

## EFECTO DE LA SEQUÍA EN LA RELACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE *PINUS PSEUDOSTROBUS* Y *PISOLITHUS TINCTORIUS*

MARIELA GÓMEZ-ROMERO<sup>1,3</sup>, ROBERTO LINDIG-CISNEROS<sup>2</sup> Y EK DEL VAL<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES), Campus Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México.

<sup>3</sup>Autor para correspondencia: mariela\_gomez@enesmorelia.unam.mx

**Resumen:** En suelos muy degradados, la retención de humedad es deficiente, causando condiciones de sequía y consecuentemente la limitación del crecimiento vegetal. Asociaciones simbióticas como las micorrizas pueden tener efectos positivos en la planta hospedera en términos de adquisición de nutrientes y posiblemente de tolerancia a la sequía. Para probar el efecto del hongo en condiciones de sequía, se realizó un ensayo con el hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius* en *Pinus pseudostrobus* con seis tratamientos, tres niveles de riego (cada 3, 7 y 14 días) en presencia/ausencia de inoculación. Se evaluó la supervivencia de las plantas mediante un modelo lineal generalizado con distribución binomial y una prueba proporcional de riesgo de Cox y el crecimiento se analizó mediante análisis de varianza. Se presentaron diferencias significativas en la supervivencia entre tratamientos ( $\chi^2_{(5)} = 197.93$  y  $P < 0.0001$ ). La prueba de Cox indica que existen diferencias significativas ( $P > 0.0001$ ), a partir del quinto mes de sequía se presenta la mayor mortalidad de plantas no inoculadas. Al finalizar el experimento, en las plantas regadas cada tres días, la supervivencia fue del 100 %, cada siete días, 90 % las inoculadas y 35 % las no inoculadas; cada 14 días, murieron todas las plantas sin inocular, mientras que las micorrizadas mantuvieron un 30 % de supervivencia. En las variables de crecimiento hubo diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) por efecto del tiempo de sequía, las plantas en simbiosis con *P. tinctorius* amortiguaron este efecto en sequía extrema. Estos resultados muestran la importancia de la asociación micorrízica para tolerar condiciones de sequía.

**Palabras clave:** supervivencia, crecimiento vegetal, ectomicorriza, estrés hídrico, acrisoles.

**Abstract:** In heavily degraded soils moisture retention is deficient, causing drought conditions and consequently limiting plant growth. Symbiotic associations such as mycorrhiza might have a positive effect in the host plant in terms of nutrient uptake and possibly for drought resistance. To test the effect of the fungi under drought conditions, an assay was established with the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* with *Pinus pseudostrobus*, with six treatments, three watering levels (every 3, 7, and 14 days) and presence/absence of inoculation. Plant survival was evaluated through generalized linear models and Cox proportional hazard test and shoot and root growth through analysis of variance. We found significant differences in survival among treatments ( $\chi^2_{(5)} = 197.93$  y  $P < 0.0001$ ). The Cox test indicates that significant differences occur from the fifth month, when the highest mortality occurs in non-inoculated plants. At the end of the experiment, when plant where watered every three days survival was 100 %, when watered every 7 days, 90 % for inoculated plants and 35 % for non-inoculated plants; when watered every 14 days all non-inoculated plants died and 30 % of the inoculated plants survived. In terms of growth variables, statistical differences ( $P < 0.0001$ ) where detected among drought treatments, plants in symbiosis with *P. tinctorius* were able to ameliorate extreme drought effects. These results show the relevance of the micorrhizal interaction for drought tolerance in plants.

**Key words:** survival, plant growth, ectomycorrhiza, hydric stress, acrisol.

Las situaciones de déficit hídrico son muy frecuentes en la vida de las plantas y de hecho, la disponibilidad de agua resulta ser el primer factor limitante del crecimiento vegetal. El estrés hídrico depende de la disponibilidad de agua, de la temperatura y de otros factores físicos de la atmósfera y del

suelo. Los suelos degradados son más propensos a presentar condiciones de sequía por la pérdida de materia orgánica y estructura, lo que reduce la capacidad de retención de agua de este suelo. En todo el mundo, donde dominan los suelos volcánicos frágiles, las malas prácticas agrícolas como el

uso excesivo de fertilizantes, el cultivo sin rotación ni descanso, pueden provocar que el suelo se degrade rápidamente. En México este proceso de degradación es común y como consecuencia, existen sitios severamente erosionados, como en la cuenca del Lago de Cuitzeo, dominados por acrisoles, suelos ácidos, arcillosos y pobres en nutrientes. Trabajos previamente desarrollados en esta zona han logrado el establecimiento de especies vegetales incluyendo fijadoras de nitrógeno como *Crotalaria pumila*, *Crotalaria rotundifolia* y *Senna hirsuta*, además de especies forestales arbóreas (Gómez-Romero *et al.*, 2013b). Durante los últimos años se han realizado diversos experimentos en sitios con un suelo derivado de acrisoles degradados, que se caracteriza por ser muy pobre en nutrientes y donde los fosfatos se encuentran secuestrados por minerales de hierro (Fe), por lo cual, se encuentran en formas químicas insolubles y no disponibles para las plantas. Se ha logrado establecer especies de pino resistentes a la sequía como *Pinus cembroides* (Farjón *et al.*, 1997; Constante-García *et al.*, 2009) y *Pinus greggii*, que se distribuyen en regiones de baja precipitación (López-Upton, 1999), sin embargo, no son especies nativas a la zona de estudio. *Pinus devoniana* es nativa y se distribuye localmente (Gómez-Romero *et al.*, 2012) pero es menos resistente al estrés por sequía. Por otro lado, *Pinus pseudostrobus* Lindl., es poco resistente pero en sitios apropiados presenta altas tasas de crecimiento. Las poblaciones de esta especie han sido fuertemente afectadas por la deforestación a lo largo de su rango de distribución en México (Rzedowski, 1978; López-Upton, 2002) por lo que requiere especial atención para encontrar mecanismos que incrementen su establecimiento y supervivencia en sitios degradados. Además, es la especie más deseada por las comunidades locales y es un buen modelo experimental por sus características de susceptibilidad, tanto a la deficiencia de nutrientes (Gómez-Romero *et al.*, 2012) y el estrés por la de sequía. *Pinus pseudostrobus* puede establecer asociación con hongos ectomicorrizógenos de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* (Carrasco, 2010) y las especies *Scleroderma texense* y *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch (Valdés *et al.*, 2010) entre otros.

Otra característica de los acrisoles degradados es que la retención de humedad es deficiente, a ciertas profundidades tienen una baja saturación de bases y arcillas de baja actividad. Por lo general, son suelos arcillosos que se compactan cuando carecen de cobertura vegetal, impidiendo la infiltración del agua (Pajares-Moreno y Gallardo-Lancho, 2010). Estos suelos se han desarrollado principalmente sobre rocas muy ácidas o arcillas muy meteorizadas, que sufren posterior degradación. Se caracterizan por presentar un contenido mayor de arcillas en los horizontes más profundos como resultado de procesos pedogenéticos, considerándose como suelos evolucionados (IUSS Working Group WRB, 2006).

Esto causa condiciones de sequía, aun en época de lluvias si éstas se interrumpen por períodos de pocas semanas. Este fenómeno es de particular importancia para especies

como *Pinus pseudostrobus* que es poco resistente al estrés por sequía (López-Upton, 2002). Con especies con estas características, una de las estrategias para su establecimiento en sitios bajo restauración ecológica, se podrían aprovechar asociaciones simbióticas entre plantas y hongos micorrizógenos (Gómez-Romero *et al.*, 2013a). Se ha propuesto que las micorrizas incrementan la resistencia a la sequía porque incrementan el volumen de exploración del suelo, más allá del que la planta puede explorar por si sola para obtener agua (Álvarez-Sánchez, 2009).

Asimismo, la formación de micorrizas, conlleva amplios cambios fisiológicos en el hospedero que hacen que éste desarrolle y responda al estrés ambiental de manera diferente a las plantas no micorrizadas (Linderman, 1993).

Se ha reportado que al aumentar el estrés en las plantas se presenta una disminución en su crecimiento en altura y producción de hojas, ésta es una respuesta característica al estrés hídrico (Levitt, 1980; Martínez-Vilalta *et al.*, 2002; Thied y Manninen, 2003). Este efecto se ha documentado con el crecimiento en altura de *Pinus leiophylla* (Martínez-Trinidad *et al.*, 2002) además en plantas cultivadas como el algodón, donde la cantidad de hojas y crecimiento en altura se ve afectado considerablemente por la carencia de agua (Méndez-Nateras *et al.*, 2007). Por otro lado, hay evidencias de que la resistencia fisiológica a la sequía ocasiona la acumulación de solutos en las hojas que las hace más resistentes (Medeiros y Pockman 2011; Charra-Vaskou *et al.*, 2011) y esto es lo que podría ocurrir con algunas interacciones bióticas que incrementan la tolerancia a la sequía en las plantas, como la asociación micorrízica (Haselwandter, 1997; Álvarez-Sánchez, 2009; Gómez-Romero *et al.*, 2013b). Los hongos micorrizógenos pueden contribuir a una mayor absorción de agua, además de nutrientes del suelo, (Smith y Read, 2010) las hifas se suman a las raíces de las plantas haciendo una mayor exploración del suelo. Regularmente en sitios de plantación que se encuentran en zonas expuestas a severo estrés hídrico, la simbiosis micorrízica puede ser de vital importancia (Barroetaveña *et al.*, 2012) para la supervivencia, crecimiento y establecimiento de las plantas.

Es por ello que se ha realizado inoculación con hongos micorrizógenos en vivero a especies de plantas que han sido destinadas a la repoblación; en la mayoría de las ocasiones se han utilizado especies de hongos cosmopolitas, como por ejemplo *Scleroderma* sp. y *Pisolithus tinctorius* (Valdés-Ramírez *et al.* 2010). El interés en utilizar *P. tinctorius*, se deriva de su éxito en la inoculación de plantas forestales en países de los cinco continentes. Las plantas con las que *P. tinctorius* establece simbiosis ectomicorrízica incluyen más de veinte géneros de gimnospermas y angiospermas con distribución mundial; incluyendo especies forestales de las familias Casuarinaceae, Dipterocarpaceae, Myrtaceae, Oleaceae y Pinaceae (Pérez-Moreno y Read, 2004).

El cuerpo fructífero de *Pisolithus tinctorius* mide entre 5 y 20 cm de altura y hasta 10 cm de diámetro, fibroso de

color pardo amarillento, esporas de color marrón canela, globosas de 7 a 12  $\mu\text{m}$  y espinas de hasta 2  $\mu\text{m}$  de largo. Fructifica al comienzo del otoño. Un aspecto muy importante es que puede sobrevivir en suelos empobrecidos o terrenos perturbados, así como en suelos de alta acidez, o con altas concentraciones de metales pesados y resiste períodos de estrés por sequía (García-Rodríguez *et al.*, 2006).

Aunado a esta problemática descrita, se ha documentado que en las próximas décadas se espera un incremento promedio anual de temperatura de 3.8 °C para el año 2090 (Flato y Boer, 2001), y se conoce que las altas temperaturas pueden, por sí solas e independientemente de la precipitación, aumentar el estrés hídrico sobre todo de las especies silvestres de bosque templado (Barber *et al.*, 2000; Angert *et al.*, 2005). Este efecto, puede tener la consecuencia de reducir los rangos actuales de distribución de casi todas las especies del bosque de pino-encino en México (Gómez-Mendoza y Arriaga, 2007) incluyendo a *Pinus pseudostrobus*.

Con base en esta información, se propuso que la micorrización de la conífera *Pinus pseudostrobus* con *Pisolithus tinctorius*, podría proveer resistencia al estrés hídrico amortiguando los cambios bruscos de disponibilidad de agua, por lo que plantas inoculadas tendrían la capacidad de sobrevivir ante condiciones de estrés hídrico en acrisoles degradados. Por ello, el objetivo planteado fue determinar el efecto de la micorrización de *P. pseudostrobus* con el hongo ectomicorrizógeno *P. tinctorius* en condiciones de estrés hídrico, evaluándose supervivencia y crecimiento de las plantas en condiciones controladas.

## Materiales y métodos

Las semillas de *Pinus pseudostrobus* de poblaciones locales se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 20 % (NaClO 1:5 H<sub>2</sub>O) durante un minuto y se colocaron en cajas Petri con papel filtro (Wathman No. 1) como sustrato humedecido con agua destilada y se estratificaron durante 15 días a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se trasladaron a una cámara de crecimiento a una temperatura constante de 25 °C con 12 horas luz, manteniendo la humedad durante el proceso de germinación. A las dos semanas una vez que la radícula había emergido, se realizó el trasplante a charolas de germinación con 50 cm<sup>3</sup> de sustrato por planta. Como sustrato se utilizó turba comercial (de musgo de Sphagnum) mezclada con agrolita en combinación 1:1 esterilizado durante dos períodos de 20 minutos en autoclave a una temperatura de 100 °C. Las plántulas fueron propagadas en condiciones de vivero con maya sombra del 30 % de cobertura. En el área del experimento, se hizo un recubrimiento con plástico transparente para proteger a las plantas de la lluvia o algún inóculo que pudiera ser propagado al estar más expuestas. Posteriormente, se realizó el trasplante a contenedores rígidos de plástico de 375 cm<sup>3</sup> con suelo acrisol óctico. A las cuatro semanas de edad, siendo plántulas fueron asignadas

al azar para el tratamiento de micorrización y fueron inoculadas de manera individual con 500,000 esporas del hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius* por cada planta en 0.5 g de turba micronizada como vehículo (Biosyneterra Solutions Inc. L'Assomption, Quebec, Canadá), haciendo un espacio en el sustrato cerca del tallo para descubrir la raíz y se aplicó la dosis de esporas directamente.

Se utilizó un diseño completamente al azar y se plantearon como factores experimentales la inoculación del hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius* y tres niveles de sequía con un total de seis tratamientos (Tabla 1) con 40 réplicas por tratamiento. La unidad experimental fue un pino en contenedor individual. Como sustrato se utilizaron muestras homogeneizadas de acrisol óctico de un sitio severamente degradado. Los análisis indicaron que es un suelo arcilloso (71.8 % de arcilla, limo 16 % y arena 12.2 %), ácido (pH 4.9), pobre en materia orgánica (0.083 %), pobre en nitrógeno (total 20.88 k/ha, 8.4 aprovechable) y potasio (92 k/ha, 36.88 asimilable), extremadamente pobre en fósforo (detectado solo en trazas), calcio muy pobre y magnesio medio. Los tratamientos de sequía se determinaron mediante la humedad del suelo que fue detectada por sensores (E C-5 Soil Moisture Sensor-M005 HOBO Data logger H21-002). Durante los primeros cuatro meses, las plantas permanecieron con humedad constante para asegurar que partieran de las mismas condiciones sin estrés hídrico. El de riego se realizó cada 3, 7 y 14 días con una solución hidropónica con macro y micronutrientes para evitar confundir el efecto de mortalidad o falta de crecimiento por falta de nutrientes. Los macronutrientes utilizados para la disolución hidropónica fueron: 136 mg/l de fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 202 mg/l de nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), 236 mg/l de nitrato de calcio Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 493 mg/l de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) y 80 mg/l de nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). Los micronutrientes: 2.86 mg/l de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 2.07 mg/l de sulfato manganoso (MnSO<sub>4</sub>), 0.22 mg/l de sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>), 0.051 mg/l de sulfato cítrico (CuSO<sub>4</sub>) y 0.09 mg/l de molibdato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub><sup>4-</sup>.

El riego se realizó con 60 ml de la solución nutritiva por planta para restablecer la humedad del sustrato, y permitir que no se acumularan sales.

**Tabla 1.** Tratamientos para probar el efecto de sequía en *Pinus pseudostrobus*. La presencia del hongo ectomicorrizógeno se marca "+" y "-" ausencia. Los tratamientos 1 y 2 son los testigos en presencia / ausencia de *Pisolithus tinctorius*.

Tratamiento	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Sequía (días)
1	-	3
2	+	3
3	-	7
4	+	7
5	-	14
6	+	14

El experimento tuvo una duración de 12 meses desde su inicio, se evaluó la supervivencia de forma mensual (se registró como planta viva a plantas turgentes con acículas verdes o amarillas y como planta muerta hasta que cambiara por completo su coloración de verde a café por efecto de pérdida de humedad o ausencia de actividad fotosintética), durante el experimento se evaluaron las siguientes variables de crecimiento: altura, diámetro a la altura de la base (DAB), cobertura (evaluado mediante la fórmula de la elipse  $[r_1 r_2 \pi]$  con dos radios de la copa para inferir el dosel), longitud de las ramas con hojas (medida indirecta del área foliar) que podría aproximar para conocer el área fotosintética. Se evaluó la suma de la longitud de cada rama en presencia de acículas y número de fascículos. La mitad de las plantas de cada tratamiento seleccionadas al azar fueron cosechadas para evaluar biomasa tanto aérea como radical, se midió la longitud y se calculó el volumen de la raíz. Para las variables de biomasa, las plantas fueron secadas en horno de secado durante 72 horas a 60 °C, hasta llegar a peso constante. Las variables de longitud se midieron con una regla graduada y el diámetro con un vernier. La presencia de la micorriza se evaluó con la verificación del cambio morfológico en las raíces de los pinos como engrosamientos, bifurcaciones y presencia de micelio, los cuales fueron fotografiados con una cámara Leica DFC 295 versión 7.0.1.0 (Figura 1).

Adicionalmente se monitoreó la humedad del sustrato y la pérdida gradual a través de los días mediante sensores colocados directamente en el sustrato de los contenedores de los distintos tratamientos (E C-5 Soil Moisture Sensor-M005 HOBO Data logger H21-002), así como la intensidad de la luz.

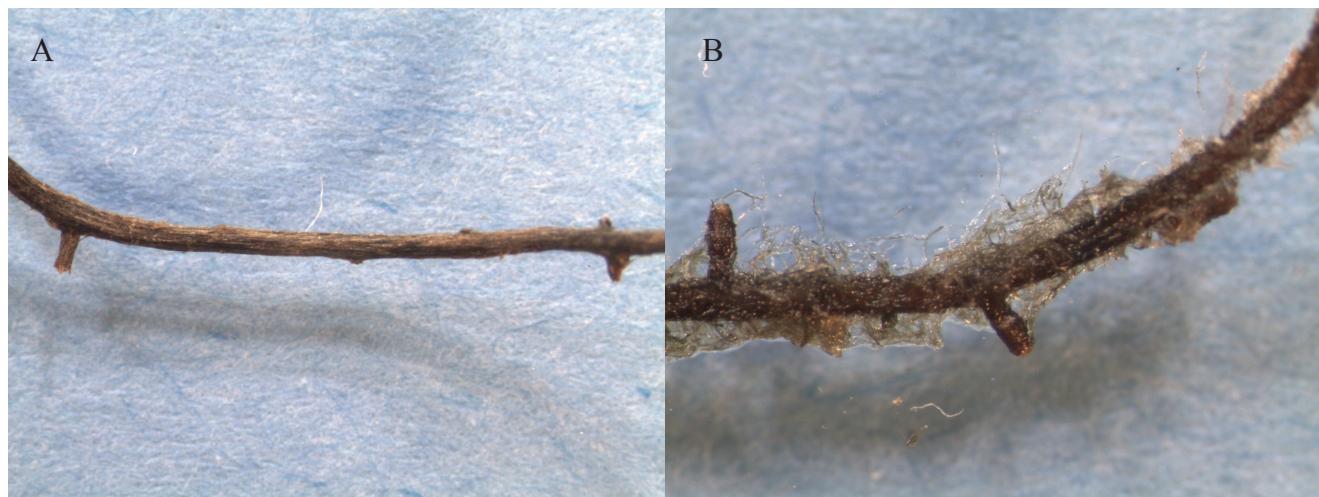
La supervivencia se analizó a través de un modelo lineal generalizado (GLM) para datos con distribución binomial y también por medio de una prueba proporcional de Cox para conocer el comportamiento de las curvas de supervivencia

entre los tratamientos a lo largo del tiempo. El análisis estadístico para las variables de crecimiento consistió en análisis de varianza (ANOVA) con nivel de significancia del 95 %. Se realizaron pruebas de comparación múltiple de medias por medio de Tukey. Para todos los análisis estadísticos se utilizó R (R Development Core Team, 2011).

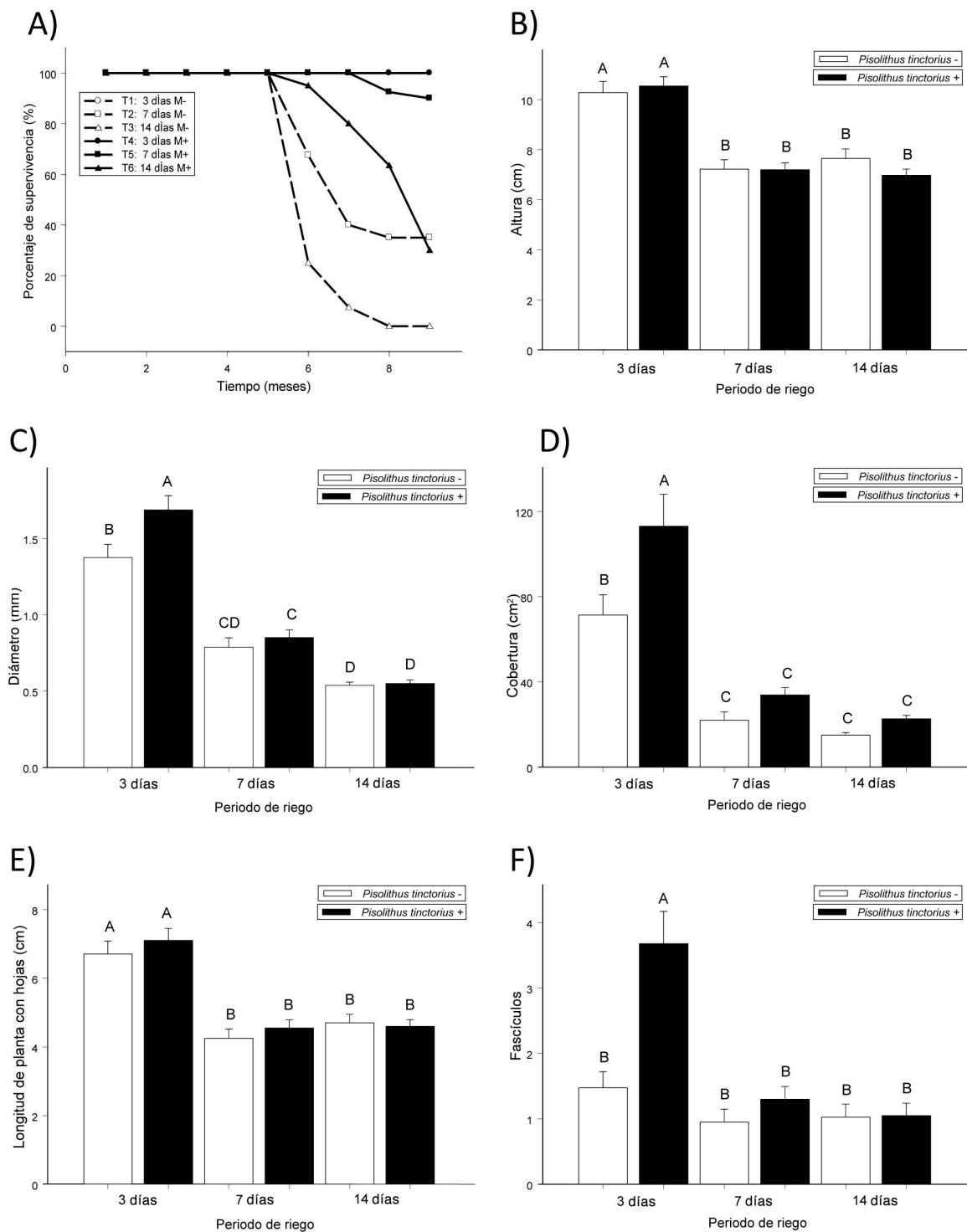
## Resultados

Por medio del análisis lineal generalizado con distribución binomial, se detectaron diferencias significativas para la supervivencia entre los tratamientos de estrés hídrico en presencia/ausencia del hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius* ( $\chi^2_{(5)} = 197.93$  y  $P < 0.0001$ ). La prueba de riesgo proporcional de Cox indicó que no solamente la supervivencia al final del ensayo sino que la forma en que se dio la mortalidad difiere ( $P < 0.0001$ ) a partir del quinto mes de sequía cuando se presenta la mayor mortalidad de las plantas no inoculadas, lo que muestra que la presencia del hongo ectomicorrizógeno *P. tinctorius* proporciona mayor resistencia al estrés hídrico aún en las plantas que se mantuvieron con riego solo cada quince días. Las curvas muestran que cuando las plantas de *Pinus pseudostrobus* reciben un riego constante (cada tres días), la supervivencia se mantiene en un 100 % para los tratamientos tanto de presencia como de ausencia de *P. tinctorius*, pero a partir de que las plantas se someten a estrés hídrico (riego cada siete días), la supervivencia de las plantas en ausencia del hongo disminuye hasta un 35 %, mientras que las plantas inoculadas mantienen un 90 % de supervivencia, sólo 10 % menos que las plantas con el período entre riegos más corto. Para el tratamiento de riego cada 14 días, las plantas en ausencia del hongo no resisten, muriendo en su totalidad, mientras que las plantas inoculadas mantienen un 30 % de supervivencia (Figura 2A).

En cuanto a las variables de crecimiento, se presentan



**Figura 1.** Raíz de *Pinus pseudostrobus* A) Ausencia de inoculación. B) Inoculada con el hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius*. Se muestra cambio morfológico como engrosamientos, bifurcaciones y manto fúngico.



**Figura 2.** Variables evaluadas de *Pinus pseudostrobus* en presencia / ausencia de *Pisolithus tinctorius* A) Supervivencia, B) Altura, C) Diámetro a la altura de la base (DAB), D) Cobertura, E) Longitud con hojas, F) Fascículos Las barras muestran el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.

diferencias estadísticamente significativas en todas ellas, siendo más notorio en algunas de ellas el efecto de los hongos ectomicorizógenos. En la altura se muestran diferencias significativas ( $F_{(5,234)} = 21.35, P < 0.0001$ ), para

esta variable se muestran diferencias por efecto del estrés hídrico, ya que las plantas con mayor crecimiento son las plantas con riego constante (Figura 2B). Para el diámetro a la altura de la base, se obtienen diferencias significativas

( $F_{(5,234)} = 54.61, P < 0.0001$ ) mostrando valores mayores las plantas micorrizadas con riego cada tres días, siendo éstas diferentes a las plantas en ausencia del hongo, éstas son diferentes con las plantas que se encuentran sometidas a estrés hídrico con riego cada siete días y éstas a su vez son diferentes de las plantas con riego solo cada 14 días (Figura 2C), lo que indica que el estrés hídrico afecta el crecimiento de esta variable.

Para la cobertura también se muestran diferencias significativas ( $F_{(5,234)} = 25.06, P < 0.0001$ ). Las plantas de mayor cobertura son las de mayor riego en presencia de *P. tinctorius*, siendo diferente a las plantas en ausencia y ambas diferentes a los tratamientos de estrés hídrico (Figura 2D). En la variable longitud de planta con hojas se presentan diferencias por efecto del estrés hídrico ( $F_{(5,234)} = 18.46, P < 0.0001$ ), (Figura 2E). Se evaluó la cantidad de fascículos formados en las plantas, probablemente es donde se puede dar un gasto energético alto sobre todo en las primeras etapas. El tratamiento que presentó mayor cantidad de fascículos ya formados fue el de riego cada tres días con presencia del hongo ( $F_{(5,234)} = 14.24, P < 0.0001$ ), (Figura 2F).

En cuanto a las variables de biomasa, se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos para el peso fresco de la biomasa aérea ( $F_{(5,234)} = 24.07, P < 0.0001$ ), con valores mayores en las plantas con riego constante; un aspecto interesante es que el tratamiento sometido a un mayor estrés hídrico (riego cada 14 días) mostró valores similares al tratamiento de estrés intermedio (riego cada 7 días) pero sólo si el pino estaba inoculado (Figura 3A). En cuanto a la biomasa aérea (peso seco) también se presentaron diferencias significativas ( $F_{(5,115)} = 10.96, P < 0.0001$ ) mostrando un patrón muy similar al peso fresco (Figura 3B). El peso fresco de la parte radical presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $F_{(5,115)} = 12.41, P < 0.0001$ ) el patrón se muestra muy similar a lo que ocurre con la parte aérea, la diferencia es que para esta variable se observa más claro el efecto de la presencia de los hongos micorrizógenos, ya que en los tratamientos con inoculación, muestran valores mayores y los que fueron sometidos a mayor estrés son capaces de compensar cuando están inoculados (Figura 3C). La biomasa radical (peso seco) muestra un patrón muy similar ( $F_{(5,115)} = 7.97, P < 0.0001$ ), (Figura 3D). Para la longitud de raíz también se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $F_{(5,115)} = 12.87, P < 0.0001$ ), aun cuando en esta variable los valores parecen ser más homogéneos, se presenta un efecto muy importante sobre una mayor elongación de las raíces en las plantas que fueron inoculadas, incluso, las de mayor estrés, presenta valores muy similares a las plantas con mayor riego (Figura 3E). Finalmente para el volumen de raíz se observan las ventajas que *Pisolithus tinctorius* está proporcionando a *Pinus pseudostrobus* mostrando diferencias significativas ( $F_{(5,115)} = 2.89, P = 0.016$ ), al igual que en todas las variables de biomasa, los valores menores corresponden a las plantas de

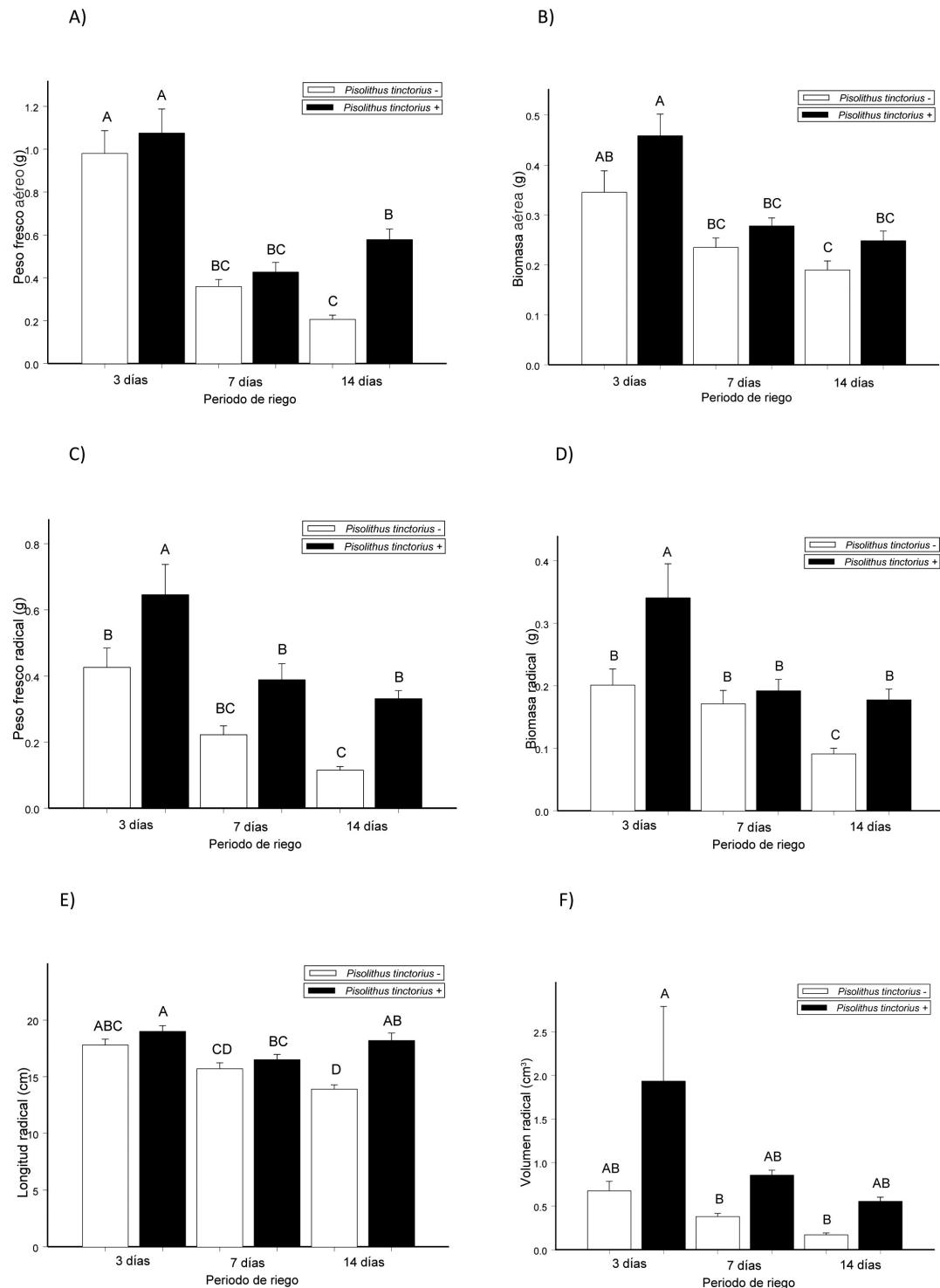
mayor estrés y en ausencia de los hongos micorrizógenos (Figura 3F).

La humedad del sustrato fue monitoreada por los sensores y un aspecto muy importante es que cuando las plantas están micorrizadas, la pérdida de humedad es menor tanto en el tratamiento de riego constante (Figura 4A) como en el tratamiento de riego cada siete días (Figura 4B) y se mantiene el mismo efecto en el tratamiento de mayor estrés hídrico, con riego cada 14 días (Figura 4C), incluso la diferencia se mantiene a lo largo del tiempo del experimento. Esto sugiere que la presencia del hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius*, puede incrementar la retención de humedad en la rizósfera de *Pinus pseudostrobus* en condiciones de sequía. También se monitoreó la luz en el experimento una vez que se inició el régimen de riego (Figura 4D), la mayor incidencia se presenta cuando las horas luz permanecen más tiempo a lo largo del día.

## Discusión

Los resultados del presente estudio muestran que la inoculación con el hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius* tiene un efecto positivo en el crecimiento, pero sobre todo en la supervivencia de *Pinus pseudostrobus* en condiciones de estrés hídrico. El efecto es evidente tanto en plantas en condiciones normales de riego en presencia del hongo, como en plantas que se encuentran en sequía extrema, que es en este punto cuando se presenta la mortalidad del total de las plantas en ausencia del hongo. La presencia del hongo ectomicorrizógeno *P. tinctorius* incrementa la retención de agua en la rizósfera de *P. pseudostrobus*. Al regar las plantas sólo una vez cada dos semanas, las plantas sin micorrizar no logran sobrevivir más de cuatro meses, mientras que las que las plantas inoculadas mantienen un 30 % de supervivencia al finalizar ese lapso de tiempo. Con riego semanal mantienen un 90 % de supervivencia, en tanto que las plantas que no fueron inoculadas presentan un 35 % de supervivencia. Lo que muestra que la relación simbiótica amortigua los efectos negativos de la sequía en la planta hospedera. El crecimiento se ve favorecido también, sobre todo en las variables de biomasa como en la biomasa aérea en condiciones de sequía extrema donde las plantas inoculadas presentan valores significativamente mayores, lo que representaría una mayor productividad. El efecto benéfico se nota especialmente en las variables evaluadas de la raíz como longitud y volumen radical, aspectos que son muy importantes para el establecimiento de las plantas en condiciones naturales. El uso de hongos ectomicorrizógeno en especies de pino propagadas en vivero y destinadas a establecimiento en repoblaciones se ha reportado en *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus pinea* y *Pinus radiata* (Pera y Parladé, 2005).

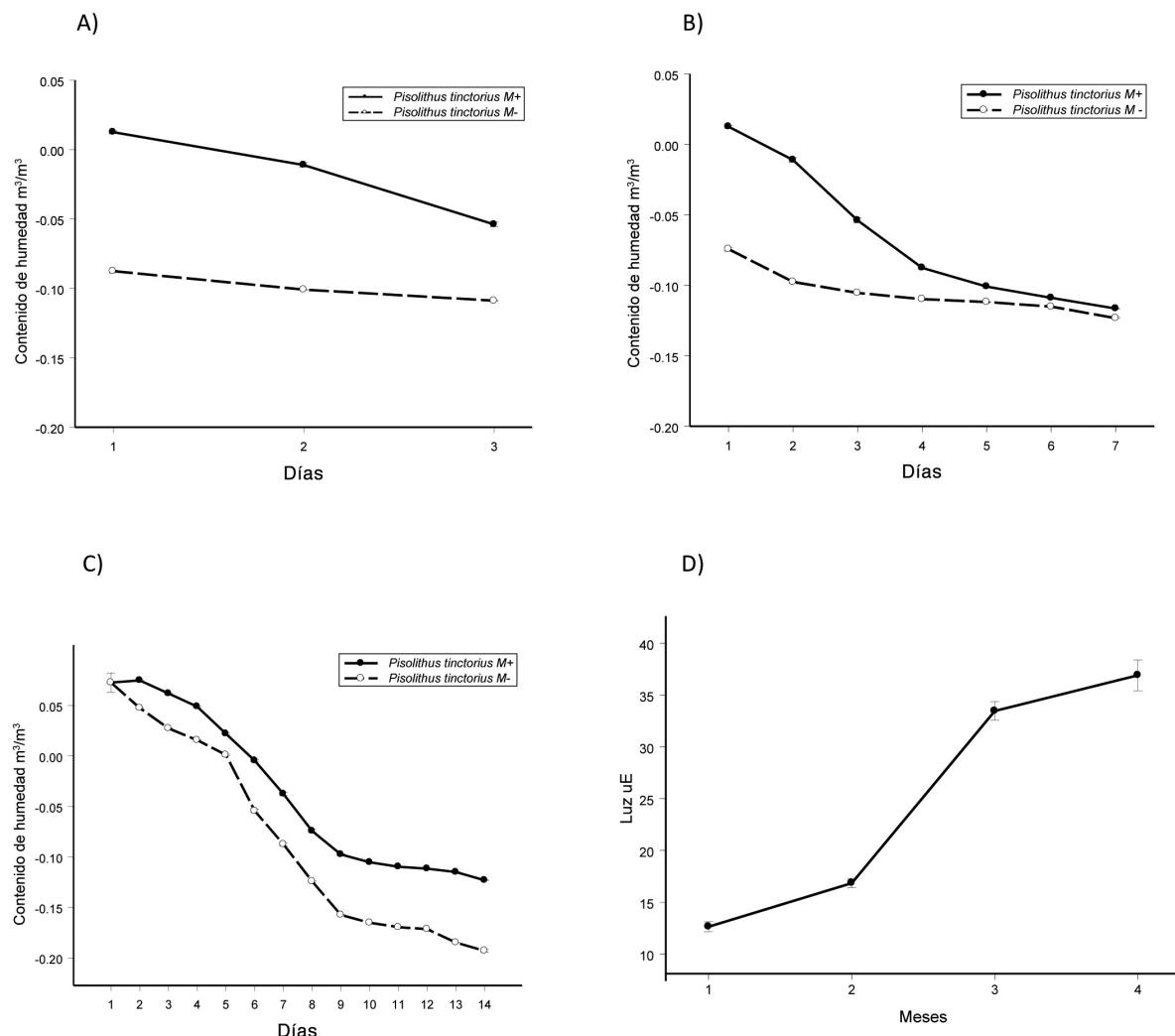
Otro de los aspectos importantes es que este déficit hídrico se ve reflejado como una limitación del crecimiento, como ocurrió en este estudio por ejemplo con la variable de



**Figura 3.** Variables evaluadas de *Pinus pseudostrobus* en presencia / ausencia de *Pisolithus tinctorius* A) Peso fresco aéreo, B) Peso fresco radical, C) Biomasa aérea, D) Biomasa radical, E) Longitud de raíz y F) Volumen de raíz de Las barras muestran el error estándar y las letras distintas grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.

longitud de planta con hojas, que es una medida indirecta para evaluar el área fotosintéticamente activa, mostrando una disminución significativa en las plantas de *Pinus pseudostrobus* con déficit hídrico. También se ha documentado

con otras especies de pino, como el estudio realizado por Prieto-Ruiz *et al.* (2004) donde evaluaron el efecto del estrés hídrico en el crecimiento de plantas de *Pinus engelmannii* encontrando que la reducción del potencial hídrico no



**Figura 4.** Contenido de humedad registrado en el sustrato de los contenedores con los distintos tratamientos. A) Contenido de humedad en sustrato con tratamiento de riego cada tres días, B) Cada siete días, C) Catorce días y D) Incidencia de luz sobre las plantas de *Pinus pseudostrobus* en presencia/ausencia de *Pisolithus tinctorius*. Las barras muestran el error estándar.

provocó daños físicos a las plantas, sin embargo, sí limitó su crecimiento en altura, diámetro a la altura de la base y biomasa, en contraste con el tratamiento control de riego constante. Mientras que para *Pinus pinea*, el efecto del estrés hídrico y térmico, se da en el crecimiento y variables de biomasa, ocasionando una reducción en el crecimiento de la yema apical. El efecto negativo del estrés hídrico en las plantas, regularmente es de dos a tres veces mayor que el de la temperatura. El aumento en temperatura, por el contrario puede ocasionar mayor engrosamiento del tallo (Martíñon-Martínez *et al.*, 2010). Las plantas de los tratamientos que son sometidos a riego constante, presentan mayores alturas, diámetros, biomasa aérea y radical, mientras que las plántulas con menor frecuencia de regado presentan menor brote de raíz (Royo *et al.*, 2001).

Se ha documentado que las situaciones de sequía o de estrés hídrico influyen de manera directa, no solo sobre la plan-

ta, sino también sobre las micorrizas (Lansac *et al.*, 1995). Adicionalmente, la asociación simbiótica puede representar un gasto energético para los pinos debido a que tienen que intercambiar hidratos de carbono (Choi *et al.*, 2005), la relación es positiva, ya que los hongos micorrizógenos proveen de nutrientes y agua a la planta, además de que les ayudan a amortiguar cambios bruscos de temperatura (Smith y Read, 2000). La disponibilidad de agua tiene el efecto directo en la disminución de la turgencia, e indirectamente limita el incremento de biomasa, por lo que una cantidad adecuada de agua disponible es esencial para mantener la productividad de las plantas (Montoya-Stuardo, 2000), de modo que la presencia de micorrizas puede influir de manera importante para tener disponibilidad de agua e incrementar la biomasa, sobre todo en la parte radicular (Gómez-Romero *et al.*, 2013a).

Por otro lado, el efecto del hongo en la planta hospedera,

también puede ser muy variable de acuerdo a las especies y el reconocimiento que se presente entre ellas. Existen reporte en los que no se den efectos positivos en la simbiosis, como en el caso de plantas de *Pinus halepensis* micorrizadas con el hongo *Suillus mediterranensis* y no micorrizadas, en un periodo de estrés hídrico de cuatro meses. La sequía inducida afectó negativamente a las plantas y el hongo no pudo compensar el efecto. Solo hasta restablecer el riego se mostró crecimiento en las plantas micorrizadas (Morte *et al.*, 2001). En este sentido, la inoculación con *Pisolithus tinctorius* puede incrementar significativamente el volumen y biomasa de *Pinus pseudostrobus* con respecto al control (Valdés-Ramírez *et al.*, 2010). Por otro lado, se han reportado experimentos con el hongo ectomicorrizógenos *P. tinctorius* inoculando plantas de *Cistus albidus* en condiciones de campo y mencionan que la inoculación presentó un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas hasta en un 130 % mayor que el de las plantas control (Alguacil *et al.*, 2003).

Otro aspecto importante de destacar es que la presencia de los hongos micorrizógenos pueden tener un efecto positivo en la retención de agua de la rizósfera, como se evaluó con los sensores, que muestran que la pérdida de humedad se presenta de manera más gradual en presencia de los hongos micorrizógenos a diferencia de las plantas donde no se realizó inoculación. En todos los tratamientos se presenta este efecto. Lo cual explicaría el incremento de la supervivencia y el crecimiento de *Pinus pseudostrobus*.

El presente estudio sugiere que con la asociación de tipo simbiótico entre *Pisolithus tinctorius* y *Pinus pseudostrobus* puede haber un buen desempeño desde etapas tempranas. Pera y Parladé (2005) sugieren que la utilización de plantas micorrizadas pueden jugar un papel importante en la reforestación de zonas fuertemente alteradas con problemas de sequía como es el caso de sitios con presencia se suelos acrisoles ócricos con falta de estructura y que pierden humedad rápidamente por ausencia de una cobertura vegetal. La inoculación con hongos micorrizógenos puede incrementar significativamente la supervivencia y crecimiento de *P. pseudostrobus* como se muestra en este experimento. Lo que podría reflejar una estrategia en la restauración de sitios con altos niveles de degradación (Gómez-Romero *et al.*, 2015).

La inoculación con el hongo ectomicorrizógenos *Pisolithus tinctorius* incrementó el crecimiento de las plantas, pero sobre todo la supervivencia de *Pinus pseudostrobus* amortiguando los efectos de estrés hídrico causados por sequía. El efecto positivo se da debido a los cambios fisiológicos en la planta hospedera por la presencia del hongo ectomicorrizógenos y a que en la rizósfera de las mismas se presenta una mayor retención de humedad que en los tratamientos en ausencia del hongo, como lo detectaron los sensores de humedad.

Esos aspectos pueden representar una estrategia para la restauración de sitios con niveles altos de degradación, des-

provistos de vegetación ya que podría incrementar la tolerancia a la sequía de las plantas hospederas, aun cuando a esto representa un gasto energético para mantener la simbiosis, sobre todo en etapas iniciales. En este sentido, se podrían implementar estas interacciones bióticas para el establecimiento inicial de especies que puedan realizar la asociación simbiótica así, poder crear condiciones microambientales que favorezcan el establecimiento futuro de otras especies y de esta manera sea posible la recuperación de la estructura y funcionalidad de un ecosistema degradado.

## Literatura citada

Alguacil M.M., Caravaca F., Azcón R., Pera J., Díaz G. y Roldán A. 2003. Improvements in soil quality and performance of mycorrhizal *Cistus albus* L. seedlings resulting from addition of microbially treated sugar beet residue to a degraded semiarid Mediterranean soil. *Soil Use and Management* **19**:277-283.

Álvarez-Sánchez J.F. (Ed.) 2009. *Ecología de micorrizas arbusculares y restauración de ecosistemas*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Angert A., Biraud S., Bonfils C., Henning C.C., Buermann W., Pinzon J., Tucker C.J. y Fung I. 2005. Drier summers cancel out the CO<sub>2</sub> uptake enhancement induced by warmer springs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:10823 -10827.

Barber V.A., Juday G.P. y Finney B.P. 2000. Reduced growth of Alaskan white spruce in the twentieth century from temperature-induced drought stress. *Nature* **405**:668-673.

Barroetaveña C., Bassani V.N. y Rajchenberg M. 2012. Inoculación micorrízica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plantas en vivero. *Bosque* **33**:163-169.

Carrasco-Hernández V., Pérez-Moreno J., Espinosa-Hernández V., Almaraz-Suárez J.J., Quintero-Lizaola R. y Torres-Aquino M.. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* **1**:567-577.

Charra-Vaskou K., Charrier G., Wortemann R., Beikircher B., Cocharth H., Ameglio T. y Mayr S. 2012. Drought and frost resistance of trees: a comparison of four species at different sites and altitudes. *Annals of Forest Science* **69**:325-333.

Choi D.S., Quoreshi A.M., Maruyama Y., Jin H.O. y Koike T. 2005. Effect of ectomycorrhizal infection on growth and photosynthetic characteristics of *Pinus densiflora* seedlings grown under elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Photosynthetica* **43**:223-229.

Constante-García V., Villanueva-Díaz J., Cerano-Paredes J., Cornejo-Oviedo E. H., y Valencia-Manzo S. 2009. Dendrocronología de *Pinus cembroides* Zucc. y reconstrucción de precipitación estacional para el Sureste de Coahuila. *Ciencia Forestal en México* **34**:1-39.

IUSS Working Group WRB. 2006. World reference base for soil resources 2006. A framework for international classification, correlation and communication. World soil resources reports 103, FAO, Roma. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/wsrr103e.pdf>

Farjón A., Pérez de la Rosa J.A. y Styles B.T. 1997. Guía de campo de los pinos de México y América Central. Kew Publishing Royal Botanic Gardens, Kew.

Flato G.M. y Boer G.J. 2001. Warming asymmetry in climate change simulations. *Geophysical Research Letters* **28**:195-198.

García-Rodríguez J.L., Pérez-Moreno J., Aldrete A., Cetina-Alcalá V.M., y Vaquera-Huerta H. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia* **40**:665-676.

Gómez-Mendoza L. y Arriaga L. 2007. Modeling the effect of climate change on the distribution of oak and pine species of Mexico. *Conservation Biology* **21**:1545-1555.

Gómez-Romero M., Lindig-Cisneros R., Sáenz-Romero C. y Villegas J. 2015. Effect of inoculation and fertilization with phosphorus in the survival and growth of *Pinus pseudostrobus*, in eroded acrisols. *Ecological Engineering* **82**:400-403.

Gómez-Romero M., Soto-Correa J.C., Blanco-García J.A., Sáenz-Romero C., Villegas J. y Lindig-Cisneros R. 2012. Estudio de especies de pino para restauración de sitios degradados. *Agrociencia* **46**:795-807.

Gómez-Romero M., De la Barrera E., Villegas J. y Lindig-Cisneros R. 2013a. Fertilización y asociación con especies pioneras herbáceas en el crecimiento de *Pinus pseudostrobus*. *Phyton* **82**:135-143.

Gómez-Romero, M., Villegas J., Sáenz-Romero C. y Lindig-Cisneros R. 2013b. Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera y Bosques* **19**:51-63.

Haselwandter K. 1997. Soil micro-organisms, mycorrhiza and restoration ecology. En: Urbanska K.M., Webb N.R., y Edwards P.J. (Eds.). *Restoration ecology and sustainable development*. Pp 65-80. Cambridge University Press, Cambridge.

Lansac A.R., Martín A. y Roldan A. 1995. Mycorrhizal colonization and drought interactions of Mediterranean shrubs under greenhouse conditions. *Arid Soil Research and Rehabilitation* **9**:167-175.

Levitt J. 1980. *Responses of plants to environmental stresses. Vol II. Water, radiation, salt, and other stresses*. Academic Press, Nueva York.

Linderman R.G. 1993. Effects of microbial interactions in the mycorrhizosphere of plant growth and health. In: R. Ferrera-Cerrato y R. Quintero Lizaola (Eds.), Agroecología, Sostenibilidad y Educación. Colegio de Postgraduados, Centro de Edafología. Montecillo, Estado de México. pp. 138-151.

López-Upton J. y Muñoz O. 1999. Selección familiar por tolerancia a sequía en *Pinus greggii* Engelm. I- Evaluación en plántula. *Agrociencia* **2**:111-123.

López-Upton J. 2002. *Pinus pseudostrobus* Lindl. En: Vozzo J.A. Tropical Tree Seed Manual. Pp.636-638. United States Department Agriculture, Forest Service. Disponible en: <<http://www.rngr.net/publications/ttsm/species>>

Martínez-Trinidad T., Vargas-Hernández J., Muñoz-Orozco A. y López-Upton J. 2002. Respuesta al déficit hídrico en *Pinus leophylla*: consumo de agua y crecimiento en plántulas de diferentes poblaciones. *Agrociencia* **36**:365-376.

Martínez-Vilalta J. y Pockman W.T. 2002. The vulnerability to freezing-induced xylem cavitation of *Larrea tridentata* in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* **89**:1916-1924.

Martíñón-Martínez R., Vargas Hernández J.J., López Upton J., Gómez Guerrero A. y Vaquera-Huerta H. 2010. Respuesta de *Pinus pinceana* Gordon a estrés por sequía y altas temperaturas. *Revista Fitotecnia Mexicana* **33**:239-248.

Medeiros J.S. y Pockman W. T.2011. Drought increases freezing tolerance of both leaves and xylem of *Larrea tridentata*. *Plant, Cell and Environment*. **34**:43-51.

Méndez-Natera, J.R., Lara L. y Gil-Marín J.A. 2007. Efecto del riego por goteo en el crecimiento inicial de tres cultivares de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) *Idesia* **25**:7-15.

Montoya-Stuardo F.J. 2001. Mejoramiento de la productividad de *Eucalyptus nitens* Maiden al primer año de establecimiento a través del riego y fertilización en un suelo rojo arcilloso del valle central de la VIII región. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad Católica de Temuco, Temuco. 60 pp.

Morte A., Díaz G., Rodríguez P., Alarcón J.J. y Sánchez-Blanco M.J. 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biología Plantarum* **44**:263-267.

Pera J. y Parladé J. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales* **14**:419-433.

Pajares-Moreno S. y Gallardo-Lancho J. F. 2010. Impacto de prácticas de manejo agrícola sobre la distribución de nitrógeno orgánico en un acrisol. *Tierra Latinoamericana* **28**:165-175.

Pérez-Moreno J. y Read D. 2004. Los hongos ectomicorrícos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* **29**:239-247.

Prieto-Ruiz J.A., Cornejo-Oviedo E.H., Domínguez-Calleros P.A., Návar-Chaidez J. de J., Marmolejo-Moncivais J.G. y Jiménez-Pérez J. 2004. Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero. *Investigación agraria, Sistema de Recursos Forestales* **13**:443-451.

Royo A., Gil L. y Pardos J.A. 2001. Effect of water stress conditioning on morphology, physiology and field performance of *Pinus halepensis* Mill. seedling. *New Forests* **21**:127-140.

Rzedowski J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México D.F.

Smith S.E. y Read D.J. 2000. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Londres

Le Thied D. y Manninen S. 2003. Ozone and water deficit reduced growth of Aleppo pine seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**:55-63.

Valdés-Ramírez M., Ambríz-Parra E., Camacho-Vera A. y Fierros-González A.M. 2010. Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* **1**:53-63.

Recibido: 6 de julio de 2014

Aceptado: 1 de diciembre de 2014