



Acta Botanica
Mexicana

Coinoculación de *Pinus montezumae* (Pinaceae) con un hongo comestible ectomicorrízico y bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Coinoculation of *Pinus montezumae* (Pinaceae) with an edible ectomycorrhizal fungus and plant growth promoting bacteria

José Luis Barragán-Soriano¹, Jesús Pérez-Moreno^{1,4}, Juan José Almaraz-Suárez¹,

Moisés Graciano Carcaño-Montiel², Julián Delgadillo-Martínez¹, Víctor Manuel Cetina-Alcalá¹, Gerardo Mata³

Resumen:

Antecedentes y Objetivos: Las coníferas, como los pinos, establecen en sus raíces simbiosis obligadas con hongos ectomicorrízicos y con determinados grupos de bacterias. México posee una alta diversidad de especies del género *Pinus*, que en este país está representado por 72 taxa. Sin embargo, actualmente son escasas las investigaciones relacionadas con la coinoculación de pinos mexicanos con hongos ectomicorrízicos y bacterias benéficas. En este trabajo se evaluó el efecto de la coinoculación, con un hongo comestible ectomicorrízico y tres cepas bacterianas, en términos de variables de crecimiento, fisiológicas y nutrimentales en plantas de *Pinus montezumae*.

Métodos: Se inocularon y coinocularon plantas de *P. montezumae* con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata*, y con tres cepas bacterianas, una de *Cohnella* sp., y dos de *Azospirillum brasilense* (una con capacidad de fijar nitrógeno y la otra con capacidad de solubilizar fosfatos). Esta investigación duró 520 días y se realizó en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

Resultados clave: La inoculación con el hongo ectomicorrízico produjo incrementos en términos de peso seco de hasta 7.8 veces y tasas fotosintéticas hasta 30 veces mayores comparadas con las plantas sin inocular. Adicionalmente se registró un efecto sinérgico en términos del crecimiento de parte aérea y total, diámetro del tallo, tasa fotosintética, contenido de clorofilas totales y carotenos, así como contenido de nitrógeno y potasio de las plantas micorrizadas coinoculadas con el hongo ectomicorrízico y la bacteria *A. brasilense* fijadora de nitrógeno.

Conclusiones: Este trabajo demuestra la importancia de la coinoculación de un hongo ectomicorrízico comestible y la bacteria *A. brasilense*, en el mejoramiento del crecimiento, fisiología y contenido nutrimental de *P. montezumae*, una especie de pino de gran importancia forestal en México.

Palabras clave: bacterias, biotecnología, hongos comestibles ectomicorrízicos, pinos, simbiosis ectomicorrízica.

Abstract:

Background and Aims: Conifers, such as pines, establish obligate symbioses with ectomycorrhizal fungi and specialized bacteria in their roots. Mexico has a high diversity of species of the genus *Pinus*, represented by 72 taxa in this country. However, currently the research related to the coinoculation of Mexican pines with ectomycorrhizal fungi and beneficial bacteria has received little attention. In this work, the effect of coinoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and three bacterial strains was evaluated in terms of growth, physiological and nutritional variables in plants of *Pinus montezumae*.

Methods: *Pinus montezumae* plants were inoculated and coinoculated with the edible ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*, and with three identified bacterial strains: one as *Cohnella* sp., and two as *Azospirillum brasilense* (one able to fix nitrogen and the other one able to solubilize phosphates). This research lasted 520 days and was carried out in a greenhouse of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Mexico State, Mexico.

Key results: Inoculation with the ectomycorrhizal fungus led to an increase in terms of dry weight of up to 7.8 times and photosynthetic rate up to 30 times higher compared with plants without any inoculation. Additionally, a synergistic effect was recorded in terms of shoot and total growth, stem diameter, photosynthetic rate, total chlorophyll and carotene content, as well as nitrogen and potassium content of the mycorrhized plants coinoculated with the ectomycorrhizal fungus and the bacterium *A. brasilense* able to fix nitrogen.

Conclusions: This work demonstrates the importance of the coinoculation of an edible ectomycorrhizal fungus and the bacterium *A. brasilense*, in terms of growth, physiology and nutritional content enhancement of *P. montezumae*, a pine species of great forest importance in Mexico.

Key words: bacteria, biotechnology, ectomycorrhizal symbiosis, edible ectomycorrhizal fungi, pines.

¹Colegio de Postgraduados, km 36.5 carretera México- Texcoco, Campus Montecillo, 56230 Texcoco, Estado de México, México.

²Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Laboratorio de Microbiología de Suelos, Edificio 103 J, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, México.

³Instituto de Ecología, Red de Manejo Biotecnológico de Recursos, Carretera Antigua a Coatepec km 351, 91070 Xalapa-Enríquez, Veracruz, México.

⁴Autor para la correspondencia: jperezm@colpos.mx

Recibido: 10 de febrero de 2022.

Revisado: 15 de marzo de 2022.

Aceptado por Marie-Stéphanie Samain: 11 de mayo de 2022.

Publicado Primero en línea: 31 de mayo de 2022.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 129(2022).



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

Citar como: Barragán-Soriano, J. L., J. Pérez-Moreno, J. J. Almaraz-Suárez, M. G. Carcaño-Montiel, J. Delgadillo-Martínez, V. M. Cetina-Alcalá y G. Mata. 2022. Coinoculación de *Pinus montezumae* (Pinaceae) con un hongo comestible ectomicorrízico y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Acta Botanica Mexicana 129: e2024. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2024>

e-ISSN: 2448-7589

Introducción

Las áreas boscosas representan una fuente de alimento, medicina y combustible; además, intervienen en la mitigación del cambio climático, protegen los suelos y el agua, y albergan tres cuartas partes de la biodiversidad terrestre mundial (FAO, 2018). Actualmente estos ecosistemas se encuentran amenazados por la intensa deforestación; se estima que tan solo en 2013 se perdieron 2.3 millones de km² de bosque a nivel mundial (Hansen et al., 2013). En México, de 2005 a 2010 se perdieron 775,000 ha⁻¹ de bosques y selvas (FAO, 2010). A pesar de esto, el país posee una superficie arbolada de 64.8 millones de hectáreas; de estas, 52% se ubican en áreas templadas donde predominan especies de pinos (López-Hernández et al., 2017). Sin embargo, se estima que a nivel global la deforestación incrementó entre 10 y 20% los gases de efecto invernadero, afectando de forma negativa al planeta (Pacheco et al., 2012; Monjardín et al., 2017).

En México, las especies del género *Pinus* L. se encuentran ampliamente distribuidas y tienen una enorme importancia ecológica, sociocultural y económica, dado que poseen un alto valor como fuente de leña, pulpa, resina, semillas y madera (Aceves-Rangel et al., 2018). De hecho, son las especies comerciales maderables más utilizadas en el país (Aguilera-Rodríguez et al., 2016). Por ejemplo, de 1993 a 2017 constituyeron 90 y 95% del volumen total aprovechado de la producción forestal de los estados de Durango y Chihuahua, respectivamente (CONAFOR, 2020a, b; Barrera et al., 2021). México, con 72 taxa de *Pinus* registrados, constituye el segundo centro de diversificación de pinos en el mundo (Perry, 1991). Dentro de ellos destaca *Pinus montezumae* Lamb., el cual posee una amplia distribución geográfica, resistencia a sequía e incendios (Aceves-Rangel et al., 2018), y es la segunda especie más utilizada en los programas de reforestación y restauración de suelos degradados en los bosques templados mexicanos (Manzanilla-Quiñones et al., 2019).

Las raíces de algunas plantas, entre las que se encuentran los pinos, requieren del establecimiento de asociaciones con hongos mutualistas conocidos como ectomicorrízicos (Horton et al., 1998; Pérez-Moreno y Read, 2004), para poder sobrevivir. En la simbiosis ectomicorrízica, el componente fúngico es denominado micobionte y el com-

ponente vegetal, fitobionte. Actualmente se estima que existen de 20,000 a 25,000 especies de micobiontes, principalmente pertenecientes a las divisiones Basidiomycota y Ascomycota, que forman simbiosis ectomicorrízicas con alrededor de 6000 fitobiontes que incluyen angiospermas y gimnospermas (Tedersoo et al., 2010; Comandini et al., 2012). En esta interacción mutualista, el micelio de los hongos penetra los espacios intersticiales de las células corticales de las raíces formando lo que se conoce como red de Hartig (Petersen et al., 2004). En la parte externa de la raíz forma una capa de hifas conocida como manto fúngico y de ahí surge una red micelial externa. Esta red, debido a su tamaño y gran extensión, es capaz de explorar enormes espacios de suelo desde donde los hongos ectomicorrízicos transfieren nutrimentos y agua a sus plantas simbiotes asociadas (Pérez-Moreno y Read, 2004). Adicionalmente las plantas ectomicorrizadas tienen, mediante sus hongos simbiotes, acceso a fuentes orgánicas de nutrimentos inaccesibles para las raíces, a través de la producción de enzimas extracelulares y ácidos orgánicos (Read y Pérez-Moreno, 2003). A cambio, los hongos ectomicorrízicos reciben fuentes carbonadas producidas mediante la fotosíntesis de sus plantas huésped (Leake et al., 2004).

Además de una nutrición mejorada, los hongos ectomicorrízicos proporcionan a sus fitobiontes beneficios adicionales que incluyen la protección contra patógenos y factores estresantes ambientales como sequía, baja fertilidad del suelo, incremento de temperatura y presencia de metales pesados o pesticidas (Smith y Read, 2008; Tedersoo, 2017). Por esa razón, las plantas ectomicorrizadas han demostrado un mayor crecimiento y eficiencia cuando son trasplantadas de vivero a campo, y su producción en vivero constituye una estrategia obligada tanto para minimizar el estrés originado por dicho trasplante como para incrementar su supervivencia y crecimiento durante los primeros años, la cual es la fase más crítica de adaptación (Sebastiana et al., 2020). Los hongos ectomicorrízicos inoculados originan efectos benéficos diferenciales en sus plantas simbiotes asociadas. Debido a esto se requiere de un proceso de selección de micobiontes. Adicional a los efectos benéficos en términos de crecimiento y transferencia nutrimental de los árboles hospederos, la comestibilidad de los micobiontes utilizados en la inocu-



lación ectomicorrízica es uno de los criterios de selección antropocéntrica que ha cobrado enorme interés, dado que estos constituyen un recurso forestal no maderable de importancia económica, alimenticia y social, aprovechable en ambientes forestales (Sousa et al., 2015; Pérez-Moreno et al., 2021a, b).

En adición a los efectos benéficos originados por los hongos ectomicorrízicos comestibles en la producción en vivero, más recientemente se ha comprobado que existe un grupo de bacterias, la mayoría incluidas en las denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), que promueven directamente la micorrización o afectan positivamente el funcionamiento de la simbiosis ectomicorrízica a través de mecanismos tales como movilización nutrimental incrementada, mayor crecimiento, fijación de nitrógeno (N) y protección contra patógenos, por lo que se les ha denominado específicamente bacterias auxiliaadoras de las micorrizas (MHB, por sus siglas en inglés) (Frey-Klett et al., 2007; Santoyo et al., 2021). Con el advenimiento de las ciencias genómicas, la comprensión de la relevancia de este grupo de bacterias ha sido documentada con mayor profundidad (p. ej., Tarkka et al., 2015; Deveau y Labbé, 2016; Gupta y Chakraborty, 2020; Fitriatin et al., 2021). Dentro de los efectos benéficos registrados por las bacterias auxiliaadoras, incluyendo especies de *Bacillus* Cohn, *Mesorhizobium* Jarvis, Van Berkum, Chen, Nour, Fernandez, Cleyet-Marel & Gillis y *Pseudomonas* Migula, están la germinación estimulada de esporas, estimulación del crecimiento vegetal y translocación nutrimental, incremento de tolerancia al estrés, mayor ramificación del micelio o incremento de la micorrización (Marupakula et al., 2017; Reis et al., 2021).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inoculación con el hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, exclusivamente, y la coinoculación simultánea con dicho hongo y con una de tres cepas bacterianas, una de *Cohnella* sp., y dos de *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner (una de ellas fijadora de nitrógeno y la otra solubilizadora de fosfatos), en el crecimiento, fisiología y contenido nutrimental de *Pinus montezumae*, una especie de gran importancia forestal en México. La hipótesis nula de la investigación fue que ninguna de las bacterias evaluadas originaría efectos benéficos en térmi-

nos de crecimiento y nutrición de la planta hospedera *P. montezumae*, cuando fueran coinoculadas con el hongo ectomicorrízico.

Materiales y Métodos

Material biológico

Las semillas de *Pinus montezumae* utilizadas, provenían de Piedra Canteada, municipio Nanacamilpa, Tlaxcala, México. Los basidiomas del hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* empleados para la obtención de inóculo provinieron de un bosque de pino del municipio Ozumba, Estado de México, México. Se utilizaron tres cepas bacterianas, una cepa de *Cohnella* sp. proporcionada por el Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados y aislada de la rizosfera de *P. montezumae*, con capacidad para producir ácido indolacético y solubilizar fosfatos, y dos cepas de *Azospirillum brasilense*, proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, una con capacidad de fijar N y otra con capacidad de solubilizar fosfatos. Las cepas fueron identificadas molecularmente en dichos laboratorios mediante secuenciación de ADNr 16S. La evaluación de las capacidades de producir ácido indolacético, solubilizar fosfatos y fijar N de las cepas utilizadas en este estudio ha sido previamente descrita en detalle (Carcaño Montiel et al., 2006; López-Reyes et al., 2017; Heredia-Acuña et al., 2018).

Diseño experimental y análisis estadísticos

El experimento se diseñó en bloques al azar con tratamientos: A) plantas sin inocular y B) plantas inoculadas con 1) *L. laccata* (L), 2) *Cohnella* sp.(C), 3) *A. brasilense* (FN), 4) *A. brasilense* (SF), 5) L+C, 6) L+FN y 7) L+SF. Cada tratamiento con siete réplicas, por lo que en total se tuvieron 56 unidades experimentales, cada una constituida por una planta. Los datos de las variables evaluadas se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) con el paquete estadístico Statistical Analysis System v. 9.00 (SAS, 2004). Los valores de colonización micorrízica, expresados como porcentajes, se transformaron y se utilizó el logaritmo natural en los análisis de varianza.

Montaje del experimento

Se desinfectaron las semillas con H_2O_2 al 30% durante 20 minutos. Se obtuvo el inóculo de hongo ectomicorrízico a partir de píleos de *L. laccata*, los cuales se deshidrataron a 35 °C (deshidratador tipo charola Jersa, Cd. Mx., México). Posteriormente, los píleos se molieron en un molino eléctrico (Thomas Scientific, Modelo 4 Wiley Mill, Swedesboro, Nueva Jersey, EUA), a través de un tamiz de 1 mm de apertura, para obtener un tamaño de partícula homogéneo. El inóculo ectomicorrízico así obtenido se almacenó a 5 °C hasta su utilización. Las cepas bacterianas se cultivaron individualmente en caldo nutritivo Merck y se mantuvieron en movimiento constante a 28 °C hasta alcanzar una concentración de 10^8 UFC·ml⁻¹. El cultivo bacteriano se centrifugó en una centrífuga (Sigma, Modelo 2-16KL, Osterode am Harz, Alemania) a 7000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El concentrado se lavó con agua destilada estéril para eliminar los restos del medio de cultivo y se resuspendió en agua destilada estéril para dejarlo a la misma concentración de 10^8 UFC·ml⁻¹. Diez días después de la segunda inoculación con el hongo ectomicorrízico, se efectuó una sola aplicación de 3 ml de la suspensión bacteriana a cada planta en las primeras horas del día.

Posteriormente, el experimento se mantuvo durante 420 días en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, estado de México, México, cerrado sin filtración de aire, control de temperatura ni fertilización adicional. Durante la duración del experimento se regaron las plantas cada tercer día con agua destilada estéril. Las condiciones ambientales durante el transcurso del experimento fueron temperatura media anual 20 °C (9 y 31 °C, mínima y máxima, respectivamente), humedad media anual 47% (23 y 81% mínima y máxima, respectivamente) y fotoperiodo promedio anual de 11.9 h (10.9 y 13.1 h, mínimo y máximo, respectivamente).

El sustrato utilizado consistió en una mezcla de arena, corteza y suelo forestal en una proporción 2:2:1, el cual se esterilizó en tres ocasiones con vapor de agua a una presión de 1.3 kg·cm⁻² a 125 °C durante 5 h. Las semillas se sembraron en tubetes de plástico negro de 125 cm³ que contenían el sustrato descrito. Se sembraron tres semillas por tubete forestal para asegurar tener al menos una

planta por tubete y 30 días después de la siembra en los tubetes, en los cuales germinó más de una semilla, se dejó solo una planta por tubete. Cada planta se inoculó con una concentración de 10^7 a 10^8 esporas de *L. laccata* determinada con un hematocitómetro (Paul Marienfeld GmbH & Co., Königshofen, Alemania). Se realizaron dos inoculaciones esporales del hongo: la primera simultáneamente con la siembra de las semillas y la segunda 90 días después de la siembra.

Diámetro y peso seco

Se midió el diámetro del tallo con un vernier digital (Truper, 14388 6 PuLG 15002100, Jilotepec, México) a los 30, 120 y 420 días después de la inoculación bacteriana (ddib) en todas las unidades experimentales. Se pesó la biomasa en siete plantas por tratamiento, seleccionadas al azar, para determinar el peso seco de la raíz, parte aérea y total, deshidratando cada componente por separado, durante tres días a 70 °C hasta lograr peso constante.

Tasa fotosintética

La tasa fotosintética se evaluó 180, 240, 300 y 360 ddib con un analizador de gases infrarrojo (IRGA, PP-Systems, modelo Ciras-3, Amesbury, EUA) y una cámara de asimilación de gases (PPSystems, accesorio original de Ciras-3 CPY-4, Amesbury, EUA) en el mismo invernadero donde se mantuvo el experimento (Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, estado de México, México). La razón por la cual no se efectuó una evaluación al final del experimento fue por limitantes prácticas relacionadas con las condiciones climatológicas. El contenido de clorofila *a*, *b*, total y carotenos se determinó 420 ddib por el método de acetona (Zhang, 1986), y la concentración de clorofilas y carotenos se obtuvo mediante las ecuaciones de Lichtenthaler (1987).

Análisis nutrimental

Los nutrimentos se analizaron con los siguientes métodos: el nitrógeno (N) se determinó por el método de semimicro-Kjeldahl (Bremner, 1965); el fósforo total (P), según Allen et al. (1997) y el potasio (K), calcio (Ca) y Manganese (Mn) mediante extracción con acetato de amonio por fotometría de llama en un fotómetro de llama



ma (A.KRÜSS Optronic, FP8800, Hamburgo, Alemania). La colonización micorrízica se evaluó mediante las técnicas propuestas por Agerer (1994) y Martínez-Reyes et al. (2012). Se identificaron con técnicas de microfotografía las estructuras características de la ectomicorriza, como el manto, red de Hartig y micelio externo, en un microscopio óptico (Leica, DM1000, Morrisville, North Carolina, EUA) y uno estereoscópico (Leica, S8APO, Morrisville, EUA). La persistencia del hongo ectomicorrízico *L. laccata* se comprobó mediante caracterización morfoanatómica de los morfotipos encontrados al final del experimento, característicos que forma este hongo en las raíces micorrizadas. Adicionalmente, se efectuó un re-aislamiento de las bacterias inoculadas en los tratamientos donde ha-

bían sido inoculadas y se comprobó su presencia utilizando los mismos métodos moleculares utilizados durante su inoculación.

Resultados

Crecimiento de plantas

Se registró un incremento en el diámetro del tallo de las plantas de *P. montezumae* coinoculadas con el hongo ectomicorrízico comestible *L. laccata* y la bacteria *Azospirillum brasilense* (L+FN) en comparación con las que no se inocularon, o con las inoculadas exclusivamente con el *L. laccata* (Tukey $p \leq 0.05$). Estos resultados fueron más evidentes a partir de los 120 días de la inoculación bacteriana (Fig. 1). En contraste, las plantas inoculadas exclusi-

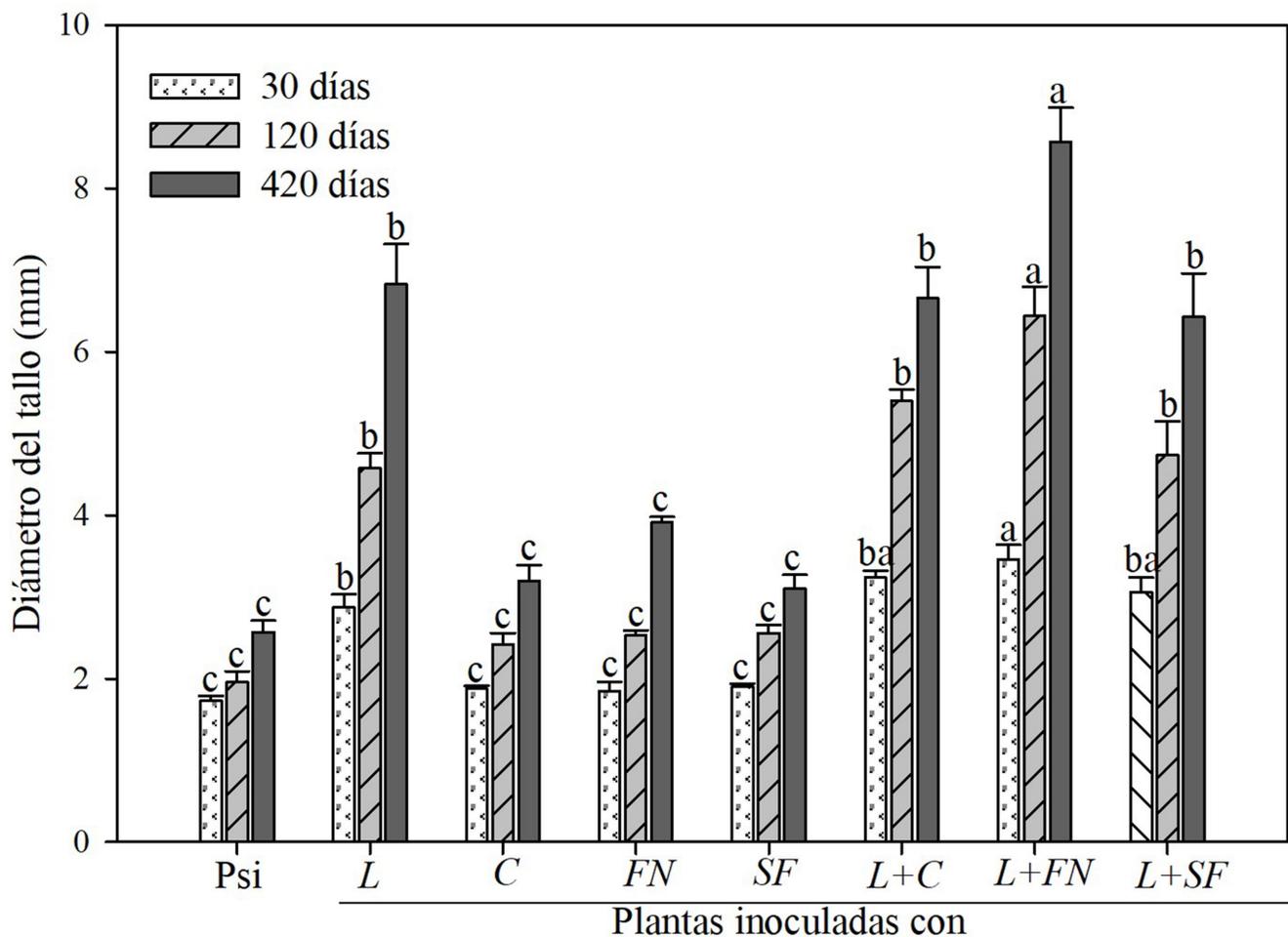


Figura 1: Diámetro de plantas *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas o coinoculadas con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke=(L), la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp.=(C) y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner, fijadora de nitrógeno=(FN) y *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner, solubilizadora de fosfatos=(SF). Psi=Plantas sin inocular. Los datos son medias \pm error estándar de la media, $n=7$. Los valores en la misma columna con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

vamente con cualquiera de las tres bacterias, C, FN y SF, no presentaron diferencias significativas en comparación con aquellas sin inocular (Tukey $p \leq 0.05$), durante los tres periodos evaluados (Fig. 1). Adicionalmente, existió un incremento (Tukey $p \leq 0.05$) del peso seco total, de raíz y parte aérea en plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico *L. laccata* y en las coinoculadas con cualquiera de las tres bacterias L+C, L+FN y L+SF, en comparación con las plantas sin inocular. Los mayores incrementos en la parte radical se presentaron en las plantas coinoculadas con L+FN, con un incremento significativo de 7.68 veces más que las plantas sin inocular. El peso seco de las plantas inoculadas exclusivamente con las bacterias no presentó diferencias significativas comparadas con las no inoculadas (Tukey $p \leq 0.05$). Se observó un incremento y por lo tanto un efecto sinérgico, en términos de peso seco de parte aérea y total y diámetro del tallo, cuando se coinoculó con el hongo ectomicorrízico y la bacteria FN (Cuadro 1, Fig. 1, 2A).

Tasa fotosintética

Después de 180 días de la inoculación bacteriana se registraron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$) entre tratamientos en términos de la tasa fotosintética. Trescientos sesenta días después de la inoculación bacteriana hubo tendencias claras. Cuando se inoculó exclusivamente con el hongo ectomicorrízico o se coinoculó con cualquiera de las tres bacterias evaluadas (L+C, o L+SF), la tasa fotosintética

fue mayor que en las plantas no inoculadas. Se registraron valores 12.9, 12.9 y 14.5 veces más elevados en los tratamientos L, L+C y L+SF, respectivamente, en comparación con las plantas sin inocular. En contraste, cuando se inoculó exclusivamente con cualquiera de las tres bacterias no existieron diferencias en comparación con las plantas sin inocular. Al igual que para el peso seco, se registró un efecto sinérgico cuando se inoculó con el hongo ectomicorrízico y la bacteria fijadora de nitrógeno (L+FN). En este último tratamiento la tasa fotosintética fue 1.85 veces superior en comparación con el tratamiento donde se inoculó exclusivamente con el hongo ectomicorrízico (Cuadro 2).

Contenido de clorofilas y carotenos

Se observó un incremento significativo (Tukey $p \leq 0.05$) en el contenido de clorofila *a*, en las plantas inoculadas con *Laccaria laccata* y en las coinoculadas con L+FN, con aumentos de 1.47 y 1.62 veces más, respectivamente, que en las que no se inocularon. Para el caso de la clorofila *b*, las plantas que presentaron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$) fueron aquellas inoculadas con L, L+C, L+FN y L+SF, las cuales presentaron incrementos de 1.37, 1.35, 1.60 y 1.34 veces mayores, respectivamente, en comparación con las plantas sin inocular. Las clorofilas totales presentaron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$), tanto en las plantas inoculadas con L como en las coinoculadas con L+FN (Cuadro 3). En el caso del contenido de carotenos, los valores

Cuadro 1: Peso seco (g) de plantas *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas o coinoculadas con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke=(L), la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp.=(C) y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner fijadora de nitrógeno=(FN) y *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner solubilizadora de fosfatos=(SF). Los datos son medias \pm error estándar de la media, $n=7$. Los valores en la misma columna con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

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

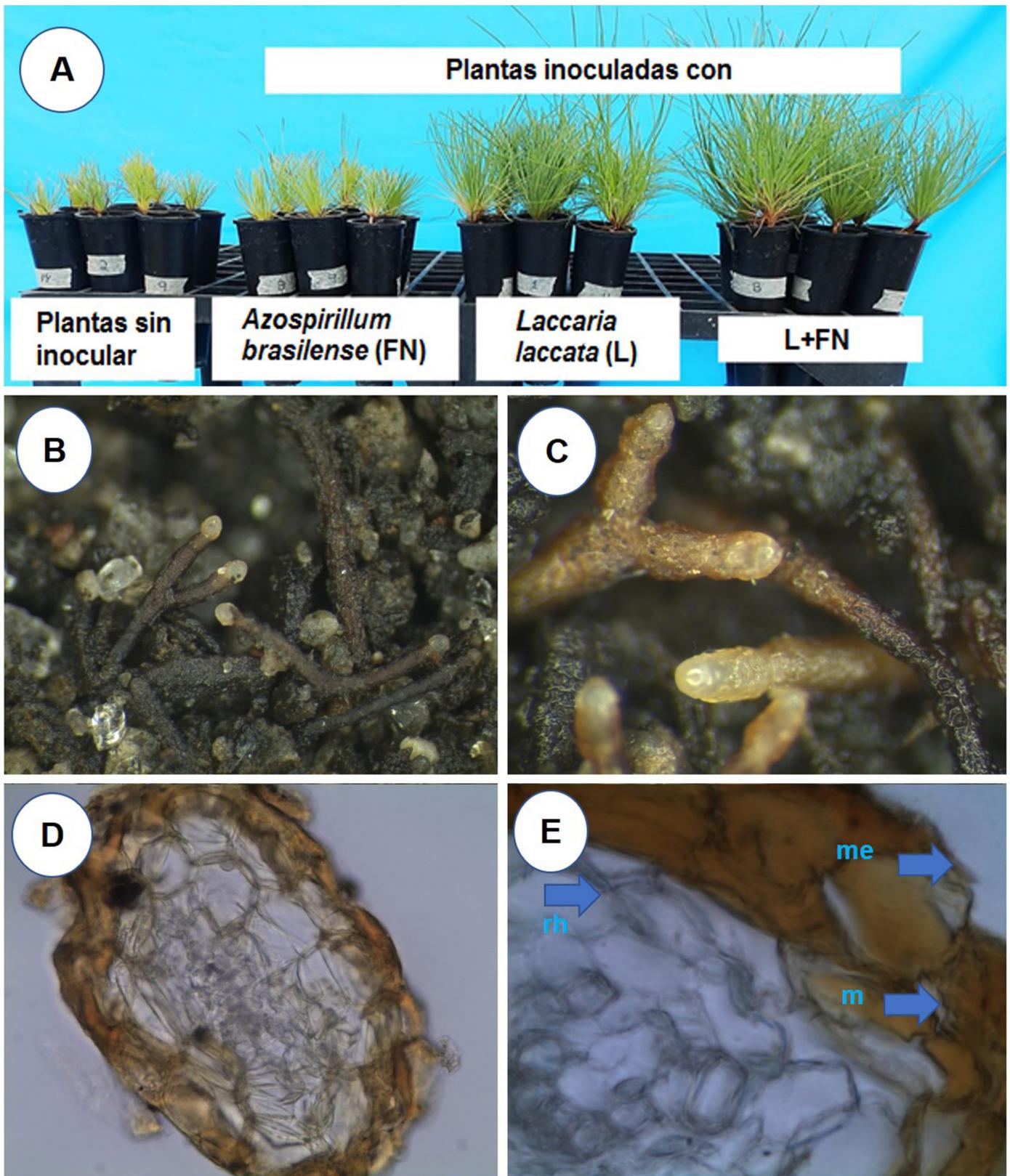


Figura 2: Imágenes generales del experimento. A. efecto de la coinoculación de *Pinus montezumae* Lamb. con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke (L) y la bacteria *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Doberneiner fijadora de nitrógeno=(FN), después de un año, plantas sin inocular y co-inoculadas; B. raíces micorrizadas de *P. montezumae* con *L. laccata*; C. morfotipo característico *P. montezumae* con *L. laccata*; D. corte transversal de raíz terciaria ectomicorrizada; E. estructuras diagnósticas de una raíz ectomicorrizada, rh=red de Hartig, m=manto, me=micelio externo.

Cuadro 2: Tasa fotosintética de plantas de *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas o coinoculadas con un hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke=(L), la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp.=(C) y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner fijadora de nitrógeno=(FN) y *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner solubilizadora de fosfatos=(SF). ddb: días después de la inoculación bacteriana. Los datos son medias \pm error estándar de la media, n=7. Valores en la misma columna con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

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

Cuadro 3: Contenido de clorofila *a*, *b*, total y carotenos en plantas de *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas o coinoculadas con un hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke=(L), la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp.=(C) y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner fijadora de nitrógeno=(FN) y *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner solubilizadora de fosfatos=(SF). Los datos son medias \pm error estándar de la media, n=7. Valores en la misma columna con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

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

fueron mayores tanto en el tratamiento inoculado con el hongo ectomicorrízico, como en el coinoculado con L+C y L+FN. En contraste, las plantas inoculadas exclusivamente con cualquiera de las tres bacterias (C, FN y SF) no presentaron diferencias significativas, en términos de clorofilas o carotenos, al ser comparadas con las plantas sin inocular. Al igual que para las variables de crecimiento y de contenido de clorofila hubo un efecto sinérgico cuando se coinoculó

con L+FN, siendo los valores 1.13 veces mayores que los reportados cuando se inoculó exclusivamente con el hongo ectomicorrízico.

Contenido de macronutrientes

El análisis nutrimental mostró efectos diferenciales de la inoculación y la coinoculación con el hongo ectomicorrízico y las bacterias benéficas. La inoculación con el hongo

ectomicorrízico, exclusivamente, originó un mayor contenido nutrimental en todos los macronutrientes evaluados, en comparación con las plantas no inoculadas. Los mayores efectos se observaron para el P, Ca y Mg. En contraste, las plantas inoculadas únicamente con cualquiera de las tres bacterias no presentaron diferencias respecto a aquellas sin inocular, independiente del macronutriente evaluado. Todos los tratamientos coinoculados con el hongo ectomicorrízico y cualquiera de las tres bacterias evaluadas presentaron mayores contenidos de macronutrientes comparados con las plantas no inoculadas. Sin embargo, el efecto más evidente se registró en el caso de las plantas coinoculadas con L+FN. En este tratamiento se observó un efecto sinérgico dado que los contenidos de N, P, K, Ca y Mg fueron 1.33, 1.20, 1.34, 1.28, 1.19 mayores, respectivamente, en los tratamientos coinoculados que en los inoculados solo con el hongo ectomicorrízico (Cuadro 4).

Porcentaje de micorrización

Los porcentajes de micorrización en las plantas inoculadas y en aquellas coinoculadas fueron de 55% cuando se inoculó exclusivamente con el hongo ectomicorrízico y de 53%, 59% y 61%, con L+SF, L+FN y L+C, respectivamente. El porcentaje de micorrización (Tukey $p \leq 0.05$) fue de 54% cuando se coinoculó con L+SF. Todos estos valores son superiores a la inoculación registrada en plantas no inoculadas o en plantas inoculadas exclusivamente con las bacterias, en donde los valores variaron 3%, 5%, 13% y 13% en los tratamientos de plantas sin inocular, SF, FN y C, respectivamente (Cuadro 5). Las raíces cortas terciarias ectomicorrizadas presentaron morfotipos característicos de *Laccaria laccata*, y sus estructuras diagnósticas como red de Hartig, manto y micelio externo fueron observadas con microscopía estereoscópica y óptica de campo claro. Las ectomicorrizas fueron simples o dicotómicas cubiertas en algunas ocasiones de abundante micelio externo gelatinoso, con ápices redondeados de tonos más claros que el resto de las puntas ectomicorrizadas, características de las especies del género *Laccaria* Berk. & Broome. Adicionalmente, se observó que las hifas penetran dos o tres capas de espacios intersticiales de las células corticales (Figs. 2B-E).

Discusión

Interacciones entre hongos micorrízicos y bacterias auxiliaadoras de las micorrizas

Las raíces de las plantas establecen interacciones simbióticas con hongos micorrízicos y bacterias benéficas que mejoran su crecimiento y contenido nutrimental (Duponnois y Plenchette, 2003; Smith y Read, 2008; Wu et al., 2012; Sousa et al., 2015). Deveau y Labbé (2016) sugirieron una diversidad de mecanismos mediante los cuales diversos grupos bacterianos benefician a las micorrizas e ilustran la complejidad del concepto de “bacterias auxiliaadoras de las micorrizas”. Dentro de los mecanismos propuestos por estos autores se incluyen algunos directamente involucrados con los hongos y que coadyuvan al reconocimiento por las raíces de las plantas hospederas: incremento en la germinación de esporas, estimulación del crecimiento micelial y liberación de metabolitos. Sin embargo, también deben ser incluidos aspectos como sinergismos, en términos de crecimiento o mejoramiento en el contenido nutrimental de las plantas micorrizadas al efectuar coinoculación con hongos ectomicorrízicos y determinados grupos de bacterias. El papel de la coinoculación con hongos ectomicorrízicos y diversos grupos bacterianos, que tienen la capacidad de potencializar los beneficios de la simbiosis ectomicorrízica principalmente en el crecimiento de las plantas inoculadas, ha sido documentado previamente (Obase, 2019).

Crecimiento vegetal

En el presente trabajo se demostró que la inoculación con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria laccata* tiene un efecto positivo en el crecimiento y contenido de macronutrientes en *P. montezumae*. Adicionalmente, la coinoculación de *Laccaria laccata* con una de las tres cepas bacterianas evaluadas e identificada como *A. brasilense* con capacidad de fijar N, originó un mayor crecimiento de *P. montezumae* en términos de biomasa aérea y radical. Existen algunos reportes previos en donde se han registrado efectos similares en el crecimiento de árboles al coinocularlos con hongos ectomicorrízicos y bacterias benéficas. Wu et al. (2012), al coinocular *Pinus thunbergii* Parl. con *Boletus edulis* Bull. y *Bacillus cereus* Frankland & Frankland cepas HB12 y HB59, registraron incrementos en su biomasa total (1.28 y 1.39, respectivamente), en comparación con

Cuadro 4: Contenido total de macronutrientes en raíz, parte aérea y raíz de plantas de *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas o coinoculadas con un hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke=(L), la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp.=(C) y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner fijadora de nitrógeno=(FN) y *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner solubilizadora de fosfatos=(SF). Los datos son medias \pm error estándar de la media, n=7. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales, según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

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

plantas inoculadas exclusivamente con el hongo ectomicorrízico. De manera similar, Araujo et al. (2018) coinocularon *Pinus pinea* L. con la bacteria *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn y el hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch y reportaron incrementos en su biomasa

seca, tanto de tallo y de raíz, de hasta 1.42 y 1.65 veces más, respectivamente, que en las plántulas inoculadas exclusivamente con el hongo ectomicorrízico.

Adicionalmente, en el presente trabajo se encontró un efecto sinérgico cuando se coinoculó con el hon-

Cuadro 5: Porcentaje de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas, muertas y vivas de plantas de *Pinus montezumae* Lamb. inoculadas o no con un hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke=(L), la bacteria auxiliadora de la micorrización *Cohnella* sp.=(C) y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner fijadora de nitrógeno=(FN) y *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg & Dobereiner solubilizadora de fosfatos=(SF). Los datos son medias \pm error estándar de la media, $n=7$. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales, según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

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

go comestible ectomicorrízico *L. laccata* y la bacteria *A. brasilense* con capacidad de fijar nitrógeno (FN), en términos de aumento en el diámetro del tallo de las plantas. Barragán-Soriano et al. (2018) reportaron que al inocular el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué., o al coinocular dicho hongo con las bacterias *Cohnella* sp., o con *Azospirillum brasilense*, se incrementó el diámetro en plantas de *Pinus montezumae*. Dichos autores registraron este fenómeno en tres periodos de evaluación, 30, 120 y 420 días después de coinocular las bacterias. De manera similar a lo encontrado en la presente investigación, Xiao-Qin et al. (2012) reportaron que la coinoculación con el hongo ectomicorrízico *Boletus edulis* y dos cepas de bacterias auxiliadoras de la micorrización pertenecientes a *Bacillus cereus* HB12 y HB59 en plantas de *Pinus thunbergii* mostraron un incremento en el diámetro del tallo hasta 1.4 y 1.48 veces mayor, respectivamente, que las plantas sin inocular.

Estos resultados son indicadores de que cuando se coinoculan hongos ectomicorrízicos con diferentes cepas bacterianas existen efectos diferenciales en el crecimiento tanto intra como interespecíficos. Esto puede ser explicado por la enorme variación genética existente entre bacterias pertenecientes a diferentes especies, o a diferentes cepas dentro de la misma especie, lo que origina una variación para la codificación de metabolitos involucrados en las distintas fases de los procesos metabólicos, enzimáticos

y efectos benéficos de la micorrización en sus plantas hospedadoras, lo cual ha sido ampliamente documentado (p.ej., Kuo et al., 2014; Hanage, 2016; Muszewska et al., 2021). Por ejemplo, Afkhami et al. (2020) reportaron que existen cepas bacterianas que presentan más afinidad con sus hospedadores genéticamente. Por ello, es importante resaltar que hay una enorme variabilidad en el efecto de la interacción entre los microorganismos, lo cual depende de la especificidad entre la relación tripartita planta hospedadora-hongos ectomicorrízicos-bacterias benéficas. Adicionalmente, con el advenimiento de la metagenómica, se ha demostrado que las relaciones entre plantas hospedadoras, hongos ectomicorrízicos y sus microbiomas asociados, son mucho más complejas de lo que se había asumido previamente. Por lo anterior, la comprensión mecanística de las interacciones genéticas, fisiológicas, bioquímicas y evolutivas entre estos componentes se encuentra actualmente en su infancia (Aslani et al., 2020; Mangeot-Peter et al., 2020).

Fotosíntesis, clorofilas y carotenos

Particularmente el efecto de la coinoculación con hongos ectomicorrízicos y bacterias benéficas en las variables fisiológicas, como la tasa fotosintética y el contenido de clorofila *a*, *b*, totales y carotenos, a pesar de su importancia, han recibido escasa atención. Por ejemplo, Xiao-Qin et al. (2012) reportaron que al coinocular plantas de *Pinus*

thunbergii con el hongo ectomicorrízico *Boletus edulis* y la bacteria *Bacillus cereus* HB12 o HB59 se incrementó la actividad fotosintética en relación con la inoculación solo con el hongo o el hongo con la bacteria. Shi et al. (2017) registraron que al coinocular tres hongos ectomicorrízicos, *Cenococcum geophilum* Fr., *Laccaria amethystina* (Scop.) Cooke (mencionada con el sinónimo *L. amethystea* (Bull.) Murrill) y *Pisolithus* sp., en *Pinus thunbergii* existió un incremento de hasta 3.8, 2.5, y 1.7 de la tasa fotosintética, respectivamente, en comparación con aquellas plantas que no fueron inoculadas. Wang et al. (2021) demostraron que la inoculación con hongos ectomicorrízicos incrementa la tolerancia al estrés por desecación crítica y estimula la fotosíntesis mediante el aumento de la producción de azúcares no estructurales, los cuales funcionan como buffer en la tolerancia a la desecación. Estos autores inocularon *Pinus tabuliformis* Carr. con el hongo ectomicorrízico *Suillus variegatus* (Sw.) Richon & Roze, en dos condiciones de desecación (40 y 20% de humedad) y registraron incrementos de la tasa fotosintética de 133 y 100%, respectivamente, al comparar con aquellos tratamientos sin inocular. Zhang et al. (2019) observaron diferencias en las tasas fotosintéticas solamente a partir de los 62 días posteriores a la inoculación de *Pinus densiflora* Siebold & Zucc., con cualquiera de los hongos ectomicorrízicos *Laccaria japonica* Popa & K. Nara, *Cenococcum geophilum*, *Pisolithus* sp. y *Suillus luteus* (L.) Roussel.

En cuanto al contenido de clorofilas y carotenos, en el presente trabajo se registró que la coinoculación con un hongo ectomicorrízico y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, incrementó el contenido de pigmentos fotosintéticos como clorofila *a*, *b*, clorofilas totales y carotenos en acículas de *P. montezumae*.

Szuba et al. (2019) inocularon plantas de *Populus canescens* (Aiton) Sm. con el hongo ectomicorrízico *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. y reportaron incrementos de clorofila *a* y *b* en comparación con plantas sin inocular. En contraste Yin et al. (2020) registraron que, en comparación con aquellas plantas sin inocular, la inoculación de *Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* Litv. con el hongo ectomicorrízico *Suillus luteus* en condiciones de estrés por salinidad disminuyó la concentración de esos pigmentos fotosintéticos en plantas micorrizadas.

El incremento registrado, tanto en la presente investigación como en estudios previos, de la tasa fotosintética y el contenido de clorofilas es relevante en la comprensión del efecto benéfico que tienen las ectomicorrizas y su microbioma asociado en el crecimiento de los árboles hospederos. Se ha demostrado que de 3 a 21% del carbono fijado por árboles es translocado al micelio externo ectomicorrízico; es conocido que dicha fijación es efectuada por la clorofila *a*, que es el principal pigmento involucrado en la fotosíntesis, mientras que la clorofila *b* es un pigmento accesorio cuya función es coleccionar la energía para transferirla hacia la clorofila *a* (Leake et al., 2004; Ricketti et al., 2022).

Contenido nutrimental

La mayoría de los nutrientes se encuentran presentes en formas orgánicas que son asimilables para la absorción de las plantas hasta después de la descomposición de la materia orgánica, proceso que involucra la participación de los hongos ectomicorrízicos y bacterias (Haas et al., 2018). Previamente se ha investigado y demostrado la importancia de la adquisición de N, P y K en plantas ectomicorrizadas (Smith y Read, 2008).

En esta investigación se registró un incremento del contenido de macronutrientes cuando se inoculó exclusivamente con el hongo ectomicorrízico o se inoculó simultáneamente con dicho hongo y con tres bacterias benéficas, independientemente de la parte de la planta y del macronutriente. Adicionalmente, se registró un efecto sinérgico cuando se inóculo con *L. laccata* y FN, en el caso de la parte aérea, la raíz y el contenido total de N y K de *P. montezumae*. Este registro constituye uno de los pocos que demuestra que la coinoculación con el hongo ectomicorrízico *L. laccata* y la bacteria *A. brasilense* origina un efecto sinérgico en la translocación de macronutrientes en *P. montezumae*.

Por su parte, Barragán-Soriano et al. (2018) reportaron que la coinoculación de dicha especie arbórea con el hongo ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. y *Azospirillum brasilense* originaron un mayor contenido de N en su parte aérea y contenido total. A pesar de que *A. brasilense* SF, una de las cepas evaluadas en el presente trabajo, tuvo la capacidad de solubilizar fosfatos, no mostró

efectos sinérgicos cuando se coinoculó con *L. laccata*. Este efecto puede deberse a la especificidad planta hospedera-bacteria, por lo que estudios con otras cepas de bacterias solubilizadoras de fosfatos son altamente deseables en la búsqueda de incrementos del contenido de P en plantas de *P. montezumae*.

Wu et al. (2012), al coinocular *Pinus thunbergii* con *Boletus edulis* y dos cepas de *Bacillus cereus*, no observaron incrementos en el contenido total de N, pero sí en el de P y K. Araujo et al. (2018) coinocularon *Quercus suber* L. con dos diferentes tipos de bio-inoculantes. El primero, denominado comercial, estaba constituido de dos hongos ectomicorrízicos (*Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma* sp. Pers.) y seis especies de *Bacillus* y *Streptomyces* Waksman & Henrici, mientras que el segundo inoculante contenía el hongo ectomicorrízico *Suillus granulatus* (L.) Roussel y la bacteria *Mesorhizobium* sp. Dichos autores registraron un incremento en el contenido de N hasta 2.4 veces mayor que en las plantas no inoculadas.

Pohjanen et al. (2014) evaluaron la inoculación de *Pinus sylvestris* L. con dos hongos ectomicorrízicos (*Pisolithus tinctorius* (Pt) y *Suillus variegatus*) y la bacteria *Methylobacterium extorquens* DSM13060 (MB) Green & Ardley. Dichos autores reportaron un incremento en la concentración de P, tanto en la parte aérea como en la raíz, cuando se inocula exclusivamente Pt o cuando se coinoculó Pt+MB en comparación con plantas no inoculadas. Domínguez-Núñez et al. (2019) reportaron que al coinocular con el hongo ectomicorrízico *Tuber melanosporum* Vitt., conocido como trufa negra, o con *Pseudomonas fluorescens* Migula CECT 844 a la especie *Pinus nigra* J.F. Arnold, se incrementa la concentración de K y P en comparación con plantas no inoculadas. Rodríguez-Gutiérrez et al. (2019) registraron que la inoculación de *Laccaria trichodermophora* G.M. Muell. o de *L. bicolor* (Maire) P.D. Orton, solas o en coinoculación con *Pseudomonas fluorescens* originó mayor contenido de K total en plantas de *Pinus montezumae* en comparación con plantas no inoculadas. En contraste, este efecto no se observó cuando se inoculó con *L. vinaceobrunnea* G.M. Muell. o *L. laccata*.

Lo anterior demuestra que, al igual que en el caso del crecimiento, existen diferencias interespecíficas de los hongos ectomicorrízicos inoculados de los efectos benéficos en

términos de los incrementos de contenidos nutrimentales debidos a la coinoculación hongos-bacterias.

Colonización ectomicorrízica

Finalmente, la colonización ectomicorrízica de las raíces de las plantas y su interacción con bacterias promotoras de la micorrización son componentes clave de los efectos benéficos sobre el desarrollo de las plantas (Noirot-Gros et al., 2018).

Shinde et al. (2019) registraron que la coinoculación con la bacteria *Pseudomonas fluorescens* y el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria bicolor* en *Populus tremuloides* Michx. incrementó la cantidad de raíces finas micorrizadas hasta 1.7 veces más que las plantas sin inocular. Araujo et al. (2018) registraron incrementos en el porcentaje de micorrización en *Pinus pinea* en aquellos tratamientos coinoculados con la bacteria *Bacillus subtilis* y el hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*.

Esas investigaciones demuestran que las combinaciones evaluadas en estos estudios (plantas-hongos ectomicorrízicos-bacterias), incrementan los porcentajes de micorrización. En la presente investigación se encontraron porcentajes de micorrización de 55% en las plantas inoculadas exclusivamente con el hongo *L. laccata* y de 54% a 61% en plantas coinoculadas con el hongo ectomicorrízico y con cualquiera de las tres bacterias evaluadas. Estos porcentajes de colonización ectomicorrízica son un indicador del éxito del establecimiento del hongo ectomicorrízico evaluado en las raíces de sus plantas hospederas, que junto con la coinoculación bacteriana explica los efectos benéficos reportados.

Conclusiones

El presente trabajo demostró que la coinoculación de *P. montezumae* con *L. laccata*, hongo comestible ectomicorrízico, y con tres cepas bacterianas produjo incrementos de peso seco total (hasta ocho veces mayores), tasas fotosintéticas 24 veces más elevadas, e incrementos nutrimentales de N, P y K totales (7.5, 12 y 26 veces respectivamente), en comparación con las plantas sin inocular.

En contraste, la inoculación solo con las tres bacterias evaluadas no originó efectos benéficos en la planta hospedera. Particularmente, se registró un efecto sinérgico



cuando se coinoculó simultáneamente con el hongo ectomicorrízico y la bacteria *A. brasilense* (FN), en términos de crecimiento vegetal, calidad fisiológica de las plantas y contenido de N y K, tanto en la parte aérea, raíz y total. En contraste, la coinoculación con las otras dos bacterias evaluadas no mostró dicho efecto sinérgico en ninguna de las variables evaluadas, demostrando una variación tanto inter como intraespecífica en las diferentes combinaciones hongo ectomicorrízico-cepas bacterianas inoculadas. En todos los tratamientos donde se aplicó inoculante ectomicorrízico de *L. laccata* se registraron valores de micorrización que variaron entre 53 y 61%, lo que demuestra la capacidad de establecimiento de dicho micobionte en las raíces de la planta hospedera independientemente de la coinoculación bacteriana evaluada.

Este trabajo demuestra el gran potencial de la coinoculación con el hongo comestible ectomicorrízico *L. laccata* y la bacteria *A. brasilense* (FN) como una alternativa recomendable en la producción de plantas en vivero de *Pinus montezumae*, la cual es una de las especies más utilizadas para la reforestación en México.

Contribución de autores

JLBS y JPM concibieron y diseñaron el estudio y las preguntas de investigación. JJAS, MCM, JDM, VMCA y GM enriquecieron los enfoques inicialmente planteados desde sus áreas de experiencia y dieron seguimiento a los análisis e interpretación de los resultados. JLBS redactó el primer borrador, el cual fue enriquecido por JPM. Todos los autores contribuyeron en la revisión y aprobación del manuscrito final.

Financiamiento

Este estudio fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Programas Nacionales Estratégicos (CONA-CyT-PRONACES)-(FOP07/2021, 03 316198).

Agradecimientos

El primer autor agradece el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de una beca para el desarrollo de sus estudios doctorales en Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

Literatura citada

- Aceves-Rangel, L. D., J. Méndez-González, M. A. García-Aranda y J. A. Nájera-Luna. 2018. Distribución potencial de 20 especies de pinos en México. *Agrociencias* 52(7): 1043-1057.
- Afkhami, M. E., B. K. Almeida, D. J. Hernandez, K. N. Kieseewetter y D. P. Revillini. 2020. Tripartite mutualisms as models for understanding plant-microbial interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 56: 28-36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.02.003>
- Agerer, R. 1994. Characterization of ectomycorrhizal. In: Norris, J. R., D. J. Read y A. K. Varma (eds.). *Techniques for mycorrhizal research*. Academic Press. London, UK. Pp. 25-73.
- Aguilera-Rodríguez, M., A. Aldrete, T. Martínez-Trinidad y V. M. Ordaz-Chaparro. 2016. Producción de *Pinus montezumae* Lamb. con diferentes sustratos y fertilizantes de liberación controlada. *Agrociencia* 50: 107-118.
- Allen, S. E., H. M. Grimshaw, J. A. Parkinson y C. Quarmby. 1997. *Chemical analysis of ecological materials*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 206 pp.
- Araujo, G. C., N. R. Sousa y M. L. P. Castro. 2018. The effect of fungal-bacterial interaction on the phenolic profile of *Pinus pinea* L. *Plant Growth Regulation* 86: 465-475. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0445-x>
- Aslani, F., L. Tedersoo, S. Polme, O. Knox y M. Bahram. 2020. Global patterns and determinants of bacterial communities associated with ectomycorrhizal root tips of *Alnus* species. *Soil Biology and Biochemistry* 148: 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107923>
- Barragán-Soriano, J. L., J. Pérez-Moreno, J. J. Almaraz-Suarez, M. G. Carcaño-Montiel y K. I. Medrano-Ortiz. 2018. Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 24(1): 5-16. DOI: <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.01.010>
- Barrera, J. M., L. Madrid y K. Hernández. 2021. La producción forestal en México a lo largo del tiempo: avances y retrocesos. Consejo Civil Mexicano para la Silvicultura Sostenible. Cd. Mx., México. Pp. 1-45.
- Bremner, J. M. 1965. Total, nitrogen. *Agronomy* 9: 1149-1178.
- Carcaño-Montiel, M. G., R. Ferrera-Cerrato, J. Pérez-Moreno, J. D. 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.
- Comandini, O., A. C. Rinaldi y T. W. Kuyper. 2012. Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: a continuous challenge. In: Pagano, M. (ed.). *Mycorrhiza: Occurrence in Natural and Restored*. Nova Science Publishers. New York, USA. Pp. 125-200.
- CONAFOR. 2020a. Paquetes tecnológicos, *Pinus montezumae* Lamb. Comisión Nacional Forestal Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). Cd. Mx., México. <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/971Pinus%20montezumae.pdf> (consultado mayo de 2022).
- CONAFOR. 2020b. Programa Nacional Forestal 2020-2024. Comisión Nacional Forestal Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). Cd. Mx., México.
- Deveau, A. y J. Labbé. 2016. Mycorrhiza helper bacteria. In: Martin, F. (ed.) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. John Wiley & Sons. Nueva Jersey, Estados Unidos. Pp. 437-450. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch24>
- Domínguez-Núñez, J. A., M. Berrocal-Lobo y S. Albanesi. 2019. Ectomycorrhizal Fungi: Role as Biofertilizers in Forestry. In: Giri, B., R. Prasad, Q. S. Wu y A. Varma (eds.). *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment*. Springer. Cham, Switzerland. Pp. 67-82. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4_4
- Duponnois, R. y C. Plenchette. 2003. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza* 13: 85-91. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0204-7>
- FAO. 2010. *Global Forest resources assessment 2010*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy. 36 pp.
- FAO. 2018. *El estado de los bosques del mundo, las vías forestales hacia el desarrollo sostenible*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy. 158 pp.
- Fitriatin, B. N., E. T. Sofyan y T. Turmuktini. 2021. Increasing Soil P and Yield of Upland Rice through Application Phosphate Solubilizing Microbes. *Haya: The Saudi Journal of Life Sciences* 6(7): 163-167.
- Frey-Klett, P., J. Garbaye y M. Tarkka. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176(1): 22-36. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>
- Gupta, S. K. y A. P. Chakraborty. 2020. Mycorrhiza Helper Bacteria: Future Prospects. *International Journal of Research and Review* 7(3): 387-391.
- Haas, J. C., N. R. Street, A. Sjödin, N. M. Lee, M. N. Högborg, T. Näsholm y V. Hurry. 2018. Microbial community response to growing season and plant nutrient optimisation in a boreal Norway spruce forest. *Soil Biology and Biochemistry* 125: 197-209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.005>
- Hanage, W. P. 2016. Not So Simple After All: Bacteria, Their Population Genetics, and Recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8(7): a018069. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018069>
- Hansen, M. C., P. V. Potapov, R. Moore, M. Hancher, S. A. Turubanova, A. Tyukavina, D. Thau y S. V. Stehman. 2013. High-Resolution Global Maps of 21st-Century Forest Cover Change. *Science* 342(6160): 850-853. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1244693>
- Heredia-Acuña, C., J. J. Almaraz-Suarez, R. Arteaga-Garibay, D. Y. Pineda-Mendoza y R. Ferrera-Cerrato. 2018. Isolation, characterization and effect of plant-growth-promoting rhizobacteria on pine seedlings (*Pinus pseudostrubus* Lindl.). *Journal of Forestry Research* 30: 1727-1734. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0723-5>
- Horton, T. R., E. Cazares y T. D. Bruns. 1998. Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months of growth after wildfire. *Mycorrhiza* 8: 11-18. DOI: <https://doi.org/10.1007/s005720050205>
- Kuo, A., A. Kohler, F. M. Martin y I. V. Grigoriev. 2014. Expanding genomics of mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00582>
- Leake, J., D. Johnson, D. Donnelly, G. Muckle, L. Boddy y D. Read. 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany* 82(8): 1016-1045. DOI: <https://doi.org/10.1139/b04-060>
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)



- López-Hernández, J. A., O. A. Aguirre-Caldero, E. Alanís-Rodríguez, J. C. Monárrez-González, M. A. González-Tagle y J. Jiménez-Pérez. 2017. Composición y diversidad de especies forestales en bosques templados de Puebla, México. *Madera y Bosques* 23(1): 39-51. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2017.2311518>
- López-Reyes, L., M. G. Carcaño-Montiel, L. Tapia-López, G. Medina-de la Rosa y R. A. Tapia-Hernández. 2017. Antifungal and growth-promoting activity of *Azospirillum brasilense* in *Zea mays* L. ssp. *mexicana*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50(13-14): 727-743. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1372247>
- Mangeot-Peter, L., T. Tschaplinski, N. Engle, C. Veneault-Fourrey, F. Martin y A. Deveau. 2020. Impacts of soil microbiome variations on root colonization by fungi and bacteria and on the metabolome of *Populus tremula* × *alba*. *Phytobiomes Journal* 4(2): 142-155 DOI: <https://doi.org/10.1094/phytobiomes-08-19-0042-r>
- Manzanilla-Quiñones, U., P. V. Delgado, J. R. Hernández, A. S. Molina, J. J. M. García y M. G. del C. Rocha. 2019. Similaridad del nicho ecológico de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus* (*Pinaceae*) en México: implicaciones para la selección de áreas productoras de semillas y de conservación. *Acta Botanica Mexicana* 126: e1398. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1398>
- Martínez-Reyes, M., J. Pérez-Moreno, L. Villarreal-Ruiz, R. Ferrera-Cerrato, B. Xoconostle-Cázares, J. J. Vargas-Hernández y M. Honrubia-García. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18(2): 183-192. DOI: <https://doi.org/10.5154/rchscfa.2010.11.112>
- Marupakula, S., S. Mahmood, J. Jernberg, S. Nallanchakravarthula, Z. A. Fahad y R. D. Finlay. 2017. Bacterial microbiomes of individual ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* roots are shaped by soil horizon and differentially sensitive to nitrogen addition. *Environmental Microbiology* 19(11): 4736-4753. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13939>
- Monjardin, S. A., C. E. Pacheco-Angulo, W. Plata-Rochan y G. Corrales-Barraza. 2017. La deforestación y sus factores causales en el estado de Sinaloa, México. *Madera y Bosques* 23(1): 7-22. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2017.2311482>
- Muszevska, A., O. Alicja, S. Kamil, O. Drgas, M. Orłowska, U. Perlińska-Lenart, T. Aleksandrak-Piekarczyk, K. Szatraj, U. Zielenkiewicz, S. Piśtyk, E. Malc, P. Mieczkowski, J. S. Kruszevska, P. Bernat y J. Pawłowska. 2021. Metabolic Potential, Ecology and Presence of Associated Bacteria Is Reflected in Genomic Diversity of Mucoromycotina. *Frontiers in Microbiology* 12: 1-21. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636986>
- Noirot-Gros, M. F., S. Shinde, P. E. Larsen, S. Zerbs, P. J. Korajczyk, K. M. Kemner y P. H. Noirot. 2018. Dynamics of Aspen Roots Colonization by Pseudomonads Reveals Strain-Specific and Mycorrhizal-Specific Patterns of Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology* 9: 1-16. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00853>
- Obase, K. 2019. Bacterial community on ectomycorrhizal roots of *Laccaria laccata* in a chestnut plantation. *Mycoscience* 60(1): 40-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.MYC.2018.08.002>
- Pacheco, C., I. Aguado y D. Mollicone. 2012. Las causas de la deforestación en Venezuela: un estudio retrospectivo. *BioLlania* 10: 281-292.
- Pérez-Moreno, J. y D. J. Read. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.
- Pérez-Moreno, J., A. Guerin-Laguette, A. C. Rinaldi, F. Yu, A. Verbeken, F. Hernández-Santiago y M. Martínez-Reyes. 2021a. Edible mycorrhizal fungi of the world: What is their role in forest sustainability, food security, biocultural conservation and climate change? *Plants, People, Planet* 3(5): 471-490. DOI: <https://doi.org/10.1002/ppp3.10199>
- Pérez-Moreno, J., P. E. Mortimer, J. Xu, S. C. Karunarathna y H. Li. 2021b. Global perspectives on the ecological, cultural and socioeconomic relevance of wild edible fungi. *Studies in Fungi* 6(1): 408-424. DOI: <https://doi.org/10.5943/sif/6/1/31>
- Perry, J. 1991. *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, USA. 234 pp.
- Petersen, R. L., H. B. Massicotte y L. H. Melville. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. CABI. Wallingford, UK. 173 pp.



- Pohjanen, J., J. J. Koskimäki, S. Sutela, P. Ardanov, M. Suorsa, K. Niemi, T. Sarjala, H. Häggman y A. M. Pirttilä. 2014. Interaction with ectomycorrhizal fungi and endophytic *Methylobacterium* affects nutrient uptake and growth of pine seedlings in vitro. *Tree Physiology* 34(9): 993-1005. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu062>
- Read, D. J. y J. Pérez- Moreno. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytologist* 157(3): 475-492. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00704.x>
- Reis, F., A. P. Magalhães, R. M. Tavares, P. Baptista y T. Lino-Neto. 2021. Bacteria could help ectomycorrhizae establishment under climate variations. *Mycorrhiza* 31: 395-401. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01027-4>
- Ricketti, B. V., E. M. Gauger y A. Fedrizzi. 2022. The coherence time of sunlight in the context of natural and artificial light-harvesting. *Scientific Reports* 12: 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08693-0>
- Rodríguez-Gutiérrez, I., D. Ramírez-Martínez, R. Garibay-Orijel, V. Jacob-Cervantes, J. Pérez-Moreno, M., P. Ortega-Larrocea y E. Arellano-Torres. 2019. Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 90: e902868. DOI: <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2868>
- Santoyo, G., E. Gamalero y B. R. Glick. 2021. Mycorrhizal-Bacterial Amelioration of Plant Abiotic and Biotic Stress. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5: 1-18 DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.672881>
- SAS. 2004. *STAT ver. 9.00 User's Guide*. SAS Institute. Cary, USA. 880 pp.
- Sebastiana, M., A. Corrêa, P. Castro y M. Ramos. 2020. *Pisolithus*. In: Amaresan, N., M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar y A. Sankaranarayanan (eds.). *Beneficial Microbes in Agro-Ecology, Bacteria and Fungi*. Elsevier. Amsterdam, Netherlands. Pp. 707-726. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00036-8>
- Shi, L., J. Wang, L. Binhao, K., Nara, C., Lian, Z. Shen, Y. Xia y Y. Chen. 2017. Ectomycorrhizal fungi reduce the light compensation point and promote carbon fixation of *Pinus thunbergii* seedlings to adapt to shade environments. *Mycorrhiza* 27: 823-830. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0795-7>
- Shinde, S., S. Zerbs, F. R. Collart, J. R. Cumming, P. Noirot y P. E. Larsen. 2019. *Pseudomonas fluorescens* increases mycorrhization and modulates expression of antifungal defense response genes in roots of aspen seedlings. *BMC Plant Biology* 19(4): 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1610-0>
- Smith, S. E. y D. J. Read. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd. ed. Academic Press. New York, USA. 787 pp.
- Sousa, R. N., R. A. Franco, A. M. Ramos, S. R. Oliveira y L. M. P. Castro. 2015. The response of *Betula pubescens* to inoculation with an ectomycorrhizal fungus and a plant growth promoting bacterium is substrate-dependent. *Ecological Engineering* 81: 439-443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.024>
- Szuba, A., L. Marczak, L. Karliński, J. Mucha y D. Tomaszewski. 2019. Regulation of the leaf proteome by inoculation of *Populus canescens* with two *Paxillus involutus* isolates differing in root colonization rates. *Mycorrhiza* 29: 503-517. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00910-5>
- Tarkka, M. T., L. Feldhahn, F. Buscot y T. Wubeta. 2015. Genome Sequence of the Mycorrhiza Helper Bacterium *Streptomyces* sp. Strain AcH 505. *Genome Announcements* 3(2): e01386. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomea.01386-14>
- Tedersoo, L. 2017. Global biogeography and invasions of ectomycorrhizal plants: Past, present and future. *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Springer International. Cham, Switzerland. Pp. 469-531. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3>
- Tedersoo, L., T. W. May y M. E. Smith. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217-263. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0274-x>
- Wang, J., H. Zhang, J. Gao, Y. Zhang, Y. Liu. y M. Tang. 2021. Effects of ectomycorrhizal fungi (*Suillus variegatus*) on the growth, hydraulic function, and non-structural carbohydrates of *Pinus tabulaeformis* under drought stress. *BMC Plant Biology* 21: 2-13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02945-3>
- Wu, X.-Q., L.-L. Hou, J.-M. Sheng, J.-H. Ren, L. Zheng, D. Chen y J.-R. Ye. 2012. Effects of ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* and mycorrhiza helper *Bacillus cereus* on the growth and



- nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. *Biology and Fertility of Soils* 48: 385-391. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0638-1>
- Xiao-Qin, W., H. Liang-Liang, S. Jiang-Mei, R. Jia-Hong, Z. Ling, C. Dan y Y. Jian-Ren. 2012. Effects of ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* and mycorrhiza helper *Bacillus cereus* on the growth and nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. *Biology and Fertility of Soil* 48: 385-395. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0638-1>
- Yin, D., S. Halifu, R. Song, J. Qi, X. Deng y J. Deng. 2020. Effects of an ectomycorrhizal fungus on the growth and physiology of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seedlings subjected to saline-alkali stress. *Journal of Forestry Research* 31: 781-788. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01007-7>
- Zhang, S., L. M. Vaario, Y. Xia, N. Matsushita, Q. Geng, M. Tsuruta, H. Kurokochi y C. Lian. 2019. The effects of co-colonising ectomycorrhizal fungi on mycorrhizal colonisation and sporocarp formation in *Laccaria japonica* colonising seedlings of *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza* 29: 207-218. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00890-6>
- Zhang, Z. X. 1986. Determination of chlorophyll content of plants - acetone and ethanol mixture method. *Liaoning Agricultural Science* 3: 26-28.

