum* y *Azotobacter*. Ambas bacterias crecen en la rizósfera de las plantas, puesto que utilizan los azúcares y otros exudados como fuente de energía. A cambio, como se mencionó anteriormente, proveen de nitrógeno aprovechable a las plantas (Smercina *et al.* 2019).

El proceso por el cual llevan a cabo esto se puede resumir de la siguiente manera: las células bacterianas son atraídas a la rizósfera de las raíces de las plantas por medio de los azúcares, por lo tanto, estas se adhieren a los pelos radicales a través de un sistema de anclaje mediado por polisacáridos (Smercina *et al.* 2019). La expresión de los genes estructurales de fijación de nitrógeno (*nif*) puede variar según los organismos, en el caso de *Azospirillum*, dichos genes se encuentran inactivos cuando se encuentran cantidades excesivas de nitrógeno, en otros casos, este gen también puede ser inactivado por la alta tensión del O<sub>2</sub> en el ambiente (Steenhoudt y Vanderleyden 2000). Por lo tanto, solamente bajo condiciones adecuadas, es decir, con bajas cantidades de nitrógeno y O<sub>2</sub>, las bacterias comienzan el proceso de FBN (Sánchez-López *et al.* 2019).

### **Bacterias solubilizadoras de fosfatos**

Después del nitrógeno, el fósforo (P) es el nutriente más limitante en la nutrición de las plantas, puesto que interviene en distintos procesos bioquímicos y fisiológicos de las plantas (Andrés *et al.* 2019); por ejemplo, en la fotosíntesis, componente estructural de las membranas celulares y en liberación de energía por la producción de adenosín trifosfato (ATP) (Gurdeep *et al.* 2015). Sin embargo, a pesar de que este nutriente puede ser encontrado en altas cantidades, su disponibilidad es limitada; ya que, solo es aprovechado en forma de ortofosfatos (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) (Satyaprakash *et al.* 2017). Por lo tanto, la intervención de bacterias que tienen la capacidad de solubilizar el P del suelo es de gran importancia en el proceso de desarrollo de las plantas (Sanclemente *et al.* 2017) que son utilizadas con fines de rehabilitación.

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos, como la mayoría de las bacterias benéficas del suelo, presentan mayor abundancia en la rizósfera, puesto que utilizan los exudados radicales como fuente de energía para llevar a cabo sus procesos metabólicos (Liu *et al.* 2015). A su vez, ellas

proporcionan P disponible a las plantas por medio de la secreción de ácidos orgánicos y protones, síntesis de fosfatasas y quelación, también mediante la acidificación del medio (Ferrera-Cerrato *et al.* 2016).

Algunas de las cepas bacterianas solubilizadoras de P más representativas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantoea*, y *Rahnella* (Satyaprakash *et al.* 2017, Bakhshandeh *et al.* 2017, Rodríguez *et al.* 2006, Charana-Walpola y Yoon 2013). Aunado a la solubilización de P, algunas de estas cepas tienen la capacidad de fijar nitrógeno y producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal, debido a que poseen los genes que permiten realizar dichas funciones (Kudoyarova *et al.* 2017, Chauhan *et al.* 2017).

### **Hongos micorrízicos**

La micorriza hace referencia a la simbiosis que se establece entre un hongo con las raíces de las plantas (Smith and Read 2008, Alarcón y Ferrera-Cerrato 1999). Durante dicha simbiosis, el hongo proporciona a la planta nutrientes minerales y agua a través de sus hifas, que funcionan como una extensión de la raíz; a cambio, el hongo recibe vitaminas y carbohidratos que no pueden sintetizar por sí mismos (Smith and Read 2008, Mujica-Pérez y Molina-Delgado 2017).

Se conocen dos tipos de micorrizas según su interacción con las plantas, la ectomicorriza y la endomicorriza (Smith and Read 2008, Fernández 2008). La primera se refiere a una interacción entre hongos con plantas principalmente forestales, su nombre hace referencia a la forma en que las hifas del hongo se relacionan con las células corticales de la planta; es decir, no las penetran, más bien forman una estructura conocida como Red de Hartig a través de los espacios intersticiales (Smith and Read 2008, Galindo-Flores *et al.* 2015). El segundo grupo (la endomicorriza), se caracteriza por penetrar las células de las raíces, por lo tanto, su red miceliar es interna, sin que forme manto por encima de la raíz, por lo que no se ven grandes cambios morfológicos en ellas



(Smith and Read 2008, Alarcón y Ferrera-Cerrato 1999). Dentro de las endomicorrizas se encuentran cinco subgrupos, los cuales son: monotrofoide, ericoide, arbutroide, orquideoide y arbuscular (Durán *et al.* 2007, Fernández 2008, Godoy *et al.* 1994). Algunos de ellos se relacionan con grupos específicos de plantas, mientras que otros pueden colonizar gran número de especies. Por ejemplo, la micorriza arbuscular puede infectar las raíces de aproximadamente el 80% de las plantas vasculares que conocemos, en prácticamente todos los ecosistemas del planeta (Rodríguez 2005).

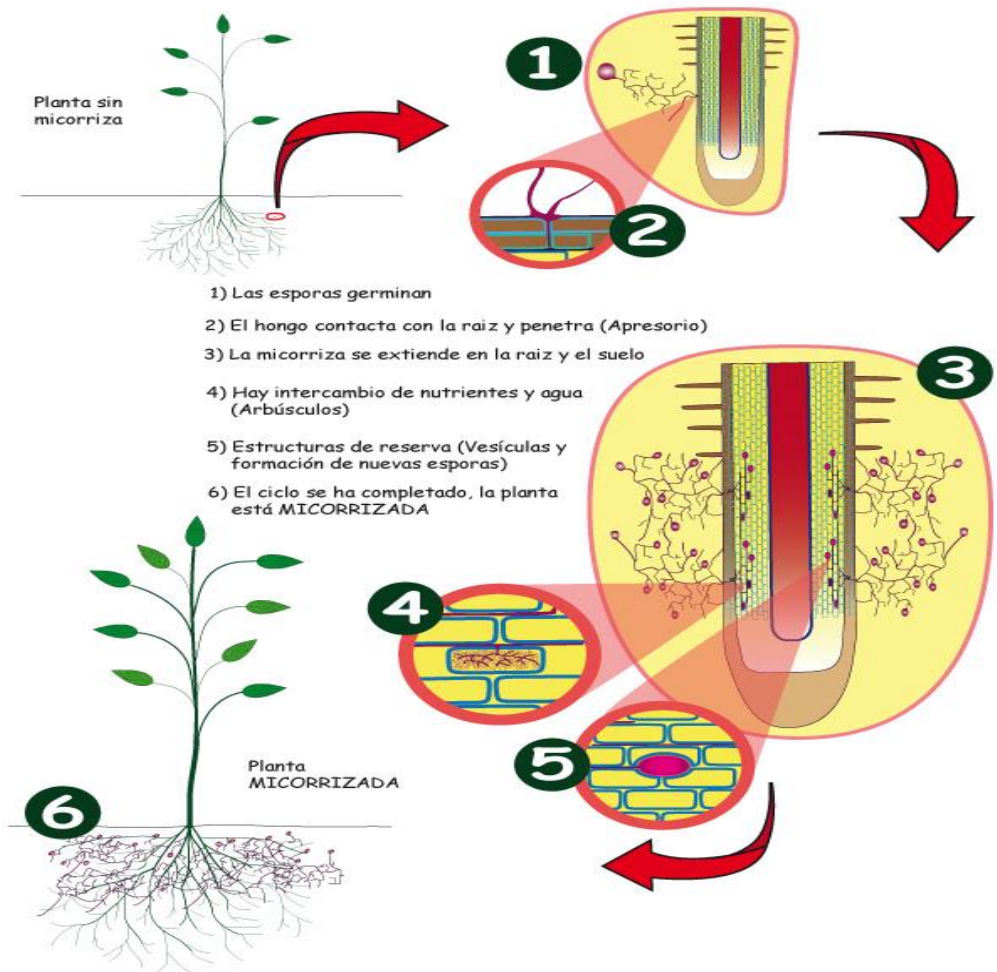
### **Hongos micorrízicos arbusculares**

La simbiosis micorrízica arbuscular es una relación que se establece entre algunos hongos microscópicos (Harrison 1997, Camarena-Gutiérrez 2012) y casi el 80% de las plantas alrededor del mundo (Santander *et al.* 2017). Estos hongos son biótrofos obligados, es decir, necesitan forzosamente una planta hospedera para culminar su ciclo de vida (Keymer y Gutjahr 2018). Esta interacción se lleva a cabo en la rizosfera (Pérez-de Luque *et al.* 2017). Su comienzo consiste en que hongos micorrízicos arbusculares (HMA) colonizan las raíces de las plantas, por medio de hifas o esporas que son su estructura de reproducción (Barrera 2009). Una vez que penetran la raíz, presentan crecimiento intra e intercelular en el córtex, donde forman estructuras funcionales como los arbusculos y, en algunas ocasiones, vesículas y esporas (Koide 2017).

Las hifas de los HMA se dividen dicotómicamente formando arbusculos, los cuales son invaginados por la membrana plasmática de las células corticales, donde se realiza el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Alarcón y Ferrera-Cerrato 1999). Estas estructuras generalmente presentan cortos periodos de vida (Bravo *et al.* 2017). Mientras que las vesículas tienen la función de almacenar los nutrientes que el hongo puede utilizar posteriormente, cuando

las condiciones del medio no sean las adecuadas para su desarrollo y se encuentran en el punto terminal de la hifas (Xie *et al.* 2018) (Figura 6).

Estos hongos han sido ampliamente estudiados debido su amplia distribución y al efecto positivo que representa la simbiosis que realiza con las plantas, ya que su principal función de es la translocación de los nutrientes del suelo a éstas. Además, las hifas de estos hongos sirven como una ampliación del espacio exploratorio de las raíces, puesto que pueden alcanzar distancias más grandes, y como resultado son capaces de obtener mayores cantidades de nutrientes que son traslocados a las plantas (Bravo *et al.* 2017). Por lo anterior, los HMA son considerados microorganismos promotores del crecimiento vegetal y estabilizadores de la fertilidad de los suelos, controladores de fitopatógenos y precursores de la formación y estabilización del suelo (Priyadharsini y Muthukumar 2016, Campuzano *et al.* 2017).



**Figura 5. Características de la micorriza arbuscular. 1) Esporas. 2) Hifas. 3) Interacción planta-hongo. 4) Arbúsculos. 5) Vesículas. Formación de la micorriza arbuscular (Tomado de Redes microbianas 2014).**

### Hongos ectomicorrízicos

Se le denomina ectomicorriza a la relación simbiótica establecida entre aproximadamente 10% de las plantas del mundo (en su mayoría de uso forestal) y hongos ectomicorrízicos. Dicha interacción se lleva a cabo en la raíz de las plantas y comienza cuando una espora o un fragmento del micelio micorrízico tiene contacto con la raíz, donde comienza un proceso de infección (Smith and Read 2008, Rentería-Chávez *et al.* 2017). La característica principal de esta simbiosis es la modificación de la raíz, ya que generalmente se eliminan los pelos absorbentes, se ramifican y se engrosan

(Valdés-Ramírez *et al.* 2010). La raíz queda cubierta por un red de hifas llamada manto, a partir de este, algunas ramificaciones se extienden a las primeras capas celulares de la corteza radical, ocupando solamente los espacios intersticiales, sin penetrar las células, a esto se le conoce como “Red de Hartig” (Smith and Read 2008, Carrera-Nieva y López-Ríos 2004).

Muchos de los hongos ectomicorrízicos tienen alta importancia económica puesto que son comestibles. La mayoría crecen de manera silvestre en los bosques, ellos representan un recurso no-maderable de importancia para los habitantes de las zonas aledañas. En México, generalmente pertenecientes a grupos indígenas, que los colectan y son una fuente de ingresos alterna para las familias (Carrasco-Hernández *et al.* 2010, Zamora-Morales *et al.* 2018). En otros países, como en China, algunas especies de hongos silvestres ectomicorrízicos ya están siendo cultivados de forma masiva (Zhang 2014, Sánchez y Sánchez 2019).

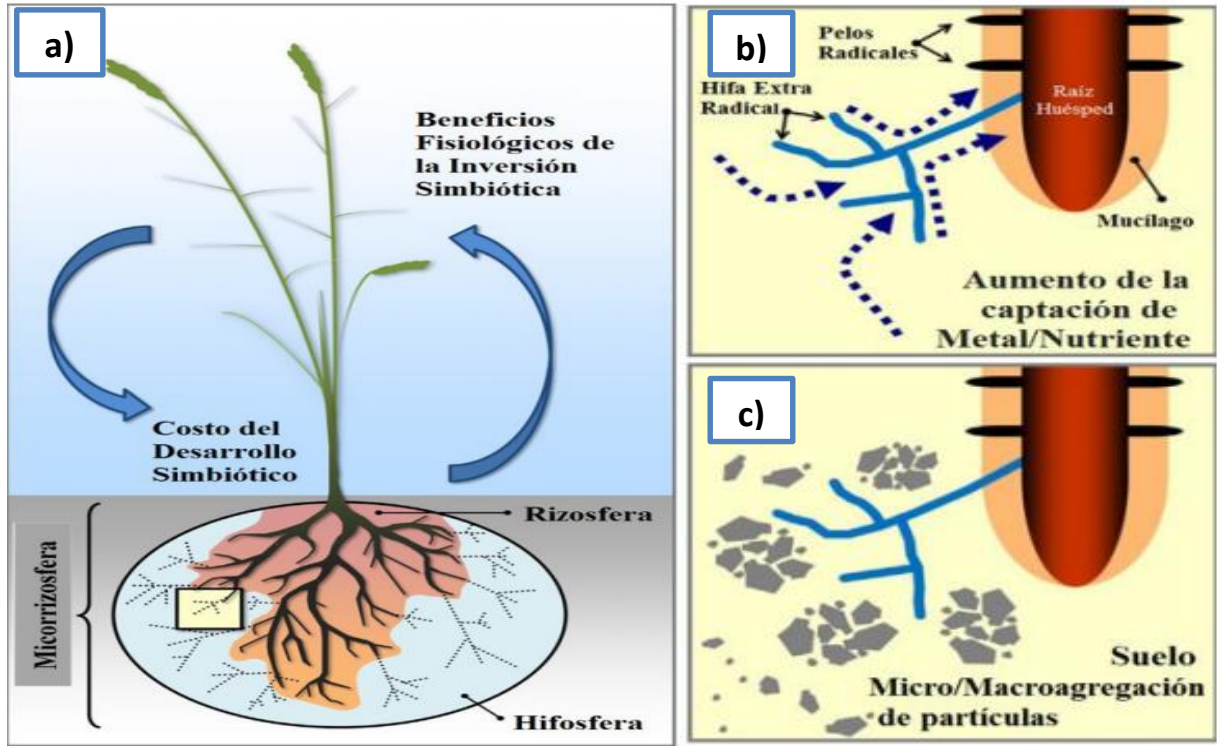
Los beneficios de la relación pino-hongo ectomicorrízico constan del intercambio de nutrientes de un organismo a otro. Por su parte, el hongo mediante su red de micelio proporciona nutrientes a la planta que no se encuentran al alcance de las raíces, tales como fósforo y potasio (Oros-Ortega *et al.* 2017). Por otro lado, la planta además de servir como hospedero para la reproducción del hongo, le brinda a este fotosintatos, azúcares y aminoácidos para su supervivencia (Zamora-Morales *et al.* 2018). Se presume que el éxito en el crecimiento de los pinos se encuentra estrictamente relacionado con la interacción que llevan a cabo con el hongo ectomicorrízico (Martínez-Nevárez *et al.* 2016), sobre todo cuando dichos pinos son utilizados en la reforestación de zonas que presentan pérdida de suelo. El porcentaje de supervivencia después del trasplante de invernadero a campo es mayor si las plantas se encuentran inoculadas con dichos hongos (Oros-Ortega *et al.* 2017).

### **Interacción hongos micorrízicos-rizobacterias**

Se menciona que la productividad de las plantas depende de las interacciones que sus raíces llevan a cabo con los microorganismos del suelo (Kuppardt *et al.* 2018). Ya que estas tienen alto impacto en la removilización de nutrientes esenciales para la absorción de la planta, la arquitectura de raíz y la estructura del suelo (Saleem *et al.* 2018). Los nutrientes del suelo funcionan como facilitadores o inhibidores de las interacciones microbianas, ya que la presencia de estos compuestos puede generar que ciertos microorganismos alcancen mayor abundancia que otros (Sarabia *et al.* 2017). Se sabe que existe una serie de interacciones microbianas en el suelo, que pueden resultar benéficas o perjudiciales en las características físicas y químicas de este; sin embargo, se han realizado grandes esfuerzos en conocer aquellas interacciones que proporcionan beneficios respecto a la estructura del suelo y la productividad del mismo. Una de estas interacciones es la que se lleva a cabo entre las rizobacterias y los hongos micorrízicos arbusculares, donde ambos microorganismos pueden realizar actividades que aumentan la proliferación y actividad del otro (Viollet *et al.* 2017, Frey-Klett *et al.* 2007).

La simbiosis micorrízica afecta a las comunidades microbianas y las funciones que estas llevan a cabo en la rizosfera, por lo cual, se ha acuñado el término “micorrizósfera”; que se define como la zona del suelo que se encuentra influenciada por el conjunto de raíces colonizadas por los hongos (Strzelczyk y Pokojska-Burdziej 1984, Priyadharsini y Muthukumar 2016). Y la “hifosfera” considerada como la parte del suelo influenciada por las hifas de los hongos (Bednářová *et al.* 1979, Carreón-Abud *et al.* 2016). Dentro de esta zona existe un microbioma distinto al de la rizosfera, que es seleccionado a través de los exudados fúngicos (Viollet *et al.* 2017). De manera general, la acción conjunta de estos microorganismos mejora las condiciones físicas y químicas

del suelo; y a su vez, estimulan el crecimiento de las plantas y disminuyen las afectaciones por patógenos (Priyadharsini y Muthukumar 2016) (Figura 7).



**Figura 6. Influencia de la simbiosis micorrízica arbuscular en las plantas. a) Rizosfera, hifosfera y micorrizosfera en el suelo. b) Aumento de la absorción de nutrientes. c) Formación de agregados en el suelo (Modificado de Audet 2012).**

Los mecanismos que intervienen en la relación entre estos microorganismos son complejos, debido a que intervienen los exudados de distintos compuestos carbonatados provenientes de las hifas de los hongos, ya que estos reciben aproximadamente el 30% de los carbohidratos de las plantas y que son transformados en un disacárido llamado trehalosa, el cual puede ser responsable de la selección de comunidades bacterianas específicas en micorrizósfera. Esto sucede tanto en campo como invernadero, facilitando la formación de biopelículas bacterianas sobre las hifas micorrízicas

(Zhang *et al.* 2018b), las cuales general diversos beneficios para las plantas, como la protección ante patógenos y la aceleración del crecimiento vegetal (Haggag y Timmusk 2008).

Por otro lado, también se pueden encontrar bacterias que promueven la micorrización (BPM), las cuales se encuentran adheridas a las hifas de estos hongos y en la zona de la micorrizosfera y juega un papel de gran importancia en la interacción micorrízica desde los aspectos evolutivo, funcional y ecológico (Frey-Klett *et al.* 2007). Por ejemplo, la endobacteria *Candidatus* sp., mejora el crecimiento presimbiótico de *Glomeribacter gigasporarum*, aumentando la elongación y ramificación de las hifas germinales (Lumini *et al.* 2007).

Actualmente se conocen distintos géneros bacterianos con capacidad de promover la micorrización, así el porcentaje de aumento de la colonización micorrízica que estas promueven, las cuales se mencionan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Interacción entre bacterias promotoras de la micorrización (BPM) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y su beneficio en la colonización.**

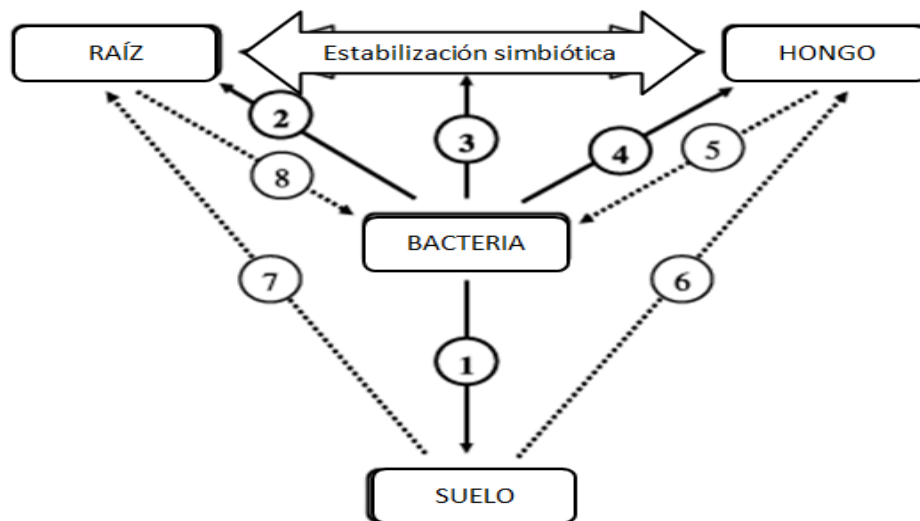
| HMA   | BPM  | Planta huésped             | Efecto | Referencia                 |
|---|--|----------------------------|--------|----------------------------|
| - <i>Diversispora aunantia</i> –<br><i>Archaeospora trappei</i><br>- <i>Glomus versiforme</i><br>- <i>Paraglomus occultum</i> | <i>Bacillus thuringiensis</i>                                    | <i>Lavandula dentata</i>   | ACM    | Armada <i>et al.</i> 2015  |
| - <i>Glomus intraradices</i><br>- <i>Glomus clarum</i>  | - <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>- <i>Burkholderia cepacia</i> | <i>Elaeis guineensis</i>   | ACM    | Sundram <i>et al.</i> 2011 |
| - <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833   | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>                               | <i>Solanum tuberosum</i>   | ACM    | Loján <i>et al.</i> 2016   |
| - <i>Glomus mosseae</i>   | <i>Brevibacillus</i> sp.   | <i>Trifolium pratense</i>  | ACM    | Vivas <i>et al.</i> 2003,  |
| - <i>Rhizophagus intraradices</i>   | <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12                             | <i>Medicago truncatula</i> | APA    | Viollet <i>et al.</i> 2017 |

|   |   |                 |     |                              |
|---|---|-----------------|-----|------------------------------|
| - <i>Diversispora</i><br><i>aunantia</i> , -<br><i>Archaeospora trappei</i> ,<br>- <i>Glomus versiforme</i><br>- <i>Paraglomus occultum</i> , | <i>Bacillus</i><br><i>thuringiensis</i> | <i>Zea mays</i> | ACM | Armada <i>et al.</i><br>2015 |
|---|---|-----------------|-----|------------------------------|

---

ACM: aumento de la colonización micorrízica  
 APA: aumento de la producción de arbusculos

Las bacterias promotoras de la micorización (BPM) estimulan el crecimiento del micelio, aumentando de esta forma el contacto del hongo con las plantas y por ende la colonización micorrízica es mayor; además reducen el impacto de las condiciones ambientales adversas que afectan el micelio, esto puede llevarse a cabo por medio de la producción de factores de crecimiento, la desintoxicación de sustancias antagonistas y la inhibición de competidores microbianos (Frey-Klett *et al.* 2007) (Figura 8).



**Figura 7. Papel de las bacterias promotoras de la micorización.** 1) La bacteria mejora la conductividad del suelo al hongo. 2) La bacteria mejora la receptividad de la raíz al hongo. 3) La bacteria interactúa con el reconocimiento planta-hongo y el establecimiento de la simbiosis. 4) La bacteria promueve la germinación de propágulos fúngicos, la supervivencia y el crecimiento del micelio. 5) El hongo selecciona poblaciones bacterianas en la rizosfera. 6) El suelo apoya el crecimiento de hongos presimbóticos. 7) El suelo determina la receptividad de la raíz al hongo. 8) Las raíces seleccionan poblaciones bacterianas en la rizosfera (Modificado de Frey-Klett *et al.* 2007).



Por lo anterior, el estudio y la utilización de consorcios microbianos es una estrategia que brinda la posibilidad de mayores beneficios en la rehabilitación de suelos y el correcto funcionamiento de los ecosistemas edáficos, puesto que al interactuar entre sí, los microorganismos logran aumentar la disponibilidad de los nutrientes del suelo, lo que tiene como resultado plantas con mejor desarrollo y suelos más estables (Ojeda-Quintana *et al.* 2016).

## LITERATURA CITADA

- Alarcón A and RF Ferrera-Cerrato. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana* 17: 179-191.
- Alexander M. 1980. Introducción a la Microbiología del suelo. John Wiley Sons. New York. pp: 136-150.
- Alexander M. 1984. Ecology of rhizobium. In Alexander M eds. Biological Nitrogen Fixation. Boston, EUA. p. 39-50.
- Altamirano C. 2019. Las etapas y las metas del programa de siembra de árboles al que el gobierno de AMLO destinará 15 mil mdp. Consultado 15 feb. 2020. Disponible en <https://www.animalpolitico.com/2019/01/las-etapas-y-las-metas-del-programa-de-siembra-de-arboles-al-que-el-gobierno-de-amlo-destinara-15-mil-mdp/>
- Álvarez M, F Tuca, E Quispe y V Meza. 2018. Incidencia de la inoculación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.). *Scientia Agropecuaria* 9: 33-42.
- Andrades M y E Martínez. 2014. Fertilidad del suelo y parámetros que la definen. Tercera edición. Universidad de la Rioja. Bogotá, Colombia p. 7-8.
- Andrés JA, DM Domínguez, RA Rojo, MJ Giménez, VAA Autrán, LB Guiñazú y CV Bruno. 2019. Solubilización bacteriana de fosfatos y ensayos de inoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo. *FAV-UNRC Ab Intus* 2: 1-12.
- Armada E, R Azcon, OM Lopez-Castillo, M Calvo-Polanco and JM Ruiz-Lozano. 2015. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 90: 64-74.
- Audet P. 2012. AM symbiosis and other plant-soil interactions in relation to environmental stress. In P Ahmad, MNV Prasad eds. Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change. New York, EUA. p 233-264.
- Bach E, DG dos Santos-Seger, FG de Carvalho, BB Lisboa and LMP Passaglia. 2016. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology* 99: 141-149.
- Bai ZG, DL Dent, L Olsson and ME Schaepman. 2008. Proxy global assessment of land degradation. *Soil Use and Management* 24: 223-234.
- Bakhshandeh E, H Pirdashti and KS Lendeh. 2017. Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice. *Ecological Engineering* 103: 164-169.
- Barnet YM, PC Catt and DH Hearne. 1985. Biological nitrogen fixation and root-nodule bacteria (*Rhizobium* sp. and *Bradyrhizobium* sp.) in two rehabilitating sand dune areas planted with *Acacia* spp. *Australian Journal of Botany* 33: 595-610.
- Barrera SE. 2009. El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 7: 123-132.

- Barrientos Z y J Monje-Nájera. 2010. Restauración ecológica en la meseta central de costa rica. *Biocenosis* 23: 1-6.
- Bednářová M, M Staněk, V Vančura and D Veselý. 1979. Microorganisms in the rhizosphere of wheat colonized by the fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Folia Microbiologica* 24: 253-261.
- Bonkowski M, C Villenave and B Griffiths. 2009. Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant and Soil* 321: 213-233.
- Bravo A, M Brands, V Wewer, P Dörmann and MJ Harrison. 2017. Arbuscular mycorrhiza-specific enzymes FatM and RAM2 fine-tune lipid biosynthesis to promote development of arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 214: 1631–1645.
- Bronstein JL. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 214-217.
- Bruns HA, K Reddy and WT Pettigrew. 2018. Effects of rotation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] crops on soil fertility in Elizabeth, Mississippi, USA. *Archives of Agriculture and Environmental Science* 3: 86-88.
- Buée M, PE Courty, D Mignot and J Garbaye. 2007. Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 1947-1955.
- Bueno-López L y JC Camargo-García. 2015. Nitrógeno edáfico y nodulación de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit en sistemas silvopastoriles. *Acta Agronómica* 64: 349-354.
- Calvo S. 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Tesis Ingeniería en Agronomía. Universidad de Salamanca. Salamanca, México. 14 p.
- Camarena-Gutiérrez G. 2012. Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18: 409-421.
- Campuzano SE, UT Laura and V Jessica. 2017. Evaluation of the cellulolytic and chitinolytic activity of rhizosphere isolated filamentous fungi from potato cultures to control rhizoctonia solani. *Nova* 15: 45-55.
- Carabias J, V Arriaga and VC Gutiérrez. 2007. Las políticas públicas de la restauración ambiental en México: limitantes, avances, rezagos y retos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 80: 85-100.
- Carcaño-Montiel MG, R Ferrera-Cerrato, J Pérez-Moreno, JD Molina-Galán y Y Bashan. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana* 24: 493-502.
- Carrasco-Hernández V, J Pérez-Moreno, V Espinosa-Hernández, JJ 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* 1: 567-577.

- Carreón-Abud Y, NR Rojas-Jacuinde, M Alvarado-Herrejón y SE García-Rueda. 2016. Función de los hongos micorrícicos arbusculares en la biorremediación de metales pesados. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo* 18: 16-22.
- Carrera-Nieva A y GF López-Ríos. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10: 93-98.
- Castro RE, A Sierra, JE Mojica, JE Carulla y CE Lascano. 2017. Efecto de especies y manejo de abonos verdes de leguminosas en la producción y calidad de un cultivo forrajero utilizado en sistemas ganaderos del trópico seco. *Archivos de Zootécnica* 66: 99-106.
- Ceccon E y C Martínez-Garza. 2016. Experiencia mexicana en la restauración de ecosistemas. Universidad Nacional Autónoma Mexicana. Cuernavaca, México. 580 p.
- Chaiharn M, S Chunchaleuchanon and S Lumyong. 2009. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1919-1928.
- Charana-Walpole B and MH Yoon. 2013. Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). *Chilean Journal of Agricultural Research* 73: 275-281.
- Chauhan A, S Guleria, PP Balgir, A Walia, R Mahajan, P Mehta and CK Shirkot. 2017. Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Brazilian Journal of Microbiology* 48: 294-304.
- Combatt-Caballero E, VH Álvarez y JC Lima. 2017. Estimación y alteraciones químicas de suelos tiomórficos con la aplicación de cal en invernadero. *Idesia* 35: 7-16.
- Connell J and R Slatyer. 1977. Mechanisms of Succession in Natural Communities and Their Role in Community Stability and Organization. *The American Naturalist* 111: 1119-1144.
- De Quadros P, K Zhalnina, AG Davis-Richardson, JC Drew, FB Menezes, FA Camargo and WE Triplett. 2016. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Applied Soil Ecology* 98: 195-203.
- Dehner CA, JD Awaya, PA Maurice and JL DuBois. 2010. Roles of siderophores, oxalate, and ascorbate in mobilization of iron from hematite by the aerobic bacterium *Pseudomonas mendocina*. *Applied and Environmental Microbiology* 76:2041–2048.
- Dong YH, LH Wang, JL Xu, HB Zhang, XF Zhang and LH Zhang. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813-17.
- Dumbrell AJ, M Nelson, T Helgason, C Dytham and AH Fitter. 2010. Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME journal* 4: 337-345.
- Durán C, M Rivero y P Seemann. 2007. Identificación de endomicorrizas en la orquídea nativa *Gavilea araucana* (Phil.) Correa. *Agro Sur* 35: 67-69.

- Etchevers J, V Saynes y MM Sánchez. 2016. Manejo sustentable del suelo para la producción agrícola. In: Martínez-Carrera y Ramírez-Juárez eds. Ciencia, tecnología e innovación en el sistema Agroalimentario de México. Biblioteca básica de agricultura. Estado de México, México, p: 63-79.
- Fabelo J. 2017. Propuesta de metodología para la recuperación de suelos contaminados. *Centro Azúcar* 44: 53-60.
- Fernández R. 2008. Las micorrizas: desenterrando un Tesoro. *Agricultura Orgánica* 12: 22-25.
- Fernández-Aunion C, TB Hamouda, F Iglesias-Guerra, M Argandona, M Reina-Bueno, JJ Nieto, ME Aouani and C Vargas. 2010. Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiology* 10: 1-16.
- Ferrari AE y LG Wall. 2015. Utilización de árboles fijadores de nitrógeno para la revegetación de suelos degradados. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 105: 63-87.
- Ferrera-Cerrato R, A Alarcón, J Delgadillo-Martínez, JJ Almaráz-Suárez y J Pérez-Moreno. 2016. Los microorganismos rizosféricos y su impacto en la nutrición vegetal. In: Alcántar-González G., L Trejo-Téllez y F Gómez-Merino eds. Nutrición de cultivos. Bba. Texcoco, Estado de México. p. 423-439.
- Ferro-Vázquez C, A Martínez-Cortizas, JC Nóvoa-Muñoz, P Ballesteros-Arias y FF Criado-Boado. 2014. 1500 años de uso del suelo reconstruido a partir de las propiedades químicas de una secuencia de suelo en terrazas. *Cuaternario Internacional* 346: 28-40.
- Flores N, AF Cañadas, I Martínez y D Rodríguez. 2009. Vitrificación solar de lodos de flotación de la zona minera de Sierra Almagrera (Almería). *Revista Técnica* 30: 50-57.
- Foster RC. 1988. Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 6: 189-203.
- Frey-Klett P, J Garbaye and M Tarkka. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22-36.
- Galdames A, A Mendoza, M Orueta, IS de Soto-García, M Sánchez, I Virto and JL Vilas. 2017. Development of new remediation technologies for contaminated soils based on the application of zero-valent iron nanoparticles and bioremediation with compost. *Resource-Efficient Technologies* 3: 166-176.
- Galindo-Flores G, C Castillo-Guevara, A Campos-López y C Lara. 2015. Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences* 93: 855-863.
- García C y G Denegri. 2016. Supuestos epistemológicos y ontológicos presentes en la historia de la ecología. Asociación Argentina de Ecología. Buenos Aires, Argentina. p. 222-226.
- García RA, NC Lovaisa y EL Ulla. 2015. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Agronómica del Noroeste Argentina* 35: 13-28.

- García-Muñoz D y F Vargas-Galvis. 2017. Aislamiento térmico de tuberías de acero que transportan fluidos calientes a partir de recubrimientos elaborados mediante proyección térmica. *Tecno Lógicas* 20: 53-69.
- Gardi C, M Angelini y S Barceló. 2014. Atlas de suelos de América Latina y el Caribe. Comisión Europea-Oficina de Publicaciones de la Unión Europea L-2995 Luxembourg, Luxembourg. 176 p.
- Godoy R, R Romero y R Carrillo. 1994. Estatus micotrófico de la flora vascular en bosques de coníferas nativas del sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 67: 209-220.
- González-Díaz AA y JC Cabrera-La Rosa. 2017. Efecto de los exudados radiculares de la "higuerilla" *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) en la mortalidad de larvas de *Gymnetis bonplandii* Schaum (Coleoptera, Scarabaeidae). *Arnaldoa* 24: 351-358.
- González H y N Fuentes. 2017. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas* 34: 2-5.
- González-Chávez MCA y R Carrillo-González. 2017. Fitorremediación asistida por microorganismos con énfasis en hongos arbusculares. *Agroproductividad* 10: 28-33.
- Greenhut IV, BL Slezak and JH Leveau. 2018. *Iac* gene expression in the indole-3-acetic acid-degrading soil bacterium *Enterobacter soli* LF7. *Applied and Environmental Microbiology* 84: e01057-18.
- Gualtieri G and T Bisseling. 2000. The evolution of nodulation. Department of Molecular Biology. *Agricultural University* 9: 183-184.
- Gurdeep K, AUR and MS Reddy. 2015. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere* 25: 428-437.
- Haggag WM and S Timmusk. 2008. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *Journal of Applied Microbiology* 104: 961-969.
- Harrison MJ. 1997. The arbuscular mycorrhizal symbiosis. In Stacey G and NT Keen eds. Plant-microbe interactions. Springer, Boston. p. 1-34.
- Hernández E, R Ferrera-Cerrato y R Rodríguez. 2003. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra Latinoamericana* 21: 81-89.
- Herrera EF, EMM Rentería, SFM Salazar, JNIR Peña and I Bustos. 2018. Bacteria of the chickpea rhizosphere with antagonistic capacity to phytopathogenous fungi and plant growth promotion. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 21: 13-18.
- Jadán O, H Cedillo, P Zeal, P Quichimbo, A Peralta y C Vaca. 2016. Relación entre deforestación y variables topográficas en un contexto agrícola ganadero, Cantón Cuenca. *Bosques Latitud Cero* 6: 1-13.

- Jorquera MA, B Shaharoon, SM Nadeem, M de la Luz-Mora and DE Crowley. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria associated with ancient clones of Creosote Bush (*Larrea tridentata*). *Microbial Ecology* 64: 1008-17.
- Keymer A and C Gutjahr. 2018. Cross-kingdom lipid transfer in arbuscular mycorrhiza symbiosis and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* 44: 137-144.
- Koide RT. 2017. Arbuscular Mycorrhiza Interaction in Temperate Soils. *Mycorrhizal Mediation of Soil* 12: 461–477.
- Kudoyarova GR, LB Vysotskaya, TN Arkhipova, LY Kuzmina, NF Galimsyanova, LV Sidorova and SY Veselov. 2017. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 253.
- Kuppardt A, T Fester, C Härtig and A Chatzinotas. 2018. Rhizosphere Protists Change Metabolite Profiles in *Zea mays*. *Frontiers Microbiology* 9: 169-178.
- Lal R and BA Stewart. 1990. Soil degradation: A global threat. *Advances in Soil* 345 p.
- Leenaars JGB, T Hengl, M Ruiperez-Gonzalez, J Mendes-de Jesus, GBM Heuvelink, J Wolf, L van Bussel, L Claessens, H Yang and KG Cassman. 2015. ISRIC Report 2015/02: Root zone plant-available water holding capacity of the Sub-Saharan Africa soil, version 1.0 Consultado 7 sep. 2019. Disponible en: <http://www.isric.org/documents/document-type/isric-report-201502-root-zone-plant-available-water-holding-capacity-sub>.
- Liu Z, YC Li, S Zhang, Y Fu, X Fan, JS Patel and M Zhang. 2015. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology* 96: 217-224.
- Loján P, M Demortier, SLS Velivelli, S Pfeiffer, JP Suarez, P de Vos, BD Prestwich, A Sessitsch and S Declerck. 2016. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria on root colonization potential and life cycle of *Rhizophagus irregularis* following co-entrapment into alginate beads. *Applied Microbiology* 122: 419-440.
- López-Santos A. 2016. Neutralizar la degradación de las tierras, una aspiración global. ¿Es posible lograrlo en México?. *Terra Latinoamericana* 34: 239-249.
- Lugtenberg B and F Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63: 541-56.
- Lumini E, V Bianciotto, P Jargeat, M Novero, A Salvioli, A Faccio, G Becard and P Bonfante. 2007. Presymbiotic growth and spore morphology are affected in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* cured of its endobacteria. *Cellular Microbiology* 9: 40–53.
- Majeed A, MK Abbasi, S Hameed, AA Imran and N Rahim. 2015. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology* 6: 198.
- Mares-Ponce de León Y, LN Muñoz-Castellanos, MF Ruiz-Cisneros, DA Pérez-Corral, JJ Ornelas-Paz, CH Acosta-Muñiz, DI Berlanga-Reyes y CC Rios-Velasco. 2018. Identificación morfológica y molecular de especies de *Mortierella* asociados a rizosfera de

- manzanos con síntomas de enfermedades radiculares. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 185-195.
- Martínez-Nevárez LE, H Sarmiento-López, JA Sigala-Rodríguez, SS Rosales-Mata y JB Montoya-Ayón. 2016. Respuesta a la inoculación inducida de *Russula delica* Fr. en plantas de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 7: 108-117.
- Molina-Romero D, MR Bustillos, O Rodríguez-Andrade y YE Morales-García. 2015. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas* 17: 24-34.
- Mujica-Pérez Y y L Molina-Delgado. 2017. Influencia de hongos micorrízicos arbusculares (*Rhizoglosum intraradices*) y un estimulador del crecimiento vegetal en *Pennisetum purpureum* Sch. *Cultivos Tropicales* 38: 131-137.
- Mylona P, K Pawlowski and T Bisseling. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* 7: 869.
- Nápoles-García M, G Cabrera-Pino, R Onderwater, R Wattiez, I Hernández-Forte, L Martínez-González y M Núñez-Vázquez. 2016. Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales* 37: 37-44.
- Návaez M, N Aguirre y M Maldonado. 2017. Efecto de la introducción de especies forestales en suelos degradados en procesos de restauración ecológica en el sur del Ecuador. *Bosques Latitud Cero* 7: 22-38.
- Newman MM, H Nigel, N Lorenzc, RP DickcMark, R Lilesd, C Ramsiere y JW Kloepper. 2016. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Science of the Total Environment* 545: 155-160.
- Nkonya E, N Gerber, P Baumgartner, J von Braun, A de Pinto, V Graw, E Kato, J Kloos and T Walter. 2011. The economics of land degradation. Toward an integrated global assessment. Development Economics and Policy. Peter Lang Publishing Group. Frankfurt, Germany. p. 1-13.
- Ochoa-Hueso R. 2017. Consecuencias de la deposición de nitrógeno sobre la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres: Una aproximación general desde la ecología de ecosistemas. *Ecosistemas* 26: 25-36.
- Onofre-Lemus J, I Hernández-Lucas, L Girard and J CaballeroMellado. 2009. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6581-90.
- Ojeda-Quintana L, L Toledo-Vazquez, C Hernández-Rodríguez, Y Machado-Díaz y E Furrázola-Gómez. 2016. Influencia de la aplicación de *Azospirillum lipoferum* en *Megathyrsus maximus* vc. guinea tobiatá en un suelo Pardo Grisáceo. *Pastos y Forrajes* 39: 27-32.
- Oros-Ortega I, A Andrade-Torres, LA Lara-Pérez, RF Guzmán-Olmos, F Casanova-Lugo, LA Sáenz-Carbonell y I Córdova-Lara. 2017. Ecología, biotecnología y taxonomía de ectomicorriza para la conservación y aprovechamiento de *Abies religiosa* en zonas templadas de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 23: 411-426.



- Perea-Vélez YS, R Carrillo-González y MCA González-Chávez. 2017. Fitorremediación asistida por microorganismos: énfasis en bacterias promotoras del crecimiento de plantas. *Agroproductividad* 10: 34-40.
- Pérez-de Luque A, A Tille, I Johnson, D Pascual-Pardo, J Ton and DD Cameron. 2017. The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens. *Scientific Reports* 7: 97-106.
- Pérez-Fernández MA, M Calvo-Magro and A Valentine. 2015. Benefits of the symbiotic association of shrubby legumes for the rehabilitation of degraded soils under mediterranean climatic conditions. *Land Degradation & Development* 27: 395–405.
- Phillips DA, CA Maxwell, UA Hartwig, CM Joseph and J Wery. 1991. Rhizosphere flavonoids released by alfalfa. In Donald L and BC KeisterPerry eds. *The rhizosphere and Plant growth*. Beltsville, Maryland. p. 149-154.
- Posada-Ochoa S, JM Cerón, J Arenas, JJF Hamedt y A Álvarez. 2013. Evaluación del establecimiento de ryegrass (*Lolium* sp.) en potreros de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) usando la metodología de cero labranza. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 8: 26-35.
- Priyadharsini P and T Muthukumar. 2016. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and potassium-solubilizing microorganisms on agricultural productivity. In *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture* 1: 111-125.
- Provorov NA. 1998. Coevolution of rhizobia with legumes: facts and hypotheses. *Symbiosis* 24: 337-368.
- Quinto C y L Cárdenas. 2007. Diálogo para ganar: Interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol. *Biotecnología* 14: 273-279.
- Redes microbianas. 2014. Consultado jul. 2018. Disponible en <http://www.redsmicrobianas.com/endomicorizas-o-micorizas-arbusculares/>.
- Rentería-Chávez MC, J Pérez-Moreno, VM Cetina-Alcalá, R Ferrera-Cerrato y B Xoconostle-Cázares. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrícicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología* 49: 93-104.
- Restrepo-Franco GM, S Marulanda-Moreno, Y de la Fe-Pérez, A Díaz-de la Osa, V Lucia-Baldani y A Hernández-Rodríguez. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 46: 63-76.
- Rodríguez H, R Fraga, T González and Y Bashan. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 287: 15-21.
- Rodríguez MÂ, LC Ladeira and M Arrobas. 2018. Azotobacter-enriched organic manures to increase nitrogen fixation and crop productivity. *European Journal of Agronomy* 93: 88-94.

- Rodríguez Y. 2005. Aspectos relacionados con las bases bioquímicas de la simbiosis micorrizica arbuscular. *Cultivos Tropicales* 26: 11-19.
- Rodríguez-Echeverría S, S Fajardo, B Ruiz-Díez and M Fernández-Pascual. 2012. Differential effectiveness of novel and old legume–rhizobia mutualisms: implications for invasion by exotic legumes. *Oecologia* 170: 253-261.
- Rojas-Badía MMR. 2011. *Quorum sensing* en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13: 135-143.
- Ruiz-Cisneros MF, JJD Ornelas-Paz, GI Olivas-Orozco, CH Acosta-Muñiz, DR Sepúlveda-Ahumada, DA Pérez-Corral y SP Fernández-Pavía. 2018. Efecto de *Trichoderma* spp. y hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 444-456.
- SAGARPA. 2013. Manejo sustentable del suelo en México. Edición 2012. Ciudad de México.
- Saleem M, M Radhi-Sahib, ZH Pervaiz and Q Zhang. 2018. Impact of root system architecture on rhizosphere and root microbiome. *Rhizosphere* 6: 47-51.
- Salinas P y G Romani. 2016. Hegemonía masculina, freno en equipos mixtos en la minería chilena. *Revista Mexicana de Sociología* 78: 469-496.
- Sánchez S y J Sánchez. 2019. Primer éxito en el cultivo de trufa negra en el oeste de la península ibérica y posibilidades de expansión. ITEA, información técnica económica agraria. *Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario* 115: 112-119.
- Sánchez-López DB, JV Pérez-Pazos, LL Luna-Castellanos, JA García-Peña y AA Espitia-Montes. 2019. *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum lipoferum* como bioestimulantes en cultivo de *Ipomoea batatas* Lam. *Agronomía Mesoamericana* 30: 563-576.
- Sanclemente OE, V Yacumal y C Patiño. 2017. Solubilización de fosfatos por bacterias nativas aisladas en tres Agroecosistemas del Valle del Cauca (Colombia). *Temas Agrarios* 22: 62-70.
- Santander R, JM Aroca, J Ruiz-Lozano, P Olave, F Cartes, F Borie and P Cornejo. 2017. Arbuscular mycorrhiza effects on plant performance under osmotic stress. *Mycorrhiza* 27: 639–657.
- Sarabia M, P Cornejo, R Azcón, Y Carreón-Abud and J Larsen. 2017. Mineral phosphorus fertilization modulates interactions between maize, rhizosphere yeasts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Rhizosphere* 4: 89-93.
- Satyaprakash M, T Nikitha, EUB Reddi, B Sadhana and SS Vani. 2017. Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6: 2133-2144.
- Secretaría de Bienestar. 2019. Programa sembrando vida. Consultado 5 ene. 2020. Disponible en <https://www.gob.mx/bienestar/acciones-y-programas/programa-sembrando-vida>.

- SEMARNAT. 2012. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México 34 p.
- SER (Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group). 2004. The SER International Primer on Ecological Restoration. www.ser.org & Tucson: Society for Ecological Restoration International.
- Seybold CA, JE Herrick and JJ Brejda. 1999. Soil resilience: a fundamental component of soil quality. *Soil Science* 164: 224-234.
- Shahzad R, M Waqas, AL Khan, S Asaf, MA Khan, SM Kang, BW Yun and IJ Lee. 2016. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry* 106: 236-243.
- Smercina DN, SE Evans, ML Friesen and LK Tiemann. 2019. To fix or not to fix: controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 85: 254-618.
- Smith SE and DJ Read. 2008. Mycorrhizal symbiosis. New York, EUA. 803 p.
- Socarrás A. 2013. Mesofauna edáfica: indicador biológico de la calidad del suelo. *Pastos y Forrajes* 36: 5-13.
- Sosa A, A Elías, AO García y M Sarmiento. 2004. Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 38: 197-201.
- Soto UL, EU Baca y RP Pardo. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. *Ciencia y cultura: Elementos* 16: 43-46.
- Souza RD, A Ambrosini and LM Passaglia. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology* 38: 401-419.
- Steenhoudt O and J Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *Microbiology Reviews* 24: 487-506.
- Strzelczyk E and A Pokojska-Burdziej. 1984. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Plant and Soil* 81: 185-194.
- Suman A, AK Shrivastava, A Gaur, P Singh and J Singh. 2008. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. *Plant Growth Regulation* 54: 1-11.
- Sundram S, S Meon, I Abu-Seman and R Othman. 2011. Symbiotic interaction of endophytic bacteria with arbuscular mycorrhizal fungi and its antagonistic effect on *Ganoderma boninense*. *Journal of Microbiology* 49: 551-557.

- errestre M, C Almirón, F Verónica, M Natalia, M Bianco, A Vojnov, A Romero y P Yaryura. 2017. Aislamiento y selección de bacterias con potencial biocontrol y promoción del crecimiento vegetal en cultivos hortícolas. *Agrotecnia* 25: 38-41.
- Valdés-Ramírez M, E Ambriz-Parra, A Camacho-Vera y AM Fierros-González. 2010. Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 1: 53-63.
- Valiente BA, J Aizen, J Alcántara, A Arroyo, M Cocucci y MM Galetti. 2015. Beyond species loss: The extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology* 29: 299-307.
- Varjani SJ. 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* 223: 277-286.
- Viollet A, B Pivato, C Mougél, JC Cleyet-Marel, C Gubry-Rangin, P Lemanceau and S Mazurier. 2017. *Pseudomonas fluorescens* C7R12 type III secretion system impacts mycorrhization of *Medicago truncatula* and associated microbial communities. *Mycorrhiza* 27: 23-33.
- Vivas A, A Marulanda, JM Ruiz-Lozano, JM Barea and R Azcón. 2003. Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza* 13: 249-256.
- Xie W, Z Hao, X Zhou, X Jiang, L Xu, S Wu, A Zhao, X Zhang and B Chen. 2018. Arbuscular mycorrhiza facilitates the accumulation of glycyrrhizin and liquiritin in *Glycyrrhiza uralensis* under drought stress. *Mycorrhiza* 28: 285–300.
- Yu X, C Ai, L Xin and G Zhou. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology* 47: 138-145.
- Zamora-Morales BP, MC Zamora-Martínez, PM Nieto-de Pascual, GG Campusano y FT Aucán. 2018. Condiciones edáficas, abundancia y riqueza de hongos ectomicorrizógenos comestibles. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 9: 226-251.
- Zhang HY, XT Lü, H Hartmann, A Keller, XG Han, S Trumbore and RP Phillips. 2018a. Foliar nutrient resorption differs between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal trees at local and global scales. *Global Ecology and Biogeography* 27: 875-885.
- Zhang J, S Hussain, F Zhao, L Zhu, X Cao, S Yu and Q Jin. 2018b. Effects of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on nitrogen transformation and enzyme activity in the rice rhizosphere. *Journal of Soils and Sediments* 18: 1453-1465.
- Zhang Y, W Geng, Y Shen, Y Wang, and YC Dai. 2014. Edible mushroom cultivation for food security and rural development in China: bio-innovation, technological dissemination and marketing. *Sustainability* 6: 2961-2973.

# **CAPÍTULO I. *Pinus greggii* INOCULADO CON *Laccaria laccata*: DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS Y RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA RIZOSFERA**

## **1.1.RESUMEN**

La simbiosis pino-hongo ectomicorrízico es de gran importancia ecológica debido a la interacción microbiana establecida en la micorrizósfera y a las condiciones edáficas favorables creadas por el metabolismo fúngico y la descomposición micobiana de la materia orgánica. El objetivo de este trabajo fue estimar el efecto de la colonización del hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* sobre el crecimiento de *Pinus greggii*, así como la diversidad y abundancia de microorganismos en la rizosfera, en condiciones de invernadero. Se observó que un año después de la siembra y 6 meses después de la inoculación, *L. laccata* mejoró el crecimiento de *P. greggii*; además, aumentó la actividad metabólica microbiana (AWCD), aunque no se presentaron diferencias en el índice de diversidad metabólica respecto al testigo. A su vez, se encontró mayor abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfatos y fijadoras de nitrógeno atmosférico en la rizósfera de las plantas inoculadas. Lo cual sugiere que estos organismos se ven favorecidos en las condiciones que propicia la micorrizósfera de *Pinus greggii* y *L. laccata*.

**Palabras clave:** Bacterias fijadoras de nitrógeno, Bacterias solubilizadoras de fosfatos, Biolog™ EcoPlates.

## 1.2.ABSTRACT

The pine-ectomycorrhiza symbiosis is of great ecological importance due to the microbial interaction established in the mycorrhizosphere and the favorable edaphic conditions created by the decomposition of organic matter. In this study the microbial and mesofauna communities were evaluated in *Pinus greggii* rootballs inoculated with the *Laccaria laccata* ectomycorrhizal fungus and not inoculated (control), under greenhouse conditions. It was observed that one year after planting and 6 months of inoculation, *L. laccata* positively influenced the growth of *P. greggii*; In addition, the microbial metabolic activity (AWCD) increased, but there were no differences in the index of metabolic diversity with respect to the control. In turn, a greater abundance of phosphate solubilizing bacteria, nitrogen fixers were found in the rhizosphere of inoculated plants. This suggests that inoculation of the pines with *L. laccata* stimulates this kind of organisms.

**Keywords:** Nitrogen fixative bacteria, Phosphate solubilizing bacteria, Biolog™ EcoPlates.

### 1.3. INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema complejo donde habitan diferentes comunidades de microorganismos, formando nichos ecológicos que son fundamentales para el correcto funcionamiento de los ecosistemas. Las especies forestales como los pinos, tienen alta importancia en la reforestación de los bosques, ya que en simbiosis con hongos ectomicorrízicos dan pie al mejoramiento de las características físicas, químicas y biológicas del suelo (Mares-Ponce de León *et al.* 2018). A su vez, crean un ambiente idóneo para la colonización de microorganismos, como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solubilizadoras de fosfatos, promotoras del crecimiento vegetal, entre otras (Orgiazzi *et al.* 2016); que forman interacciones con los hongos ectomicorrízicos que en conjunto potencian el crecimiento de las plantas.

En este sentido, la inoculación de pinos con hongos ectomicorrízicos ha sido muy estudiada (Rasouli-Sadaghiani *et al.* 2018) y también, se ha determinado que el microbioma rizósferico es crucial para el crecimiento del pino (Friesen *et al.* 2011). Pero poco se conoce de la capacidad que tiene la inoculación del pino con hongos ectomicorrízicos en el desarrollo de la microbiota del suelo, ya sea como patógenos (Gonthier *et al.* 2019) o en el sentido benéfico.

Además, el estudio de los microorganismos edáficos que proporcionan beneficios al suelo, se han evaluado desde la perspectiva de las relaciones uno a uno, es decir, planta-microorganismo. No obstante, las nuevas investigaciones tienen como objetivo conocer las relaciones que llevan a cabo diversos microorganismos, que en conjunto conforman consorcios.

## 1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

El germoplasma de *P. greggii* utilizado se colectó en la zona de Izta Popo, Puebla, México. Las semillas se esterilizaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % durante 20 min y se sembraron en tubetes de plástico negro de 125 cm<sup>3</sup> previamente desinfectados con alcohol al 70 %. El inóculo consistió de esporas de *Laccaria laccata* provenientes de un bosque de pinos en el Municipio de Ozumba, Estado de México. Se separaron los estípites de los púleos, estos últimos se deshidrataron a 35 ° C en un horno (Jersa<sup>®</sup> deshidratador de tipo bandeja, México). Posteriormente, se molieron en un molino eléctrico (Thomas Scientific<sup>®</sup>, Modelo 4 Wiley Mill, EE.UU.) y pasó través de un tamiz de abertura de 1 mm para obtener un tamaño de partícula homogéneo. El inóculo se almacenó a 5 °C durante 2 d. El experimento se estableció en condiciones de invernadero en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Carretera México – Texcoco km 36.5, en el Municipio de Texcoco, Estado de México.

### 1.4.1. Preparación del sustrato e inoculación

El sustrato consistió en una mezcla de arena, corteza y suelo forestal en una proporción 2: 2: 1, se esterilizó tres veces con vapor a una presión de 1.3 kg cm<sup>-2</sup> a 125 ° C durante 5 h en una olla de presión doméstica con capacidad de 200 kg. Las semillas se sembraron en tubos de plástico negro de 125 cm<sup>3</sup> que contienen el sustrato descrito. La investigación se realizó con un diseño experimental completamente al azar, compuesto por dos tratamientos: *Pinus greggii* inoculado con *Laccaria laccata* y testigo. Ambos con diez repeticiones. A las plantas del tratamiento inoculado se les adicionó una concentración aproximada de 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> esporas de *L. laccata*, determinada con un hematocitómetro (Marca Marienfeld), evaluada con ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 20 X. Se hicieron dos inoculaciones: la primera simultáneamente con la siembra y la



segunda 60 días después. Las plantas fueron regadas diariamente con agua destilada estéril durante seis meses (Figura 1.1).



**Figura 1.1. Preparación del sustrato e inoculación de *P. greggii*. a) Mezcla del sustrato; b) Esterilización del sustrato; c) Inoculación de las plantas.**

#### **1.4.2. Índice de diversidad y perfil metabólico de comunidades microbianas**

Los perfiles metabólicos de las comunidades microbianas cultivables de ambos tratamientos (testigo e inoculado con *L. laccata*), se determinaron con las microplacas Biolog™ EcoPlates (BIOLOG Inc., Hayward, CA). Definiendo como perfil metabólico a la identidad y abundancia de los sustratos que las comunidades microbianas fueron capaces de metabolizar, medida ya sea cualitativamente (presencia / ausencia) o cuantitativa (abundancia). Cada placa de 96 pocillos se compone de tres repeticiones, cada una comprende 31 únicas fuentes de carbono y un blanco de agua destilada estéril.

Las fuentes de carbono están conformadas por **9 ácidos carboxílicos y cetónicos** (ácido D-galactónico  $\gamma$ -lactona, ácido D-galacturónico, ácido 2-hidroxi benzoico, ácido 4-hidroxi benzoico, ácido  $\gamma$ -hidroxi butírico, ácido D-glucosaminico, ácido Itaconico, ácido  $\alpha$ -ketobutirico, ácido D- $\acute{m}$ alico), **2 aminos/amidas** (fenil etil amina y putrescina), **6 aminoácidos** (L-arginina, L-

asparagina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, ácido glicil-L-glutámico), **10 carbohidratos** ( $\beta$ -metil-D-glucosida, D-xylosa, i-eritritol, D-manitol, N-acetil-D-alucosamina, D-celobiosa,  $\alpha$ -D-lactosa, metil éster ácido piruvico, glucosa-1-fosfato, D,L- $\alpha$ -glicerol fosfato) y **4 polímeros** (glucógeno, Tween 40, Tween 80,  $\alpha$ -ciclodextrina), contenidas en los pozos, los cuales también contienen cloruro de trifenil-tetrazolio, que es un indicador redox utilizado comúnmente como indicador de la respiración celular. En esta determinación se asume que la reducción del tetrazolio (desarrollo de color violeta) en las placas, está relacionado con el número de células viables en la fase de crecimiento exponencial. Al utilizar la fuente de carbono del pozo, los microorganismos reducen el tetrazolio, debido a la respiración celular, y modifican el color del sustrato.

Se utilizó el método de diluciones decimales, procedimiento adaptado de Garland y Mills (1991), que consiste en pesar 10 g de sustrato seco y adicionarlo a una botella con 90 mL de agua destilada estéril, dicha solución se agitó en una incubadora orbital modelo MAXQ 4000, a 28 °C y 80 rpm, durante 30 min, después se realizaron diluciones seriadas y se utilizó la dilución  $10^{-3}$ . En cada uno de los pocillos se colocó una alícuota de 150  $\mu$ L, mientras que en los pocillos numerados como A1, A5 y A9 únicamente se agregaron 150  $\mu$ L de agua destilada como control. Las placas se incubaron a 28 °C y la absorbancia fue leída a 590 nm, usando un lector de microplacas (BioTek Synergy 2). Las mediciones se realizaron a las 48 h de la incubación. El desarrollo del color del pocillo se registró como la densidad óptica (DO), se corrigió sustrayendo el valor obtenido del pocillo de blanco (inoculado con agua esterilizada) y luego normalizada por la suma de color de toda la placa (Figura 1.2).

La actividad metabólica microbiana en cada microplaca se expresó como promedio de desarrollo de color (AWCD, por sus siglas en inglés) que se determinó con la siguiente ecuación:

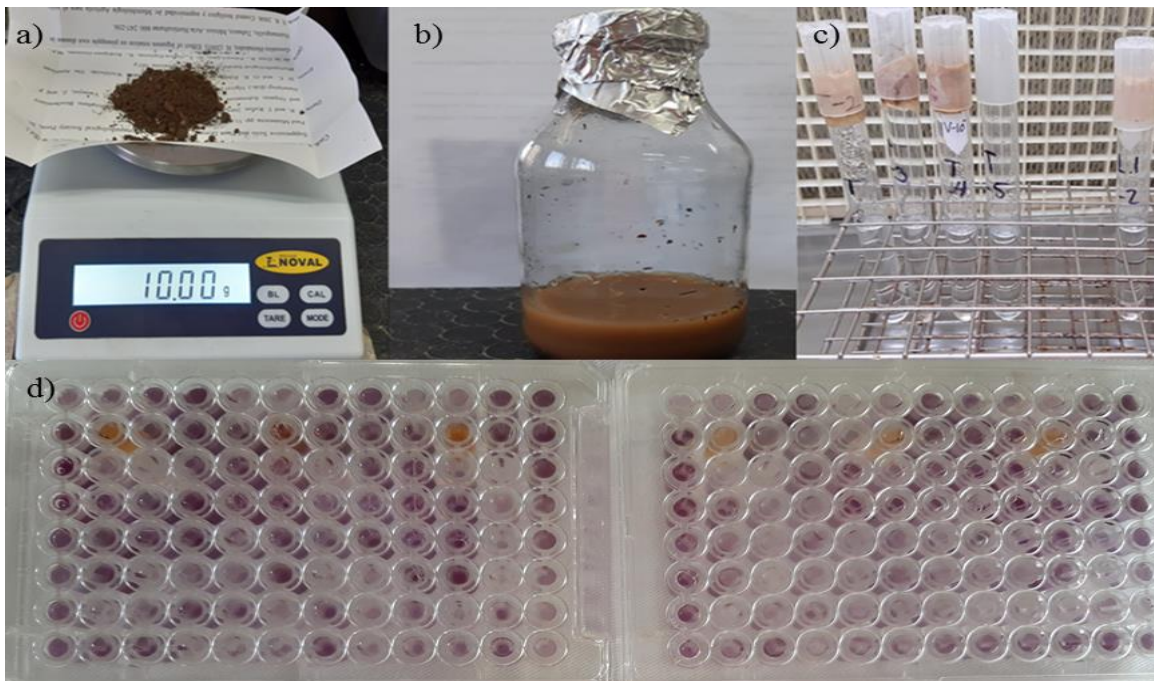
$$AWCD = \sum OD_i / 31$$

Donde OD<sub>i</sub> es el valor de densidad óptica de cada pocillo.

Se evaluó el índice de diversidad metabólica, con la ecuación de Shannon Weaver (H'), como aparece a continuación:

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

Donde p<sub>i</sub> es la relación entre la actividad de cada sustrato (OD<sub>i</sub>) y la suma de las actividades en todos los sustratos ( $\sum OD_i$ ) (Magurrán 1988, Garland y Mills 1991, Tam *et al.* 2001, Muñiz *et al.* 2014).



**Figura 1.2. Índice de diversidad y perfil metabólico de comunidades microbianas. a) Pesado de la muestra de sustrato; b) Elaboración de la solución madre; c) Diluciones seriadas; d) Viraje de color en las placas Biolog™ EcoPlates.**

### 1.4.3. Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos

Se pesaron 10 g de sustrato seco y se adicionaron a una botella con 90 mL de agua destilada estéril, dicha solución se agitó en una incubadora orbital modelo MAXQ 4000, a 28 °C y 80 rpm, durante 30 min. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

Para el conteo de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFN) se utilizaron las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , mientras que para las solubilizadoras de fosfatos (BSF) se usaron las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . En ambos casos se tomaron 100  $\mu$ L de cada dilución y se sembraron en placas de Petri con un total de cinco repeticiones por dilución. Los medios de cultivo utilizados fueron fuente combinada de carbono (Rennie 1981) y Pikovskaya (Nopparat *et al.* 2009), para fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos, respectivamente. Se incubaron por 3 d en el caso del medio de cultivo de fuente combinada de carbono y 10 d para Pikovskaya.

Se eligió la dilución que presentó mayor cantidad de colonias aisladas, a la cual se le realizó el conteo de colonias. Para ambos casos se seleccionó la dilución  $10^{-4}$ . En medio de cultivo de fuente combinada de carbono se contaron las colonias totales, mientras que en para las BSF se tomaron en cuenta aquellas que presentaron un halo de solubilización, ya que es una característica representativa de las cepas que pertenecen a este grupo (Figura 1.3). Finalmente, se determinaron las unidades formadoras de colonias por g de suelo (UFC  $g^{-1}$ ), con la siguiente fórmula:

$$UFC = \frac{C * D * PH}{PS}$$

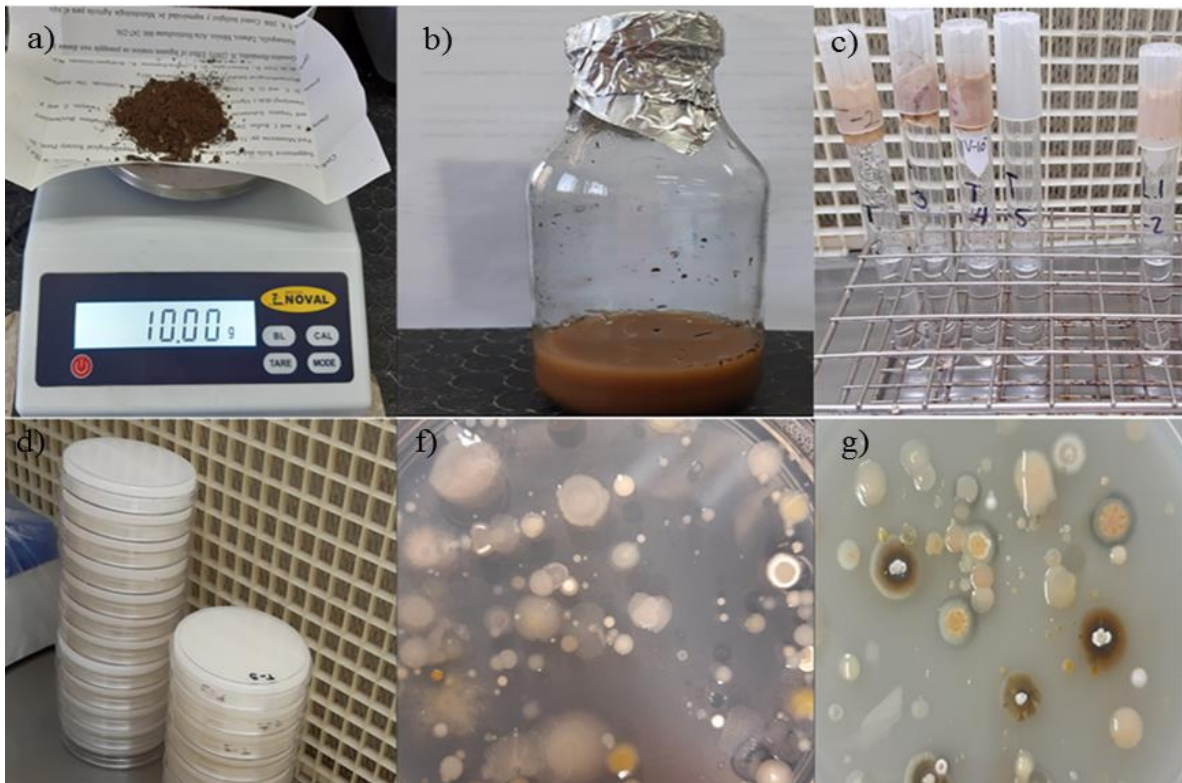
Donde:

C= Media del número de colonias

D= Factor de dilución

PH= Peso húmedo

PS= Peso seco



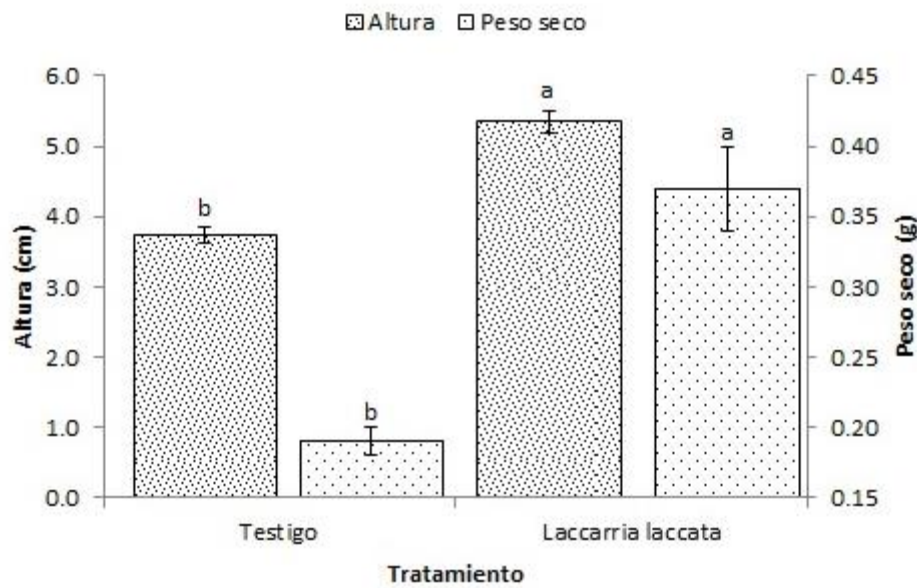
**Figura 1. 3. Conteo de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. a) Pesado de la muestra de sustrato; b) Elaboración de la solución madre; c) Diluciones decimales seriadas; d) Medios de cultivo utilizados: fuente combinada de carbono y Pikovskaya; e) Bacterias fijadoras de nitrógeno; f) Bacterias solubilizadoras de fosfatos con halo de solubilización.**

## 1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.5.1. Crecimiento de *P. greggii* inoculado con *L. laccata*

El análisis estadístico indicó diferencias significativas (Tukey  $p < 0.05$ ) en la altura y peso seco de las plantas. En el caso de la altura, los tratamientos testigo e inoculado con *L. laccata* presentaron medias de  $3.7 \pm 0.11$  y  $5.4 \pm 0.16$  cm, respectivamente. Mientras que en el peso seco se presentaron valores de  $0.19 \pm 0.01$  g para el testigo y  $0.37 \pm 0.03$  g para el inoculado con *L. laccata*, como se muestra en la Figura 1.4.

Un fenómeno similar en la altura de *P. greggii* fue observado por Rentería-Chávez *et al.* (2017) y Carrera-Nieva y López-Rios (2004), usando la misma técnica (inóculo a partir de esporomas deshidratados) y carga microbiana en la inoculación (concentración de  $10^7$  a  $10^8$  esporas por g de inóculo) donde, después de 12 y 24 meses de la inoculación hubo diferencias estadísticas entre el tratamiento *L. laccata* y el testigo, en un sustrato con las mismas proporciones usadas en este trabajo. Lo cual indica que la influencia de la inoculación sobre el crecimiento de las plantas es constante en diversos estudios. En otras investigaciones el peso seco también aumenta cuando *P. greggii* es ectomicorrizado por *L. laccata*, fenómeno que se puede observar a partir de un año de la inoculación (Carrera-Nieva y López-Rios 2004, Méndez-Neri *et al.* 2011).

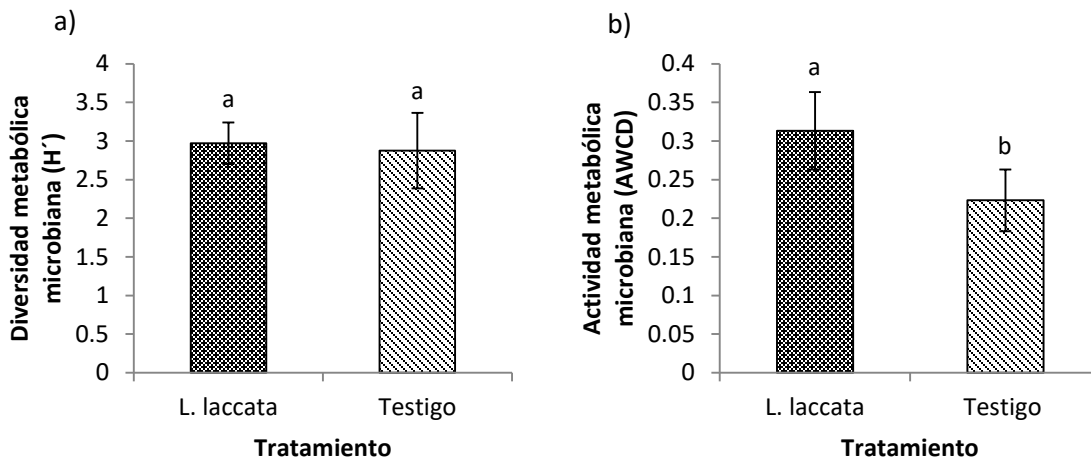


**Figura 1.4. Influencia de la inoculación de *L. laccata* sobre la altura y el peso seco de *P. greggii* (Tukey  $p < 0.05$ )  $n= 6$ .**

### 1.5.2. Índice de diversidad y actividad metabólica de las comunidades microbianas

La diversidad metabólica microbiana, evaluada con el índice de Shannon-Weaver ( $H'$ ) a las 48 h de incubación, no mostró diferencias significativas (Tukey  $p < 0.05$ ) entre tratamientos:  $2.97 \pm 0.27$  en el inoculado con *L. laccata* y  $2.87 \pm 0.49$  en el testigo (Figura 1.5a). Sin embargo, la inoculación con *L. laccata* afectó claramente la actividad metabólica microbiana (AWCD). En general, la AWCD fue mayor en el tratamiento inoculado, con una lectura de una media de  $0.3 \pm 0.07$  comparada con una media de  $0.22 \pm 0.09$  en el testigo, ambas observadas a 590 nm (Figura 1.5b). Esto indica que, a pesar de que la diversidad de microorganismos en ambos tratamientos es similar, los microorganismos son más activos en el sustrato de los pinos inoculados. Dicha actividad microbiana elevada aumenta el crecimiento y desarrollo de *P. greggii*, dando como resultado plantas con mayor capacidad de adaptación al ambiente (Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019). Barragán-Soriano *et al* (2017) observaron que la especie forestal *Pinus montezumae*, al encontrarse en contacto con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, aumentó el crecimiento y peso seco

de las plantas, resultados similares a los presentados en la Figura 1.4 de esta investigación. Además, la ectomicorriza, entre sus múltiples funciones, ayuda a la formación y descomposición de materia orgánica que puede ser aprovechada por los microorganismos rizosféricos (Brundrett 2009). Esto confirma que la MO en el suelo y/o sustrato, podría mejorar el acceso a nutrientes y energía para la proliferación de biomasa microbiana, lo que condujo a que los microorganismos degradaran con mayor facilidad las fuentes de carbono (García *et al.* 2018, Wang *et al.* 2019).



**Figura 1. 5. Diversidad ( $H'$ ) y actividad metabólica microbiana (AWCD) del sustrato de *P. greggii* inoculado con *L. laccata* y no inoculado. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) n= 6.**

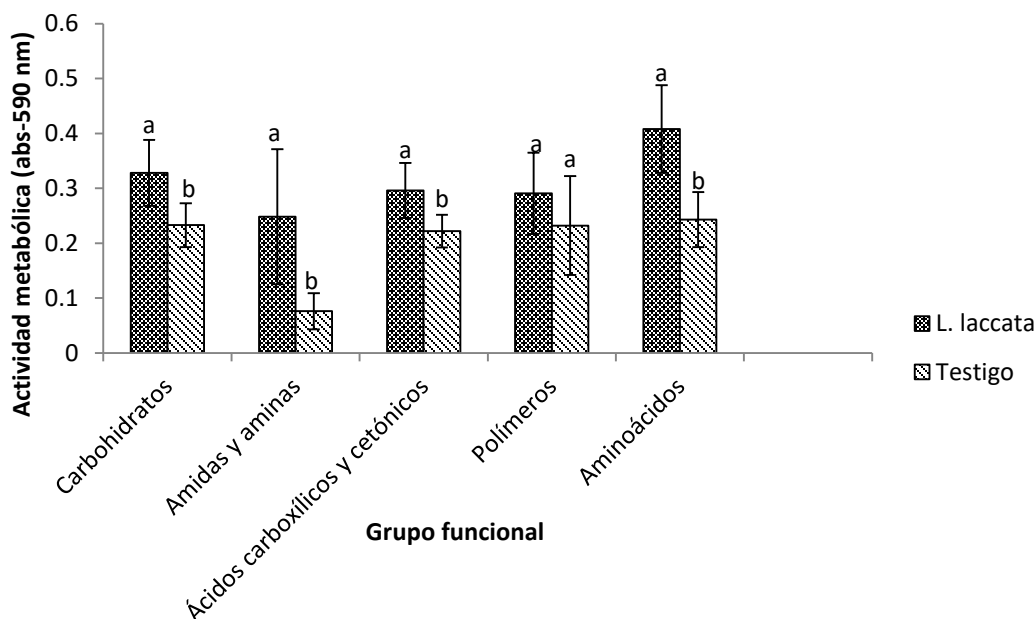
Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, para la mayoría de los grupos funcionales, a excepción de los polímeros. Para ambos tratamientos, las fuentes de carbono más utilizadas fueron las que se encuentran dentro del grupo funcional de los aminoácidos, seguidas de los carbohidratos, ácidos carboxílicos y cetónicos; mientras que las menos usadas en ambos casos, fueron los polímeros y las amidas y aminas (Figura 1.6). Tian *et al.* (2016) mencionan que los microorganismos con la capacidad de utilizar aminoácidos como fuente de C, inducen cambios en la actividad peptidasa del suelo, lo que acelera la descomposición de las proteínas de



la MO, agilizando la rotación de N orgánico. Efecto que se puede observar tanto en el crecimiento como en la producción de biomasa seca de este experimento.

Además, varios estudios han demostrado que los hongos ectomicorrízicos (HE) aumentan la formación de agregados del suelo, a través de exudados fúngicos y la hidrofobicidad del micelio (Zheng *et al.* 2014). Esta capacidad se encuentra relacionada con la atracción de microorganismos al micelio extraradical (Viollet *et al.* 2017, Zheng *et al.* 2014). Wang *et al.* (2019), observaron que la actividad metabólica microbiana de los ácidos carboxílicos, carbohidratos y amoniácidos es más elevada en los suelos que tienen mayor cantidad de agregados. Lo anterior sugiere que los HE no aportan dichos beneficios edáficos de manera aislada, sino en conjunto con el microbioma que se forma a partir de su inoculación.

En resumen, tanto la diversidad como la actividad metabólica microbiana son indicadoras de la calidad del suelo (Wang *et al.* 2019). Por medio de esta información se pueden plantear estrategias de rehabilitación mediante incorporación de plantas vivas inoculadas con microorganismos adaptables al ambiente y; a su vez, realizar monitoreos de seguimiento para evaluar la efectividad de la intervención (García *et al.* 2018, Ge *et al.* 2018). Aunado a lo anterior, en el suelo, al tener una comunidad compleja, la función de los microorganismos tiene alta relevancia en el ecosistema, por lo que la composición taxonómica queda en segundo plano (Ruiz *et al.* 2019).



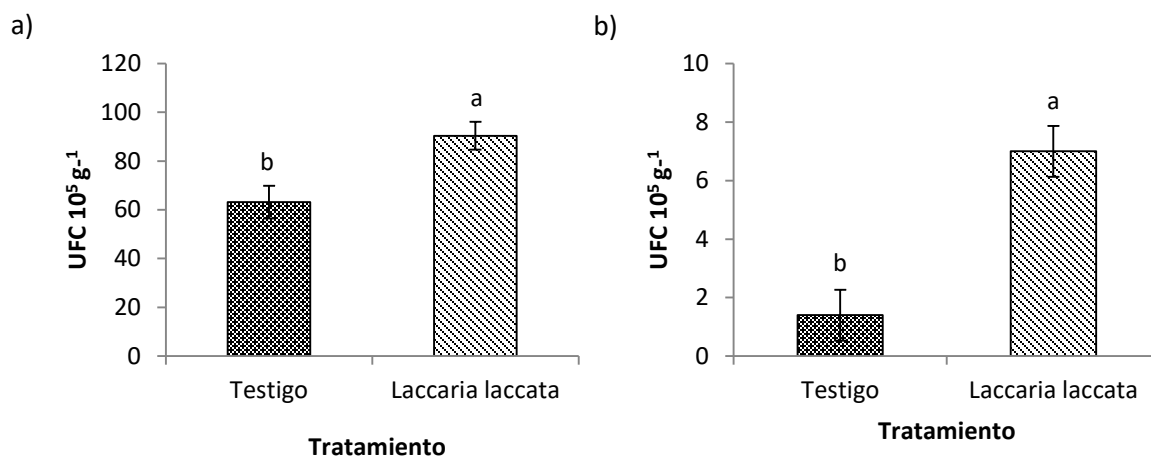
**Figura 1.6.** Actividad metabólica microbiana expresada en el uso de fuentes de carbono correspondientes a cinco grupos funcionales (ANOVA). Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa (Tukey,  $\alpha=0.05$ )  $n=6$ .

### 1.5.3. Población de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos

Dentro de los microorganismos que habitaban en ambos tratamientos, los que presentan mayor importancia por su función, son las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) y las solubilizadoras de fosfatos (BSF), por lo que se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) para ambas. A pesar de que dichas bacterias no fueron inoculadas directamente, se infiere que se encontraban en los esporomas de los HE al momento de su inoculación, puesto que no se realiza un proceso de desinfección a los cuerpos fructíferos, ya que esto impediría el desarrollo de ectomicorriza en las plantas. Los resultados señalaron diferencia significativa entre tratamientos, donde los pinos inoculados con *L. laccata* tuvieron mayor abundancia de BFN y BSF (Figura 1.7).

Kuppardt *et al.* (2018) mencionan que las raíces de las plantas seleccionan comunidades fúngicas y bacterianas que tienen efectos sobre su desarrollo y productividad. Además, las raíces ectomicorrizadas influyen sobre la selección y abundancia de estas bacterias, debido a que el micelio recibe altas cantidades de carbohidratos provenientes de la fotosíntesis que realizan las plantas, lo cual genera una gran área de superficie para la colonización bacteriana (Marupakula *et al.* 2017).

Tomando en cuenta que el N y el P son los nutrientes que ocasionan mayores limitaciones en el crecimiento de las plantas (Celaya-Michel y Castellanos-Villegas 2011, Morón 1994), parece predecible que los HE atraigan bacterias con la capacidad de sintetizar dichos nutrientes. Marupakula *et al.* (2017) mencionan que al estudiar los microbiomas bacterianos asociados a las raíces *P. sylvestris* colonizadas por diversos HE, algunos de los géneros representativos encontrados fueron *Burkholderia*, y *Bradyrhizobium*, los cuales tienen la capacidad de fijación de nitrógeno y/o solubilización de fosfatos (Bolívar-Anillo *et al.* 2016, Nápoles *et al.* 2018). Esto puede indicar que, en términos generales, los HE atraen especies bacterianas con la facultad de promoción del crecimiento vegetal.



**Figura 1. 7. Abundancia de bacterias a) fijadoras de nitrógeno y b) solubilizadoras de fosfatos en *P. greggii* inoculado con *L. laccata* y no inoculado (Tukey  $p < 0.05$ )  $n= 6$ .**

## 1.6. CONCLUSIONES

El hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* tiene efectos positivos sobre el desarrollo de *Pinus greggii* (altura y peso seco). Además, esta simbiosis aumenta la actividad metabólica microbiana (AWCD) de la rizósfera pero no influye en la diversidad metabólica de la misma. Las fuentes de carbono más utilizadas por los microorganismos rizosféricos de *P. greggii*, sin importar la inoculación, fueron las pertenecientes a los grupos funcionales aminoácidos, carbohidratos, y ácidos carboxílicos y cetónicos; mientras que las menos utilizadas fueron los polímeros y las aminas y amidas. La ectomicorriza también promueve la colonización de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos; es decir, proporciona el ambiente adecuado para la proliferación de microorganismos que promueven el crecimiento vegetal.

## 1.7. LITERATURA CITADA

- Barragán-Soriano JL, J Pérez-Moreno, JJ Almaraz-Suárez, MG Carcaño-Montiel KI Medrano-Ortiz. 2018. Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 24: 3-16.
- Bolívar-Anillo HJ, ML Contreras-Zentella and LG Teherán-Sierra. 2016. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *Tip* 19: 102-108.
- Brundrett MC. 2009. Asociaciones de micorrizas y otros medios de nutrición de las plantas vasculares: comprender la diversidad global de las plantas huésped resolviendo información conflictiva y desarrollando medios confiables de diagnóstico. *Suelo Vegetal* 320: 37-77.
- Carrera-Nieva A y GF López-Ríos. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10: 93-98.
- Celaya-Michel E y A Castellanos-Villegas. 2011. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana* 29: 343-355.
- Friesen, ML, SS Porter, SC Stark, EJ von Wettberg, JL Sachs y E. Martínez-Romero. 2011. Microbially mediated plant functional traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42: 23-46.
- García DE, BR Lopez, LE de-Bashan, AM Hirsch, M Maymon and Y Bashan. 2018. Functional metabolic diversity of the bacterial community in undisturbed resource island soils in the southern Sonoran Desert. *Land Degradation & Development* 29: 1467-1477.
- Garland JL and AL Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2351-2359.
- Ge Z, H Du, Y Gao and W Qiu. 2018. Analysis on metabolic functions of stored rice microbial communities by BIOLOG ECO microplates. *Frontiers in Microbiology* 9: 1375.
- Gonthier, P, L Giordano, E Zampieria, G Lione, A Vizzini, JV Colpaert y R Balestrini. 2019. An ectomycorrhizal symbiosis differently affects host susceptibility to two congeneric fungal pathogens. *Fungal Ecology* 39: 250-256.
- Kuppardt A, T Fester, C Härtig and A Chatzinotas. 2018. Rhizosphere Protists Change Metabolite Profiles in *Zea mays*. *Frontiers in Microbiology* 9: 169-178.
- Magurran AE. 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton.
- Marupakula S, S Mahmood, J Jernberg, S Nallanchakravarthula, ZA Fahad and RD Finlay. 2017. Bacterial microbiomes of individual ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* roots are shaped by soil horizon and differentially sensitive to nitrogen addition. *Environmental Microbiology* 19: 4736-4753.

- Méndez-Neri M, J Pérez-Moreno, R Quintero-Lizaola, E Hernández-Acosta, y A Lara-Herrera. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana* 29: 73-81.
- Morón A. 1994. Fósforo: Disponibilidad y dinámica en el suelo. Manejo y Fertilidad de suelos. Ed INIA. Montevideo-Uruguay, 27.
- Nápoles MC, JC Cabrera, G Wegria, R Onderwater, R Wattiez, I Hernández y G González. 2018. Inducción de señales en la interacción *Mesorhizobium cicerii*-*Cicer arietinum* L. *Cultivos Tropicales* 39: 101-107.
- Nopparat C, M Jatupornpipat and A Rittiboon. 2009. Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Kasetsart Journal - Natural Science* 43: 172-181.
- Rasouli-Sadaghiani MH, M Barin, H Khodaverdiloo, S Siavash-Moghaddam, A Damalas and S Kazemalilou. 2018. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobacteria Promote Growth of Russian Knapweed (*Acroptilon repens* L.) in a Cd-Contaminated Soil. *Journal of Plant Growth Regulation* 36: 1-9.
- Rennie RJ. 1981. A single medium for the isolation of acetylenereducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology* 27: 8-14.
- Rentería-Chávez MC, J Pérez-Moreno, VM Cetina-Alcalá, R Ferrera-Cerrato y B Xoconostle-Cázares. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología* 49: 93-104.
- Rodríguez-Gutiérrez I, D Ramírez-Martínez, R Garibay-Orijel, V Jacob-Cervantes, J Pérez-Moreno, M del Pilar Ortega-Larrocea, y E Arellano-Torres. 2019. Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 90: 1-11.
- Ruiz EB, JMB Salort, AR Munar y BN Fernández. 2019. Aplicación de la técnica Biolog™ ECO-plate para el estudio del perfil fisiológico de las comunidades microbianas del suelo agrícola. *Revista Ecosistemas* 28: 46-53.
- Tian J, J Wang, M Dippold, Y Gao, E Blagodatskaya, and Y Kuzyakov. 2016. Biochar affects soil organic matter cycling and microbial functions but does not alter microbial community structure in a paddy soil. *Science of the Total Environment* 556: 89-97.
- Viollet A, B Pivato, C Mougél, JC Cleyet-Marel, C Gubry-Rangin, P Lemanceau and S Mazurier. 2017. *Pseudomonas fluorescens* C7R12 type III secretion system impacts mycorrhization of *Medicago truncatula* and associated microbial communities. *Mycorrhiza* 27: 23-33.
- Wang S, T Li, Z Zheng and HY Chen. 2019. Soil aggregate-associated bacterial metabolic activity and community structure in different aged tea plantations. *Science of The Total Environment* 654: 1023-1032.
- Zheng W, EK Morris and MC Rillig. 2014. Ectomycorrhizal fungi in association with *Pinus sylvestris* seedlings promote soil aggregation and soil water repellency. *Soil Biology and Biochemistry* 78: 326-331.





## CAPÍTULO II. CRECIMIENTO DE *Pinus greggii* BAJO EL DOSEL DE *Acacia saligna* CON LA INOCULACIÓN DE RIZOBIOS, HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y ECTOMICORRÍZICOS

### 2.1 RESUMEN

Algunas especies de plantas, a pesar de diferir por sus características morfológicas y fisiológicas, se pueden encontrar compartiendo el mismo espacio y formando nichos que favorecen el crecimiento de estas. En un rodal del Municipio de Texcoco, Estado de México, dominado por *P. greggii*, la presencia de la leguminosa arbórea *Acacia saligna* coincide con la proliferación de hongos azules (*Lactarius indigo*) durante la temporada de lluvias. Derivado de esta observación, en este trabajo se evaluó la interacción de *Pinus greggii* bajo el dosel de *Acacia saligna*; y el efecto de la inoculación de microorganismos benéficos: rizobios nativos, hongos micorrízicos arbusculares y dos hongos ectomicorrízicos (*Laccaria laccata* y *Lactarius indigo*). A pesar de que los resultados no fueron favorables debido a las condiciones climáticas experimentales, se logró observar que los pinos inoculados con *L. laccata* tuvieron porcentajes de colonización elevados (valores de hasta 91.27 %). Además, aumentó la colonización micorrízica arbuscular en *A. saligna* y la abundancia de las bacterias solubilizadoras de fosfatos en el tratamiento sin inoculación ectomicorrízica. Lo que indica que la función que realizan los hongos ectomicorrízicos puede ser sustituida por la función que realizan los hongos micorrízicos arbusculares y las bacterias solubilizadoras de fosfatos.

**Palabras clave:** *Laccaria laccata*, *Lactarius indigo*, micorriza arbuscular, colonización micorrízica, bacterias solubilizadoras de fosfatos.

## 2.2 ABSTRACT

Some species of plants, despite differing greatly from each other, according to their morphological and physiological characteristics, can be found by sharing the same space and forming niches that favor the growth of both. In a stand of the Municipality of Texcoco, State of Mexico, dominated by *Pinus greggii*, there is the presence of the tree legume *Acacia saligna*; which coincides with the proliferation of blue fungi (*Lactarius indigo*) only in that area, during the rainy season. Because of this, in this work the interaction of *P. greggii* was evaluated under the canopy of *A. saligna*; and the effect of the inoculation of beneficial microorganisms: native rhizobia, arbuscular mycorrhizal fungi and two ectomycorrhizal fungi (*Laccaria laccata* and *Lactarius indigo*). Although the results were not favorable due to the adverse climatic conditions, it was observed that the pines inoculated with *L. laccata* had high colonization rates values of up to 91.27%. In addition, arbuscular mycorrhizal colonization increased in *A. saligna* and the abundance of phosphate solubilizing bacteria in the treatment without ectomycorrhiza inoculation. This indicate that the role of ectomycorrhizal fungi can be taken by phosphate solubilizing rhizobacteria and/or arbuscular mycorrhizal fungi.

**Keywords:** *Laccaria laccata*, *Lactarius indigo*, arbuscular mycorrhiza, mycorrhizal colonization, phosphate solubilizing bacteria.

## 2.3 INTRODUCCIÓN

La fitorrehabilitación asistida hace referencia a la rehabilitación de suelos por medio de plantas vivas en conjunto con diversos microorganismos benéficos (Perea-Vélez *et al.* 2017). Los principales beneficios obtenidos por medio de esta técnica son el aumento en las concentraciones de nutrientes como fósforo, nitrógeno, potasio, entre otros (da Silva-Fonseca *et al.* 2018, Tamagno *et al.* 2018, Giles *et al.* 2018); así como el mejoramiento de las condiciones físicas del suelo (estructura, textura, porosidad, etc.) (Saad *et al.* 2018).

La fitorrehabilitación no es llevada a cabo exclusivamente por las plantas, sino en conjunto con los organismos que habitan, principalmente en la zona de la raíz, llamada rizósfera (Mares-Ponce de León *et al.* 2018); donde efectúan diferentes mecanismos, tales como la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Carrillo-González *et al.* 2017), entre otros.

Según Návaez *et al.* (2017), la biomasa microbiana se encuentra relacionada directamente con el alto de los árboles y la altura de su copa, esta relación puede ser positiva o negativa, dependiendo los microorganismos con los que interactúe la flora.

Por lo anterior, el estudio y la utilización de consorcios microbianos es una estrategia que brinda mayores beneficios en la rehabilitación de suelos y el correcto funcionamiento de los ecosistemas edáficos, puesto que al interactuar entre sí, los microorganismos logran aumentar la disponibilidad de los nutrientes del suelo, lo que tiene como resultado plantas con mejor desarrollo y suelos más estables (Ojeda-Quintana *et al.* 2016).

## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1 Establecimiento de *Acacia saligna*

El material biológico de *Acacia saligna* (suelo, semillas y plantas) se colectó en Cuautla, Morelos, México; en las siguientes coordenadas: 18° 44' 57.1'' N, 98° 54'07.5''W. Se sembraron en charolas de germinación con suelo de la zona de colecta, esterilizado con Basamid (Bazamet al 98%, marca CERTIS) previo a la inoculación, colocando 50 g del producto en polvo de forma homogénea sobre el sustrato, se humedeció y se tapó con plástico, evitando fugas. Se dejó reposar durante 24 h y durante 10 días se destapó, 4 h diarias, para permitir la eliminación de gases tóxicos.

Una vez germinadas, las plantas de 30 días de edad, se trasplantaron a bolsas de plástico con 3 kg con el mismo suelo y se inocularon con rizobios provenientes de nódulos aislados de *Acacia saligna* a una concentración de  $10^8$  UFC, hongos micorrízicos arbusculares (10 esporas por gramo de suelo) y esporas del hongo ectomicorrízico *Lactarius indigo* a una concentración de  $10^7$  a  $10^8$  determinada con un hematocitómetro (Marca Marienfeld), evaluada con ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 20 X. Se regaron diariamente con agua corriente durante el periodo Noviembre 2016-Enero 2019.

### 2.4.2 Preparación de los inóculos

Los rizobios fueron aislados tomando nódulos activos (con coloración rosácea) de las raíces de las leguminosas colectadas en Cuautla, Morelos, se lavaron con agua corriente y se colocaron en una gasa para ser desinfectados. En condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se sumergieron en alcohol al 95 % durante 20 segundos y se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, se sumergieron en cloro al 10 % (hipoclorito de sodio al 0.3 %) por 2 minutos y se llevaron a cabo 5 enjuagues con agua destilada estéril. Después, se colocaron

en una micropalaca con 1 mL de agua destilada estéril y se maceraron con una varilla de vidrio. Se tomó una muestra con un asa bacteriológica de cada suspensión y se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo Extracto de Levadura Manitol Agar Rojo Congo (ELMARC) (Ferrera *et al.* 1993), elaborado con insumos del laboratorio de microbiología. Se dejaron incubar por 48 h a 28 °C hasta obtener colonias aisladas. A dichas colonias se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: crecimiento en Glucosa Peptona Agar y prueba de ácido alcalí (Ferrera *et al.* 1993). Finalmente, las cepas fueron agrupadas de acuerdo a las siguientes características morfológicas: tamaño, superficie, coloración, tipo borde, forma, elevación, textura y velocidad de crecimiento. De acuerdo a la morfología colonial y los resultados de las pruebas bioquímicas se seleccionaron las cepas que presentan afinidad al grupo de las rizobios.

Dichas cepas se sembraron en tubos de centrifuga de plástico (Falcon de 50 mL, marca Sarstedt) con Caldo Nutritivo (Merck) (Ferrera *et al.* 1993), tomando una muestra con el asa. Se colocaron en un incubadora orbital modelo MAXQ 4000, a 28 °C y 80 rpm, durante 4 d, hasta obtener una concentración de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Las muestras se centrifugaron a 7000 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se sustituyó por agua destilada estéril. Finalmente se mezcló con ayuda de un vórtex (MS1 Minishaker IKA). Se hicieron dos inoculaciones con 10 mL, la primera al momento del trasplante y la segunda 6 meses después (Figura 2.1).



**Figura 2.1. Elaboración de inóculo de rizobios nativos de *A. saligna*. a) separación de raíces del suelo; b) corte de los nódulos; c) proceso de desinfección de nódulos; d) siembra de las muestras en Caldo Nutritivo; e) centrifugación de la muestra para la formación del pellet.**

El inóculo de hongos micorrízicos arbusculares fue proporcionado por el laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Se agregaron 10 g de inóculo por planta, con aproximadamente 10 esporas por g de inóculo al momento del trasplante.

En un rodal dominado por *Pinus greggii*, con la presencia de la leguminosa arbórea *Acacia saligna*, ubicado en el Municipio de Texcoco, entre las coordenadas 19° 27' 20'' N, 98° 46' 51'' W y 19° 27' 56'' N, 98° 47' 11'' W, se colectaron hongos azules (*Lactarius indigo*) durante la temporada de lluvias. Mientras que el inóculo de *Laccaria laccata* provino de un bosque de pinos en el Municipio de Ozumba, Estado de México (Figura 2.2). En ambos casos, se separaron los estípites de los púleos, estos últimos se deshidrataron a 35 ° C en un horno deshidratador de tipo bandeja (Jersa ®, México). Posteriormente, se molieron en un molino eléctrico de martillo (Thomas

Scientific ©, Modelo 4 Wiley Mill, EE.UU.) y pasó través de un tamiz de abertura de 1 mm para obtener un tamaño de partícula homogéneo.



**Figura 2. 2. Rodal de *Accacia saligna* en un bosque de *Pinus greggii*.**

#### **2.4.3 Preparación del sustrato e inoculación para el establecimiento preliminar de *P. greggii***

El sustrato consistió en una mezcla de arena, corteza y suelo forestal en una proporción 2: 2: 1, se esterilizó tres veces con vapor a una presión de  $1.3 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$  a  $125^\circ \text{C}$  durante 5 h. Las semillas de *P. greggii* provenientes de la zona de Izta Popo, Puebla, México, se esterilizaron con 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 20 min.

Se sembraron en tubos de plástico negro de  $125 \text{ cm}^3$  que contienen el sustrato descrito. Las plantas se inocularon con *L. laccata* a una concentración de  $10^7$  a  $10^8$  esporas determinada con un

hematocitómetro. Se hicieron dos inoculaciones: la primera simultáneamente con la siembra y la segunda 60 días después. Las plantas fueron regadas diariamente con agua destilada estéril, durante seis meses.

El experimento se estableció bajo condiciones de invernadero en las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ubicado en Carretera México – Texcoco km 36.5, en el Municipio de Texcoco, Estado de México.

#### **2.4.4 Establecimiento del experimento**

Se trasplantaron las leguminosas y los pinos en bolsas de 30 kg de sustrato compuesto por suelo y tezontle a una relación 3:7 previamente esterilizado con Basamid y se regaron diariamente con agua corriente. Se formaron los siguientes tratamientos (en función de la inoculación de hongos ectomicorrízicos) en un diseño factorial 2x2, con siete repeticiones cada uno:

- a) Acacia inoculada con Lactarius-Pino inoculado con Laccaria
- b) Acacia sin inocular-Pino inoculado con Laccaria
- c) Acacia inoculada con Lactarius-Pino sin inocular
- d) Acacia sin inocular-Pino sin inocular

Nota: En todos los tratamientos las acacias se inocularon con rizobios nativos y hongos micorrízicos arbusculares.

#### **2.4.5 Elaboración del sustrato**

Se utilizó suelo de una zona de tepetate del municipio de San Miguel Tlaixpan, Estado de México, a 20 cm de profundidad, bajo las siguientes coordenadas: 19° 30' 13.3'' N 98° 47' 30.0'' W. Se



mezcló con tezontle en una relación 3:7 (30 % suelo-70 % tezontle). Posteriormente se fumigó con Basamid, colocando 50 g del producto en polvo de forma homogénea sobre el sustrato, se humedeció y se tapó evitando fugas. Se dejó reposar durante 24 h y durante 10 días se destapó 4 horas diarias para su aireación.

#### **2.4.6 Análisis químico de los suelos: San Miguel Tlaixpan, Estado de México y Cuautla, Morelos**

La muestra de suelo se dividió en dos partes, ambas fueron maceradas con ayuda de un mortero y se tamizaron para obtener muestras homogéneas. La primera con un tamiz de malla 30 para las pruebas de nitrógeno total, nitratos y amonio; y la segunda con un tamiz malla 10 para pH, conductividad eléctrica (CE), potasio, fósforo y materia orgánica (MO).

El análisis de nitrógeno total se elaboró con la técnica de macro-Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), donde se utilizaron 2 repeticiones de 10 g de la muestra de suelo, así como de un suelo patrón. Para las pruebas de nitratos y amonio se usó el procedimiento micro-Kjeldahl (Semarnat, 2002). Para determinar pH y CE se pesaron 10 g de suelo y se diluyeron en 20 mL de agua, formando una relación (1:2). La determinación de potasio intercambiable fue bajo el método de extracción con acetato de amonio 1N (Semarnat, 2002), fósforo por medio de la metodología de Olsen (Olsen y Watanabe, 1970) y materia orgánica (MO) mediante la técnica de Walkley y Black (1934) (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1. Características químicas de los suelos.**

|                              | Suelo                                 |                  |
|------------------------------|---------------------------------------|------------------|
|                              | San Miguel Tlaixpan, Estado de México | Cuautla, Morelos |
| pH (1:2)                     | 8.15                                  | 5.87             |
| CE (dS m <sup>-1</sup> )     | 0.09                                  | 0.02             |
| M.O (%)                      | 0.06                                  | 25.8             |
| Nt (%)                       | 0.04                                  | 0.65             |
| P (ppm)                      | 4                                     | 8                |
| K (cmoles+Kg <sup>-1</sup> ) | 0.8                                   | 0.3              |
| N-NO <sub>3</sub> (ppm)      | 11                                    | 28               |
| N-NH <sub>4</sub> (ppm)      | 11                                    | 18               |

#### **2.4.7 Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos**

Se pesaron 10 g de suelo seco y se adicionaron a una botella con 90 mL de agua destilada estéril. Dicha solución se agitó en una incubadora orbital modelo MAXQ 4000, a 28 °C y 80 rpm, durante 30 min, posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>.

Para el conteo de bacterias fijadoras de nitrógeno se sembraron las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup>, mientras que para las solubilizadoras de fosfatos se sembraron las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>. En ambos casos se tomaron 100 µL de cada dilución y se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo, con un total de cinco repeticiones por dilución. Los medios de cultivo utilizados fueron Fuente combinada de carbono (Rennie, 1981) y Pikovskaya (Nopparat *et al.*, 2009), para fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos, respectivamente. Se incubaron por 3 días en el caso de Fuente combinada de carbono y por 10 días para Pikovskaya.

Se eligió la dilución que presentó una cantidad de colonias aisladas entre 30 y 300, para realizar el conteo. Para ambos casos se seleccionó la dilución 10<sup>-4</sup>. En medio Fuente combinada de carbono se contaron las colonias totales, mientras que en para las BSF se tomaron en cuenta aquellas que

presentaron un halo de solubilización, ya que es una característica representativa de las cepas que pertenecen a este grupo (Figura 4.2).

#### 2.4.8 Conteo de nódulos

Se cortó el tallo de las leguminosas a un centímetro de la raíz, posteriormente las raíces fueron separadas del suelo de manera cuidadosa y se lavaron con agua corriente. Después, se colocaron individualmente en una hoja de papel, donde se extendieron y se contaron los nódulos totales (Figura 2.3).



**Figura 2.3. Conteo de nódulos. a) Raíces de *A. saligna*; b) Observación de Nódulos; c) Conteo de los nódulos.**

#### 2.4.9 Determinación de la colonización micorrízica

Para esta determinación las raíces fueron teñidas siguiendo el método de Phillips y Hayman (1970), modificado por Sieverding (1983). El cual consiste en clareo, blanqueo, acidificación, tinción y decoloración. Se separaron las raíces del tallo y se eliminó el exceso de suelo y posteriormente se lavaron con agua corriente. Se cortaron las raíces más finas en fragmentos de aproximadamente 1

cm de largo y se colocaron en un frasco de vidrio, al que se adicionó una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 %. Las muestras permanecieron en dicha solución durante un día para después ser cambiada por una nueva, dejando reposar las raíces por un día más. Esto con la finalidad de eliminar la epidermis de las raíces y facilitar su observación al microscopio. Una vez transcurrido el tiempo de clareo, se eliminó el KOH y se lavaron las raíces con abundante agua. Posteriormente, se colocaron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 min, se lavaron nuevamente con agua corriente y se sumergieron en HCl por 5 min. Después, fueron teñidas con el colorante azul de tripano durante 10 min. Finalmente, las raíces se decoloraron con lactoglicerol al 50 % durante 10 min.

Se seleccionaron 80 fragmentos de cada planta que se encontraran bien teñidos y fueron colocados de forma paralela en grupos de 20 fragmentos por portaobjetos. Obteniendo un total de 4 muestras por planta. Las cuales se observaron en el microscopio óptico dividiendo cada muestra en tres secciones (alta, media y baja). Se observaron las 20 raíces de cada muestra en los tres puntos mencionados anteriormente, realizando en total 60 observaciones por muestra. Se tomaron en cuenta aquellas observaciones en las que se encontraron estructuras pertenecientes a la colonización micorrízica arbuscular (hifas, vesículas y arbusculos) y fueron contadas (Figura 2.4).

La evaluación de la colonización micorrízica arbuscular se llevó a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{no. de segmentos colonizados}}{\text{no. total de segmentos observados}} * 100$$



**Figura 2.4. Laminillas de raíces para la determinación de colonización micorrízica arbuscular.**

#### **2.4.10 Extracción de esporas por el método de tamizado y decantado en húmedo**

Se pesaron 20 g de suelo rizosférico, se colocaron en un frasco de vidrio de 1 L y se agregó agua corriente. Se mezcló de forma homogénea y se dejó reposar durante 5 min para que las partículas de suelo se sedimentaran. Posteriormente el sobrenadante se vació sobre dos tamices de 2 y 0.043 mm, respectivamente. Este procedimiento se repitió 5 veces hasta obtener una pequeña suspensión de suelo en el tamiz más pequeño.

La suspensión que se formó en el tamiz de 0.043 mm se colocó en un tubo de 50 mL con un gradiente de sacarosa entre 20 y 60% (5 mL de 20 % y 4 ml de 60 %). Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. Se formó un sobrenadante que se colocó nuevamente en el tamiz de 0.043 mm y se enjuagó para eliminar los residuos de la sacarosa. Finalmente, se colocó la muestra en una caja de Petri de cristal con aproximadamente 100 mL de agua.

La muestra se observó al estereoscopio, se separaron las partículas de suelo y se colectaron las esporas con una micropipeta. Estas fueron colocadas en un portaobjetos, separándolas en dos muestras. A una se le agregó reactivo de MELZER y a la otra alcohol polivinílico-glicerol

(PVLG), de acuerdo al método de Schenck y Pérez (1990). Con la finalidad de que unas esporas se tiñeran mientras que las otras se fijaran con su coloración normal. Finalmente, las esporas se contaron. Se determinó el número de esporas que se encontraban en 10 g de suelo seco.

#### **2.4.11 Determinación de colonización ectomicorrízica**

Se tomaron tres plantas inoculadas con *L. laccata* y una sin inocular, para la evaluación del porcentaje de micorrización. Posteriormente, se extrajeron de las bolsas de plástico. La parte radical se lavó con agua corriente sobre tres tamices de diferente diámetro de apertura (1.19, 0.180 y 0.085 mm), con la finalidad de reducir la pérdida de raíces cortas. La identificación de raíces vivas micorrizadas se realizó con un microscopio estereoscópico. Se contaron todas las raíces cortas del total de la masa radical y se efectuaron cortes con un bisturí para su análisis micromorfológico (Martínez–Reyes *et al.*, 2012). Se analizaron las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza: manto, red de Hartig y micelio externo.

#### **2.4.12 Análisis de resultados**

En todos los casos realizaron análisis de varianza con el paquete SAS versión 9.0 para Windows (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1 Supervivencia de *Pinus greggii* bajo el dosel de *Acacia saligna* y la inoculación de microorganismos benéficos (rizobios, HMA y HE).

Debido a las temperaturas altas presentadas en los meses de marzo y abril 2019 (Temperaturas máximas entre 40 y 45 °C), sólo sobrevivieron 4 pinos de los 28 trasplantados (14.28% de supervivencia; Cuadro 5.2). Por lo anterior, no fue posible obtener resultados adecuados ni realizar un análisis estadístico, en referencia a los efectos de los tratamientos en el crecimiento y desarrollo de los pinos. Tampoco fue posible el estudio completo de la interacción entre los HE y los pinos. Las leguminosas se adaptaron mejor a estas temperaturas elevadas. Por lo anterior, la supervivencia total al final del experimento fue de 42.57 % (Cuadro 5.2). Tres de los tratamientos tuvieron 57.14 % (4 plantas sobrevivientes de 7 iniciales) y un tratamiento 0 % de supervivencia. Al respecto, la leguminosa *Acacia saligna* es considerada una planta invasora de ecosistemas naturales, por su gran capacidad de adaptación a ambientes extremos; especialmente, temperaturas altas (Nsikani *et al.* 2019). Por lo contrario, los pinos de México se desarrollan en tres sistemas: sólo pinos, pino-encino y encino-pino; en todos los casos, temperaturas máximas por debajo de los 32°C (Challenger 1998).

El tratamiento que presentó mayor supervivencia de pinos fue Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria*, con 3 pinos sobrevivientes. Un pino del testigo; es decir, Acacia sin inocular y pinos sin inocular, fue el otro sobreviviente.

**Cuadro 2.2. Supervivencia de *P. greggii* bajo el dosel de *A. saligna*.**

| Tratamiento  | %<br>Supervivencia<br>de pinos | %<br>Supervivencia<br>de Acacias |
|--|--------------------------------|----------------------------------|
| Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo)                          | 14.28                          | 57.14                            |
| Acacia sin inocular - Pino inoculado con <i>Laccaria</i>                   | 42.85                          | 57.14                            |
| Acacia inoculada con <i>Lactarius</i> - Pino sin inocular                  | 0                              | 0                                |
| Acacia inoculada con <i>Lactarius</i> - Pino inoculado con <i>Laccaria</i> | 0                              | 57.14                            |

### **2.5.2 Altura y peso seco de la parte aérea de los pinos**

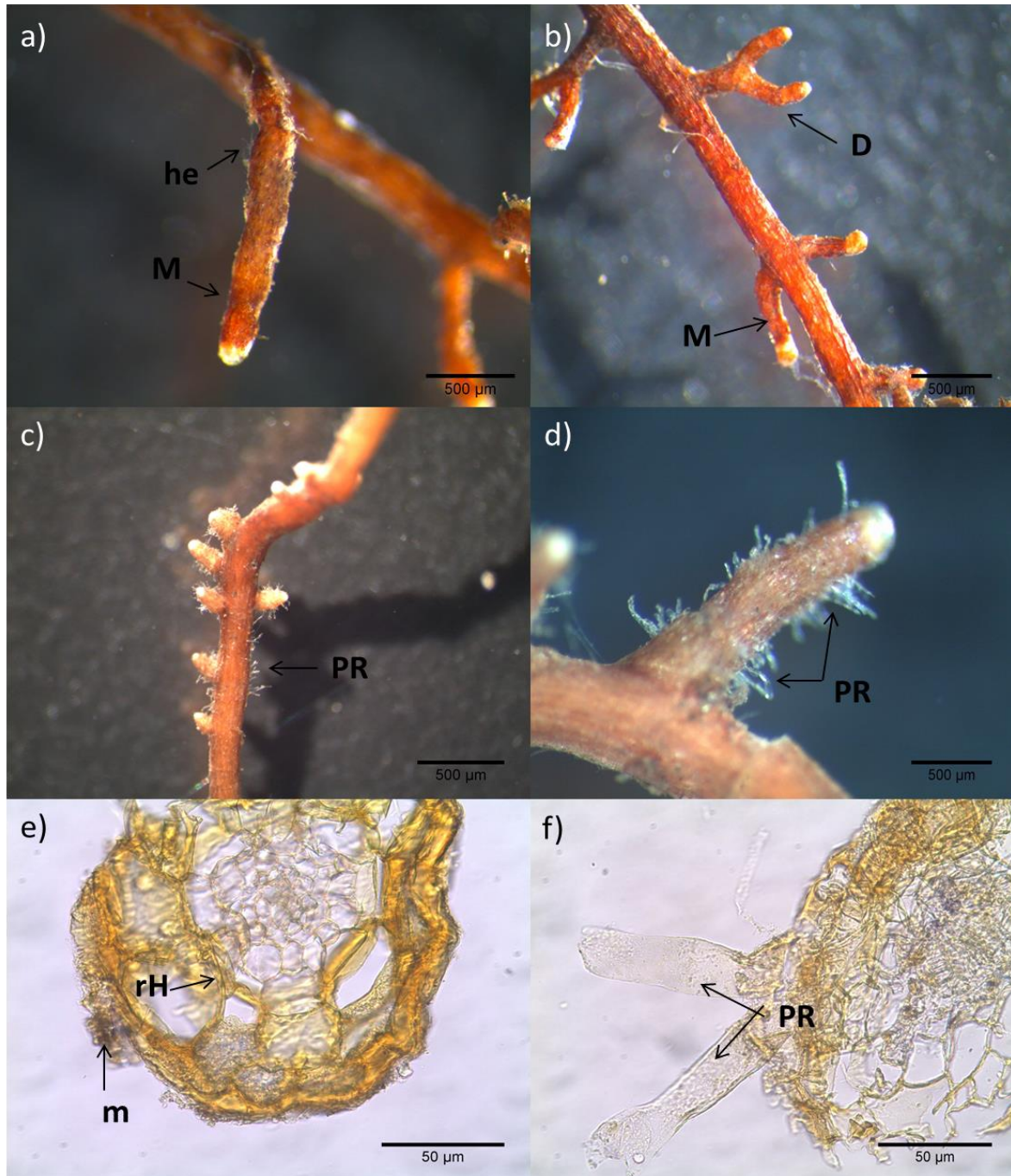
Los pinos del tratamiento Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria* presentaron un promedio de altura de 7.16 cm; mientras que la altura del pino sobreviviente del testigo fue de 6.1 cm. Además, el peso seco de la parte aérea y la raíz fue de 0.40 g y 0.52 g, en promedio para los pinos del tratamiento Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria*; en el testigo se presentó un peso de 0.13 g de la parte aérea y 0.28 g en la raíz.

### **2.5.3 Colonización ectomicorrízica de *Laccaria laccata* en *Pinus greggii***

La colonización de *L. laccata* en las raíces de los pinos del tratamiento Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria* presentó morfotipos monopodiales y dicotómicos según su ramificación, con una longitud de 2 a 3.5 mm. El orden del sistema de ramificación fue de 0-2; es decir, de una o dos ramificaciones a cada lado. Se determinó que la abundancia de micorrizas en la raíz fue abundante o densa y la forma de la terminación de la raíz ectomicorrizada fue directa o recta. Se encontraron hifas emanando de algunos de los morfotipos observados. Además, las terminaciones de los morfotipos fueron color marrón. Mientras que la red de Hartig penetró 2-3 capas de células corticales (Figura 2.5). Estas características coinciden con la descripción de dicho hongo ectomicorrízico en diversos estudios (Rentería-Chávez *et al.* 2017, Carrera-Nieva y López-Ríos 2004).



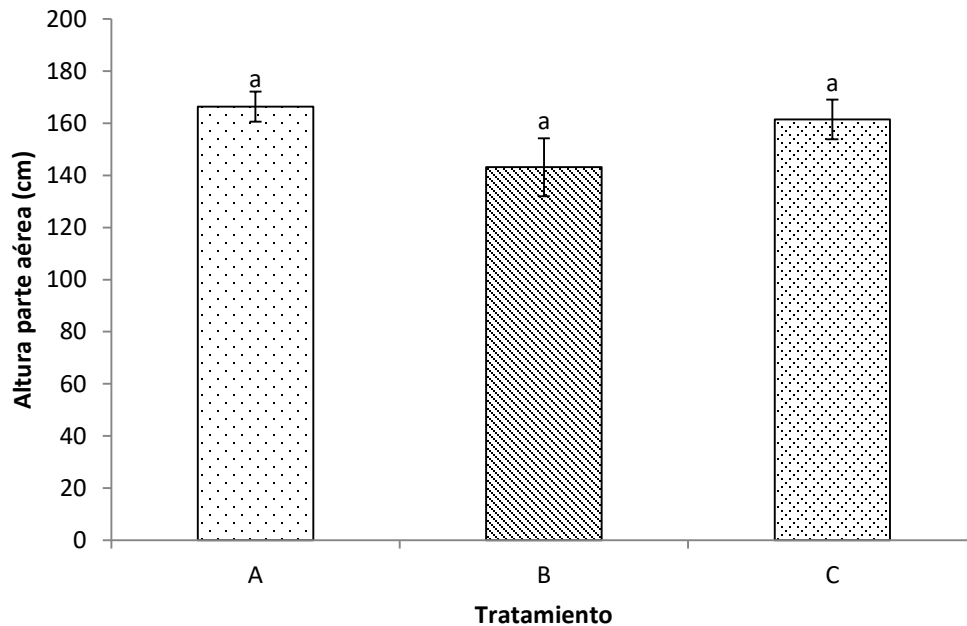
A seis meses del trasplante de los pinos bajo el dosel de *A. saligna*, los porcentajes de colonización ectomicorrízica por planta alcanzaron valores de hasta 91.27 %. De acuerdo con Méndez-Neri *et al.* (2011), una colonización mayor al 70 % es un indicador de que la especie de hongo inoculada se estableció extensivamente en las raíces de los pinos. Un estudio realizado por Rentería-Chávez *et al.* (2017) registró porcentajes de colonización de *L. laccata* en *P. greggii* de alrededor de 28 a 32 % a los 12 y 24 meses del trasplante. Datos considerablemente menores a los resultados de este estudio, tomando en cuenta que se presentaron condiciones de cultivo muy similares en ambos trabajos.



**Figura 2.5.** Aspectos generales de las raíces de *Pinus greggii* micorrizadas por *Laccaria laccata*, comparadas con las raíces no micorrizadas. a) Raíz colonizada con un morfotipo monopodial (M) donde se presentan hifas emanantes (he); b) Raíz colonizada con morfotipos monopodiales (M) y dicotómicos (D); c) y d) Raíces no colonizadas con presencia de pelos radicales (PR); e) Manto (m) y red de Hartig (rH) en una raíz colonizada; f) Corte transversal de una raíz no colonizada con pelos radicales (PR).

#### 2.5.4 Altura y peso seco de *Acacia saligna*

No existieron diferencias en la altura de las plantas al realizar la comparación de las medias entre tratamientos (Figuras 2.6 y 2.7). *Acacia* inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria* tuvo 166.38 cm, *Acacia* sin inocular - Pino sin inocular (testigo) tuvo 161.5 cm y *Acacia* sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria* tuvo 143.13 cm. Lo anterior indica que, debido a las condiciones ambientales adversas y/o a los microorganismos inoculados; no se observó un aumento en la altura de las leguminosas con respecto a las del testigo.



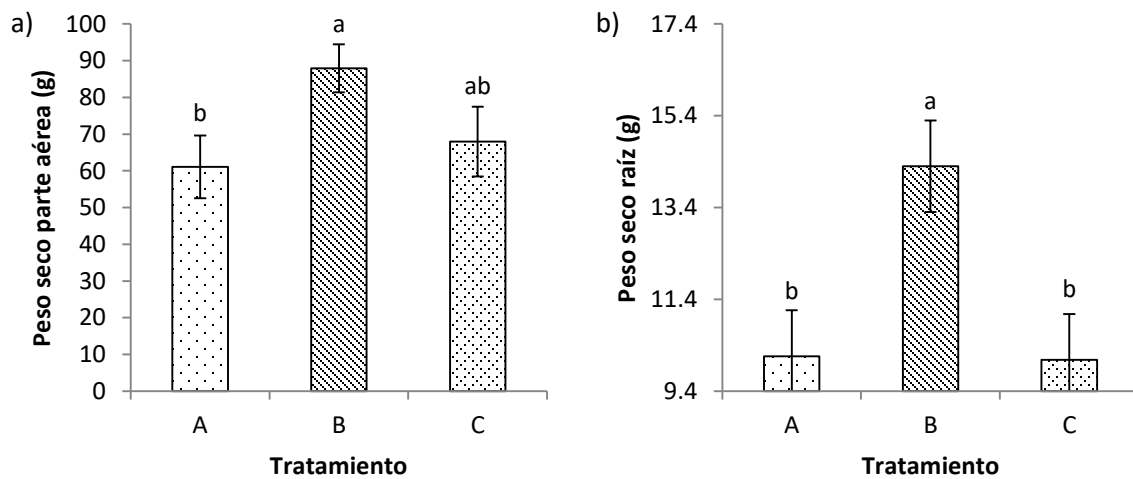
**Figura 2.6.** Altura de *Acacia saligna* cultivada junto a *Pinus greggii* bajo la influencia de diferentes microorganismos. A= *Acacia* inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria*; B= *Acacia* sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria*; C= *Acacia* sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0.05$ )  $n = 4$ .



**Figura 2.7. Crecimiento de *Acacia saligna* junto con *Pinus greggii* en distintos tratamientos.**

Sin embargo, en el peso seco de las plantas, de la parte aérea se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos Acacia inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria* y Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria* con 61.09 y 87.92 g, mientras que el tratamiento Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo) con 67.96 g, no presentó diferencias con ninguno de los anteriores (Figura 2.8a). Además, en el peso seco de la raíz (Figura 2.9), el tratamiento Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria* fue estadísticamente diferente de Acacia inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria* y

Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo), con 16.3, 10.16 y 10.08 g, respectivamente (Figura 2.8b). Esto indica que a pesar de no haber un efecto sobre la altura de las plantas, estas tuvieron mayor biomasa tanto radical como en la parte aérea al encontrarse compartiendo espacio con los pinos inoculados con *L. laccata*. Algunos estudios mencionan que los hongos ectomicorrízicos tienen efectos positivos en el desarrollo de leguminosas (Cope *et al.* 2019); por ejemplo Acacia spirorbis (Houles *et al.* 2018). Sin embargo, en este trabajo no se observó colonización de HE en las raíces de *A. saligna*, a pesar de que el tratamiento inoculado con *L. laccata* destaca en el peso seco de la raíz y parte aérea. Por lo tanto, se sugieren investigaciones futuras sobre este fenómeno.



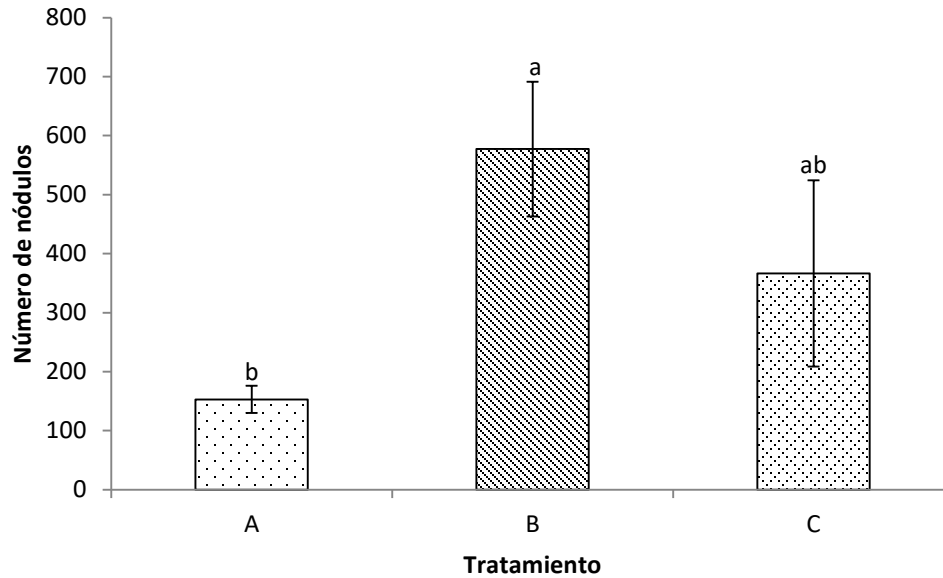
**Figura 2.8. Peso seco de *Acacia saligna* cultivada junto a *Pinus greggii* bajo la influencia de diferentes microorganismos. a) Parte aérea; b) Raíz. A= Acacia inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria*; B= Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria*; C= Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) n= 4.**



**Figura 2.9. Raíces de *Acacia saligna* pertenecientes a tres tratamientos.**

### **2.5.5 Nodulación de *Acacia saligna***

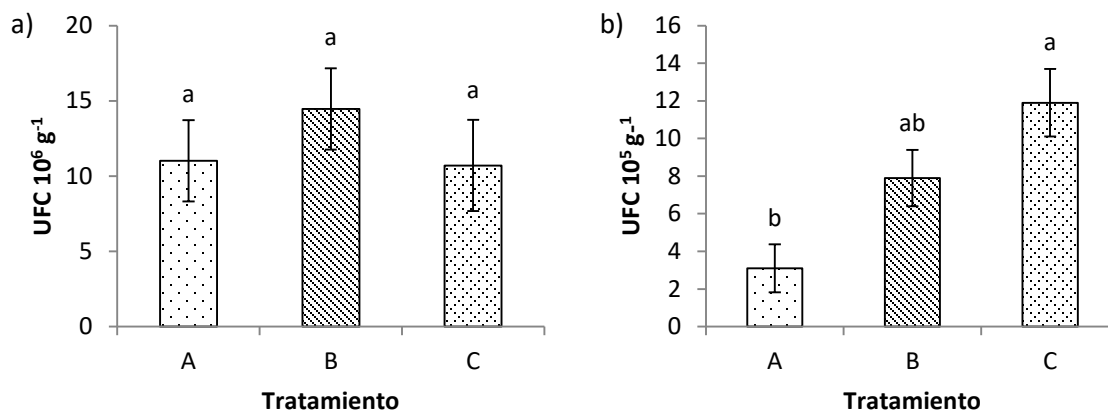
En la nodulación de las leguminosas, se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos Acacia inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria* y Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria*, con promedios de 153 y 577.2 nódulos planta<sup>-1</sup>; mientras que el tratamiento Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo) tuvo 366.5 nódulos y no mostró diferencias con los dos anteriores (Figura 2.10). Quintino *et al.* (2017) precisan que la nodulación de las leguminosas está relacionada con la colonización micorrízica arbuscular.



**Figura 2.10.** Nodulación de *Acacia saligna* cultivada junto a *Pinus greggii* bajo la influencia de diferentes microorganismos. A= Acacia inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria*; B= Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria*; C= Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) n= 4.

### 2.5.6 BFN y BSF en *Acacia saligna*

Las abundancias de UFC de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Figura 2.11a), mientras que la abundancia de UFC de las bacterias solubilizadoras de fosfatos presentaron mayor abundancia en el tratamiento testigo, Acacia sin inocular - Pino sin inocular (Figura 2.11b). Lo anterior indica que la adquisición de P puede estar cargada hacia la solubilización de fosfatos en los casos que no hay inoculación de hongos ectomicorrízicos.



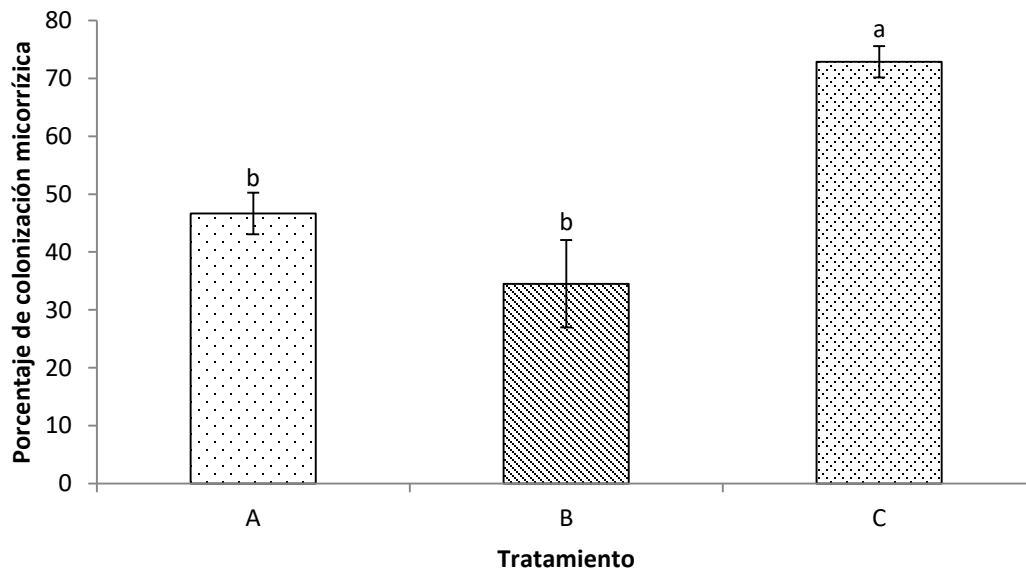
**Figura 2.11.** Tamaño de la población de a) bacterias fijadoras de nitrógeno y b) bacterias solubilizadoras de fosfatos, en la rizósfera de *Acacia saligna* cultivada junto a *Pinus greggii* bajo la influencia de diferentes microorganismos. A= Acacia inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria*; B= Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria*; C= Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ).

### 2.5.7 Colonización micorrízica arbuscular y número de esporas

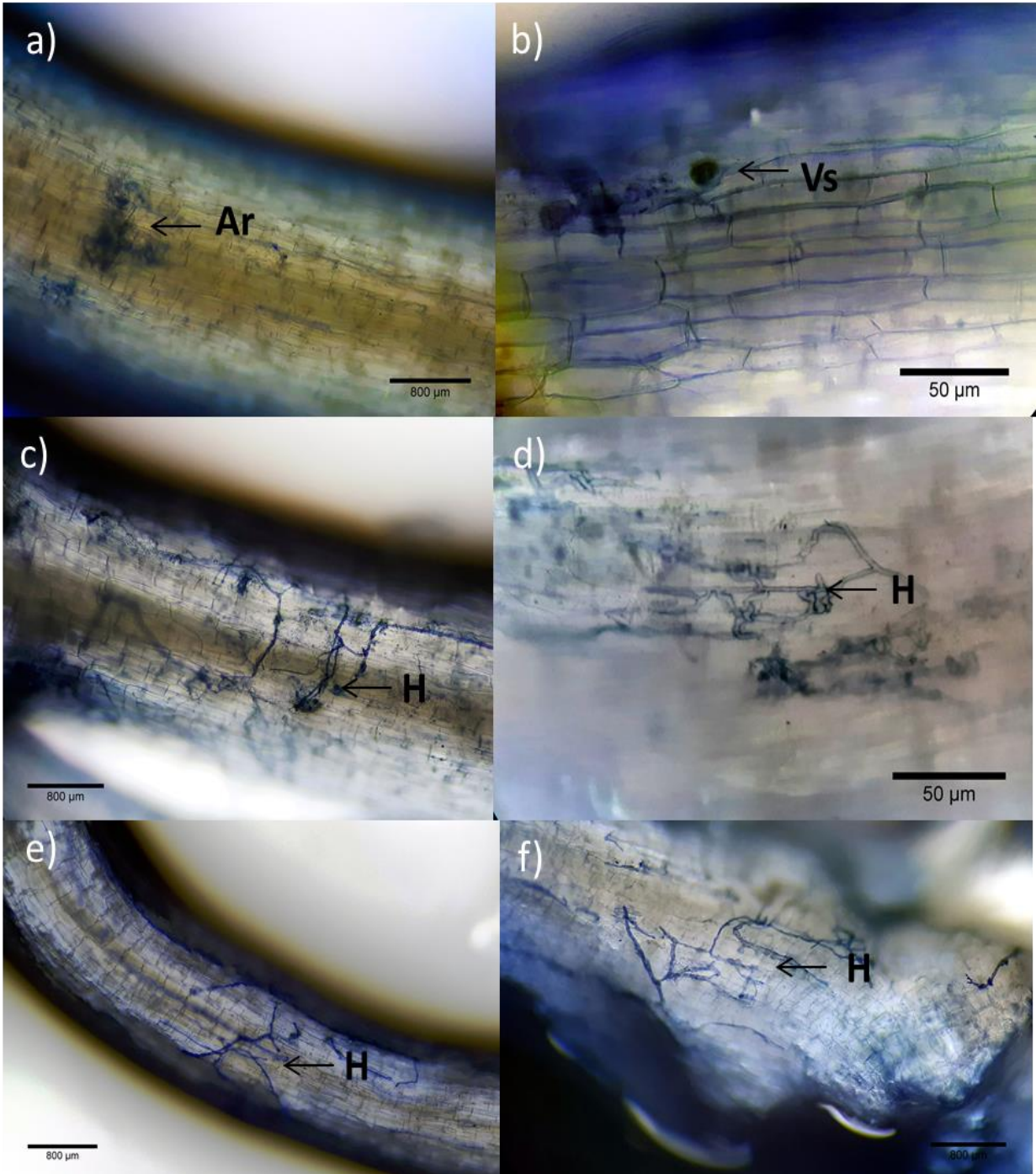
La Figura 2.12 muestra la colonización por HMA. Los tres tratamientos exhibieron raíces colonizadas por dichos hongos. El porcentaje de colonización fue estadísticamente mayor en el Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo), con 72.87 %. Los tratamientos Acacia inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria* y Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria* tuvieron 46.5 y 34.52 %, respectivamente. Aunado a esto, se encontraron  $10 \pm 1.22$  c,  $168.25 \pm 8.47$  b y  $238.5 \pm 16.74$  a esporas para los tratamientos Acacia inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria*, Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria* y Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo), respectivamente (figura 2.13). Lo anterior indica que, del mismo modo de lo ocurrido con las bacterias solubilizadoras de fosfatos, la adquisición de P puede estar mayoritariamente encargada a la simbiosis micorrízica arbuscular en los casos que no hay inoculación de hongos ectomicorrízicos. Viollet *et al.* (2017) y Frey-Klett *et al.* (2007) mencionan que en la interacción entre las rizobacterias y los hongos micorrízicos arbusculares, ambos microorganismos realizan actividades que aumentan la proliferación y actividad del otro;



fenómeno que se observa en el presente trabajo. Además, se conoce que la micorrizósfera formada a partir de la micorriza arbuscular, tiende a ser hábitat idóneo de bacterias solubilizadoras de fosfatos (Mahanta *et al.* 2018, Nepomuceno *et al.* 2019, Dar *et al.* 2018) y otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal, como las fijadoras de nitrógeno (Liang *et al.* 2016). De manera general, la acción conjunta de estos microorganismos mejora las condiciones físicas y químicas del suelo; y a su vez, estimulan el crecimiento de las plantas y disminuyen las afectaciones por patógenos (Priyadharsini y Muthukumar 2016).



**Figura 2.12.** Colonización micorrízica arbuscular en las raíces de *Acacia saligna* cultivada junto a *Pinus greggii* bajo la influencia de diferentes microorganismos. A= Acacia inoculada con *Lactarius* - Pino inoculado con *Laccaria*; B= Acacia sin inocular - Pino inoculado con *Laccaria*; C= Acacia sin inocular - Pino sin inocular (testigo). Promedios con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ).



**Figura 2.13.** Colonización micorrízica arbuscular en las raíces de *Acacia saligna*. a y b) Tratamiento Acacia inoculada con *Lactarius*-Pino inoculado con *Laccaria*, donde observan arbusculos (Ar) y Vesículas (Vs); c y d) Tratamiento Acacia sin inocular-Pino inoculado con *Laccaria*, donde se observan hifas (H); e y f) Tratamiento Acacia sin inocular-Pino sin inocular (Testigo), con presencia de hifas (H).

## 2.6 CONCLUSIONES

El hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* tiene la capacidad de colonizar de forma rápida y abundante las raíces de *Pinus greggii*. Los microorganismos rizosféricos no ejercen un efecto sobre la altura de *Acacia saligna*, pero sí en la biomasa seca (parte aérea y raíces). La nodulación de *A. saligna* puede estar relacionada con la colonización micorrízica arbuscular y la abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfatos. Se sugiere la elaboración de más estudios sobre la interacción de los microorganismos rizosféricos en conjunto con especies vegetales distintas, como el caso de *P. greggii* y *A. saligna*.

## 2.7 LITERATURA CITADA

- Abu-Muriefah SS. 2016. The use of *Acacia saligna* inoculated with mycorrhizae in phytoremediation of lead-contaminated soils in the Kingdom of Saudi Arabia [J]. *Global Journal of Agricultural Research* 4: 58-70.
- Carrera-Nieva A y GFLópez-Ríos. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie ciencias forestales y del ambiente* 10: 93-98.
- Challenger, A., 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Agrupación Sierra Madre A.C. México.
- Cope KR, A Bascaules, TB Irving, M Venkateshwaran, J Maeda, K Garcia E Steigerwald. 2019. The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* produces lipochitoooligosaccharides and uses the common symbiosis pathway to colonize *Populus* roots. *The Plant Cell* 31: 2386-2410.
- Dar ZM, A Masood, M Asif and MA Malik. 2018. Response of Onion to Inoculation with Vesicular Arbuscular Mycorrhiza and Phosphorus Solubilizing Bacteria under Varying Levels of Phosphorus. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7: 1-12.
- Ferrera C, M González y M Rodríguez. 1993. Manual de Agromicrobiología. México. Trillas. pp. 11-22.
- Frey-Klett P, J Garbaye y M Tarkka. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22-36.
- García-Cárdenas M, R Miranda-Casas y H Fajardo-Durán. 2013. Manual de manejo de la fertilidad del suelo bajo riego deficitario para el cultivo de la quinua en el altiplano boliviano. La Paz, Bolivia. UNESCO. 108 p.
- Houles A, B Vincent, M David, M Ducouso, A Galiana, F Juillot and P Jourand. 2018. Ectomycorrhizal communities associated with the legume *Acacia spirorbis* growing on contrasted edaphic constraints in New Caledonia. *Microbial Ecology* 76: 964-975.
- Kjeldahl J. 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschrift für Analytische Chemie* 1883: 22-366.
- Liang Y, F Pan F, X He, X Chen and Y Su. 2016. Effect of vegetation types on soil arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacterial communities in a karst region. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 18482-18491.
- Mahanta D, RK Rai, S Dhar, E Varghese, A Raja and TJ Purakayastha. 2018. Modification of root properties with phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhiza to reduce rock phosphate application in soybean-wheat cropping system. *Ecological Engineering* 111: 31-43.
- Martínez-Reyes M, J Pérez-Moreno, L Villarreal-Ruiz, R Ferrera-Cerrato, B Xoconostle-Cázares, JJ Vargas-Hernández y M Honrubia-García. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de

- Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente* 18: 183-192.
- Méndez-Neri M, J Pérez-Moreno, R Quintero-Lizaola, E Hernández-Acosta y A Lara-Herrera. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana* 29: 73-81.
- Nepomuceno RA, CMB Brown, PN Mojica and MB Brown. 2019. Biological Control Potential of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Root Inoculant (VAMRI) and associated phosphate solubilizing bacteria, *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* against soilborne phytopathogens of Onion (*Allium cepa* L. var. Red Creole). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 52: 714-732.
- Nopparat C, M Jatupornpipat and A Rittiboon. 2009. Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Kasetsart Journal - Natural Science* 43: 172-181.
- Nsikani, M.M., M. Gaertner, S.Kritzinger-Klopper, N.P.Ngubanec y K.J.Esler. 2019. Secondary invasion after clearing invasive *Acacia saligna* in the South African fynbos. *South African Journal of Botany* 125: 280-289.
- Olsen SR and Watanabe. 1970. Difusive supply of phosphorus in relation to soil textural variations. *Soil Science* 110: 318-327.
- Priyadharsini P y T Muthukumar. 2016. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and potassium-solubilizing microorganisms on agricultural productivity. *In Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* 1: 111-125.
- Rennie RJ. 1981. A single medium for the isolation of acetylenereducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology* 27: 8-14.
- Rentería-Chávez MC, J Pérez-Moreno, VM Cetina-Alcalá, R Ferrera-Cerrato y B Xoconostle-Cázares. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología* 49: 93-104.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis. Diario oficial de la Federación 85-85.
- Viollet A, B Pivato, C Mougél, JC Cleyet-Marel, C Gubry-Rangin, P Lemanceau y S Mazurier. 2017. *Pseudomonas fluorescens* C7R12 type III secretion system impacts mycorrhization of *Medicago truncatula* and associated microbial communities. *Mycorrhiza* 27: 23-33.
- Walkley A and IA Black. 1934. An examination of Degtjareft method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science* 37: 29-38.
- Weil RR and NC Brady. 2016. The nature and properties of soils. Edinburgh, England. 1086 p.

Wood AR 2017. Fungi and invasions in South Africa. *Bothalia-African Biodiversity & Conservation* 47: 1-16.

## CONCLUSIONES GENERALES

- El hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* inoculado en *Pinus greggii* mejoró las condiciones edáficas que permitieron el aumento de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos; además, esta interacción tuvo efectos positivos sobre la actividad metabólica microbiana, con respecto al testigo. Lo anterior, benefició el crecimiento de *P. greggii*.
- No se observaron efectos en la interacción de *Acacia saligna* y *Pinus greggii*, bajo la influencia de los hongos ectomicorrízicos (*Laccaria laccata* y *Lactarius indigo*). No obstante, se encontraron beneficios por la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y aumento en la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfatos.

## ANEXOS

### a. Medios de cultivo y soluciones

---

#### Extracto de Levadura Manitol Agar Rojo Congo (ELMARC) (Ferrera 1993)

---

| <b>Reactivo</b>                      | <b>Cantidad</b> |
|--------------------------------------|-----------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 1 g             |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0.2 g           |
| NaCl                                 | 0.18 g          |
| Manitol                              | 9 g             |
| Extracto de levadura                 | 1.5 g           |
| Rojo Congo 1:400                     | 10 mL           |
| Agar                                 | 16 g            |
| Agua destilada                       | 1 L             |

Ajustar pH a 6.5

---

---

#### Caldo Extracto de Levadura Manitol (CELM) (Ferrera 1993)

---

| <b>Reactivo</b>                      | <b>Cantidad</b> |
|--------------------------------------|-----------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 1 g             |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0.2 g           |
| NaCl                                 | 0.18 g          |
| Manitol                              | 9 g             |
| Extracto de levadura                 | 1.5 g           |
| Agua destilada                       | 1 L             |

Ajustar pH a 6.5

---



---

**Glucosa Peptona Agar (Ferrera 1993)**

---

| <b>Reactivo</b>        | <b>Cantidad</b> |
|------------------------|-----------------|
| Glucosa                | 10 g            |
| Peptona                | 5 g             |
| Púrpura de bromocresol | 0.1% 10 mL      |
| Agar                   | 16 g ADECUADO   |
| Agua destilada         | 1000 mL         |

Ajustar pH a 7

---

---

**Agar nutritivo**

---

| <b>Reactivo</b> | <b>Cantidad</b> |
|-----------------|-----------------|
| Agar nutritivo  | 15 g            |
| Agua destilada  | 1 L             |

Ajustar pH a 6.5

---

---

**KOH (10 %)**

---

| <b>Reactivo</b> | <b>Cantidad</b> |
|-----------------|-----------------|
| KOH             | 114.9 g         |
| Agua corriente  | 1 L             |

---

---

**MELZER**

---

| <b>Reactivo</b>   | <b>Porcentaje</b> |
|-------------------|-------------------|
| Yoduro de potasio | 3.75 %            |
| Yodo              | 1.25 %            |
| Agua              | 25 %              |
| Hidrato de coral  | 25 %              |

---

---

**alcohol polivinílico-glicerol (PVLG)**

---

---

| <b>Reactivo</b>            | <b>Cantidad</b> |
|----------------------------|-----------------|
| Ácido láctico              | 100 mL          |
| Glicerol                   | 10 mL           |
| Alcohol polivinílico (PVA) | 16.6 g          |
| Agua destilada             | 100 mL          |

---