

Calidad de *Pinus greggii* inoculados con hongos ectomicorrízicos comestibles y bacterias auxiliaadoras de la micorrización

Quality of *Pinus greggii* inoculated with edible ectomycorrhizal fungi and mycorrhizal helper bacteria

Violeta Carrasco-Hernández^{1*}, Dante Arturo Rodríguez-Trejo^{1†}, Víctor Manuel Duarte Zaragoza^{2*}, Moisés Graciano Carcaño-Montiel³, Alejandro Corona Ambríz¹ y César Ramiro Martínez-González⁴

¹ Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales, Carretera México-Texcoco km 38.5, 56230 Chapingo, Estado de México, México.

² Tecnológico de Estudios Superiores del Oriente del Estado de México, División de Ingeniería Ambiental, Paraje San Isidro, s/n, Mpio. La Paz, Estado de México, 56400, México.

³ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Laboratorio de Microbiología de Suelos, Edificio 103 J, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, México.

⁴ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México.

RESUMEN

La calidad de la planta en el vivero es un factor determinante para el éxito de los programas de reforestación. El empleo de hongos ectomicorrízicos y bacterias auxiliaadoras de la micorrización representa una alternativa biotecnológica para fortalecer la calidad de la planta en vivero. El presente estudio evaluó el efecto de la inoculación de dos hongos ectomicorrízicos (*Laccaria* sp. y *Hebeloma crustuliniforme*) y tres bacterias auxiliaadoras de la micorrización (*Chromobacterium violaceum*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Azospirillum brasilense*) en plántulas de *Pinus greggii*. Las variables evaluadas fueron altura de planta, biomasa aérea y radical, índice de esbeltez y de Dickson, contenido nutrimental (N, P, K) y porcentaje de colonización micorrízica. La coinoculación de hongos y bacterias generó incrementos significativos en altura de planta, biomasa total y absorción nutrimental, alcanzando valores de colonización micorrízica superiores al 60%. Aunque el índice de Dickson fue bajo (<0.2), los tratamientos con consorcios microbianos presentaron valores más altos con respecto al testigo y a las inoculaciones simples. La inoculación con *Laccaria* sp. resultó más eficiente que *H. crustuliniforme*, destacando por mayor colonización y mejor desempeño morfológico. Los resultados confirman un efecto sinérgico positivo entre hongos ectomicorrízicos y bacterias auxiliaadoras de la micorrización.

Palabras claves: *Laccaria* sp.; *Hebeloma crustuliniforme*; *Chromobacterium violaceum*; *Acinetobacter calcoaceticus* y *Azospirillum brasilense*.

ABSTRACT

Plant quality in forest nurseries is a key factor determining the success of reforestation programs. The use of ectomycorrhizal fungi and mycorrhiza helper bacteria represents a biotechnological alternative to enhance seedling quality under nursery conditions. In this study, we evaluated the effect of

inoculating *Pinus greggii* seedlings with two ectomycorrhizal fungi (*Laccaria* sp. and *Hebeloma crustuliniforme*) and three mycorrhiza helper bacteria (*Chromobacterium violaceum*, *Acinetobacter calcoaceticus*, and *Azospirillum brasilense*) in *Pinus greggii* seedlings. The variables evaluated were plant height, aerial and radical biomass, sturdiness quotient and Dickson quality index, nutrient content (N, P, K) and percentage of mycorrhizal colonization. Co-inoculation of fungi and bacteria significantly increased plant height, total biomass, and nutrient uptake, achieving mycorrhizal colonization values exceeding 60%. Although the Dickson index was low (<0.2), treatments with microbial consortia presented higher values with respect to the control and simple inoculations. Inoculation with *Laccaria* sp. proved more effective than *H. crustuliniforme*, showing higher colonization rates and improved morphological performance. Overall, the results confirm a positive synergistic effect between ectomycorrhizal fungi and mycorrhiza helper bacteria.

Keywords: *Laccaria* sp.; *Hebeloma crustuliniforme*; *Chromobacterium violaceum*; *Acinetobacter calcoaceticus* and *Azospirillum brasilense*.

INTRODUCCIÓN

El índice de calidad de Dickson es utilizado principalmente por los forestales para conocer la calidad de la planta en los viveros a través de mediciones morfológicas, donde un índice mayor, indica una mejor calidad de la planta (Aldrete et al., 2023). Por lo tanto, una planta con un índice de calidad alto y micorrizada tendrá mayores probabilidades de supervivencia al trasplante a campo, en especial en zonas con suelos altamente degradados donde no existe la presencia de propágulos fúngicos que puedan micorrizar la planta de forma natural.

Sin embargo, el índice de calidad de Dickson no considera el grado de micorrización de la planta, a pesar de que este constituye un factor determinante para su supervivencia.

*Autor para correspondencia: Violeta Carrasco-Hernández, Víctor Manuel Duarte Zaragoza
e-mail: etalovich@yahoo.com.mx; vduarte896@gmail.com

Recibido: 28 de agosto de 2025

Aceptado: 12 de diciembre de 2025

Publicado: 19 de febrero de 2026

Debido a que los hongos ectomicorrízicos (ECM) conforman una simbiosis mutualista junto con raíces de plantas principalmente leñosas, cuya interacción es reconocida desde hace más de un siglo por su relevancia ecológica y fisiológica en ambientes forestales (Brundrett, 2009) ya que juegan un papel crucial en el crecimiento, resistencia a fitopatógenos, así como a la absorción de agua y nutrientes (Smith y Read, 2008; Policelli *et al.*, 2020).

En las últimas décadas se ha demostrado que esta interacción no solo es bipartita, si no que coexisten e interaccionan con las bacterias del suelo, las cuales participan en la relación hongo-planta al estimular el crecimiento micelial, la colonización de raíces e incrementar el establecimiento y eficiencia de la micorrización, configurando un sistema simbiótico complejo (Frey-Klett y Garbaye, 2005; Frey-Klett *et al.*, 2007). Así mismo, estas interacciones permiten alcanzar una mejor estabilidad y resiliencia en los sistemas naturales, ya que se promueven la conservación de la biodiversidad, el flujo de energía y el ciclaje de nutrientes (Van Der Heijden *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha confirmado que ciertas bacterias rizosféricas desempeñan un papel funcional en la simbiosis ectomicorrízica al facilitar la iniciación y progresión del proceso de micorrización (Deveau *et al.*, 2007). A lo cual se deriva el concepto de bacterias auxiliaadoras de la micorrización (BAM), conocido en inglés como mycorrhiza helper bacteria (BAM), donde se incluye a un grupo diverso de bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, las cuales son capaces de facilitar y potenciar la simbiosis micorrízica (Garbaye, 1994). Se ha reportado que las BAM favorecen la micorrización a través de los siguientes aspectos: i) mejoran la recepción de la raíz al hongo simbionte, ii) facilitan el reconocimiento hongo-raíz, iii) estimulan el crecimiento micelial, iv) modifican las condiciones fisicoquímicas de la rizosfera, y v) promueven la germinación de propágulos fúngicos (Deveau *et al.*, 2007; Frey-Klett *et al.*, 2007).

El efecto de las bacterias sobre el desarrollo de la planta es de especial interés cuando se realizan coinoculaciones con hongos micorrízicos. Tales efectos de las BAM, individualmente o en la coinoculación con ectomicorrizas, han sido evaluadas en algunas especies de pinos (Poole *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2022). Sin embargo, los estudios sobre la interacción tripartita entre BAM, ectomicorrizas y pinos son escasos comparados con la gran diversidad de especies que existen de pinos, hongos y bacterias.

El presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto de la inoculación de dos hongos ectomicorrízicos (*Laccaria* sp. y *Hebeloma crustuliniforme*) y tres bacterias auxiliaadoras la micorrización (*Chromobacterium violaceum*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Azospirillum brasilense*) en la calidad de planta de vivero, su contenido nutrimental y tasa de colonización micorrízica en *Pinus greggii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas y sustrato

La semilla de *P. greggii* que se utilizó en la presente investigación procede de la localidad Ciénega Larga, Chignahuapan,

Puebla, México. Previo a la siembra, la semilla se remojó en agua durante 24 h con un cambio de agua a las 12 h. Posteriormente se desinfectó con peróxido de hidrógeno al 30 % durante 10 min y se sembró en un sustrato previamente esterilizado durante 30 min a 120 °C/15 lb. El sustrato consistió en una mezcla de arena, corteza y suelo de monte en una proporción 2:2:1. Se utilizaron contenedores forestales con capacidad de 140 mL. Durante la germinación y hasta la etapa de plántula se realizaron riegos cada tercer día a una dosis de 1 g/L. Los pinos permanecieron en invernadero durante 288 días.

Preparación de inóculo fúngico y bacteriológico.

El inóculo ectomicorrízico en polvo se realizó de acuerdo a la metodología seguida por Carrasco *et al.*, 2018 y se utilizaron los hongos ectomicorrízicos de *Laccaria* sp. y *H. crustuliniforme* con números de genbank de PV637204 y PV637205. El aislamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno de *A. brasilense* (UAP-151 y UAP 154) fueron realizadas de acuerdo con la metodología descrita por Paredes-Cardona *et al.*, 1988. En el caso de las bacterias solubilizadoras de fosfatos *C. violaceum* (BUAP-35), *A. calcoaceticus* (BUAP 40) se realizó de acuerdo con lo descrito por Carcaño *et al.* (2003). Las cepas bacterianas pertenecen al Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Inoculación

Una vez que las plantas germinaron, se realizó la primera inoculación de los hongos ectomicorrízicos (*Laccaria* sp. y *H. crustuliniforme*) y la segunda a los dos meses posteriores a la germinación. En cada inoculación se aplicó 1.5 g del hongo/planta a una concentración de esporas de 10^6 a 10^8 esporas/g. Al mismo tiempo que se realizaron las inoculaciones de los hongos ectomicorrízicos, se aplicaron las bacterias *A. brasilense*, *C. violaceum* y *A. calcoaceticus*, cada una con una población equivalente a 10^8 UFC mL⁻¹. En el caso de las bacterias se aplicaron 3 mL por planta en cada inoculación.

Diseño experimental y análisis de datos

El diseño experimental empleado fue completamente al azar con 16 tratamientos y 20 repeticiones. Los tratamientos consistieron en la aplicación de dos hongos ectomicorrízicos y tres bacterias auxiliaadoras de la micorrización en diferentes combinaciones, como se observan en el Tabla 1.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey con un $\alpha = 0.05$ y con el software estadístico (R Core Team, 2023)

Variables evaluadas

Los indicadores morfológicos evaluados fueron: altura de planta (cm), diámetro del cuello del tallo (mm) y peso anhidro total de la planta (g). Así mismo se evaluaron los índices morfológicos de esbeltez (IE) y Dickson (ICD).

Índice de Dickson

$$(ICD) = \frac{\text{Peso seco total}}{\text{Altura de la planta (parte aérea) (cm)} + \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Diámetro del cuello de la raíz (mm)}} + \frac{\text{Peso seco raíz (g)}}{\text{Diámetro del cuello de la raíz (mm)}}}$$

(Dickson *et al.*, 1960)

Tabla 1. Tratamientos.**Table 1.** Treatments.

No.	Tratamiento	Clave
1	Pino sin inocular (testigo)	T
2	<i>C. violaceum</i> + <i>A. calcoaceticus</i>	B1
3	<i>A. brasilense</i>	B2
4	<i>C. violaceum</i> + <i>A. calcoaceticus</i> + <i>A. brasilense</i>	B1+B2
5	<i>H. crustuliniforme</i>	H
6	<i>H. crustuliniforme</i> + <i>C. violaceum</i> + <i>A. calcoaceticus</i>	H+B1
7	<i>H. crustuliniforme</i> + <i>A. brasilense</i>	H+B2
8	<i>H. crustuliniforme</i> + <i>C. violaceum</i> + <i>A. calcoaceticus</i> + <i>A. brasilense</i>	H+B1+B2
9	<i>Laccaria</i> sp.	L
10	<i>Laccaria</i> sp. + <i>C. violaceum</i> + <i>A. calcoaceticus</i>	L+B1
11	<i>Laccaria</i> sp.+ <i>A. brasilense</i>	L+B2
12	<i>Laccaria</i> sp.+ <i>C. violaceum</i> + <i>A. calcoaceticus</i> + <i>A. brasilense</i>	L+B1+B2
13	<i>Laccaria</i> sp. + <i>H. crustuliniforme</i>	L+H
14	<i>Laccaria</i> sp. + <i>H. crustuliniforme</i> + <i>C. violaceum</i> + <i>A. calcoaceticus</i>	L+H+B1
15	<i>Laccaria</i> sp. + <i>H. crustuliniforme</i> + <i>A. brasilense</i>	L+H+B2
16	<i>Laccaria</i> sp. + <i>H. crustuliniforme</i> + <i>C. violaceum</i> + <i>A. calcoaceticus</i> + <i>A. brasilense</i>	L+H+B1+B2

n=20

$$IE = \frac{\text{Altura de la planta (parte aérea) (cm)}}{\text{Diámetro del cuello de la raíz (mm)}}$$

(Duryea, 1985)

El porcentaje de colonización micorrízica se evaluó de acuerdo con la metodología reportada por (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011). Se evaluó el contenido nutrimental total de nitrógeno, fósforo y potasio. La concentración de nitrógeno se determinó por el método semimicro-kjeldahl (Bremner y Mulvaney, 1982). En el caso del fósforo y potasio se realizó por colorimetría Olsen y K por fotometría de flama de acuerdo con (Chapman y Parker, 1986).

Extracción de ADN genómico de los hongos ectomicorrízicos

El ADN genómico se extrajo por el método de CTAB (Martínez-González *et al.*, 2017) con algunas modificaciones que permitieron eliminar de las muestras una mayor cantidad de pigmentos y compuestos fenólicos.

El ADN se cuantificó en un Nanodrop (Thermo, USA). De cada una de las muestras se prepararon diluciones a 20 ng para la amplificación de los genes.

Amplificación de los genes de los hongos ectomicorrízicos

Se amplificó el Espacio Transcripto Interno (ITS). La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 µL conteniendo: buffer de la enzima 1 x Taq DNA polimerasa, 0.8 mM de oxinucleósido trifosfatos (0.2 mM cada uno), 100 ng de DNA, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de GoTaq DNA (Promega, USA). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México), las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% preparado con 1x TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) y corrido a 87 V cm⁻¹ durante 1 h. El gel se tiñó con Gel red (Biotium, USA) y las bandas se visualizaron en un

transiluminador (Infinity 3000 Vilber Lourmat, Germany). Los productos amplificados se limpiaron mediante una reacción enzimática con ExoSAP-IT (Affymetrix, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, se cuantificaron y se prepararon para la reacción de secuenciación usando el Bigdyeterminator v. 3.1 (Applied Biosystems). Estos productos se secuenciaron en el Applied Biosystems modelo 3130XL (Applied Biosystems, USA).

Ensamble de las secuencias de los hongos ectomicorrízicos

Las secuencias de ambas hebras de cada uno de los genes se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999) para crear una secuencia consenso. Lo anterior, se comparó con las depositadas en GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), empleando la herramienta BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento en planta

Las plantas con mayor crecimiento se observaron en el tratamiento donde se inocularon los dos hongos ECM y tres BAM (L+H+B1+B2) (Figura 1) siendo tres veces mayor en promedio con respecto a las plantas donde no se aplicó ningún tipo de inóculo (T). Dichos resultados concuerdan con previos estudios con la misma especie de pino e inoculados con el hongo ectomicorrízico de *Laccaria laccata* (Rentería-Chávez *et al.*, 2017; Aguirre-Zamora *et al.*, 2021). Sin embargo, difiere con respecto a especies como *P. montezumae* inoculados con *Laccaria* var. *laccata* y *P. fluorescens* ya que reportaron una diferencia mínima con respecto al control, lo anterior se debe a que dicho pino es de lento crecimiento comparado con *P. greggii* (Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2019). En la misma Figura 1, observamos que para L+H+B1+B2, no existió diferencia estadísticamente significativa con respecto a las plantas en las que solo se inocularon con L+H, L+H+B2, L+B1+B2 y L+B1, respectivamente.

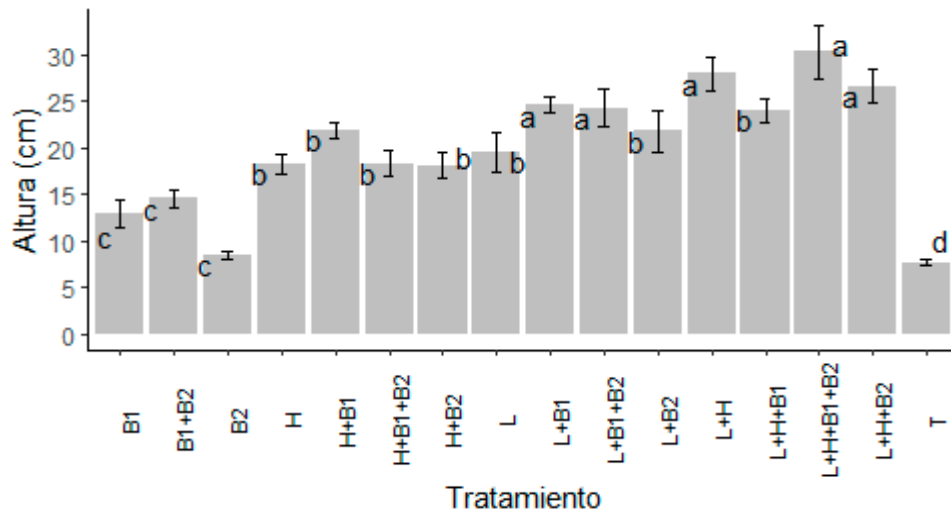


Figura 1. Medias de altura de planta (parte aérea), para *P. greggii* en los diferentes tratamientos. Valores con diferentes letras en la parte superior de las barras tuvieron diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Las abreviaturas de los tratamientos se encuentran en el Tabla 1.

Figure 1. Mean plant heights (aerial part) for *P. greggii* in the different treatments. Values with different letters at the top of the bars were significantly different from each other according to Tukey's test ($\alpha \leq 0.05$). Treatment abbreviations are shown in Table 1.

Biomasa total

La biomasa total de los *P. greggii* se vio favorecida en los tratamientos donde se inoculó con el hongo *Laccaria* sp. solo y en combinación con alguna bacteria (L, L+B1, L+B2, L+B1+B2). Del mismo modo se observó en los tratamientos con ambos hongos ectomicorrízicos (L+H) y bacterias (L+H+B1, L+H+B1+B2 y L+H+B2) así como en el tratamiento H+B1, todos sin diferencia significativa. Lo anterior nos indica que no hay un efecto sinérgico si solo se inoculan las bacterias o combinadas (B1, B2, B1+B2), solo el hongo de *Hebeloma* (H) y esta a su vez en los tratamientos en los que se le aplicó la

bacteria *A. brasilense* (H+B1+B2, H+B2). Debido a lo anterior es probable que el hongo *Laccaria* sp. tenga mayor cantidad de BAM que el hongo *H. crustuliniforme* por lo que sería necesario aplicar bacterias en pinos inoculados solo con este último hongo.

Al respecto, cabe señalar que se han registrado mayores valores en peso seco total para *P. greggii* inoculados con los hongos ECM (*H. crustuliniforme* y *Laccaria* sp.) y las BAM (*C. violaceum*, *A. calcoaceticus* y *A. brasilense*) así como en pinos inoculadas por separado con las especies ECM de *L. laccata*, *L. bicolor*, *H. leucosarx* (Rentería-Chávez *et al.*, 2017; Aguirre-

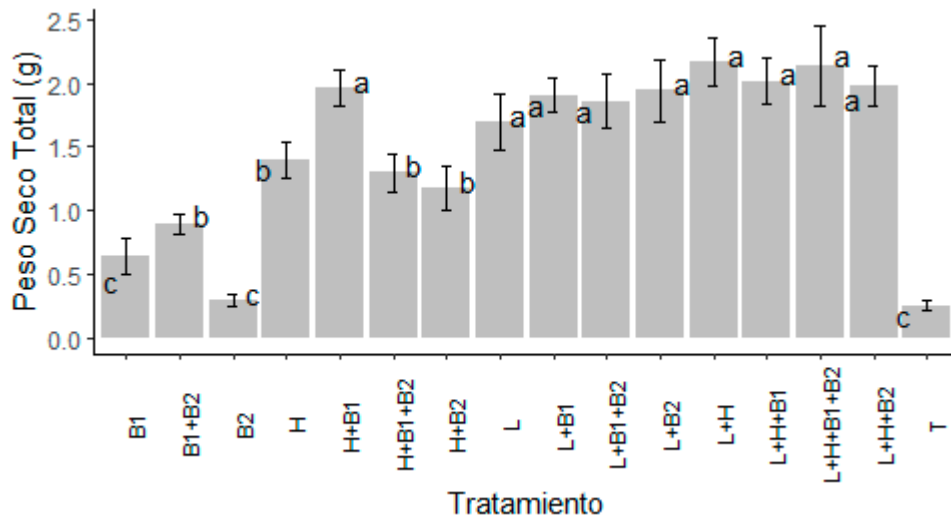


Figura 2. Medias de peso seco total (g) de *P. greggii* en los diferentes tratamientos. Valores con diferentes letras en la misma columna tuvieron diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Las abreviaturas de los tratamientos se encuentran en la Tabla 1.

Figure 2. Mean total dry weight (g) of *P. greggii* across treatments. Values with different letters at the top of the bars were significantly different from each other according to Tukey's test ($\alpha \leq 0.05$). Treatment abbreviations are shown in Table 1.

Zamora *et al.*, 2021). De igual forma se observó en *P. patula* y *P. pseudostrobus* a los 397 días e inoculados con los hongos ectomicorrízicos (*L. laccata*, *L. bicolor*, *L. proxima*, *H. leucosarx*, *H. mesophaeum* y *H. alpinum*) por separado y en combinación con respecto a los no inoculados (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011). En el caso *P. montezumae* han registrado pesos secos de hasta 7.8 veces mayor en los coinoculados con *L. laccata* y las bacterias *Cohnella* sp. y *A. brasilense* en comparación con los no inoculados, así como en los inoculados con *L. bicolor* con y sin *Pseudomonas fluorescens* (Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2019; Barragán-Soriano *et al.*, 2022).

Índice de esbeltez o robustez

Los valores con respecto a este índice variaron en los diferentes tratamientos y se presentaron valores más bajos en las plantas no inoculadas comparadas con el resto de los tratamientos (Figura 3). El índice de esbeltez en coníferas se recomienda que tenga valores menores a seis (Aldrete *et al.*, 2023). En el caso de los tratamientos analizados ninguno presentó valores menores a ese valor, aunque si alrededor de seis como fue el caso de las plantas que no fueron inoculadas con algún hongo ECM o BAM. Dichos valores altos en este índice concuerdan con un estudio en los que también se evaluó *P. greggii* inoculados con y sin un hongo ECM en diferentes sustratos (Vicente-Arbona *et al.*, 2019).

Calidad de planta

La calidad de planta expresada por medio del índice de Dickson en todos los tratamientos fue mayor en las plantas en las que se aplicó al menos un hongo ectomicorrízico (Figura 4); siendo estadísticamente diferente con respecto a los tratamientos en los que solo se aplicó al menos una bacteria y en las plantas en las que no se inocularon hongos.

Cabe señalar que todos los tratamientos presentaron valores menores que 0.20, al respecto, de acuerdo con el trabajo realizado por Dickson (1960), estos se clasificarían dentro de una calidad baja. Aunque la calidad de planta expresada en este no alcanzó valores óptimos (>0.20), las diferencias significativas con respecto al control evidencian un efecto positivo de las ectomicorrizas y las bacterias auxiliaadoras de la micorrización. Cabe destacar que la calidad de la planta se ve afectada por diversos factores que van desde el germo-plasma de la semilla hasta el uso de insumos adecuados y buenas prácticas culturales en el vivero, dentro de los que se encuentra la fertilización adecuada para la nutrición de la planta (Aldrete *et al.*, 2023). En el estudio realizado por Vicente-Arbona *et al.* (2019), con *P. greggii* observaron que el mejor tratamiento con respecto al índice de Dickson se presentó en las plantas que crecieron en el sustrato 5 (aserrín 60 %, corteza 10 %, composta 10 %, agrolita 10 % y vermiculita 10 %), fertilización de 6 g L^{-1} , e inoculadas con *L. laccata*, en donde se obtienen índices de 0.2 a 0.8 que corresponden a plantas de calidad media a alta. Lo anterior sugiere que, además de la utilización de hongos ectomicorrízicos, es necesario cierto nivel de fertilización para la obtención de valores más altos en el índice de Dickson. Cabe señalar que la colonización ectomicorrízica no se ha visto afectada o ha sido moderada en algunas coníferas a ciertos niveles de fertilización (Khasa *et al.*, 2001; Agathokleous *et al.*, 2023).

Colonización micorrízica

En cuanto a la colonización micorrízica se observaron valores superiores al 50 % en tratamientos inoculados con hongos ECM y al menos una bacteria (Figura 5), lo que coincide con lo reportado por Barragán-Soriano *et al.* (2022), quienes inocularon *P. montezumae* con *Laccaria* spp. y tres cepas auxilia-

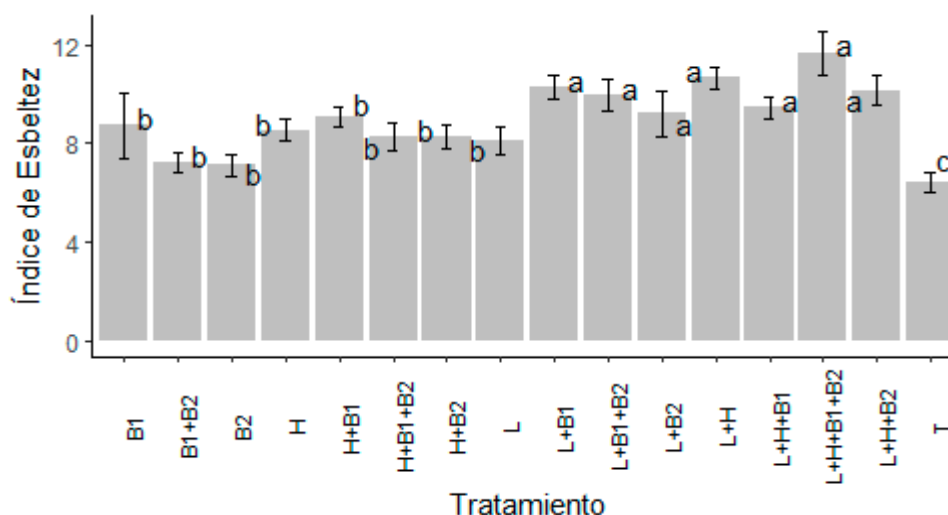


Figura 3. Índice de Esbeltez en los tratamientos analizados. Valores con diferentes letras en la parte superior de las barras tuvieron diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Las abreviaturas de los tratamientos se encuentran en la Tabla 1.

Figure 3. Slenderness Index for the treatments analyzed. Values with different letters at the top of the bars were significantly different from each other according to Tukey's test ($\alpha \leq 0.05$). Treatment abbreviations are shown in Table 1.

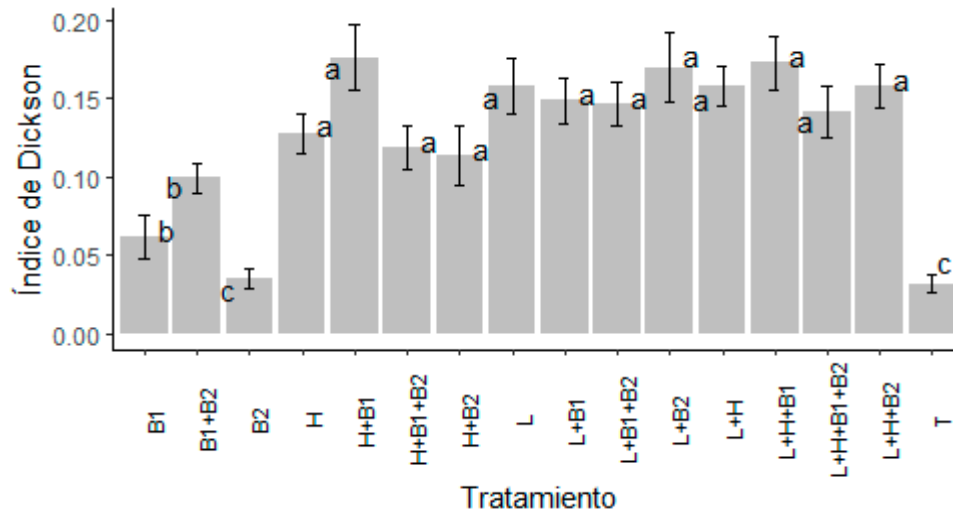


Figura 4. índice de Dickson en los diferentes tratamientos. Valores con diferentes letras en la parte superior de las barras tuvieron diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

Figure 4. Dickson index across treatments. Values with different letters at the top of the bars were significantly different from each other according to Tukey's test ($\alpha \leq 0.05$).

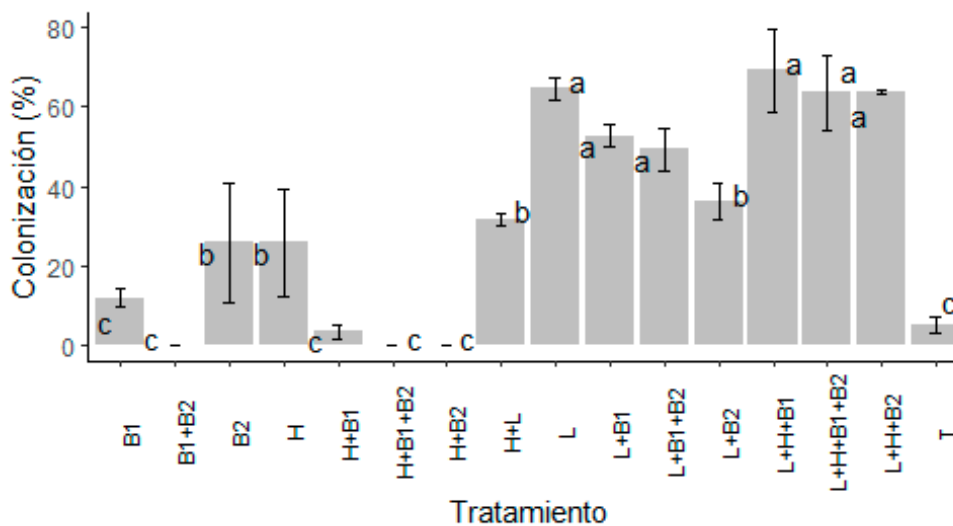


Figura 5. Medias del porcentaje de colonización micorrízica en *P. greggii* en los diferentes tratamientos. Valores con diferentes letras en la parte superior de las barras tuvieron diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Las abreviaturas de los tratamientos se encuentran en la Tabla 1.

Figure 5. Mean percentage of mycorrhizal colonization in *P. greggii* across treatments. Values with different letters at the top of the bars were significantly different from each other according to Tukey's test ($\alpha \leq 0.05$). Treatment abbreviations are shown in Table 1.

doras de la micorrización (una *Cohnella* y dos de *A. brasilense*) y observaron un efecto sinérgico entre hongos y bacterias, así como una alta adaptabilidad y excelente eficacia de la simbiosis en condiciones de vivero. Además, la acción de *Azospirillum* ha sido vinculada con el rol de "bacterias auxiliaadoras de micorrizas" (BAM), lo que favorece tanto la colonización como la funcionalidad de las hifas y mecanismos fisiológicos involucrados en el crecimiento vegetal (Frey-Klett *et al.*, 2007; Cassán *et al.*, 2020).

En los tratamientos que hubo baja o nula micorrización fueron los inoculados solo con el hongo *H. crustuliniforme* o en combinación con alguna bacteria (H, H+B1, H+B1+B2, H+B2) y en los que solo se inoculó con bacterias auxiliaadoras de la micorrización (B1, B2, B1+B2) así como en el testigo. Por otro lado, el tratamiento en el que no se aplicó hongo se esperaba una nula micorrización, sin embargo, existió una micorrización muy baja, esto debido a una posible contaminación de tratamientos donde sí se aplicó inóculo ectomicorrízico.

Contenido nutrimental de N-P-K, en plantas

En términos generales, el contenido nutrimental fue muy similar en el contenido de nitrógeno, no obstante, solo se observaron diferencias con respecto a plantas sin inocular (T) e inoculadas con *C. violaceum* y *A. calcoaceticus* (B1) (Figura

6). En cuanto al contenido nutricional de P, los tratamientos con los menores valores correspondieron a las plantas donde no se aplicaron inoculantes (T), además bacterias por separado (B1, B2). En cuanto a potasio todos los tratamientos donde se utilizaron los dos hongos y las tres bacterias fueron

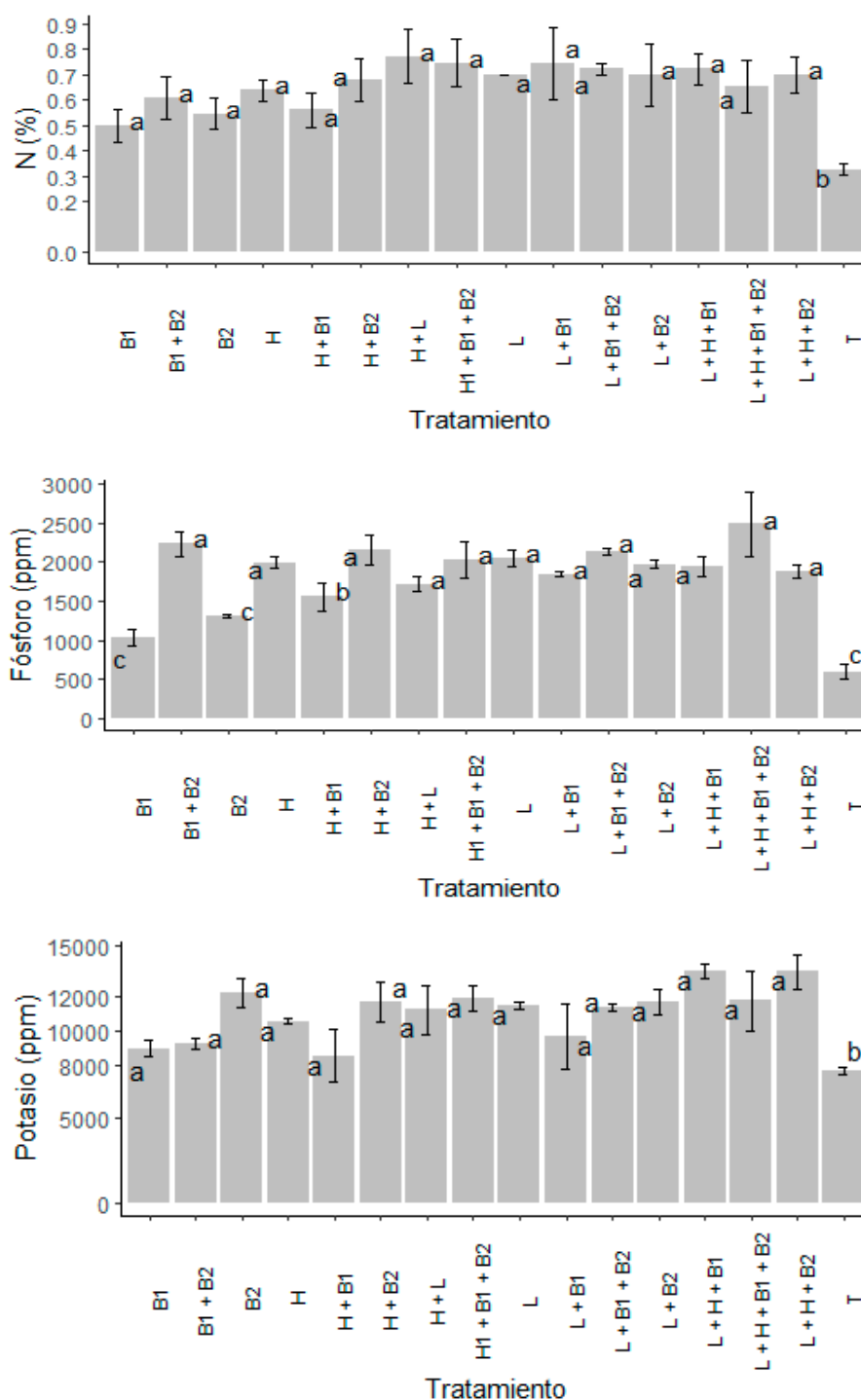


Figura 6. Contenido nutrimental (N, P y K) de *P. greggii* en los diferentes tratamientos. Valores con diferentes letras en la misma columna tuvieron diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

Figure 6. Nutrient content (N, P, and K) of *P. greggii* in the different treatments. Values with different letters at the top of the bars were significantly different from each other according to Tukey's test ($\alpha \leq 0.05$).

superior en comparación al testigo (T). Por lo tanto, se consideró que la mejora en contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio observada en los tratamientos combinados puede explicarse por mecanismos complementarios, donde las ECM aumentan la superficie de absorción y movilización de P y K, mientras que las BAM como *Azospirillum* y *Acinetobacter* solubilizan nutrientes y producen fitohormonas que estimulan el crecimiento de la planta (Zeffa *et al.*, 2019; He y Wan, 2021; Mujumdar *et al.*, 2023). Esto fortalece la necesidad de considerar consorcios microbianos como bioinoculantes multifuncionales en programas de reforestación. Al respecto, Mei *et al.* (2024), encontraron que bacterias endófitas combinadas con *Suillus grevillei* aumentaron la fosforilación en raíces de *P. massoniana*, mejorando su captación nutricional.

El conocimiento generado en este estudio confirmó que la coinoculación de hongos ectomicorrízicos (ECM) y bacterias auxiliaadoras de la micorrización (BAM) en *P. greggii* genera efectos sinérgicos en algunas variables morfológicas. Además, los tratamientos con los hongos (*Laccaria* sp., *H. crustuliniforme*) y bacterias (*A. brasilense*, *C. violaceum* y *A. calcoaceticus*) mostraron un incremento en biomasa total, altura, contenido nutrimental y colonización micorrízica.

El hecho de que no se encontrara diferencia significativa entre tratamientos inoculados con hongos y bacterias con respecto a los solo inoculados con hongos ectomicorrízicos en las variables altura, peso seco, puede deberse a la forma en la que se preparó el inoculo ectomicorrízico; ya que el hongo además de contener esporas en toda su estructura tiene bacterias, al respecto, en previos estudios han reportado una gran diversidad de bacterias dentro y en la superficie de hongos ectomicorrízicos (Liu *et al.*, 2018; Mei *et al.*, 2024).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la coinoculación de hongos ectomicorrízicos (*Laccaria* sp. y *H. crustuliniforme*) junto con bacterias auxiliaadoras de la micorrización (*C. violaceum*, *A. calcoaceticus* y *A. brasilense*) mejora significativamente diversos indicadores de la calidad en plántulas de *P. greggii*, en comparación con plantas no inoculadas o inoculadas de forma individual. Las plantas tratadas con ambos grupos microbianos presentaron los valores más altos en crecimiento y altura, biomasa total, contenido nutrimental (N, P, K) y porcentaje de colonización micorrízica, confirmando un efecto sinérgico positivo. Por otra parte, el índice de Dickson y de esbeltez no alcanzaron los niveles óptimos reportados en literatura, sin embargo, mostraron mejoras relativas en los tratamientos con coinoculación. La inoculación con *Laccaria* sp. mostró ser más eficaz en términos de colonización y respuesta morfológica que *H. crustuliniforme*, mientras que la combinación de bacterias actuó como agente facilitador de la simbiosis y de la absorción nutrimental. En conjunto, estos resultados respaldan el uso de consorcios microbianos como estrategia biotecnológica para mejorar la calidad de la planta en vivero, promoviendo un manejo forestal más eficiente, sostenible y adaptado a condiciones locales.

AGRADECIMIENTO

La primera autora agradece el financiamiento de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación a través de una beca de estancias posdoctorales por México para la formación y consolidación de las y los investigadores por México desarrollada durante el período 2022 al 2025 en la Universidad Autónoma Chapingo.

REFERENCIAS

- Agathokleous, E., Kitao, M., Komatsu, M., Tamai, Y., Harayama, H. y Koike, T. 2023. Single and combined effects of fertilization, ectomycorrhizal inoculation, and drought on container-grown Japanese larch seedlings. *Journal of Forestry Research*. 34(4): 1077–1094. doi: 10.1007/s11676-022-01565-3.
- Aguirre-Zamora, M., Pérez-Moreno, J., López-Lozano, N.E., Barragán Soriano, J.L., y Delgadillo-Martínez, J. 2021. La inoculación de *Pinus greggii* con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* favorece a las comunidades nativas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Biotecnia*. 23(2): 5–10. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i2.1302>
- Aldrete, A., Sánchez-Velázquez, J.R., Aguilera-Rodríguez, M., Cibrián-Tovar, D. y García-Díaz, S.E. 2023. Manual de buenas prácticas para el manejo de la salud de planta en viveros forestales. Estado de México, México: Universidad Autónoma Chapingo. Available at: <https://dicifo.chapingo.mx/publicaciones/> [Accessed: 20 February 2025].
- Barragán-Soriano, J.L., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J.J., Carcaño-Montiel, M.G., Delgadillo-Martínez, J., Cetina-Alcalá, V.M. y Mata, G. 2022. Coinoculación de *Pinus montezumae* (Pinaceae) con un hongo comestible ectomicorrízico y bacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Acta Botanica Mexicana*. 129: 1–17. doi: 10.21829/abm128.2021.1924.
- Bremner, J.M. y Mulvaney, C.S. 1982. *Methods of Soil Analysis*. In: Page, A. L. ed. Second. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, pp. 595–622. doi: 10.2134/agronmonogr9.2.2ed.
- Brundrett, M.C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*. 320(1): 37–77. doi: 10.1007/s11104-008-9877-9.
- Carcaño Montiel, M.G., López Reyes, L., Martínez Cruz, A. y Patrón Ibarra, J.C. 2003. Biofertilización de maíz con bacterias solubilizadoras de fósforo. Primer Encuentro de Investigación y Transferencia de Tecnología del Sector Agropecuario del Estado de Puebla. Colegio de Postgraduados, Puebla, México, Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología y Fundación Produce A.C. 122–26.
- Carrasco Hernández, V., Rodríguez Trejo, D.A., Pérez Moreno, J., Duarte Zaragoza, V.M., Navarro Sandoval, J.L. y Quintero Lizaola, R. 2018. Evaluación del costo de producción de inoculantes ectomicorrízicos neotropicales a base de esporas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 9(2): 417–429. doi: 10.29312/remexca.v9i2.1082.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J.J., Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales.

- Revista Chilena de Historia Natural. 84(1): 83–96. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2011000100006>
- Cassán F., Coniglio A., López G., Molina R., Nievas S., Carlan C.L.N. de, Donadio F., Torres D., Rosas S., Olivera-Pedrosa F., Souza E. de, Díaz-Zorita M., de-Bashan L., Mora V. 2020. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*. 56(4): 461–479. doi: 10.1007/s00374-020-01463-y.
- Chapman, H.D. y Parker, F.P. 1986. *Métodos de análisis para suelos, plantas y agua*. Editorial Trillas. México, DF.
- Deveau, A., Palin, B., Delaruelle, C., Peter, M., Kohler, A., Pierrat, J.C., Sarniguet, A., Garbaye, J., Martin, F. y Frey-Klett, P. 2007. The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBC6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist*. 175(4): 743–755. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02148.x.
- Dickson, A., Leaf, A.L. y Hosner, J.F. 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *The Forestry Chronicle*. 36(1): 10–13. <https://pubs.cif-ifc.org/doi/10.5558/tfc36010-1>
- Duryea, M.L. 1985. *Evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major tests: proceedings of the workshop held October 16-18, 1984*. Oregon State: Forest Research Laboratory, Oregon State University.
- Frey-Klett, P. y Garbaye, J. 2005. Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal–bacterial interactions. *New Phytologist*. 168(1): 4–8. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01553.x.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. y Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*. 176(1): 22–36. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x.
- Garbaye, J. 1994. Tansley Review No. 76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 128(2): 197–210. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium Series* Vol. 41, No. 41. pp. 95–98.
- He, D. y Wan, W. 2021. Phosphate-solubilizing bacterium *Acinetobacter pittii* gp-1 affects rhizosphere bacterial community to alleviate soil phosphorus limitation for growth of soybean (*Glycine max*). *Frontiers in Microbiology*. 12: 737116. doi: 10.3389/fmicb.2021.737116.
- Khasa, P.D., Sigler, L., Chakravarty, P., Dancik, B.P., Erickson, L. y Mc Curdy D. 2001. Effect of fertilization on growth and ectomycorrhizal development of container-grown and bare-root nursery conifer seedlings. *New Forests*. 22(3): 179–197. <https://doi.org/10.1023/A:1015674921878>
- Liu, Y., Sun, Q., Li, J. y Lian, B. 2018. Bacterial diversity among the fruit bodies of ectomycorrhizal and saprophytic fungi and their corresponding hyphosphere soils. *Scientific Reports*. 8(1). 11672. doi: 10.1038/s41598-018-30120-6.
- Martínez-González, C.R., Ramírez-Mendoza, R., Jiménez-Ramírez, J., Gallegos-Vázquez, C. y Luna-Vega, I. 2017. Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). *Plant Methods*. 13(1): 82. doi: 10.1186/s13007-017-0234-y.
- Mei, Y., Zhang, M., Cao, G., Zhu, J., Zhang, A., Bai, H., Dai, C. y Jia, Y. 2024. Endofungal bacteria and ectomycorrhizal fungi synergistically promote the absorption of organic phosphorus in *Pinus massoniana*. *Plant, Cell & Environment*. 47(2): 600–610. <https://doi.org/10.1111/pce.14742>
- Mujumdar, S., Bhoyar, J., Akkar, A., Hundekar, S., Agnihotri, N., Jaybhay, P. y Bhuyan, S. 2023. *Acinetobacter*: A versatile plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: *Plant-Microbe Interaction - Recent Advances in Molecular and Biochemical Approaches*. Academic Press, pp. 327–362. doi: 10.1016/B978-0-323-91875-6.00009-8.
- Paredes-Cardona, E., Carcaño-Montiel, M., Mascarua-Esparza, M.A. y Caballero-Medallo, J. 1988. Response of maize to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Rev Latinom Microbio*. 30(4): 351–355.
- Policelli, N., Horton, T.R., Hudon, A.T., Patterson, T.R. y Bhatnagar, J.M. 2020. Back to roots: The role of ectomycorrhizal fungi in boreal and temperate forest restoration. *Frontiers in Forests and Global Change*. 3: 97. doi: 10.3389/ffgc.2020.00097.
- Poole, E.J., Bending, G.D., Whipps, J.M. y Read, D.J. 2001. Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation *in vitro*. *New Phytologist*. 151(3): 743–751. doi: 10.1046/j.0028-646x.2001.00219.x.
- R Core Team. 2023. R: A language and environment for statistical computing (versión 4.3.1).
- Rentería-Chávez, M.C., Pérez-Moreno, J., Cetina-Alcalá, V.M., Ferrera-Cerrato, R. y Xoconostle-Cázares, B. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrícicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología*. 49(1): 93–104.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., Del Pilar Ortega-Larrocea, M. y Arellano-Torres, E. 2019. Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 90. doi: 10.22201/IB.20078706E.2019.90.2868.
- Smith, S.E., y Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis (Third edition)*. Academic Press. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6.
- Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. y Van Straalen, N.M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*. 11(3): 296–310. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x.
- Vicente-Arbona, J.C., Carrasco-Hernández, V., Rodríguez-Trejo, D.A. y Villanueva-Morales, A. 2019. Calidad de planta de *Pinus greggii* producida en sustratos a base de aserrín. *Madera y Bosques*. 25(2). doi: 10.21829/myb.2019.2521784.
- Wang, Y.-H., Hou, L.-L., Wu, X.-Q., Zhu, M.-L., Dai, Y. y Zhao, Y.-J. 2022. Mycorrhiza helper bacterium *Bacillus pumilus* HR10 improves growth and nutritional status of *Pinus thunbergii* by promoting mycorrhizal proliferation. *Tree Physiology*. 42(4): 907–918. doi: 10.1093/treephys/tpab139.
- Wu, X.-Q., Hou, L.-L., Sheng, J.-M., Ren, J.-H., Zheng, L., Chen, D. y Ye, J.-R. 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(4): 385–391. doi: 10.1007/s00374-011-0638-1.
- Zeffa, D.M., Perini, L.J., Silva, M.B., de Sousa, N.V., Scapim, C.A., Oliveira, A.L.M., Amaral Júnior, A.T.D. y Azeredo Gonçalves, L.S. 2019. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PLOS ONE*. 14(4): e0215332. doi: 10.1371/journal.pone.0215332.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. y Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7(1-2): 203–214. doi: 10.1089/10665270050081478.