

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE INGENIERÍA EN
TECNOLOGÍA DE LA MADERA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA DE LA MADERA

Crecimiento de plantas de *Pinus devoniana* inoculadas con PGPRs y ectomicorrizas bajo condiciones *in vitro* e invernadero.

T E S I S

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

Alumna: Biol. Olga Leticia Enríquez Velázquez

Directores: Dr. Crisanto Velázquez Becerra

Dr. J. Enrique Ambriz Parra

Morelia, Michoacán, Febrero del 2016



A MI MADRE

CON AMOR Y GRATITUD

EN MEMORIA DE MI PADRE

PARA MÍ ABUELITOS POR LO
QUE REPRESENTAN PARA MÍ.

A MÍ FAMILIA POR SER MÍ LUZ Y MÍ
IMPULSO.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Proyecto “Estudio de las propiedades fisicoquímicas de suelos forestales y su influencia en la germinación y desarrollo de *Pinus michoacana* inoculadas con bacterias PGPRs” del Consejo de Investigación científica por el financiamiento a este trabajo. A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y en particular a la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, al programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante los dos años para continuar con mis estudios de la Maestría en ciencias.

Quiero agradecer a los siguientes laboratorios: Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Laboratorio de Interacción Suelo-Planta-Microorganismo, Laboratorio de Ecología Microbiana, todos pertenecientes al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo (UMNSH), por brindarme un espacio y por proporcionarme los organismo para poder realizar los experimentos.

A mis directores de tesis el Dr. Crisanto Velázquez Becerra y el Dr. J. Enrique Ambriz Parra, por su orientación y apoyo en la realización de ésta tesis, pero sobre todo por creer en mí.

Agradezco a la mesa de Sinodales la Dra. Mariela Gómez Romero, M.C. Idolina Flores Cortez y al Dr. José Cruz de León por sus comentarios, sugerencias y consejos para mejorar éste trabajo.

A los profesores el Dr. Raúl Espinoza, M.C. Héctor Sosa y la maestra Tere por compartir sus conocimientos y experiencias al así mismo su tiempo y sabiduría.

A Estelita y Tere por todo su apoyo académico pero también personal, por sus consejos tan acertados cuando más los necesitaba.

Agradezco a mi papá Romaldo Enríquez Guerrero se que siempre has estado conmigo como mi ángel de la guarda, me hubiera gustado conocerte, abrazarte y decirte lo importante que eres para mí. A mi mamá Celia Velázquez Aguilar por su apoyo en cada paso que he dado, por su amor y motivame a luchar por mis sueños. Agradezco a mi padrastro Adalberto Hernández, a mi hermana Eva Esmeralda y a mi hermano Betito por su cariño y por los buenos momentos que he pasado a su lado, me siento orgullosa de ustedes por qué no se rinden nunca, me han demostrado lo fuertes que son y eso me llena de energía para seguir adelante por ustedes. A mi primo Carlos que es como mi hermano gracias por no separarte de mi lado.

Quiero agradecer a mis abuelitos Ignacio Velázquez y Liboria Aguilar, porque gracias ellos entiendo un poco del idioma purhépecha y me han enseñado lo importante que es la familia, con ustedes he sido feliz. Papá Ignacio has sido importante para mí me enseñaste a que hay que leer y seguir aprendiendo día a día cosas nuevas, tú has sido un ejemplo de que la edad no importa para seguir estudiando, estoy muy orgullosa de ti por tu ejemplo de perseverancia. Mamá Liboria tú me cuidaste como una hija más, siempre te has preocupado por mí gracias por todo. A mi compañero y esposo Tomás Hurtado Herrera por tu apoyo para poder realizar mi sueño de seguir en este camino que escogí y por los gratos momentos compartidos.

A mis compañeros y amigos que conocí en la maestría Freddy, Yisus, Wilber, Ulises, Lalo, Garibay, Chilango, Fores, Lore, Ade, Ana, por su ánimo y consejos, quiero decirles que fue un placer conocerlos y compartir todas y cada una de las experiencias vividas. Con mucho cariño agradezco a mis amigos: Fran, Pato, Bianca, Emanuel, Nubia Xanaritz, Nuri, por qué han estado conmigo en las buenas, pero sobre todo han estado en las malas, con ustedes he vivido momentos que jamás olvidare.

A ti señor Dios por darme fuerzas y entendimiento para salir adelante, también por la oportunidad de crecer, disfrutar, sonreír, madurar, sufrir, pero sobre todo por mostrarme que la vida es más que buenas experiencias y aunque en ocasiones no te entiendo muchas cosas se que todo pasara y sanara algún día.

1. ÍNDICE GENERAL

	Página
1. ÍNDICE GENERAL.....	5
2. ÍNDICE DE CUADROS.....	7
3. ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	8
4. ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
5. RESUMEN.....	10
6. ABSTRACT.....	12
7. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	14
8. ANTECEDENTES GENERALES.....	16
9. CAPÍTULO I.....	18
9.1. INTRODUCCIÓN.....	18
9.2. ANTECEDENTES.....	20
9.2.1. Propiedades físicas del Suelo.....	21
9.2.2. Textura.....	21
9.2.3. Porosidad.....	21
9.2.4. Estructura.....	21
9.2.5. Propiedades químicas del Suelo.....	22
9.2.5.1. Potencial de hidrógeno (pH).....	22
9.2.5.2. Capacidad de intercambio catiónico (CIC).....	22
9.2.5.3. Nutrientes.....	22
9.2.6. Características biológicas del Suelo.....	22
9.3. JUSTIFICACIÓN.....	25
9.4. HIPÓTESIS.....	25
9.5. OBJETIVOS.....	25
9.5.1. OBJETIVO GENERAL.....	25
9.5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
9.6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
9.6.1. Descripción general de experimento.....	26
9.6.2. Microorganismos utilizados.....	26

9.6.3. Material Vegetal.....	26
9.6.4. Colecta y análisis de suelo.....	26
9.6.5. Esterilización superficial de las semillas.....	27
9.6.6. Montaje del experimento.....	27
9.6.7. Variables evaluadas.....	28
9.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
9.8. RESULTADOS.....	29
9.9. DISCUSIÓN.....	36
9.10. CONCLUSIONES.....	39
9.11. LITERATURA CITADA.....	40
10. CAPÍTULO II.....	46
10.1. INTRODUCCIÓN.....	46
10.2. ANTECEDENTES.....	48
10.3. JUSTIFICACIÓN.....	52
10.4. HIPÓTESIS.....	52
10.5. OBJETIVOS.....	52
10.5.1. OBJETIVO GENERAL.....	52
10.5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	53
10.6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
10.6.1. Descripción general de experimento.....	53
10.6.2. Material Biológico.....	53
10.6.3. Material vegetal.....	54
10.6.4. Esterilización superficial de las semillas.....	54
10.6.5. Montaje del experimento.....	54
10.6.6. Variables evaluadas.....	55
10.6.7. Extracción de Clorofila.....	56
10.6.8. Porcentaje de micorrización.....	57
10.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	57
10.8. RESULTADOS.....	58
10.9. DISCUSIÓN.....	68
10.10. CONCLUSIONES.....	71

10.11. LITERATURA CITADA.....	72
11. DISCUSIÓN GENERAL.....	79
12. CONCLUSIONES GENERALES.....	80
13. LITERATURA CITADA GENERAL.....	81
14. ANEXO I.....	84

2. ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CAPITULO I	
Cuadro 1.- Características fisicoquímicas de los suelos.....	29
Cuadro 2.- Macronutrientes y micronutrientes de los suelos.....	29
Cuadro 3.- Análisis estadístico multifactorial de longitud de la parte aérea...	84
Cuadro 4.- Análisis estadístico multifactorial de longitud de raíz.....	84
Cuadro 5.- Análisis estadístico multifactorial de peso fresco de la parte aérea.....	84
Cuadro 6.- Análisis estadístico multifactorial de peso fresco de raíz.....	85
Cuadro 7.- Análisis estadístico del número de raíces laterales factor suelo.....	85
Cuadro 8.- Análisis estadístico del número de raíces laterales suelo y bacteria....	85
Cuadro 9.- Macronutrientes y micronutrientes de dos diferentes soluciones nutritivas para el crecimiento de plantas.....	85
CAPITULO II	
Cuadro 1.- Descripción de tratamientos.....	55
Cuadro 2.- Porcentaje de colonización analizados por sección de raíz del mismo tratamiento.....	66
Cuadro 3.- Porcentaje de colonización analizado por sección de raíz entre los diferentes tratamientos.....	66

3. ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
CAPITULO I	
Gráfica 1.- Longitud de raíz de plantas de <i>Pinus devoniana</i> crecida en tres suelos procedentes de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro.....	30
Gráfica 2.- Longitud de raíz de plantas de <i>Pinus devoniana</i> con el uso de las bacterias y sin inóculo.....	31
Gráfica 3.- Peso fresco de la parte aérea de plantas de <i>Pinus devoniana</i> con el uso de las bacterias y sin inóculo.....	32
Gráfica 4.- Peso fresco de raíz de plantas de <i>Pinus devoniana</i> crecidas en tres suelos procedentes de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro.....	33
Gráfica 5.- Peso fresco de raíz de plantas de <i>Pinus devoniana</i> con el uso de las bacterias y sin inóculo.....	33
Gráfica 6.- Peso fresco de raíz de plantas de <i>Pinus devoniana</i> crecidas en el suelo procedente de Ciudad Hidalgo con el uso de las bacterias y sin inóculo.....	34
Gráfica 7.- Número de raíces laterales de las plantas de <i>Pinus devoniana</i> crecidas en el suelo procedente de Ciudad Hidalgo con el uso de las bacterias y sin inóculo.....	35
CAPITULO II	
Gráfica 1.- Altura de las plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos, durante los siete meses del experimento.....	58
Gráfica 2.- Diámetro del tallo de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos, durante los siete meses del experimento.....	59
Gráfica 3.- Cobertura de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos, durante los siete meses del experimento.....	60
Gráfica 4.- Longitud del tallo y de raíz de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos.....	61

Gráfica 5.- Diámetro del tallo de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos.....	61
Gráfica 6.- Cobertura aérea de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos.....	62
Gráfica 7.- Peso fresco de la parte aérea y de raíz de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos.....	63
Gráfica 8.- Peso seco de la parte aérea y de raíz de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos.....	64
Gráfica 9.- Clorofila total de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos.....	64
Gráfica 10.- Volumen de raíz de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> en diferentes tratamientos.....	65

4. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Toma de datos de cobertura de plantas de <i>Pinus devoniana</i>	56
Figura 2.- Medición del porcentaje de micorrización en raíces de plantas de <i>Pinus devoniana</i>	57
Figura 3.- Raíces colonizadas de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> inoculadas con hongos ectomicorrízicos.....	67
Figura 4.- Raíces colonizadas de plántulas de <i>Pinus devoniana</i> con hongos ectomicorrízicos.....	67

5. RESUMEN

- Plantas de *Pinus devoniana* inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) y dos hongos ectomicorrízicos, las cuales fueron crecidas en dos sistemas diferentes.
- En el capítulo I se realizó un experimento *in vitro*, en el cual se analizó el comportamiento de las variables de crecimiento de plantas de *Pinus devoniana* en tres suelos de diferente procedencia y su interacción con las bacterias *Bacillus megaterium* (UMCV1) y *Bacillus cereus* (L254). Los suelos utilizados fueron procedentes de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro, a estos se les realizó un análisis fisicoquímico. El ensayo tuvo una duración de cuarenta y cinco días y al término de este se realizó una cosecha destructiva donde se tomaron datos de variables de crecimiento vegetal como longitud de la parte aérea y de raíz, peso fresco de la parte aérea y de raíz y número de raíces laterales. Los resultados obtenidos muestran que los tres suelos se encuentran en un rango de pH de 5 a 6, para el contenido de materia orgánica 4.3 a 6.83 %, la capacidad de intercambio catiónico es de entre 21.57 y 33.33 Cmol(+)Kg⁻¹ y la porosidad se localiza entre los porcentajes de 51.69 a 59.53 %. Los suelos presentaron una deficiencia de fósforo, pero todos los demás nutrientes analizados son los suficientes para el crecimiento de las plantas. El factor suelo influyó en el crecimiento de *P. devoniana* en las variables de longitud de raíz y peso fresco de raíz. El factor bacteria tuvo influencia en la longitud de raíz, peso fresco de la parte aérea y peso fresco de raíz. En los suelos con baja presencia de fósforo incrementan la longitud de raíz de las plantas de *P. devoniana*. La presencia de las bacterias incrementan el crecimiento de las plantas de *P. devoniana*, pero la eficiencia de las bacterias se ve influenciada dependiendo del tipo de suelo en el cual es inoculada.
- En el capítulo II se llevó a cabo un experimento en invernadero con la finalidad de analizar el crecimiento de plantas de *Pinus devoniana* y la inoculación de dos ectomicorrizas *Laccaria* spp, *lactarius deliciosus* y la bacteria *Bacillus cereus* (L254). El sustrato utilizado fue Peat-most con

arena (2:1 v:v). El experimento tuvo una duración de siete meses y durante el transcurso de éste se evaluaron las variables de crecimiento de altura, cobertura y diámetro. Al finalizar el experimento se realizó una cosecha destructiva donde se evaluaron las variables de longitud de tallo y de raíz, peso fresco de la parte aérea y de raíz, peso seco de la parte aérea y de raíz, volumen de raíz, clorofila y finalmente se determinó el porcentaje de micorrización. Los resultados obtenidos muestran que las plantas de *P. devoniana* inoculadas con la combinación de *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus* tuvieron los mayores valores en la mayoría de las variables analizadas, siendo diferentes significativamente con las plantas de todos los demás tratamientos. El porcentaje de colonización fue de 31% para la combinación de *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus* y este fue significativamente diferente con los demás tratamientos. Se concluye que los dos hongos ectomicorrízicos utilizados tienen un mayor efecto en las variables de crecimiento de *P. devoniana* al inocularse de manera simultánea.

PALABRAS CLAVE. *Pinus devoniana*, suelo, bacterias, ectomicorrizas y crecimiento.

6. ABSTRACT

- *Pinus devoniana* plants inoculated with plant growth promoting bacteria (PGPRs) and two ectomycorrhizal fungi, which were grown in two different systems.
- Chapter I an *in vitro* experiment, in which the behavior of the variables of plant growth in three *Pinus devoniana* soils of different origin and their interaction with the bacteria *Bacillus megaterium* (UMCV1) and *Bacillus cereus* (L254) was analyzed was performed. The soils used were from Ciudad Hidalgo, Cherán and Pátzcuaro, these underwent a physicochemical analysis. The experiment lasted forty-five days and at the end of this destructive harvest data where plant growth variables as length of the shoot and root fresh weight of shoot and root were taken and number was made lateral roots. The results show that the three soils found in a pH range of 5 to 6, for the organic matter content 4.3 to 6.83%, the cation exchange capacity is between 21.57 and 33.33 Cmol (+) kg⁻¹ and the porosity is located between the percentages of 51.69 to 59.53%. The soils presented a deficiency of phosphorus, but all other nutrients analyzed are sufficient for plant growth. The soil factor influenced the growth of *P. devoniana* in the variables of root length and root fresh weight. The bacterium factor influenced the root length, fresh weight of shoot and root fresh weight. In soils with low phosphorus increased presence of root length of *P. devoniana* plants. The presence of the bacterium increases the plant growth of *P. devoniana*, but the efficiency of bacterium is influenced depending on the type of soil on which it is inoculated.
- Chapter II conducted a greenhouse experiment in order to analyze the growth of *Pinus devoniana* plants and inoculation of two ectomicorrizas *Laccaria* spp, *Lactarius deliciosus* and *Bacillus cereus* (L254). The substrate used was sand Peat-most (2: 1 v: v) and during the experiment variables were evaluated growth height and diameter coverage. At the end of the experiment where destructive harvesting variables length of

stem and root were evaluated, fresh weight of shoot and root dry weight of shoot and root, root volume, chlorophyll was performed and finally He determined the percentage of mycorrhizal colonization. The results show that *P. devoniana* plants inoculated with the combination of *Laccaria sp* and *Lactarius deliciosus* had the highest values in most of the variables analyzed, being significantly different plants all other treatments. The colonization percentage was 31% for the combination of *Laccaria spp* and *Lactarius deliciosus* and this was significantly different to other treatments. We conclude that the two ectomycorrhizal fungi used have a major effect on the growth of *P. devoniana* variables when inoculated simultaneously.

KEYWORDS. *Pinus devoniana*, soil, bacterium, ectomycorrhizal and growth.

7. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Pinus* está representado por aproximadamente 111 especies a nivel mundial (Perry *et al.*, 1998). En México el número de especies registradas son 47 del total del género *Pinus* del mundo (Farjon y Styles, 1997; Ledig, 1997).

Del género *Pinus* se obtienen una gran variedad de productos como madera, trementina, carbón, entre otros, así mismo es considerado un recurso forestal muy importante (Martínez, 1992).

Entre las especies nativas de *Pinus* encontradas en nuestro país tenemos a *Pinus devoniana* (Perry, 1991). Esta especie característica del bosque de coníferas es considerada como prioritaria por su alto valor económico, social y ecológico en México, al igual que es una especie forestal considerada para conservación *ex situ* (FAO, 2011).

Los recursos forestales en México han tenido un deterioro que va en crecimiento, por lo que realizar de forma eficiente reforestaciones es de suma importancia y con ello tener recuperación de suelos y aéreas boscosas (Cetina-Alcalá *et al.*, 1999).

La asociación micorrícica confiere ventajas a las plantas para el establecimiento en condiciones de estrés (Haselwandter, 1997; Álvarez, 2009). Así mismo se sabe de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPRs) son capaces de estimular el crecimiento de la planta directa o indirectamente (Vessey, 2003). Por lo que las interacciones entre PGPRs, hongos micorrízicos y plantas tienen funciones favorables (Artursson *et al.*, 2006).

En este trabajo se evaluó el crecimiento de plantas de *Pinus devoniana* y se dividió en dos capítulos. El primer capítulo fue un experimento *in vitro*. Las plantas de *P. devoniana* fueron crecidas en tres suelos de diferente procedencia y en éstas se realizó la inoculación de las bacterias *Bacillus megaterium* (UMCV1) y *Bacillus cereus* (L254), se tomaron datos de variables de crecimiento de las plantas como longitud de raíz, peso fresco, entre otros. El crecimiento de *P. devoniana* varió en cada procedencia de suelo.

En segundo capítulo se realizó un experimento en invernadero. Las plantas de *P. devoniana* fueron inoculadas con dos hongos ectomicorrízicos *Laccaria* spp, *Lactarius deliciosus* y la bacteria *Bacillus cereus* (L254), se evaluaron variables del crecimiento de la parte aérea y de raíz. Los resultados muestran que la combinación de hongos ectomicorrízicos incrementó las variables de crecimiento de las plantas de *P. devoniana*.

Los resultados en ambos capítulos se discuten en relación a microorganismos y *Pinus devoniana*.

8. ANTECEDENTES GENERALES

Los ecosistemas forestales poseen gran diversidad biológica al igual que desempeñan funciones para el ambiente y abastecen a la población humana de alimentos y producción de madera para diferentes usos (SEMARNAT, 2009).

Los ecosistemas que ocupan mayor superficie en México son los matorrales xerófilos (41 %), bosques templados (24 %) y las selvas (22 %) (INEGI, 2007). En esta riqueza forestal los pinos tienen gran importancia económica (Rzedowski, 2006).

La especie forestal *Pinus devoniana* Lindley (1839) es conocida con los nombres comunes pino lacio, tsihiréen, pino escobetón, ocote gretado, pino blanco (CONABIO, 2009); Pino Michoacán.

Clasificación taxonómica.

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Pinophyta*

Clase: *Pinopsida*

Orden: *Pinales*

Familia: *Pinaceae*

Género: *Pinus*

Subgénero: *Pinus*

Especie: *Pinus devoniana*

Los árboles de *P. devoniana* por lo regular son de tronco recto de 20-30 m de altura y 80 a 100 cm de DAP (diámetro a la altura del pecho). La corteza de estos árboles es de color rojo-marrón a marrón oscuro, áspera y con la edad ésta forma placas alargadas divididas por profundas fisuras longitudinales negras. Las unidades foliares de dichos árboles forman manojos densos hacia los extremos de las ramas. Las vainas de este pino presentan 5 fascículos de hasta 30-40 mm de largo, los cuales son persistentes y en cada fascículo se presenta una aguja. Las agujas persisten 2-3 años y tienen una consistencia que va desde rígida y recta a lo flexible y caída (Farjon y Styles, 1997).

P. devoniana crece en una amplia variedad de suelos y su hábitat principal es el bosque de pino-encino con baja densidad de árboles. Esta especie se encuentra en altitudes de 1500 a 2500 msnm (Perry, 1991). Las especies con las cuales se asocia este pino son con *P. oocarpa*, *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* y *P. maximinoi* y en altitudes muy bajas la podemos encontrar con *P. cembroides* y en altitudes mayores con *P. hartwegii* (Farjon y Styles, 1997).

La especie *Pinus devoniana* se encuentra en una extensión amplia de México, en los estados de Durango, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Veracruz, Puebla, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, estado de México, Distrito Federal, Tlaxcala, Morelos, Oaxaca y Chiapas (Téllez *et al.*, 2005; Perry, 1991, Farjon y Styles, 1997).

La especie de *P. devoniana* fue utilizada para un estudio con objetivo de restaurar sitios fuertemente erosionados con presencia de cárcavas (Atécuaro, Municipio de Morelia, Michoacán, México). Este trabajo se realizó con las especies de *Pinus cembroides*, *P. greggii*, *P. devoniana* y *P. pseudostrobus*. Los datos que se tomaron de todas las especies fueron supervivencia, altura y diámetro durante los años del 2005 al 2011 y la clorofila se evaluó al final del experimento. La especie *P. devoniana* tuvo una supervivencia del 80 % y los resultados indican que una plantación mixta de *P. devoniana* y *P. greggii* lograría la mejor opción para restaurar estos sitios (Gómez-Romero *et al.*, 2012).

En otra investigación también se utilizó *P. devoniana* y tuvo como objetivo evaluar los patrones de variación morfológica en diferentes gradientes altitudinales. Los resultados mostraron que esta especie de pino tiene un patrón altitudinal significativo, esto es, los árboles de *P. devoniana* presentan hojas, semillas y conos más largos en las partes bajas en comparación con los que se desarrollan en las partes medias y altas (Sáenz-Romero, 2012).

La interacción de *P. devoniana* con especies micorrízicas o bacterias promotoras del crecimiento ha sido poco estudiada, es por ello del planteamiento de este estudio donde observamos el comportamiento de algunas variables de crecimiento de *P. devoniana* al estar en contacto con organismo promotores del crecimiento.

9. CAPÍTULO I

Crecimiento de plantas de *Pinus devoniana* inoculadas con PGPRs en tres suelos de diferente procedencia bajo condiciones *in vitro*.

9.1. INTRODUCCIÓN

La reforestación en el estado de Michoacán y el país tiene diferentes problemas como falta de agua, heladas, inadecuada selección de especies, entre otras. Debido a estos problemas la supervivencia es solo del 37.8 % en promedio de las diferentes especies utilizadas (Sáenz *et al.*, 2004). Otro elemento que limita una mayor supervivencia de las reforestaciones es la calidad de la planta (SEMARNAT, 2010).

Las principales especies forestales propagadas en los viveros de Michoacán son: *Pinus pseudostrobus*, *P. devoniana* (*P. michoacana*), *P. greggii*, *P. montezumae*, *P. douglasiana*, *P. ayacahuite*, *P. oocarpa*, *Cupressus lindleyi* y *Abies religiosa* (Sáenz *et al.*, 2010).

La especie *Pinus devoniana* se distribuye localmente en Michoacán (SEMARNAT, 2010). Este pino tiene importancia económica y se ha colocado como fuente permanente para usos como el aserrío, elaboración de productos artesanales y resinación. Este pino presenta altos índices de sobrevivencia y rendimientos altos en zonas ecológicamente apropiadas para la especie (Musalem *et al.*, 2008). Los tipos de suelo donde se desarrolla *P. devoniana* son entisoles e inceptisoles, los cuales se caracterizan de profundos a muy profundos, su textura es franco-limo-arcillosa y areno-migajosa. Estos suelos tienen buena capacidad de drenaje y presentan pH ligeramente ácido (CONAFOR, 2014).

El suelo es importante en el crecimiento de las plantas y una de sus principales funciones es de sustento. Además el suelo proporciona elementos como el agua y componentes minerales importantes para el desarrollo de las plantas (González y Chueca, 2010). El suelo posee una gran multiplicidad de organismos vivos y estos interactúan con diferentes plantas (FAO, 2015). Dentro de los microorganismos de la rizósfera podemos encontrar bacterias, hongos, nematodos entre otros (Johansson *et al.*, 2004). Esta microbiota en el suelo es primordial para transformación de componentes minerales, disponibilidad de nutrientes y

agregación de partículas del suelo (Gómez y Corlay, 2007; Silva *et al.*, 2009). Dentro de estos microorganismos se ubican a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), las cuales se localizan libres en el suelo y pueden colonizar algunas plantas. Estas bacterias pueden provocar un efecto en el crecimiento de las plantas ya sea positivo o negativo (Glick *et al.*, 1999). Estos microorganismos también intervienen dentro de los ciclos de nutrientes del carbono, nitrógeno y el fósforo (Paul, 2007).

La interacción de especies forestales con bacterias promotoras del crecimiento ha sido estudiada para incrementar la calidad de la planta. Dichas bacterias aumentan la supervivencia de la plantaciones debido a que mejoran las características en la parte de raíz de las plantas (Ramos *et al.*, 2006).

Este estudio se realizó con el objetivo de analizar el comportamiento de variables del crecimiento en plantas de *Pinus devoniana* en tres suelos de diferente procedencia y en combinación con la inoculación de cepas bacterianas promotoras del crecimiento *Bacillus megaterium* (UMCV1) y *Bacillus cereus* (L254). El experimento se llevó a cabo en forma *in vitro* y al término de éste se realizó una cosecha destructiva donde se tomaron datos de las variables de crecimiento como longitud de la parte aérea y de raíz, peso fresco de la parte aérea y de raíz y número de raíces laterales. Los resultados muestran que las plantas de *P. devoniana* crecidas en el suelo procedente de Ciudad Hidalgo y que fueron inoculadas con bacteria tuvieron incremento en el peso fresco de raíz y el número de raíces laterales en comparación con las plantas que no fueron inoculadas.

9.2. ANTECEDENTES

El suelo es un elemento natural de los sistemas terrestres y éste influye en la regulación y purificación del agua y gases. Así mismo el suelo tiene la capacidad de sobrellevar vida vegetal y animal (Angers y Caron, 1998). México cuenta con aproximadamente 90 % de los tipos de suelos que existen a nivel mundial. Este país se caracteriza por una gran diversidad de vegetación, determinada por su variedad de relieves y clima (Rabindranath, 2008). En Michoacán existen recursos naturales ricos e importantes, cuya riqueza es determinada por su privilegiada geografía y diversidad orográfica, por lo que el estado se ubica en quinto lugar nacional en biodiversidad (COFOM, 2014). Los suelos que predominan en Michoacán son los derivados de cenizas volcánicas (Andosoles), aunque también podemos encontrar vertisoles, gleysoles, rendzinas, fluvisoles, litosoles, regosoles, salinos, ódicos entre otros (COFOM, 2001). El suelo es un subsistema esencial del ecosistema forestal, el cual tiene características físicas, químicas y biológicas, que en su conjunto determinan las propiedades y fertilidad del suelo (Hernández *et al.*, 2004). El suelo cumple funciones de gran importancia para el soporte de vida en el planeta, tales como hábitat de muchos organismos, en él suceden los ciclos biogeoquímicos y como medio amortiguador. La mayoría de las actividades humanas se desarrollan en el suelo, debido a que este proporciona soporte físico y de infraestructura para la agricultura, actividad forestal, entre otras (Volke *et al.*, 2005). Una forma de clasificación de los tipos de suelos es de acuerdo a su tamaño de partícula inorgánica, los cuales son cuatro componentes principales: arcilla (tamaño de partícula menor a 0.002 mm), limo (0.002-0.05 mm), arena (0.05-2 mm) y grava (partículas mayores a 2 mm). La cantidad de cada tipo de partícula (arcilla, limo, arena y grava) contenida en el suelo define la textura de la misma y sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Miller, 1994; Van Deuren *et al.*, 2002).

9.2.1. Propiedades físicas del suelo

Las propiedades físicas del suelo determinan en gran parte el potencial de uso y estas características precisan la rigidez y la facilidad para la penetración de las raíces, además de que establecen la acumulación de agua y retención de nutrientes (Rucks *et al.*, 2004).

9.2.2. Textura

La textura está determinada por el conjunto de partículas minerales inorgánicas de diferentes tamaños contenidas en el suelo. La textura decreta la proporción y magnitud a la que ocurren las reacciones físicas, químicas y biológicas. Así mismo dicha propiedad influye en la plasticidad, permeabilidad y la facilidad de trabajar la tierra (Buckman y Brady, 1966).

9.2.3. Porosidad

La porosidad es el principal espacio en el que se desarrollan las raíces de las plantas. En este espacio poroso del suelo se pueden diferenciar macroporos y los microporos. Los macroporos son los responsables del drenaje y la aireación del suelo, los microporos son los que retienen el agua, parte de la cual es disponible para las plantas. La textura y estructura del suelo determinan las características del espacio poroso (Rucks *et al.*, 2004). Un suelo ideal debe tener una porosidad del 50 %, en suelos ligeros la mínima debe ser del 35 % y 45 % en suelos pesados, esto para que permita un buen desarrollo de plantas.

9.2.4. Estructura

La estructura del suelo es la manera de agrupación de las partículas como arena, limo y arcillas formando espacios porosos (Bronick y Lal, 2005). La estructura del suelo regula el flujo del agua, nutrientes, almacenamiento y flujo de gases (Angers y Caron, 1998).

9.2.5. Propiedades químicas del suelo

9.2.5.1. Potencial de hidrógeno (pH)

El pH del suelo es el que establece el nivel de absorción de los iones (H⁺) por partículas de suelo. Este también es un indicador de la fertilidad, ya que influye en la solubilidad y disponibilidad de los nutrientes presentes en el suelo.

9.2.5.2. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

La capacidad de intercambio catiónico es la capacidad que tiene el suelo para retener o intercambiar cationes (Ca, Mg, Na, K, NH₄ entre otros). El CIC nos podría mostrar la cantidad y disponibilidad de nutrientes, esto para uso de las plantas (FAO, 2015).

9.2.5.3. Nutrientes

El suelo posee macronutrientes y micronutrientes esenciales para un buen desarrollo de las plantas. Los macronutrientes son aquellos que se necesitan en mayores cantidades (Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Azufre (S), Calcio (C), Magnesio (Mg) y Silicio (Si)) y los micronutrientes los de menor cantidad requerida (Hierro (Fe), Zinc (Zn), Manganeseo (Mn), Molibdeno (Mo), Boro (B), Sodio (Na), Cobre (Cu) y Cloro (Cl) (FAO, 2015).

9.2.6. Características biológicas del suelo

La biología del suelo es un aspecto de importancia, ya que esta característica desempeña un papel fundamental en la composición del suelo y sus características. Los organismos del suelo participan en procesos esenciales para la sostenibilidad de todos los ecosistemas (FAO, 2015). Entre los elementos formadores del suelo, los microorganismos tienen un papel muy importante ya que estos son los encargados de la fertilidad del suelo y degradación de la materia orgánica, lo que permite la liberación de algunos elementos básicos para la nutrición de las plantas. Estos organismos también participan en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, entre otros (Porta *et al.*, 2003). Para el mantenimiento de una apropiada biota del suelo, deben cumplirse ciertas condiciones y ajustarse diferentes factores. La biota del suelo se ve afectada cuando ciertos elementos de importancia como la temperatura, pH extremo o

contaminación química se dan en un ambiente natural (Oliveira y Pampulha, 2006). En la actualidad se reconoce que la actividad de los microorganismos es un factor importante en la fertilidad y estabilidad del suelo, al igual que intervienen en la funcionalidad de los ecosistemas (Trasar *et al.*, 2000).

En 1978 Kloepper definió a las bacterias de vida libre localizadas en la rizósfera de las plantas como Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPRs) por sus siglas en inglés (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), las cuales mostraron ser organismos de alta eficiencia para aumentar el crecimiento de las plantas y acrecentar sus defensas frente a otros microorganismos causantes de enfermedades. Dos mecanismo de acción de PGPRs e conocen a nivel mundial, los cuales fueron clasificados como directo e indirecto (Ahmad *et al.*, 2006). El mecanismo directo de estas bacterias consiste en la producción de fitohormonas. El ácido indol-acético (AIA), giberelinas o citoquininas son producidos por los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus*. Estas sustancias tienen acción directa en las plantas, estas actúan como un estimulante en el crecimiento de las plantas principalmente en etapa de plántula (Lugtenberg y Kamilova, 2009). El mecanismo indirecto de las bacterias radica en la liberación de cierto tipo de metabolito, estos no actúan directamente en la planta si no que afectan factores rizosféricos que intervienen en un incremento o estimuló de crecimiento de la planta (Kloepper, 1993).

Entre las PGPRs encontramos el género *Bacillus*, el cual pertenece a familia *Bacillaceae* y está formado por microorganismos Gram positivas. Estas bacterias son anaerobias o aerobias facultativas, se localizan en suelos y plantas, las cuales juegan un papel importante en el ciclo del carbono y nitrógeno (Koneman, 2001). En general *Bacillus* posee gran variedad y número de bacterias, tales como *B. thuringiensis*, *B. lincheniformis*, *B. pumilis*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. anthracis* (Berge'ys, 1984-2000). Varios estudios se han realizado para mejorar el rendimiento vegetal por medio de la utilización de este tipo de microorganismos, pero la mayoría de tales investigaciones se realizan en especies de interés agrícola. Un estudio se realizó para conocer la influencia de dos tipos de suelo en el efecto estimulador de rizobacterias en el crecimiento de maíz. Las bacterias

utilizadas en dicho estudio fueron *Pseudomonas alcaligenes* (PsA15), *Bacillus polymyxa* (BcP26) y *Mycobacterium phlei* (MbP18), las cuales mostraron un efecto mucho mayor sobre el crecimiento de maíz en el suelo deficiente de nutrientes (Difuza, 2007).

En otro estudio se realizó un aislamiento de bacterias en tejidos de la raíz de *Eucalyptus nitens* y este aislamiento fue con el objetivo de evaluar la capacidad de las bacterias para promover el crecimiento en plántulas de esta misma especie. Las rizobacterias encontradas corresponden a los géneros *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus*. Dentro de las bacterias aisladas 15 especies promovieron significativamente el crecimiento de *Eucalyptus nitens*, mostrando diferencias en las variables de altura y largo de raíces (Angulo *et al.*, 2014). Un estudio evaluó el efecto de la inoculación de PGPRs en plántulas de dos meses de edad de cuatro especies forestales (*Acacia macracantha*, *Acacia farnesiana*, *Luehea candida* y *Guazuma ulmifolia*) con el propósito de mejorar el desarrollo de plántulas. Las especies de rizobacterias utilizadas fueron *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida*, cepas FCA 8, FCA 56 y FCA 60. Los resultados de este estudio mostraron que solo *Acacia macracantha* y *A. farnesiana* expresaron evidencia del efecto de la inoculación reflejándose en la variable de altura (López, 2011). Una de las investigaciones que se han realizado en el género *Pinus* fue en la especie *Pinus pinea* con la inoculación de *Pisolithus tinctorius* y PGPRs correspondientes al género *Bacillus* (*Bacillus licheniformis* CECT 5105 y *Bacillus pumilus* CECT 5105). En este estudio se observó el efecto de los inóculos en el crecimiento de las plántulas y las variaciones que promovieron en las comunidades microbianas, las dos cepas bacterianas utilizadas promovieron el crecimiento de *P. pinea*, pero este resultado no implica un efecto combinado con la infección de micorrizas (Probanza *et al.*, 2002).

En otra investigación se observaron los efectos de la inoculación de 12 cepas bacterianas en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, las cuales fueron aisladas de la rizósfera de *Citrus aurantifolia*. Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que las cepas L254, L265a y L265b no cambiaron el crecimiento de la raíz primaria, pero estas originaron la formación de raíces

laterales. Los datos obtenidos proponen que las cepas bacterianas pueden modificar el crecimiento de la planta, así como también la arquitectura de la raíz mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COV) (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010). En un experimento se realizó la inoculación en plantas de frijol y alfalfa de las cepas bacterianas ferrirreductoras *Bacillus megaterium* UMCV1, *Arthrobacter agilis* UMCV2, y *Stenotrophomonas maltophilia* UMCV3 y UMCV4. Dichas bacterias mostraron un aumento en el contenido de Fe y clorofila en las plantas (Valencia, 2006).

9.3. JUSTIFICACIÓN

Se planteó este trabajo con el propósito de analizar el comportamiento del crecimiento de plantas de *Pinus devoniana* en tres suelos de diferente procedencia y su interacción con dos tipos de bacterias promotoras del crecimiento pertenecientes al género *Bacillus*.

9.4. HIPÓTESIS

El contenido de nutrientes del suelo y la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento afectan el crecimiento de las plantas de *Pinus devoniana* bajo condiciones *in vitro*.

9.5. OBJETIVOS

9.5.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar las variables de crecimiento de *Pinus devoniana* bajo tres suelos de diferente procedencia y en interacción con PGPRs.

9.5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar las condiciones fisicoquímicas de tres suelos de diferente procedencia.
- Evaluar el crecimiento de plantas de *P. devoniana* en tres suelos inoculadas con bacterias del género *Bacillus*.

9.6. MATERIALES Y MÉTODOS

9.6.1. Descripción general de experimento

El experimento se llevó a cabo en una cámara de crecimiento en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo (UMNSH), el cual consistió en la utilización de tres suelos de diferente procedencia y la inoculación de dos bacterias del género *Bacillus*.

9.6.2. Microorganismos utilizados

Las bacterias que se utilizaron para la realización de este experimento fueron *Bacillus megaterium* (UMCV1) y *Bacillus cereus* (L254), las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIQB de la UMNSH. Posteriormente las bacterias fueron sembradas en Agar Nutritivo (Bioxon) y crecidas en una cámara de incubación a 28 °C ± 2.

9.6.3. Material vegetal

La especie de estudio para este experimento fue *Pinus devoniana*. Las semillas de ésta fueron proporcionadas por el banco de germoplasma de la COFOM (Comisión forestal del estado de Michoacán).

Las semillas fueron colocadas en bolsas de plástico herméticas etiquetadas y almacenadas en un refrigerador a 4 °C hasta su utilización.

9.6.4. Colecta y análisis de suelo

Los suelos utilizados para la realización de este estudio fueron de tres diferentes localidades del estado de Michoacán: Cherán (Latitud: 19°41'13.60"N y Longitud: 101°52'1.96"O), Pátzcuaro (Latitud: 19°29'17.39"N y Longitud: 101°36'33.31"O) y Ciudad Hidalgo (Latitud: 19°41'36.22"N y Longitud: 100°32'56.15"O), los cuales son considerados sitios forestalmente importantes y con una presencia histórica de *P. devoniana*.

El suelo de dichas localidades fue colectado en los primeros 30 cm de profundidad y se les realizó un análisis fisicoquímico. Las características analizadas fueron el contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, porosidad y pH, asimismo se efectuó un análisis cuantitativo de macronutrientes (Nitrógeno,

Fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio) y micronutrientes (Hierro y Zinc) disponibles para las plantas (CEMA NOM-021-RECNAT-2000) (www.cemamexico.com).

9.6.5. Esterilización superficial de las semillas

La esterilización superficial de las semillas se realizó previo al montaje del experimento, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera: las semillas se colocaron en un vaso de precipitados de 250 ml que contenía hipoclorito de sodio al 5 % v/v (Cloralex^{MR}) y dicha suspensión se agitó constantemente durante ocho minutos. Posteriormente las semillas se lavaron 2 veces con agua estéril y enseguida estas se colocaron en etanol al 25 % agitando durante un minuto y finalmente las semillas se lavaron 3 veces con agua estéril.

Después del proceso de desinfección superficial de las semillas se procedió al montaje del experimento *in vitro*.

9.6.6. Montaje del experimento

Los suelos colectados previamente de las localidades de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro, fueron utilizados para la realización del ensayo. El experimento consistió en un diseño factorial, en el cual las variables a analizar fueron la procedencia del suelo (Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro) y presencia o ausencia de inóculo (Sin inóculo, *B. megaterium* (UMCV1) y *B. cereus* (L254) (ver Tabla 1).

El experimento se realizó de la siguiente manera: en frascos de 500 ml de volumen se colocó el suelo (previamente tamizado con una malla de 2.38 mm) hasta completar un volumen aproximado de 250 ml, y dichos frascos se esterilizaron dos veces cada 24 hrs. en autoclave a 120 °C y 1.2 Kg·cm⁻² durante 25 min, se utilizaron 6 réplicas y en cada uno de ellos se colocaron veinte semillas por frasco. Los frascos con las semillas fueron llevados a una cámara de crecimiento a una temperatura constante (22 °C).

Después de quince días de haber germinado las semillas la inoculación se realizó con las bacterias *B. megaterium* (UMCV1) y *B. cereus* (L254), agregando en el agua de riego una cantidad de inóculo de 1×10^7 unidades formadoras de colonia (Santoyo *et al.*, 2012).

9.6.7. Variables evaluadas

La cosecha destructiva de las plantas se realizó a los cuarenta y cinco días, ésta para la toma de datos de las variables evaluadas como: longitud de la parte aérea y de raíz las cuales fueron tomadas con ayuda de una regla de treinta centímetros. Peso fresco de la parte aérea y de raíz se tomaron en una balanza analítica marca AdventurerPro OHAUS. Por último el número de raíces laterales se contabilizó visualmente.

9.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis se realizó mediante una ANOVA multifactorial y unifactorial, posteriormente con una prueba de Tukey a una significancia de $p < 0.05$, con el programa estadístico "Statistica v7".

9.8. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el análisis de suelo muestran que el pH de las tres procedencias se encuentra dentro un rango de 5 a 6. Para el contenido de materia orgánica de los suelos procedentes de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro están entre los valores de 4.3 a 6.86 %. En cuanto a la capacidad de intercambio catiónico (CIC), los resultados señalan que las tres procedencias de suelo presenta una CIC entre los valores de 21.57 y 33.33 $\text{Cmol}(+)\text{Kg}^{-1}$. La porosidad de las tres procedencias de suelo son muy similares, esta se localiza entre los porcentajes de 51.69 a 59.53 % (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Características fisicoquímicas de los suelos provenientes de las localidades de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro. pH=potencial hidrógeno; MO=Materia orgánica; CIC= Capacidad de intercambio catiónico.

Sitios	pH	MO	CIC	Porosidad
	UPH	%	$\text{Cmol}(+)\text{Kg}^{-1}$	%
Cd. Hidalgo	5.06	6.86	21.57	52.69
Cherán	5.97	6.32	33.33	59.53
Pátzcuaro	5.47	4.3	23.53	51.69

Los resultados de las cantidades obtenidas de macronutrientes y micronutrientes para las tres procedencias de suelo fueron las siguientes: el nitrógeno contenido en los suelos se encuentra entre los 1790 a 2130 ppm, mientras que la cantidad de fósforo esta en los valores <0.5 a 1.354 ppm, en cuanto a hierro las tres procedencias presentan de entre 15009.982 y 50214.471 ppm (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Macronutrientes y micronutrientes de los suelos procedentes de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro.

Sitios	N	P	K	Ca	Mg	Zn	Fe
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Cd. Hidalgo	2130	1.354	358.8	2074.8	5807.1	22.759	15009.982
Cherán	1940	<0.5	1150.5	4563	4149.6	45.663	43212.961
Pátzcuaro	1790	<0.5	553.8	1739.4	4980.3	84.349	50214.471

Los resultados obtenidos en el experimento *in vitro* son los siguientes: para la variable de longitud de la parte aérea el factor suelo, bacteria y la interacción de ambos factores no tienen influencia sobre esta variable en un análisis multifactorial muestra que no existe diferencia significativa (Anexo 1, Cuadro 3).

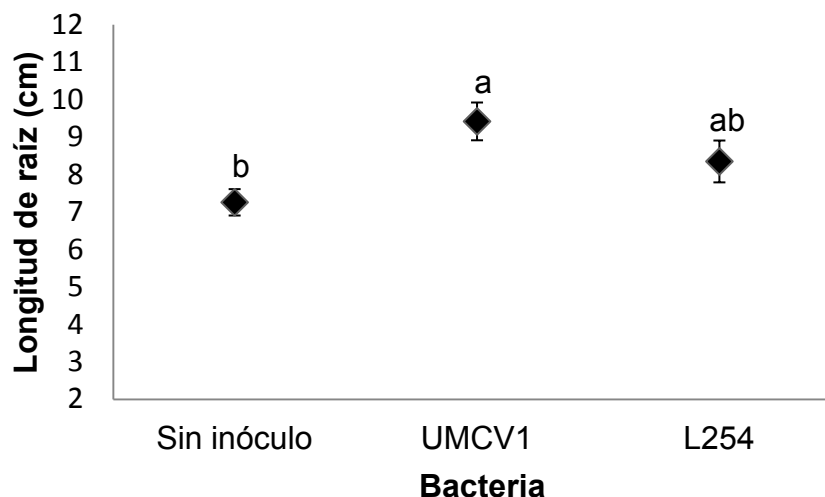
De acuerdo con el análisis multifactorial de resultados de la variable de longitud de raíz, muestran que el factor suelo si influye sobre esta variable, al igual que el uso de las bacterias, donde no se obtuvo diferencia fue en la interacción de suelo y bacteria (Anexo 1, Cuadro 4).

En la gráfica 1 se observa la influencia del factor suelo en la longitud de raíz. En los suelos procedentes de Cherán y de Pátzcuaro se obtuvieron los valores más altos en longitud de raíz (promedio de 9.3 cm), entre estos dos suelos no hay diferencia significativa, pero estos son significativamente diferentes con respecto al suelo procedente de Ciudad Hidalgo, en el cual se presentó la longitud de raíz menor (promedio 5.5 cm).



Gráfica 1.- Longitud de raíz de plantas de *Pinus devoniana* crecida en tres suelos de procedentes de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro. Un análisis unifactorial se realizó junto con una prueba de Tukey $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

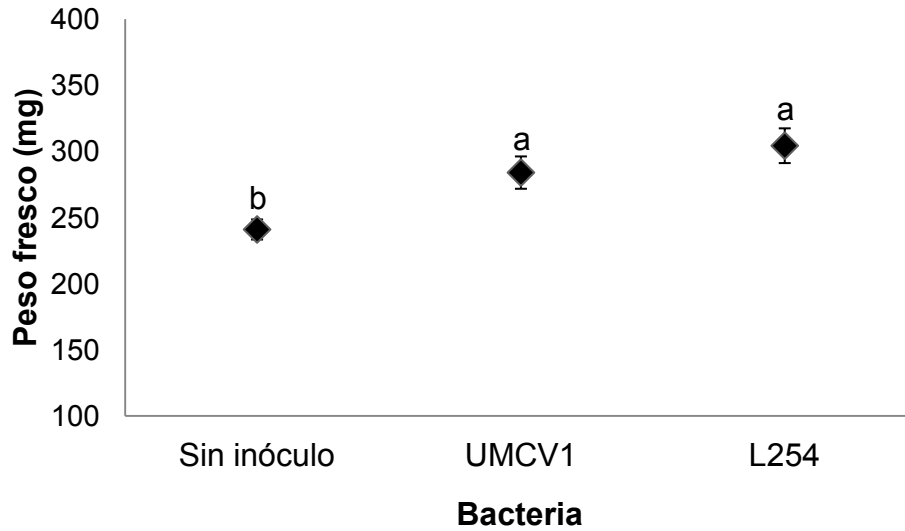
Las bacterias inoculadas tuvieron influencia sobre longitud de raíz de las plantas. Las longitudes de raíz obtenidas con la inculación de la bacteria UMCV1 fueron significativamente diferentes con las obtenidas en las plantas sin inóculo. La bacteria L254 también incremento la longitud de raíz, aunque no existe diferencia significativa con las raíces de las plantas sin inóculo (Gráfica 2).



Gráfica 2.- Longitud de raíz de plantas de *Pinus devoniana* con el uso de las bacterias y sin inóculo. Un análisis unifactorial se realizó junto con una prueba de Tukey $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

En el peso fresco de la parte aérea el análisis multifactorial muestra que el factor suelo no influye sobre ésta variable, pero la bacteria si influye sobre dicha variable. Por otro lado en la interacción de los factores no hay diferencia significativa (Ver anexo 1, Cuadro 5).

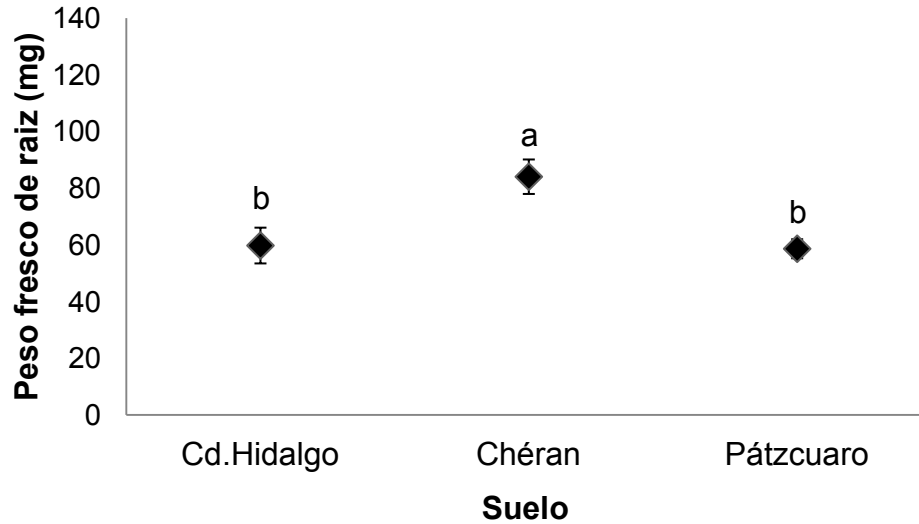
En la gráfica 3 observamos la influencia de la inoculación de las bacterias en la variable de peso fresco de la parte aérea. Las plantas que fueron inoculadas tuvieron los valores mayores en el peso fresco de la parte aérea, siendo significativamente diferentes con respecto a las plantas no inoculadas.



Gráfica 3.- Peso fresco de la parte aérea de plantas de *Pinus devoniana* con el uso de las bacterias y sin inóculo. Un análisis unifactorial se realizó junto con una prueba de Tukey $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

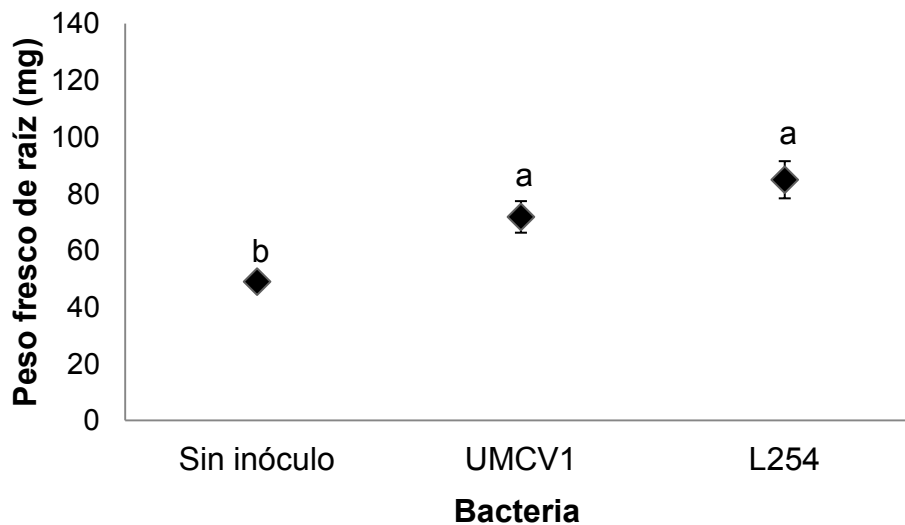
En la variable de peso fresco de raíz el análisis multifactorial muestra que existe influencia del factor suelo y bacteria sobre de esta variable, al igual que se encontró diferencia significativa en la interacción de los dos factores analizados (Ver anexo 1, Cuadro 6).

En la gráfica 4 se puede observar que el factor suelo si influye en el peso fresco de la raíz. El suelo procedente de Cherán las plantas obtuvieron los valores más altos (promedio de 84 mg) de peso fresco de raíz y estos son significativamente diferentes con los obtenidos en los sitios de Ciudad Hidalgo y Pátzcuaro.



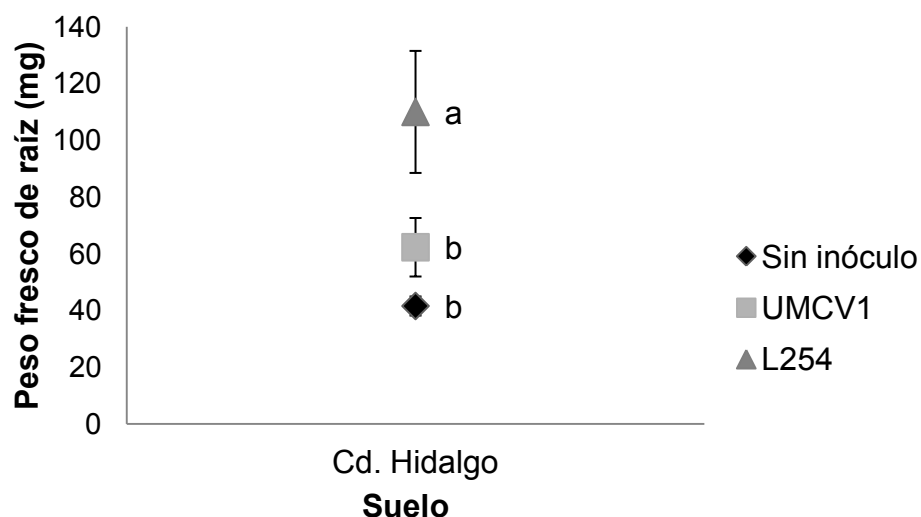
Gráfica 4.- Peso fresco de raíz de plantas de *Pinus devoniana* crecidas en tres suelos procedentes de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro. Un análisis unifactorial se realizó junto con una prueba de Tukey $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

En cuanto al factor bacteria, en la gráfica 5 se observa que peso fresco de raíz fue significativamente mayor en relación con el peso fresco obtenido en las plantas sin inóculo.



Gráfica 5.- Peso fresco de raíz de plantas de *Pinus devoniana* con el uso de las bacterias y sin inóculo. Un análisis unifactorial se realizó junto con una prueba de Tukey $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

De acuerdo al análisis estadístico, las bacterias inoculadas influyen sobre el peso fresco de raíz de las plantas de *Pinus devoniana* crecidas en el suelo de Ciudad Hidalgo. En la gráfica 6 se observa que la combinación del suelo de Ciudad Hidalgo y la bacteria L254 se obtienen los valores más altos de peso fresco de raíz obteniendo un promedio de 110 mg. Las plantas de *P. devoniana* crecidas en los suelos de Cherán y Pátzcuaro con la interacción de las bacterias no muestran diferencias significativas de lo obtenido en el peso fresco de raíz.

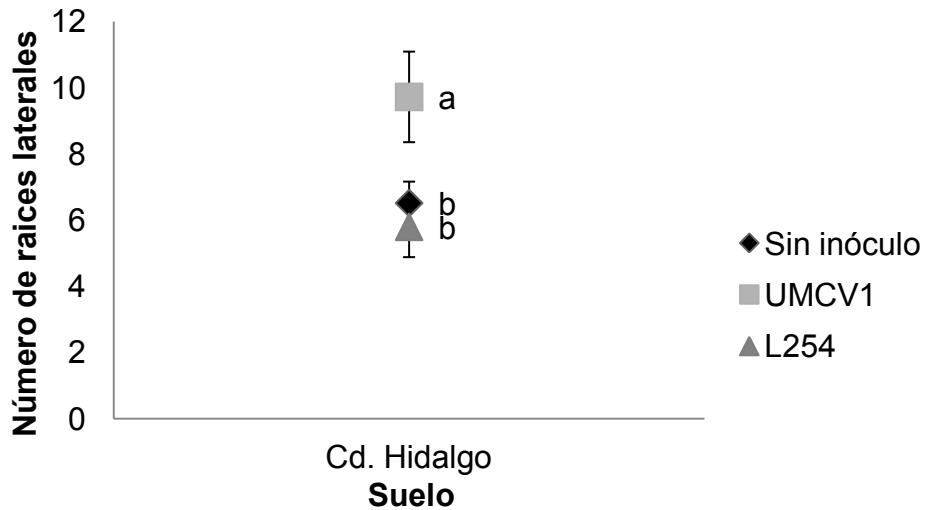


Gráfica 6.- Peso fresco de raíz de plantas de *Pinus devoniana* crecidas en el suelo procedente de Ciudad Hidalgo con el uso de las bacterias y sin inóculo. Un análisis unifactorial se realizó junto con una prueba de Tukey $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

El número de raíces laterales muestran que factor suelo no influye sobre esta, ya que no se muestra alguna diferencia significativa entre las procedencias del suelo y el número de raíces laterales. Las plantas de las tres procedencias de suelo tuvieron un promedio de 7 a 8 raíces laterales (ver Anexo 1, Cuadro 7).

Por otro lado, tenemos que el número de raíces laterales de las plantas en el suelo de Ciudad Hidalgo si se ve influenciada por el uso de bacterias (Ver anexo 1, Cuadro 9). En la gráfica 7 se observa que en el suelo procedente de Ciudad Hidalgo las plantas inoculadas con la bacteria UMCV1 son significativamente diferentes con respecto a las plantas no inoculadas, obteniendo un incremento en el número de raíces laterales con el uso de las baterias.

En los tipos de suelo procedentes de Cherán y Pátzcuaro no hay diferencia significativa entre el número de raíces de las plantas inoculadas con las bacterias y las no inoculadas.



Gráfica 7.- Número de raíces laterales de plantas de *Pinus devoniana* crecidas en el suelo procedente de Ciudad Hidalgo con el uso de las bacterias y sin inóculo. Un análisis unifactorial se realizó junto con una prueba de Tukey $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

9.9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de pH, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico (CIC) y porosidad indican que los suelos procedentes de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro muestran características adecuadas para el desarrollo de la especie forestal *Pinus devoniana*. El pH de los tres sitios según el análisis químico se encuentra dentro del rango en donde se desarrolla normalmente esta especie (Rojas, 1984).

La materia orgánica tiene gran relación con los procesos que ocurren en el suelo, además de ser un indicador que expresa la calidad del suelo (Ghisolfi, 2011). Una de las principales funciones de la materia orgánica es la estabilidad del suelo (Tisdall y Oades, 1982; Six *et al.*, 2002). La cantidad de materia orgánica en los suelos procedentes de Ciudad Hidalgo y Cherán es media, mientras que para Pátzcuaro la MO se clasifica como baja, en ambos casos de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000. La CIC obtenida en el suelo de Cherán es alta, esta propiedad podría darnos un idea de la cantidad de nutrientes que tiene el suelo (NOM-021-RECNAT-2000) (FAO, 2015). En los resultados obtenidos en los nutrientes de los suelos si se observa una relación con la CIC, ya que el suelo de Cherán en algunos nutrientes si tiene una mayor cantidad en comparación con obtenido para Pátzcuaro y Ciudad Hidalgo, donde estos últimos sitios tienen un CIC media.

La porosidad en las tres procedencias de suelo analizados mostró ser similar y se encuentra dentro de lo requerido para un buen desarrollo de las plantas. Los suelos de Ciudad Hidalgo y Pátzcuaro tienen una porosidad considerada como buena, mientras que solo Cherán estaría tendiendo hacia una porosidad alta. La porosidad del suelo debe ser el 50 % de su volumen y debe tener un balance entre los poros ya sea ocupados por agua o aire o en los dos, esto para que la planta pueda tener un buen desarrollo (Núñez, 1981).

En los resultados de la comparación de cantidades de macronutrientes y micronutrientes obtenidas en los tres tipos de suelo y las usadas en la solución nutritiva Hoagland, se observa que estos suelos tendrían el suficiente nitrógeno y potasio, así mismo de todos los micronutrientes analizados se tendría lo suficiente

para el desarrollo de las plantas. El fósforo es el único macronutriente que se encuentra en poca cantidad, el cual es uno de los principales nutrientes para el desarrollo plantas, ya que tiene una participación importante en la fotosíntesis, en el desarrollo químico fisiológico, formación de tejidos que constituyen sitios de crecimiento de las plantas, por lo que las plantas con deficiencia de este macronutriente pueden presentar un retraso en su crecimiento (FAO, 2002).

De acuerdo con la solución nutritiva MS, las tres procedencias de suelo analizados tendrían la suficiente cantidad de todos los nutrientes analizados para el desarrollo de las plantas. Algunos nutrientes se encuentran en mayor cantidad de lo que utilizan las soluciones nutritivas, esto no quiere decir que los suelos tengan un exceso, ya que no sabemos cuánto de la cantidad obtenida en el análisis de nutrientes está disponible para las plantas. Lo anterior es porque el análisis de macronutrientes y micronutrientes que se realizó nos da el contenido total más no la forma química de los nutrientes. Las plantas absorben los nutrientes en cierta forma química. De los nutrientes contenidos en el suelo solo una cantidad menor está disponible para las plantas, la otra parte se fija en los minerales y materia orgánica y no es accesible para las plantas. Por ejemplo el nitrógeno es tomado por las plantas en forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+) y el fósforo H_2PO_4^- (Thompson, 1988).

El factor suelo influyó en la longitud de raíz y los valores mayores se presentaron en los suelos de Cherán y Pátzcuaro. En algunas plantas se ha observado que cuando hay una deficiencia de fósforo la longitud de raíz incrementa (Fragoso *et al.*, 2005). Por lo que suponemos que la deficiencia de fósforo en los suelos procedentes de Cherán y Pátzcuaro estaría interviniendo longitud de raíz de las plantas de *Pinus devoniana*.

Otra de las variables donde influyó la procedencia de suelo fue en peso fresco de raíz donde el suelo de Cherán tiene los valores más altos. De acuerdo con el análisis físico este suelo tendría las características adecuadas para el desarrollo de las plantas. En el suelo de Ciudad Hidalgo se obtuvieron los valores más bajos en algunas variables. La deficiencia de fósforo está teniendo influencia sobre el comportamiento del factor suelo en las variables de crecimiento, ya que se

considera que la disponibilidad de este macronutriente se encuentra principalmente en rango de pH de 6.5 y 7.5 (Thompson, 1988). El fósforo también tiene importancia en desarrollo de las plantas como fuente de energía (Núñez, 1981).

El factor bacteria no influyó sobre la longitud de la parte aérea, lo cual ya se ha visto con la inoculación de otras bacterias promotoras del crecimiento en especies leñosas de selva baja caducifolia donde no se observó influencia en la altura (López, 2011). Aunque las bacterias utilizadas en este trabajo han mostrado un aumento en parte del tallo, estas no se han probado en plantas de *Pinus devoniana*. En la longitud de raíz se observó influencia de la bacteria UMCV1 con respecto a las no inoculadas. La inoculación de las bacterias también tuvieron influencia en el peso fresco de la parte de raíz, esto independientemente del tipo de bacteria, teniendo valores mayores en las plantas inoculadas con respecto a las de sin inóculo. El aumento en esta variable coincide con los resultados obtenidos en otros trabajos donde esta se ha visto que esta bacteria promueve el crecimiento de raíz y aumento de biomasa en las plantas inoculadas (López-Bucio *et al.*, 2009).

Las dos bacterias inoculadas mostraron un aumento en peso fresco de la parte aérea con respecto a las plantas sin inóculo, aun cuando el factor bacteria no influyó en la longitud de de la parte aérea. Este patrón de comportamiento se ha visto en otras bacterias promotoras del crecimiento (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011).

El análisis estadístico muestra diferencia en la interacción de los factores (suelo y bacteria), el suelo de Ciudad Hidalgo con la bacteria L254 presento un aumento en el peso fresco de raíz y en el número de raíces laterales, esto en comparación con las plantas sin inóculo. Algunas bacterias promotoras del crecimiento tienen mejor eficiencia en suelos deficiente de nutrientes (Difuzza, 2007), aunque el suelo de Ciudad Hidalgo tiene los nutrientes suficientes para el desarrollo de las plantas, según lo comparado con las soluciones nutritivas.

En la variable del número de raíces laterales en los tipos de suelo no se observó diferencia significativa, probablemente por la similitud en la porosidad que tiene cada uno, ya que es uno de los parámetros de importancia para el desarrollo de la raíz de la planta (Núñez, 1981).

9.10. CONCLUSIONES.

En los suelos con baja presencia de fósforo incrementan la longitud de raíz de las plantas de *Pinus devoniana*. La presencia de las bacterias *Bacillus megaterium* (UMCV1) y *Bacillus cereus* (L254) incrementan el crecimiento de las plantas de *P. devoniana* principalmente en la raíz en suelos con baja presencia de fósforo, así mismo la eficiencia de las bacterias se ve influenciada dependiendo del tipo de suelo en el cual es inoculada.

9.11. LITERATURA CITADA

- Ahmad, F., Ahmad I., Khan, M. S. 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 36:1-9.
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., Sossa, K. E. 2014. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 46, núm. 4. pp. 338-347 Asociación Argentina de Microbiología Buenos Aires, Argentina
- Angers, D. A. y J. Caron. 1998. Plant-induced changes in soil structure: processes and feedbacks. *Biogeochemistry* 42: 55-72.
- Bergeys, D. 1989 - 2000. *Manual of the Determinative Bacteriology*. Night Edition. Philadelphia 2:540-589.
- Bronick, C. J. y Lal, R. 2005. Soil structure and management. *Geoderma*, 124, pp. 3–22.
- Buckman, H. y N. C. Brady. 1966. *The Nature and Properties of Soils*. The Macmillan company. pp 590.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2014. Fichas técnicas para reforestación *Pinus devoniana*. (revisada en octubre 2015).
- COFOM (Comisión forestal de Michoacán). 2001. *Atlas Forestal del Estado de Michoacán*. COFOM. Morelia, Michoacán.
- COFOM (Comisión Forestal de Michoacán). 2014. *Inventario estatal forestal y de suelos de Michoacán de Ocampo 2014*.
- Difuzá, E. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *applied soil ecology* 36.184–189
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2015. *Propiedades del suelo físicas y químicas*. <http://www.fao.org/soils-portal/levantamiento-de-suelos/propiedades-del-suelo>. consultada en octubre del 2015.

- FAO. 2002. Fertilizantes y su uso. Cuarta edición. Revisada, FAO e IFA. Roma, ISBN 92-5-304414-4.
- Fragoso, S., E. Martínez-Barajas., S. Vázquez-Santana., J. Acosta y P. Coello. 2005. Respuesta de la soya (*Glycine max*) a la deficiencia de fosfato. *Agrociencia* 39:303-310. Volumen 39. Número 3.
- Gómez, C. y Corlay, L. 2007. Microbiota edáfica y su importancia en la agricultura. *In*: Ferrera. Cerraro R. y Alarcon A. Microbiología agrícola. (eds). Trillas. pp 39-55.
- González, R. J. L. y Chueca, S. A. 2010. C4 y CAM. Características generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas. Editorial. Consejo Superior de Investigaciones científicas. ISBN 978-84-00-09213-9. pp 200.
- Gutiérrez-Luna, F. M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia Cantero, E., Reyes de la Cruz, H. y Macías-Rodríguez, L. 2010. "Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission". *Symbiosis* 51:75-83.
- Ghisolfi, E. 2011. Contenidos de materia orgánica en relación con la fertilidad del suelo en siembra directa. 1ª edición. Villa Maria: Eduvim. ISBN 978-987-1727-66-7. pp 84.
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G. and Penrose, D. M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London, England. pp 267.
- Hernández, A., Ascanio, M. O., Cabrera, A., Morales, M., Medina, N. 2004. Problemas Actuales de Clasificación de Suelos: énfasis en Cuba. Editorial Universidad de Veracruz, México.
- Johansson, F., Paul, L. y Finlay, R. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 1-13.
- Koneman, E. W. 2001. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

- Kloepper, J. W. y Schroth, M. N. 1978. *In Proc 4th int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria Vol.2* (ed. Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie) 879–882 (Gibert-Clarey, Tours, 1978).
- Kloepper, J. W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents In: Metting. *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*, Marcel Dekker Inc, New York USA. pp 274.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Valencia-Cantero, E., Velázquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R. y Macías-Rodríguez, L. I. 2009. *Bacillus megaterium* modifica la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* independientemente de auxinas y etileno. *Biológicas*. 11:1-8.
- López, C. F. D. 2011. Inoculación con bacterias promotoras del crecimiento en cuatro especies leñosas de Selva baja caducifolia trabajo. Trabajo de experiencia profesional Ingeniero Agrónomo. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias agrícolas. Xalapa Veracruz.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 63: 541-556.
- Miller, T. 1994. *Ecología y medio ambiente*. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F. pp 867.
- Musalem, M. Á y Cruz, O. S. 2008. Monografía de *Pinus michoacana*. Centro documental. Instituto nacional de ecología. Coordinación de investigación e integración de programas especiales. ISBN: 968-5580-05-7.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- NORMA Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000). Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.

- Núñez, S. J. 1981. Fundamentos de Edafología. Segunda Edición. 3era reimpresión. Editorial EUNED, San José de Costa Rica 2000. ISBN ISBN: 9977-64-148-5. pp 188.
- Oliveira, A y Pampulha, M. E. 2006. Efectos de la contaminación por metales pesados de largo plazo sobre las características microbianas del suelo. J. Biosci Bioeng; 102 (3): 157.
- Paul, E. A. (2007). Soil microbiology, ecology, and biochemistry. Academic Press. Amsterdam, Boston, pp 532.
- Porta-Casanellas, J., López-Acevedo, M., Roquero De Laburu, C., 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente, Tercera edición; Impreso en España, Ediciones Mundi-prensa. pp.929.
- Probanza, A., J. L. Mateos., J. L. Mateos., J. A. Lucas García., B. Ramos., M. R. de Felipe., F. J. Gutiérrez Manero. 2001. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. Microbial Ecology. Volume 41, Issue 2, pp 148.
- Rabindranath, T. 2008. Características edáficas, fisiológicas, climáticas e hidrográficas de México. INEGI. Geografía de México.
- Ramos, S. B., Pereyra de la Iglesia M. T., Probanza, A., Lucas, G. J. A., Megias, M., Gutiérrez, M. F. J. 2006. Screening for PGPR to improve growth of *Cistus ladanifer* seedlings for reforestation of degraded Mediterranean ecosystem. Plant Soil; 287:59-68.
- Rojas, F. E. 1984. Análisis del Crecimiento de Plántulas de Diez Especies del Género *Pinus* Bajo Tres Condiciones Edáficas y Dos Regímenes de Humedad. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de posgraduados, Chapingo, México.
- Rucks, L., F. García. A. Kaplán., J. Ponce de León., M. Hill. 2004. Propiedades físicas del suelo. Facultad de agronomía. Universidad de Agronomía. Universidad de la Republica. Departamento suelo y aguas. Montevideo Uruguay.

- Sáenz, R. C. y Lindig, C. R. 2004. Evaluación y Propuestas para el Programa de Reforestación en Michoacán. Ciencia Nicolaita. No. 37. Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México. pp.120.
- Sáenz, R. J. T., Villaseñor, R. F. J., Muñoz, F. H. J., Rueda, S. A. y Prieto, R. J. A. 2010. Calidad de planta en viveros forestales de clima templado en Michoacán. Folleto Técnico Núm. 17. SAGARPA-INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Uruapan. Uruapan, Michoacán, México. 48 p.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, Ma. del C y Govindappa, M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of Bacillus and Pseudomonas: a review. Biocontrol Science and Technology, vol. 22, no 8.
- Silva, L., Abrahao, A., Barberi, N., Da Silva, K., Furtado, F. y De Souza F. 2009. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Plant Soil. 319:127-145.
- Six, J., Callewaert, P., Lenders, S., De Gruze, S., Morris, S. J., Gregorich, E. G., Paul E. A. y Paustian K., 2002. Measuring and understanding carbon storage in afforested soils by physical fractionation. Soil Science Society of America Journal 66: 1981-1987.
- Tisdall, J. M., Oades, J. M. 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. Journal of Soil Science 33, 141–163.
- Thompson, M. L., Frederick, R. T. 1988. Los suelos y su fertilidad. McGraw-Hill Book Company, New York, USA. Editorial Reverté, S. A. Cuarta Edición. Reimpresión Junio 2002. ISBN: 84-291-1041-0.
- Trasar, M. C., Leirós, M. C., Gil, F. 2000. Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): specific parameters. Soil Biology & Biochemistry 32: 747-755.

- Valencia, C. E. 2006. Contribución de la reducción bacteriana de Fe a la nutrición vegetal, perspectivas biotecnológicas. *Rev Latinoam Microbiol*; 48 (2): 126-130
- Van Deuren, J., T. Lloyd., S. Chetry., R. Liou y J. Peck. 2002. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide, 4th Edition. Technology Innovation Office, EPA Platinum International, Inc.
- Velazquez-Becerra, C., L. I. Macías-Rodríguez., J. López-Bucio., J. Altamirano-Hernández., I. Flores-Cortez., E. Valencia-Cantero. 2011. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and medicago sativa *morphogenesis in vitro*. *Plant and Soil*. Volumen 339, Número 1, pp 329.
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J. A., de la Rosa Pérez, D. A. 2005. Suelos Contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación, Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Impreso en México. pp 31.

10. CAPÍTULO II

Crecimiento de plantas de *Pinus devoniana* inoculadas con *Laccaria* spp, *Lactarius deliciosus* y *Bacillus cereus* (L254) en condiciones de invernadero.

10.1. INTRODUCCIÓN

En México, el género *Pinus* representa el 60 % de las especies maderables y es uno de los principales géneros en los cuales se presenta la actividad económica forestal. La cosecha de madera de especies de pinos representa en 85 % de la producción total de ésta (Caballero-Deloya, 2010).

Los pinos de México son valiosos por su uso tradicional, comercial y por los servicios ambientales que ofrecen; sin embargo, su cobertura disminuye aceleradamente debido a incendios forestales, deforestación para aprovechamiento de madera comercial o de subsistencia (Farjon *et al.*, 1997).

Por las causas anteriores establecen la necesidad de efectuar mejores estrategias como las plantaciones forestales comerciales o de restauración y para la protección y conservación de los recursos asociados al bosque (Sáenz *et al.*, 2010).

Una de las estrategias son las plantas con micorrizas ya que tienen mayor capacidad de resistencia y tolerancia a múltiples condiciones de estrés ambiental (Pozo y Azcón, 2007). Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre algunos hongos y las raíces de plantas, las cuales están presentes en aproximadamente 95 % de las plantas terrestres (Brundrett, 2009). Esta simbiosis es un elemento fundamental para la mayoría de las comunidades forestales y en bosques de pinos las ectomicorrizas son las más abundantes (Tedersoo *et al.*, 2010). En los árboles de la familia Pinaceae las ectomicorrizas son esenciales para su conservación y supervivencia (Marmeisse, 2004).

El crecimiento de plantas de *Pinus devoniana* fue evaluado bajo condiciones de invernadero y con la inoculación de las ectomicorrizas *Laccaria* spp, *Lactarius deliciosus* y la bacteria *Bacillus cereus* (L254). El sustrato utilizado fue Peat-most con arena (2:1 v:v). El experimento tuvo una duración de siete meses y durante el transcurso de éste se evaluaron las variables de crecimiento de altura, cobertura y diámetro. Al finalizar el experimento se realizó una cosecha destructiva donde se

evaluaron las variables de longitud de tallo y de raíz, peso fresco de la parte aérea y de raíz, peso seco de la parte aérea y de raíz, volumen de raíz, clorofila y finalmente se determinó el porcentaje de micorrización. La colonización de los hongos ectomicorrízicos fue en los primeros veinte centímetros de la raíz. Las plantas de *Pinus devoniana* co-inoculadas con *Laccaria* spp y *L. deliciosus* tiene mayores valores en las variables de crecimiento analizadas, siendo estas significativamente diferentes a las plantas control.

10.2. ANTECEDENTES

La asociación de una planta y un hongo es conocida como micorriza. La definición de Micorriza significa “hongo-raíz”, el cual fue propuesto por Frank en 1885 para describir la asociación simbiótica de plantas y hongos, los cuales se benefician mutuamente. Las micorrizas se asocian con importantes especies forestales de la familia *Pinaceae*, *Fagaceae* y *Betulaceae* (Karkouri *et al.*, 2005). Los hongos micorrízicos viven en las raíces delgadas de las plantas. Los exudados producidos por las raíces de las plantas son los que aportan al hongo los carbohidratos que requiere para vivir (Saenz, 2004). La micorrización inicia con la germinación de las esporas, esto sucede una vez que se tengan las condiciones ambientales favorables como temperatura y humedad (Bolan y Abbott, 1983). Cuando el hongo encuentra la raíz apta para la colonización, este incrementa la ramificación de su micelio y con ello aumenta la oportunidad de contacto con la raíz (Giovannetti *et al.*, 1993). El reconocimiento hongo-planta es facilitado por exudados de raíces de las plantas (Saenz, 2004). Una vez establecida la asociación micorrícica se producen cambios en ambos. El desarrollo de la interface es uno de los cambios que se producen en la asociación, en cual se lleva el intercambio de nutrientes en ambas direcciones (Peterson y Bonfante, 1994). La micorrización mejora la absorción de algunos nutrientes como pueden ser nitrógeno, fósforo, potasio, hierro, entre otros (Smith y Read, 1997).

En las micorrizas se distinguen dos grandes grupos, las cuales son las endomicorrizas y ectomicorrizas (Harley y Smith, 1983; Harley y Harley, 1987). Las endomicorrizas se distinguen porque sus hifas se desarrollan entre y dentro de las células corticales de la raíz, originando arbuscúlos y vesículas. Este tipo de micorriza es de mucha importancia en la agricultura y fruticultura, al igual que para diversas especies de briofitas, pteridofitas, gimnospermas y varias angiospermas (Harley y Harley, 1987).

Las ectomicorrizas son una asociación mutualista entre algunos hongos del suelo y ciertas plantas y estas tienen un sistema de hifas y micelio que se vinculan con la raíces ectomicorrizógenas (Kong-Luz, 2003).

La característica de las ectomicorrizas es que el micelio crece entre los espacios de las paredes de las células de las raíces, pero sin atravesarlas. Las raíces con ectomicorriza tienen la característica de Manto, Red de Hartig y micelio externo (Smith y Read, 2008).

Las ectomicorrizas son especialmente los Basidiomicetes, incluyendo macromicetos forestales y *Sclerodermales*. Los hongos formadores de ectomicorrizas son de los géneros *Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopon*, *Russul*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Tricholoma*, *Cenococcum*, y *Tuber*. Las plantas huésped de las ectomicorrizas son las gimnospermas y angiospermas (Castellano y Molina, 1989; Selosse *et al.*, 2006).

Descripción del Género *Lactarius*

Las especies del Género *Lactarius* se caracterizan por tener la capacidad de segregar látex de colores y su carne quebradiza.

Las características macroscópicas de las setas del género *Lactarius* es que presentan sombreros convexos que se aplanan y se deprimen con el tiempo, la coloración que presentan es de blancos, rojos y ocre. Las láminas del sombrero son adherentes y producen esporas blancas de tipo amiloides. En este género hay especies comestibles y también tóxicas.

En el género *Lactarius* destaca *Lactarius deliciosus* (L.) Gray que es una especie muy comercializada (Cuesta y Jiménez, 2003).

Descripción de *Lactarius deliciosus*

Lactarius deliciosus (L.) Gray es un hongo comestible conocido comúnmente como nísacalo, nicalo, nízcalo, mízcalo, azmilcle, chilpan enchilado, entre otros. Las características macroscópicas de esta especie son que está compuesta por un sombrero con láminas y un pie. El sombrero es convexo, evolucionado a extendido y decaído en forma de embudo de hasta 25 cm de diámetro, con margen liso y enrollado de color claro, cutícula de color anaranjado, no separable. Las láminas del sombrero son adnatas o ligeramente decurrentes de color naranja que torna a verde en las zonas dañadas. El Pie es corto con relación al sombrero, quebradizo de hasta 8 cm de longitud y 3.5 cm de diámetro, color naranja

blanquecino. Las esporas contenidas en las láminas son ovoides, reticuladas y con verrugas, de 8-9 x 6-7 μm hialinas y amiloides. Este hongo se encuentra en otoño y principios de invierno en zonas de pinares, prefiriendo los árboles jóvenes, los cuales se encuentran principalmente en grupos o en forma gregaria (Cuesta y Jiménez, 2003).

Descripción del género *Laccaria* spp. Berk y Broome.

Los hongos pertenecientes al género *Laccaria* spp son setas comestibles de colores brillantes, desde colores de naranjas a violetas. Las láminas del sombrero son anchas, gruesas, adherentes hasta un poco decurrentes y separadas entre sí. Las esporas que producen estos hongos son blancas, de forma ovoides casi lisas, con pequeños agujones (Cuesta y Jiménez, 2003) y el micelio es a veces teñido de violeta (Castro-Cerceda y Freire, 1984). *Laccaria* spp es considerada una especie cosmopolita, habita en bosques profundos, en suelos arenosos y volcánicos (Singer, 1986).

Beneficios de las micorrizas.

Los suelos poseen naturalmente una diversidad de especies de micorrizas, las cuales pueden colonizar las raíces de la mayoría de las plantas cultivadas, independientemente de las condiciones ambientales. Las micorrizas pueden mejorar el suministro de nutrientes, crecimiento y producción de las plantas hospederas especialmente en suelos donde hay deficiencia de nutrientes (Pérez *et al.*, 2011). Entre otros beneficios que proporciona la micorrización destacan: la protección ante el ataque de parásitos, hongos patógenos y nematodos; el aumento de su resistencia a la herbívora; influyen en la producción de sustancias defensivas por parte de la misma planta y absorben metales pesados tóxicos como el zinc y el cadmio, los cuales son alojados en las hifas de los hongos (Camargo-R *et al.*, 2012). En la interacción simbiótica también es importante la producción de hormonas por los hongos como auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno. Estas hormonas promueven que la raíz se ramifique, al igual que estimulan a las raíces micorrizadas a aumentar su actividad fisiológica (Wild, 1990).

Micorrización en pinos.

En el género *Pinus* en asociación con micorrizas se ha logrado superioridad en cuanto a establecimiento, supervivencia y crecimiento en las reforestaciones, ya que esta asociación simbiótica con hongos ectomicorrízicos permite que se abastezca mejor de agua y nutrientes como fósforo y nitrógeno (Barroetaveña *et al.*, 2012). En un estudio determinaron el efecto de las sustancias húmicas en la simbiosis *Pinus pseudostrobus* y hongos ectomicorrízicos *Amanita caesarea sensu lato*, *Lactarius deliciosus* y *Laccaria* spp. Los resultados mostraron que las sustancias húmicas fomentan el establecimiento de los hongos en la planta. La inoculación de *L. deliciosus* y la adición de sustancias húmicas aumentaron la longitud específica radical en comparación con las plantas no inoculadas, aunque no se observó un efecto en cobertura, altura y biomasa, mientras que *L. deliciosus* y *Laccaria* spp aumentaron la eficacia fotosintética de las plantas inoculadas (Caro, 2013).

Otra investigación se realizó con el objetivo de hacer la evaluación de la especificidad, infectividad y efectividad de ocho especies de hongos ectomicorrízicos comestibles en el desarrollo de *Pinus patula* y *Pinus greggii*. Los resultados expusieron que la ectomicorriza que mostró mayor efecto en altura, diámetro y peso seco fue *Laccaria laccata* en *Pinus patula*. En *Pinus greggii* se observó que con la asociación de *Suillus pseudobrevipes* y *L. laccata* se obtuvo una mayor colonización (Carrera, 2004). En otro trabajo se investigó el efecto de la inoculación de *Laccaria laccata* s.l., *Hebeloma mesophaeum* s.l y *Boletus edulis* s.l., en la especie de *Pinus greggii* Engelm. y *P. montezumae* Lamb. sobre el peso seco de la parte aérea, raíz, altura, diámetro del tallo y contenido nutrimental. Los resultados mostraron un aumento en todos los parámetros con la inoculación de los dos hongos con respecto a las plantas no inoculadas (Martínez, 2010). Otra investigación evaluó el efecto y la eficiencia de la inoculación *in vitro* de cinco cepas diferentes de ectomicorrizas (producidas *in vitro*) en plántulas de *P. pseudostrobus* y *P. patula*. En general los resultados mostraron que las plantas colonizadas obtuvieron mejores resultados en la supervivencia, desarrollo y en el crecimiento en comparación con las plantas no micorrizadas (Gómez, 2013).

Por otra parte un estudio se realizó con plantas de *Pinus devoniana* y *P. pseudostrobus* inoculadas con *Pisolithus tinctorius* 202, *P. tinctorius* (PHC) y *Scleroderma texense* (nativo). Los resultados obtenidos muestran que a los seis meses los hongos utilizados presentaron buena capacidad colonizadora en ambas especies de pinos, así mismo ambos mostraron formación de micelio externo. Durante esta etapa temprana, los pinos estudiados al ser inoculadas con *S. texense* obtuvieron significativamente mayor biomasa de la parte aérea en comparación con las plantas sin inóculo. En la especie *Pinus devoniana* se observó que al año del experimento, tuvo un aumento en el volumen de la parte aérea lograda con la asociación de *P. tinctorius* (202) (Valdés *et al.*, 2010). En un ensayo la especie *P. devoniana* fue inoculada con la bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2. Los resultados mostraron que la bacteria promovió el crecimiento de *P. devoniana*, obteniendo un aumento en altura, grosor del tallo, y un incremento en la concentración de clorofila (Valencia-Cantero *et al.*, 2015).

10.3. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo se realizó con el propósito de evaluar el comportamiento del crecimiento de plantas de *Pinus devoniana* inoculadas dos hongos ectomicorrízicos *Laccaria* spp, *Lactarius deliciosus* y una bacteria promotora del crecimiento *Bacillus cereus* (L254), esto en condiciones de invernadero.

10.4. HIPÓTESIS

Las plantas de *Pinus devoniana* inoculadas con los hongos ectomicorrízicos y la bacteria, tendrán un mejor crecimiento en comparación con las plantas no inoculadas.

10.5. OBJETIVOS

10.5.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto en el crecimiento de *Pinus devoniana* inoculada con *Laccaria* spp, *Lactarius deliciosus* y *Bacillus cereus* (L254) en condiciones de invernadero.

10.5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el crecimiento de *P. devoniana* inoculada con *Laccaria* spp, *Lactarius deliciosus*.
- Evaluar el crecimiento en *P. devoniana* inoculada la bacteria *Bacillus cereus* (L254).
- Evaluar el porcentaje de micorrización de las plantas inoculadas con *Laccaria* spp, *Lactarius deliciosus*.

10.6. MATERIALES Y MÉTODOS

10.6.1. Descripción general del experimento

El estudio se desarrolló en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacán de san Nicolás de Hidalgo (UMSNH), el cual consistió en la inoculación de los dos hongos ectomicorrízicos y una bacteria promotora del crecimiento vegetal en plantas de *Pinus devoniana*.

10.6.2. Material biológico

Los hongos ectomicorrízicos utilizados fueron *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Interacción Suelo-Planta-Microorganismo del IIQB de la UMSNH. Los inóculos fueron colectados en las plantaciones forestales y bosques de Yoricostio Mpio. de Tacámbaro, Michoacán por la Asociación de Recolectores de Hongos de Yoricostio, la Villita S. A. de R. L. Posteriormente se llevaron al Laboratorio y se conservaron en refrigeración a 4 °C. La bacteria que se utilizó fue *Bacillus cereus* (L254), la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIQB de la UMSNH. Esta bacteria fue sembrada en Agar Nutritivo (Bioxon) y crecida en una cámara de incubación a 28 °C± 2.

Las esporas de los hongos ectomicorrízicos se encontraba en medio líquido. A dicha suspensión se le determinó la concentración de esporas mediante diluciones. Lo anterior se realizó con una cámara de Neubauer y un microscopio óptico (marca Zeigen) a 40x. La viabilidad de las esporas se determinó por medio de la una prueba de MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).

10.6.3. Material vegetal

La especie de estudio para este experimento fue *Pinus devoniana*. Las semillas de esta fueron proporcionadas por el banco de germoplasma de la COFOM (Comisión forestal del estado de Michoacán).

Las semillas fueron colocadas en bolsas de plástico herméticas etiquetadas y almacenadas en un refrigerador a 4 °C hasta su utilización.

10.6.4. Esterilización superficial de las semillas

La esterilización superficial de las semillas se realizó previo al montaje del experimento, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera: las semillas se colocaron en un vaso de precipitados de 250 ml que contenía hipoclorito de sodio al 5 % v/v (Cloralex^{MR}) y dicha suspensión se agito constantemente durante ocho minutos. Posteriormente las semillas se lavaron 2 veces con agua estéril y enseguida estas se colocaron en etanol al 25 % agitando durante un minuto y finalmente las semillas se lavaron 3 veces con agua estéril y a continuación las mismas fueron puestas en remojo en agua estéril por 24 horas.

10.6.5. Montaje del experimento

En una charola de germinación de 200 cavidades y medidas de 54.5 cm x 25 cm x 4 cm se colocaron las semillas previamente esterilizadas, en la cual permanecieron durante treinta días. Posteriormente se procedió al trasplante de las plantas a macetas de 23 cm x 23 cm y 21.5 cm de profundidad, contenían sustrato comercial Peat-most con arena en proporciones 2:1v/v. En dichas macetas se colocaron 5 plantas y por cada tratamiento el número de macetas fue 4. La fertilización se realizó una única vez con una solución nutritiva comercial MS, la cual se agregó a cada maceta a una quinta parte de la recomendada en la etiqueta (1.075 g por cada medio litro de agua). La inoculación de los hongos ectomicorrízicos (*Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*) y la bacteria se realizó a los 13 días después del trasplante de las plántulas y la cantidad de inóculo fue de 1×10^6 esporas por planta para las ectomicorrizas y 1×10^7 unidades formadoras de colonia para la bacteria (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Descripción de tratamientos.

Tratamiento	Descripción
Control	<i>P. devoniana</i> creciendo sin inóculo
Del	<i>P. devoniana</i> creciendo con <i>Lactarius deliciosus</i>
Lac	<i>P. devoniana</i> creciendo con <i>Laccaria</i> spp
Lac-Del	<i>P. devoniana</i> creciendo con <i>Laccaria</i> spp y <i>Lactarius deliciosus</i>
L254	<i>P. devoniana</i> creciendo con <i>Bacillus cereus</i> (L254)

10.6.6. Variables evaluadas

El experimento tuvo una duración de siete meses y los datos morfológicos de altura, cobertura y diámetro del tallo se tomaron cada mes en todas las plantas. La cosecha destructiva se realizó al término del experimento, la cual consistió en la división de la planta en parte aérea y de raíz. Los datos obtenidos fueron de longitud del tallo, longitud de raíz, peso fresco de la parte aérea y de raíz y peso seco de la parte aérea y de raíz, clorofila de las hojas y el porcentaje de micorrización el cual se determinó con la técnica de Palazón (1999).

La variable de altura se tomó del ápice a la base de la planta al ras del suelo, lo anterior cada mes en todas las plantas. En la cosecha destructiva la longitud del tallo se midió donde empezaba la raíz hasta el ápice de la planta y la longitud de raíz se tomó de la base del tallo hasta la raíz más larga.

El diámetro se tomó a la altura de la base durante el experimento y en la cosecha destructiva se midió hasta donde terminaba el tallo. Para su medición se utilizó un vernier marca Truper (Gómez, 2013).

Para la cobertura se tomaron dos diámetros de la copa y para determinarla se utilizó la fórmula de la elipse ($\text{Área} = \pi * \text{semiejea} * \text{semiejeb}$), para medir esta variable se utilizó una regla de treinta centímetros (Gómez, 2013) (Figura 1).



Figura 1.- Toma de datos de cobertura de plantas de *Pinus devoniana*.

El peso fresco de la parte aérea y de raíz se tomó al momento de realizar la cosecha destructiva. Para determinar el peso seco las partes de la planta se colocaron en un horno a 70 °C hasta alcanzar un peso constante (Gómez, 2013). El volumen de raíz se midió por desplazamiento de agua de acuerdo al principio de Arquímedes. En una micropipeta se colocó agua a una medida conocida y se contabilizó el desplazamiento de agua al colocar la raíz dentro de la micropipeta.

10.6.7. Extracción de Clorofila

La extracción de clorofila se realizó de la siguiente manera: de acículas de las plantas se pesaron de entre 0.206 y 0.209 g, posteriormente éstas se maceraron en un mortero con 4 ml de acetona pura y el macerado se colocó en tubos de 12 ml. El mortero se enjuagó con 2 ml de acetona y por último los tubos con el macerado se aforaron a 10 ml. Después de 24 horas se procedió a la toma de las lecturas del macerado de los tubos en el espectrofotómetro a 664 nm y 648 nm y finalmente se determinó la concentración de clorofila (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013):

$$\text{Clorofila A } (12.21) * (\text{dato } 664) - (2.81) * (\text{dato } 648)$$

$$\text{Clorofila B } (20.13) * (\text{dato } 648) - (5.03) * (\text{dato } 664)$$

$$\text{Total} = ((10) * (\text{total/peso})) / \text{peso}$$

10.6.8. Porcentaje de micorrización

El porcentaje de micorrización de las plantas se determinó de la siguiente manera. Para eliminar el exceso de suelo en las raíces de las plantas se limpiaron cuidadosamente con agua corriente y con las raíces limpias se tomaron fotografías. Posteriormente en la fotografía la raíz se dividió en cuatro partes para poder realizar el conteo de raíces bifurcas y sin bifurcación. La primera parte de la raíz fue de 0-10 cm, la segunda los siguientes 10-20 cm, la tercera de 20-30 cm y por último el resto de la raíz, finalmente el porcentaje de colonización se determinó por la siguiente regla (Palazón *et al.*, 1999) (Figura 2):

$$(\text{Número de raíces bifurcadas} \times 100) / \text{Número total de raíces.}$$

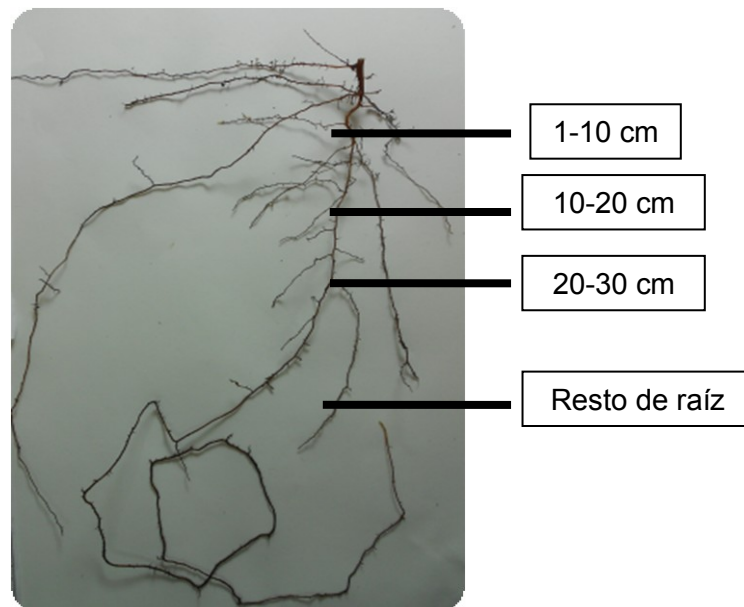


Figura 2.- Medición del porcentaje de micorrización en raíces de plantas de *Pinus devoniana*.

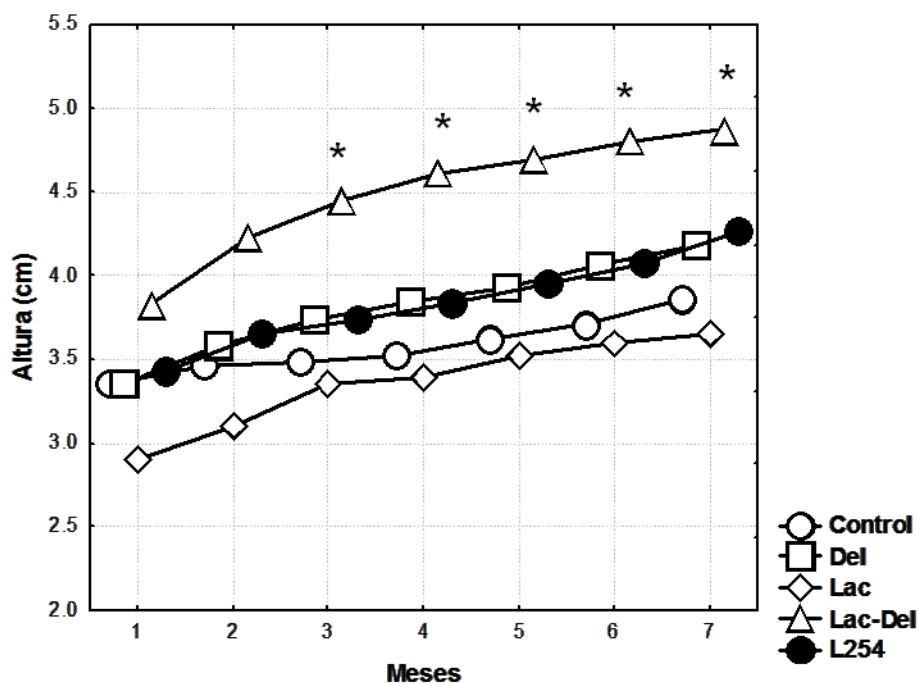
10.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos obtenidos en el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba de Duncan $p < 0.05$ con el programa estadístico Statistica v7.

10.8. RESULTADOS

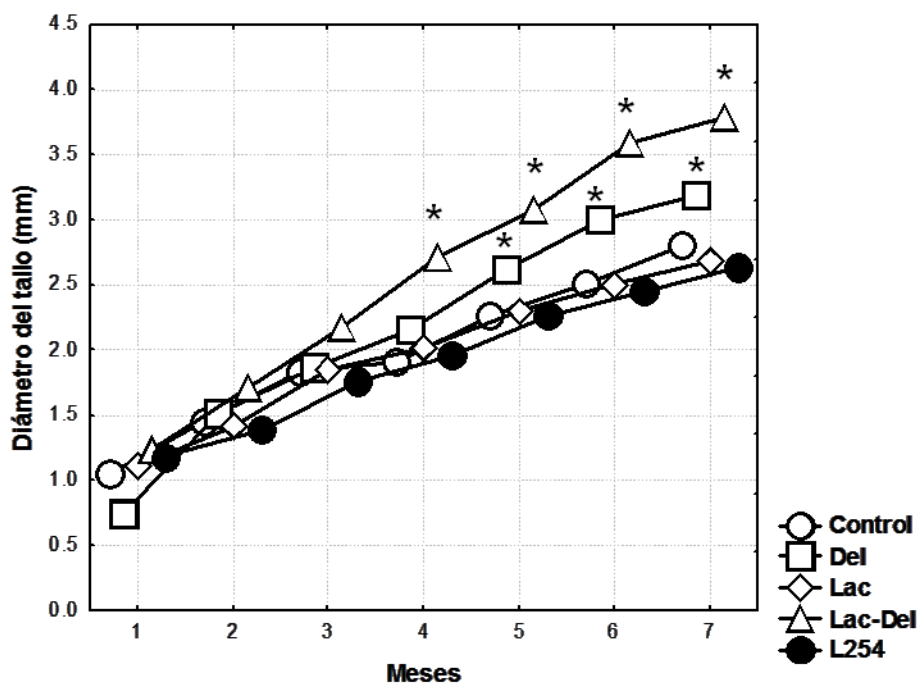
De acuerdo con los datos obtenidos durante siete meses del experimento, los resultados muestran que la inoculación de los hongos ectomicorrízicos y la bacteria tienen efecto sobre las variables altura, diámetro y cobertura (Gráfica 1-3).

Los datos de altura durante los siete meses muestran que todos los tratamientos tuvieron incremento constante conforme transcurrió el experimento, pero el tratamiento de la co-inoculación de *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus* (Lac-Del) fue el que tuvo un mayor incremento en altura en las plántulas de *Pinus devoniana* (Gráfica 1). Los tratamientos con la inoculación simple de *Laccaria* spp (Lac), *Lactarius deliciosus* (Del) y la bacteria *Bacillus cereus* (L254) no presentaron diferencias significativas con respecto a las plantas del tratamiento control.



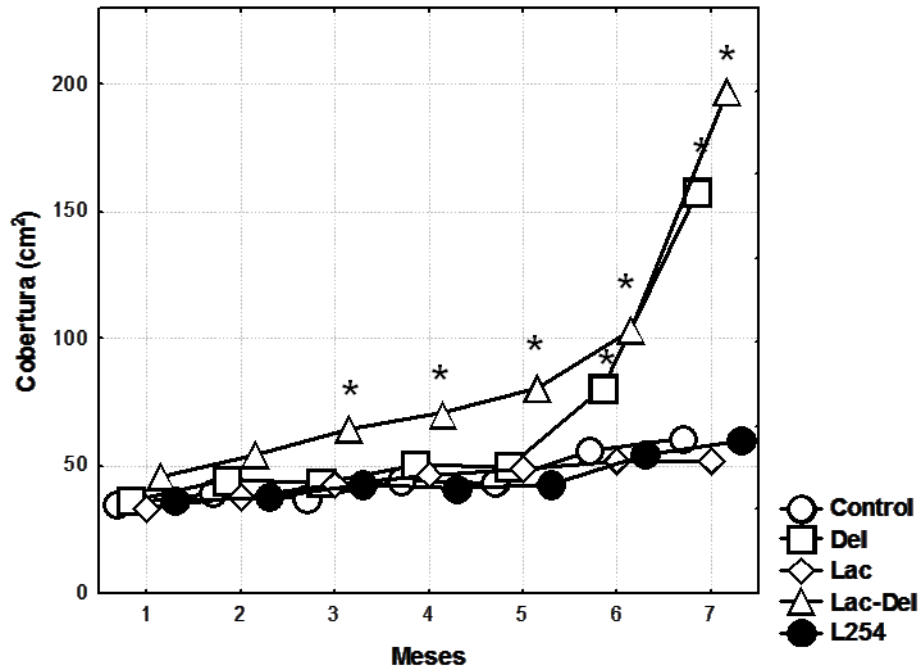
Gráfica 1.- Altura de las plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos, durante los siete meses del experimento. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Tratamientos con asterisco no presentan diferencias significativas.

En el diámetro del tallo se observó un incremento entre todos los tratamientos, pero el tratamiento que mostró un mayor incremento en esta variable fue Lac-Del, separándose de los demás tratamientos. El diámetro de las plantas de todos los tratamientos en los primeros tres meses no tuvieron diferencias significativas con respecto a las plantas control. Las plantas del tratamiento Lac-Del a partir del mes cuatro fueron diferentes significativamente con relación a las plantas de los tratamiento control, Lac y L254 (Gráfica 2).



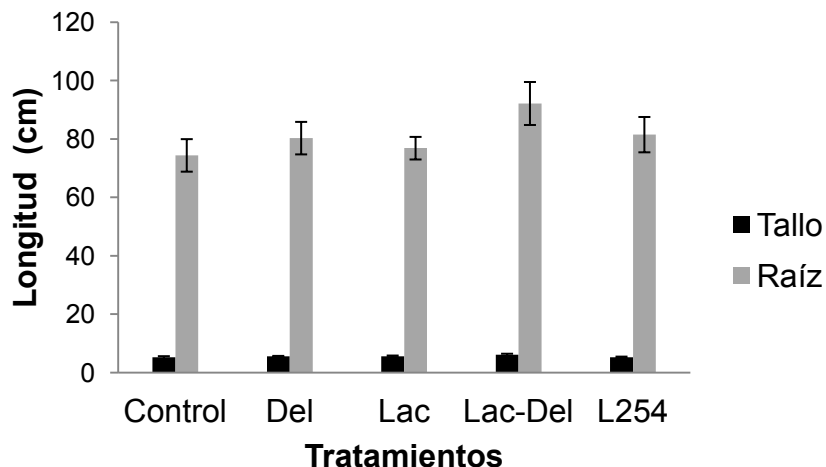
Gráfica 2.- Diámetro del tallo de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos, durante los siete meses del experimento. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Tratamientos con asterisco no presentan diferencias significativas.

En cobertura los resultados muestran un incremento muy notable con el tratamiento Lac-Del desde el segundo mes de inoculación. La cobertura de las plantas del tratamiento Lac-Del fueron diferentes significativamente con respecto a las plantas de los tratamientos control, Lac, Del y L254 en los primeros cinco meses. En los últimos dos meses, la cobertura de las plantas de los tratamientos Del y Lac-Del no presentaron diferencias significativas entre ellos (Gráfica 3).



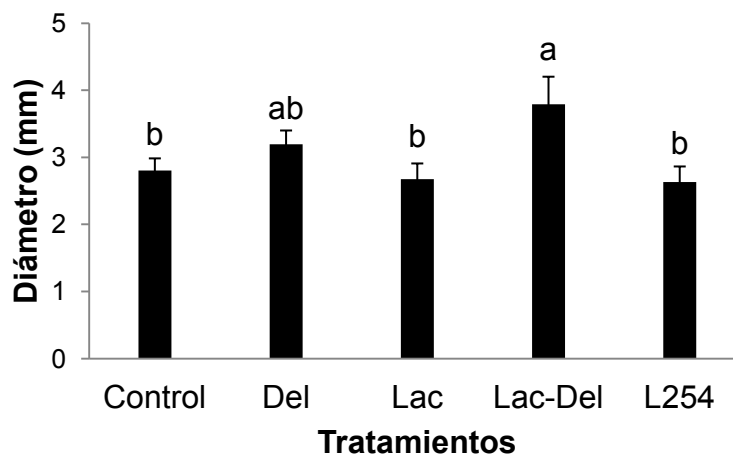
Gráfica 3.- Cobertura de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos, durante los siete meses del experimento. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Tratamientos con asterisco no presentan diferencias significativas.

En la cosecha destructiva los resultados obtenidos son los siguientes. En la variable de longitud del tallo y de raíz muestran que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, ya que todos tuvieron valores similares. En estas variables se observó un pequeño incremento con el tratamiento Lac-Del pero no es significativamente diferente con los demás tratamientos. La longitud de raíz obtenida en los fue de 74.40 cm a 92.18 cm y la longitud del tallo se encuentra entre los 5.20 cm y 6.11 cm (Gráfica 4).



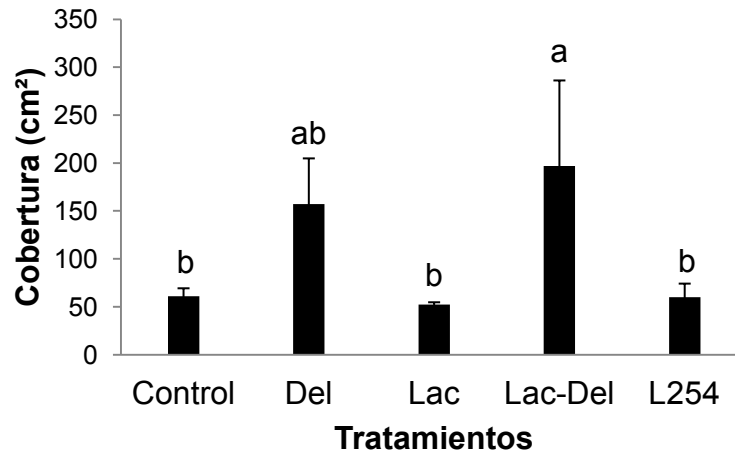
Gráfica 4.- Longitud del tallo y de raíz de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar.

El diámetro de las plantulas mas alto fue de 3.79 mm y éste se obtuvo en las plántulas del tratamiento Lac-Del, el cual fue significativamente diferente con los tratamientos control, Lac, y L254, pero son similares con los resultados obtenidos en el tratamiento Del (Gráfica 5).



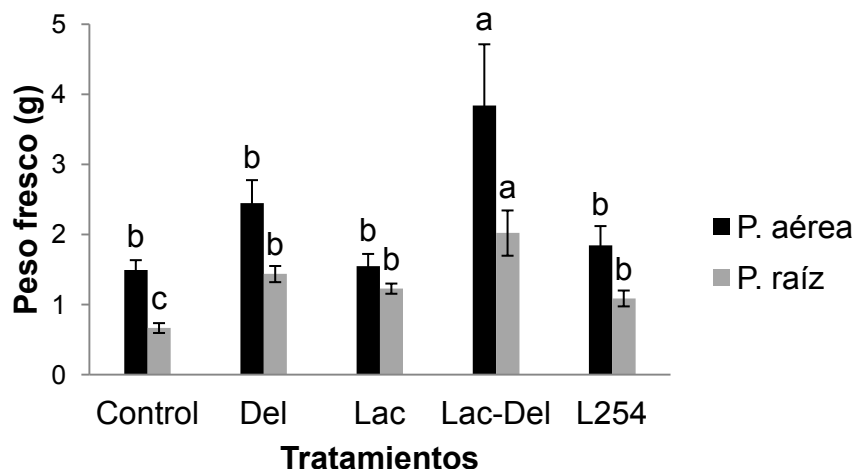
Gráfica 5.- Diámetro del tallo de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Para la cobertura, los resultados muestran un comportamiento similar a lo ocurrido con el diámetro. Las plantas con el tratamiento Lac-Del tuvieron las mayores coberturas de 197 cm², siendo este valor significativamente diferentes con los tratamientos Control, Lac y L254 (valores entre 52 y 61 cm²), aunque según el análisis las coberturas obtenidas en el tratamiento Del y en el Lac-Del no hay diferencia estadística entre estos (Gráfica 6).



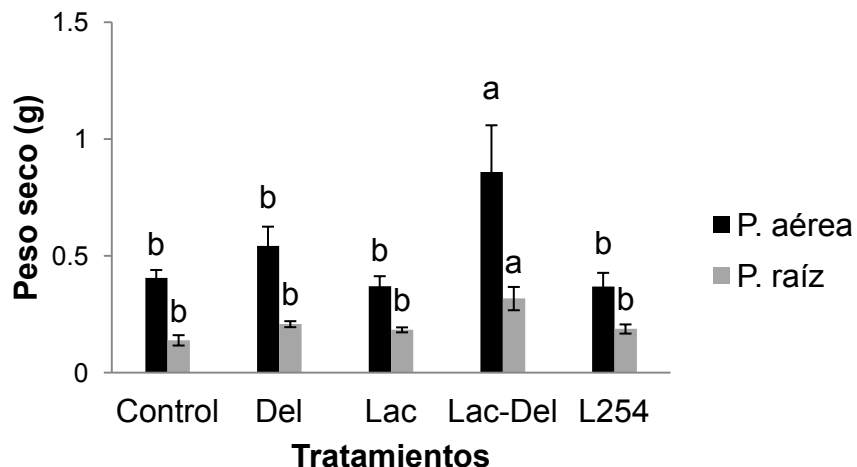
Gráfica 6.- Cobertura aérea de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* sp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

En las variables de peso fresco de la parte aérea y de raíz observamos que las plántulas del tratamiento Lac-Del obtuvieron los valores mas altos en ambas variables y son significativamente diferentes con todos los demás tratamientos. Para el peso fresco de la parte aérea el valor mayor fue de 3.83 g, mientras que para la longitud de raíz fue de 2.02 g (Gráfica 7).



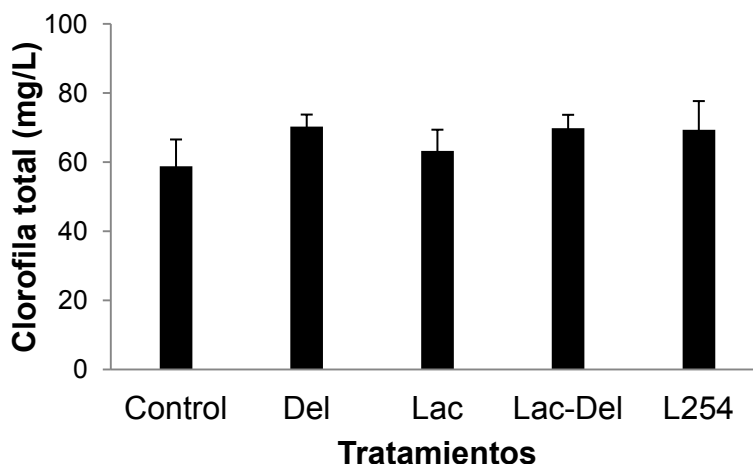
Gráfica 7.- Peso fresco de la parte aérea y de raíz de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Las barras representan el error estandar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Para el peso seco de la parte aérea y de raíz se observó que las plántulas del tratamiento Lac-Del tuvieron mayores valores en ambas variables y éstas son significativamente diferentes con los valores obtenidos en los otros tratamientos. En el peso seco de la parte aérea el valor mayor fue de 0.85 g en promedio y el valor mas bajo fue de 0.36 g. En el peso seco de raíz el valor mas alto fue de 0.31 g y el valor mas bajo fue de 0.13 g y 0.20 g (Gráfica 8).



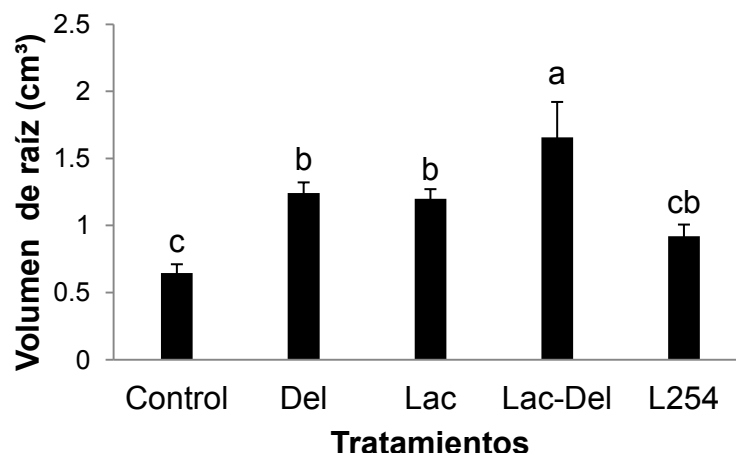
Gráfica 8.- Peso seco de la parte aérea y de raíz de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Las barras representan el error estandar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

En análisis de la clorofila total contenida en las plántulas de *Pinus devoniana*, indica que todas las plántulas independientemente del tratamiento, no muestran diferencias en el contenido de clorofila total entre los tratamientos (Gráfica 9).



Gráfica 9.- Clorofila total de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Las barras representan el error estandar.

En el volumen de raíz de las plántulas se observa que el tratamiento Lac-Del mostró un aumento en esta variable y éste significativamente diferentes con lo obtenido en los demás tratamientos. El tratamiento Lac-Del obtuvo en promedio un volumen de raíz de 1.65 cm³, mientras que los demás tratamientos obtuvieron volúmenes de raíz de entre 0.64 y 1.24 cm³ (Gráfica 10).



Gráfica 10.- Volumen de raíz de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

El porcentaje de colonización muestra una diferencia significativa en las plántulas de los tratamientos de Lac y Lac-Del. La colonización de la raíz en el tratamiento Lac se observa que en los primeros 20 cm la colonización de la raíz es similar, pero ésta disminuye a los 30 y resto de la raíz, esto mismo ocurre en las raíces de las plántulas del tratamiento Lac-Del. En el tratamiento Del no existe diferencia significativa en el porcentaje de colonización entre las tres primeras divisiones del mismo tratamiento. En las plantas de los tratamientos Control y L254 se encontró una ligera contaminación ya que se encontraron raíces bifurcadas (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Porcentaje de colonización de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos, analizados por sección de raíz del mismo tratamiento. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa por fila.

Tratamientos	Sección de la raíz			
	0-10 cm	10-20 cm	20-30 cm	Restante de raíz
Control	3ab	5ab	6a	0c
Del	24a	29a	23a	16b
Lac	19b	34a	21b	15b
Lac-Del	31b	39a	17c	18c
L254	4b	9a	9a	7ab

La colonización de la raíces analizada por secciones de raíz entre los diferentes tratamientos, muestra que a los primeros 10 cm de la raíz el porcentaje de colonización es similar en los tratamientos Del, Lac, y Lac-Del, teniendo porcentajes de entre 19 y 31 % (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Porcentaje de colonización de plántulas de *Pinus devoniana* en diferentes tratamientos, analizados por sección de raíz entre los diferentes tratamientos. Control=sin inóculo; Del=*Lactarius deliciosus*; Lac=*Laccaria* spp; Lac-Del= *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*; L254=*Bacillus cereus*. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Duncan $p < 0.05$. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa por columna.

Tratamiento	Sección de la raíz			
	0-10 cm	10-20 cm	20-30 cm	Restante de raíz
Control	3c	5c	6b	0c
Del	24b	29b	23a	16a
Lac	19b	34ab	21a	15a
Lac-Del	31a	39a	17a	18a
L254	4c	9c	9b	7b

El porcentaje de colonización general que tuvieron las plantas en los diferentes tratamientos son los siguientes: las plantas del tratamiento Del tuvo un 26 %, Lac un 19 % y Lac-Del del 31 %.

En la figura 3 se muestra la forma de las raíces colonizadas por los hongos ectomicorrízicos después de su limpieza. También se muestra como ésta se encontraban colonizadas cuando aun permanecían con suelo al extraerlas de la maceta (Figura 4 a-b).



Figura 3.- Raíces colonizadas de plántulas de *Pinus devoniana* inoculadas con hongos ectomicorrízicos.

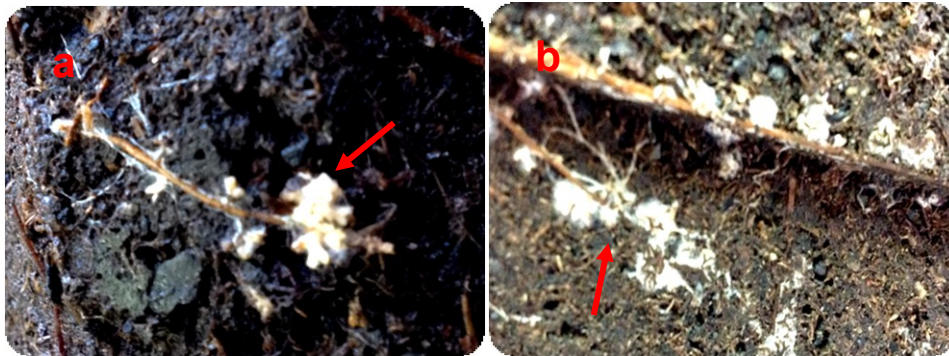


Figura 4.- Raíces colonizadas de plántulas de *Pinus devoniana* con hongos ectomicorrízicos.

10.9. DISCUSIÓN

La respuesta que tuvieron las variables de crecimiento de *Pinus devoniana* durante los siete meses en los tratamientos control, *Lactarius deliciosus* (Del), *Laccaria* spp (Lac), *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus* (Lac-Del) y la bacteria *Bacillus cereus* (L254) muestra que hubo un incremento constante en altura y diámetro independientemente del tratamiento. Aunque las plantas del tratamiento de la Lac-Del sobresalieron en comparación de los demás tratamientos.

En la variable de cobertura se observó que los valores no tuvieron un aumento constante, estos valores fueron muy similares durante el transcurso del experimento, a excepción del tratamiento Lac-Del donde a partir del tercer mes inició un incremento constante y a los cinco meses el tratamiento donde se aplicó *Lactarius deliciosus* (Del) también inició el incremento de la cobertura constantemente hasta el término del experimento. Esto podría deberse al tiempo de colonización del hongo, en especial *L. deliciosus* tiene poco crecimiento micelial y más lento en su colonización (Royo *et al.*, 1998; Santiago Martínez, 2003; Yamada *et al.*, 2001; 2005), así mismo, en algunas especies de pinos se ha visto que con la co-inoculación de dos especies de hongos las plántulas respondieron de una mejor manera (Martínez, 2010). Las plántulas de *P. devoniana* en los diferentes tratamientos no mostraron diferencias significativas en la longitud del tallo y de raíz. Esto probablemente porque esta especie en su etapa de plántula presenta un estado cespitoso, por lo que en longitud de tallo no crece mucho (Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997). En cuanto a la longitud parte de raíz en ocasiones influye el tipo de sustrato utilizado, los nutrientes y el tamaño del contenedor. En este caso puede ser el contenedor, ya que las raíces de las plántulas llegaron al tope de las macetas y eso impidió un mayor crecimiento (Rincón *et al.*, 2001).

El diámetro fue otra de las variables medidas en el experimento. En las especies de *Pinus* el diámetro tiene relación con la cantidad de reservas, a mayor diámetro se tendrá también más de estas (Thompson, 1984). Así mismo podría, ser un indicador de grado de lignificación de la planta (Chavesse, 1980).

En este estudio el tratamiento Lac-Del fue el que tuvo mayor efecto sobre el diámetro de las plántulas de *P. devoniana* y el análisis estadístico muestra una similitud de valores con lo obtenido en el tratamiento Del. Los valores altos obtenidos en diámetro de las plántulas serían buenos para el momento de la plantación, ya que se menciona que un mayor diámetro tiene relación con la supervivencia y algunos autores mencionan una mejora en el volumen de madera en las plantaciones (South *et al.*, 1984).

En las variables de peso fresco y peso seco de la parte aérea y de raíz mostraron tener una correlación, ya que las plántulas que tuvieron mayor peso fresco también fueron mayores en peso seco. Las plántulas con mayor peso fresco y seco fueron las plántulas inoculadas con la combinación de los dos hongos ectomicorrízicos, mientras que las plántulas de los demás tratamientos tuvieron valores muy similares entre ellos. El peso seco de la parte aérea es un indicador de la eficiencia fisiológica, esto en el transcurso del desarrollo de la plántula por lo que se le correlaciona con la supervivencia en campo (Thomson, 1984). Por lo que los incrementos mostrados en biomasa aérea y de raíz con la co-inoculación se atribuye a que la actividad llevada en la raíz por esta co-inoculación se convierte en una mayor actividad fotosintética (Ruano, 2003). La cobertura es otra de las variables relacionadas con la actividad fotosintética, en ésta se obtuvo que las plántulas de los tratamientos Lac-Del y Del tuvieron las mayores coberturas.

Para el volumen de raíz, las plántulas del tratamiento de la combinación de los dos hongos ectomicorrízicos tuvieron valores mayores. Las plantas de los tratamientos control y tratamiento inoculado con la bacteria *Bacillus cereus* (L254) obtuvieron los valores menores en volumen de raíz. El aumento en el volumen de raíz podría deberse a que el hongo funciona como una extensión de la raíz (Allen 1991; Smith y Read 2000) y esto podría aumentar el volumen de la misma.

Los aumentos en las variables de diámetro, cobertura, peso seco (parte aérea y de raíz), de las plántulas de *P. devoniana* obtenidos con la combinación de los dos hongos ectomicorrízicos, podrían deberse a que las plantas aumentaron su tasa fotosintética y obtuvieron ganancias en carbohidratos y por lo tanto ganaron volumen (Montoya, 1995).

En la variable de clorofila no se muestra diferencia significativa de las plántulas inoculadas con respecto a las no inoculadas. Esto podría deberse a que las plantas tenían el suficiente nitrógeno para su desarrollo. el contenido de clorofila se ha observado sin variación cuando existe el suficiente nitrógeno en el suelo (Latsague, 2014). La clorofila la han considerado como un pigmento para medir indirectamente el estado de nutrición de la planta, así mismo en bosque de coníferas se ha empleado para estimar las condiciones del dosel (Zarco-Tejada *et al.*, 2004).

La colonización fue disminuyendo conforme aumentaba la longitud de la raíz, teniendo los mayores porcentajes de colonización en los primeros 20 cm de la raíz. Lo anterior se debe a que principalmente en los primeros centímetros de la raíz se localizan la mayoría de las raíces secundarias delgadas y estas son las más adecuadas para ser colonizadas.

Todos los tratamientos tuvieron una colonización general de entre 19 y 31 %. estos valores son un poco bajos y considera que 38 % podría ser un valor aceptable (Obase *et al.*, 2009), pero dichos resultados no alcanzan este porcentaje.

Los porcentajes bajos de colonización obtenidos podrían ser por los nutrientes que se colocaron en el sustrato usado en el experimento como nitrógeno y fósforo (Wallander, 1992). La baja colonización ha observado en otra especie de pino y los nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo son los que provocan tal situación (Carrillo, 2000).

La inoculación de los dos hongos ectomicorrízicos en las plántulas de *P. devoniana* tuvieron mejor efecto en co-inoculación que cuando se inocularon por separado, aunque algunas similitudes fueron detectadas cuando solo se inóculo *Lactarius deliciosus*. En las especies *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*, la inoculación del hongo *Lactarius deliciosus* se ha estimulado un mayor crecimiento (Gómez, 2013).

Sudhakara y Natarajan (1997) observaron que al inocular simultáneamente *Laccaria laccata* y *Telephora terrestris* en *Pinus patula* obtuvieron mejores resultados de crecimiento que cuando se inoculaban por separado. Así mismo otro

estudio coincide que la combinación de dos o más especies de ectomicorrizas muestran un mayor incremento (Martínez, 2010). En un estudio colocaron simultáneamente *Hebeloma* y *Laccaria* y las plántulas no mostraron diferencias significativas en peso seco total, esto con respecto a las plántulas que se inoculaban individualmente. Las plántulas inoculadas con *Laccaria* tuvieron menores resultados que los obtenidos por *Hebeloma* (Carrasco, 2010). Lo anterior coincide con nuestro trabajo donde se tuvieron menores valores cuando se inoculó solo *Laccaria* spp.

En las plántulas de los tratamientos donde se inoculó *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus* si hubo colonización, pero en algunas variables no existió diferencia significativa con respecto al control. Con lo anterior se puede decir que en vivero hay buenas condiciones para el crecimiento de las plantas como nutrientes y agua, esto podría hacer que no se manifestaron con claridad los beneficios de la micorrización (Barroetaveña, 2012). Las bifurcaciones encontradas en los tratamientos control y L254 fueron diferentes a las encontradas en los tratamientos Lac, Del y Lac-Del.

Así mismo la bacteria inoculada tampoco tuvo efectos en el crecimiento de las plantas, en especies leñosas donde se han usado PGPRs se ha visto que cuando se colocan en suelos ricos la acción de las bacterias no se observa (Sánchez y Lozano Chontal, 2010).

10.10. CONCLUSIONES

Se concluye que a mayor porcentaje de colonización también hay un aumento en las variables de crecimiento de *Pinus devoniana*. Las plantas de *P. devoniana* tuvieron un mayor crecimiento al ser co-inoculadas con *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus*, esto con respecto a las plantas control. Las especies de ectomicorrizas utilizadas resultaron mejor cuando la inoculación se realizó de ambas, teniendo mejores resultados en crecimiento de las plantas de *P. devoniana* que cuando se inocularon de manera individual.

10.11. LITERATURA CITADA.

- Allen, M. F. 1991. The Ecology of Mycorrhizae. Cambridge University Press, New York, pp184.
- Barroetaveña, C., V. Bassani., M. Rajchenberg. 2012. Inoculación micorrizica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. Área protección forestal. Universidad Nacional de la Patagonia. Dto. Ingeniería forestal.
- Bolan, N. S. y L. K. Abbott. 1983. "Seasonal Variation in Infectivity of Vesicular Arbuscular Micorrhizal Fungi in Relation to Plant Response to Applied Phosphorus", Aust. J. of Soil Res. 21.
- Brundrett, M. 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. 320:37-77.
- Carrera-Nieva, A., F. López-Ríos. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. División de ciencias forestales, Universidad Autónoma de Chapingo. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 10(2): 93-98.
- Carrillo, S. C. 2000. Técnicas de micorrización en vivero con hongos ectomicorrizicos. Experiencias realizadas en el Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo", ministerio de medio ambiente. Tercer Curso Avanzado de Viveros y Producción de Planta Forestal. Guadalajara, España. pp19.
- Carrasco, H. V. 2010. Aspectos ecofisiológicos de la raíz de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula* y especies ectomicorrizicas comestibles de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados. Montecillo. pp 89.

- Castellano, M. A., Molina, R., 1989. Manual de viveros para la producción de especies forestales en contenedor. Department of Agriculture, Forest Service. pp. 96-147.
- Castro-Cerceda, M. L. y L. Freire. 1984. Estudio autoecológico y taxonómico del género *Laccaria* Bk. y Br. En Galicia. Universidad de Murcia. Anales de biología 1:11-13.
- Camargo-Ricalde, S. L., N. M. Montañó., C. J. de la Rosa Mera y S. A. Montañó Arias. 2012. Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. Revista Digital universitaria. Volumen 13. Numero 7. ISSN: 1067-6079. UNAM.
- Caballero-Deloya, M. 2010. La verdadera cosecha maderable en México. Rev. Mex. Ciencias For. 1(1): 5-16.
- Caro, G. E. 2013. Efecto de sustancias húmicas sobre la simbiosis de *Pinus pseudostrobus*-Hongos ectomicorrízicos. Tesis licenciatura. Laboratorio "interacción planta-suelo-microorganismos" del instituto de químico Biológicas y en el herbario de la Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 75
- Cuesta, J. y Jiménez, J. 2003. Asociación Micológica El Royo. Guía Micológica, Ficha de especies. *Lactarius deliciosus* Linnaeus: Fries 1821. <http://www.amanitacesarea.com/lactarius-deliciosus.html> (Consultado en octubre 2015).
- Cuesta, J. y Jiménez, J. 2003. Asociación Micológica El Royo. Guía Micológica, Ficha de especies. *Laccaria* sp Linnaeus: Fries 1821. <http://www.amanitacesarea.com/laccaria.html> (Consultado en octubre 2015).
- Chavasse, C. G. R. 1980. Planting stock quality: a review of factors affecting performance. New Zealand Journal of Forestry, 25(2): 144-171.
- Farjon, A. y B. T. Styles. 1997. *Pinus (Pinaceae)*. The New York Botanical Garden, Nueva York. 147 p.
- Farjon, A., J. A. Pérez de la R. Y B. T. Styles. 1997. Guía de campo de los pinos de México y América Central. Royal Botanic Garden y Universidad de Oxford. pp3-5

- Frank, B. 1885. Über die auf Wurzeisymbiosen beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Ber Deutsch Bot Ges 3: 128-145.
- Giovannetti, M., Avio, L., Sbrana, C y Citernesi, A. S. 1993. Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe. New Phytol 123:115-22.
- Gómez, V. F. 2013. Inoculación in vitro de ectomicorrizas comestibles asociados con *Pinus pseudostrobus* Lindl. y *Pinus patula* Schiede ex Schtdl. & Cham. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de ciencias agrícolas. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Red Manejo Biotecnológico, del Instituto de Ecología, A.C. (INECOL).pp.109.
- Harley, J. L., Harley, E. L. 1987. A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora. New Phytologist, Vol. 105, No. 2, A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora (Feb., 1987), pp. 1-102.
- Harley, J. L. y S. E. Smith. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic, Londres, p. 268-295.
- Karkaouri, K., Martin, F., Douzery, J. P. E., Mousain, D., 2005. Diversity of ectomycorrhizal fungi naturally established on containerized *Pinus seedlings* in nursery conditions. Microbiological Research (160):47-52.
- Kong-Luz, A. 2003. Clasificación de los hongos ectomicorrizogenos. In: Estrada-Torres, A. y M.G. Santiago-Martínez. (2003). Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala. pp. 26.
- Latsague, M., P. Sáenz y M. Mora. 2014. Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, sobre el contenido foliar de carbohidratos, proteínas y pigmentos fotosintéticos en plantas de *Berberidopsis corallina* Hook.f. Gayana Bot. 71(1): 37-42. ISSN 0016-5301.
- Martínez, R. M. 2010. Micorrización, crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* y *P. Montezumae* inoculados con tres hongos comestibles. Tesis doctoral. Colegio de posgraduados. Instituto de enseñanza e

investigación en ciencias agrícolas. Postgrado en edafología. Campus Montecillo, Texcoco Estado de México. Pp. 130.

- Marmeisse, R., Guidot, G., Gayl, R., Lambilliotte, H., Sentenac, J., Combierl, D., Melayah, L., Fraissinet-Tachet, J y Debaud, C. 2004. Hebeloma cylindrosporum a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytologist*. 163:481-498.
- Montoya, G., L. Soto, Ben de Jong, K. Nelson, P. Farias, Pajal Yakac Tic, J. Taylor y R. Tipper. 1995. Desarrollo Forestal Sustentable: Captura de Carbono en las Zonas Tzeltal y Tojolabal del Estado de Chiapas. Instituto Nacional de Ecología, Cuadernos de Trabajo 4. México, D.F.
- Obase, K., Tamai, Y., Yajima, T., Miyamoto, T. 2009. Mycorrhizal synthesis of four ectomycorrhizal fungi potted *Populus maximowiczii* seedlings. *Mycoscience*. 50:143-145.
- Orozco-Mosqueda, Ma. del C., C. Velázquez-Becerra., L. I. Macías-Rodríguez., G. Santoyo., I. Flores-Cortez., R. Alfaro-Cuevas y E. Valencia-Cantero. 2013. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) *in vitro* vía dimethylhexadecylamine emission. *Plant and soil*. Volumen 362, Issue 1. pp 51-66.
- Palazón, C., Delgado, I., Cartié, G., Delgado, I., Barriuso, J y Esteban, H.1999. Propuesta de una metodología de evaluación y control de calidad de planta (*Quercus* spp.) micorrizada con *T. melanosporum* para la obtención en España de de la etiqueta de calidad. 5º C. International Science Culture de la Truffe . Aix en Provence.
- Perez, C. Alexander., Rojas, S. Johanna y Montes, V. Donicer. 2011. Micorrizal arbuscular fungi: a biological alternative for sustainable of grasslands agroecosystems in the colombian caribbean. *Rev. Colombiana. Anim.* 3(2). pp.20.
- Perry, J. P. 1991. The pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, OR, USA
- Peterson, R. L., Bofante, P. 1994. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. In. Robson AD, Abbott LK,

Malajczuk N. eds. Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry. Kluwer Academic Publishers. pp 79-88.

- Pozo, M. J. y Azcón A., C. 2007. Unravelling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 393-398.
- Rincón, A. M., I. F. Álvarez., J Pera. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11(6): 265-271.
- Royo, P., Fernández, T. M., Fischer, C. R. 1998. Síntesis micorrícica de *Lactarius deliciosus* Fr. y *Pinus sylvestris* L. Invest.Arg: Sist Recur.For. pp93.
- Ruano, M. J. R. 2003. Viveros Fprestales. Manual de cultivos y proyectos. Edición Mundi-Prensa. Madrid. pp 281.
- Saenz, P. C. 2004. Reino fungí: Micorrizas. Hipertextos del Área de Biología. <http://www.biologia.edu.ar/fungi/micorrizas.htm>. Consultado en octubre del 2015.
- Sáenz, R. J. T., Villaseñor, R. F. J., Muñoz, F. H. J., Rueda, S. A. y Prieto, R. J. A. 2010. Calidad de planta en viveros forestales de clima templado en Michoacán. Folleto Técnico Núm. 17. SAGARPA-INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Uruapan. Uruapan, Michoacán, México. pp 48.
- Santiago Martínez, Ma. G., Estrada-Torres, A., Valeria, L., Herrera, T. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* (37):575-584.
- Sánchez, T. J y M. I. Lozano Chontal. 2010. Inoculación de rizobacterias y hongos micorrizogenos en *Cucumis sativa* L.) Con manejo hidropónico. (Tesis) licenciatura Ingeniero Agrónomo. Fac. C. Agrícolas Xalapa. UV. pp 42.
- Selosse, M. A., Richard, F., He, X., Simard, S. W., 2006. Mycorrhizal networks: desliaisons dangereuses *TRENDS in Ecology and Evolution*. 21-11,621-628.
- Singer, R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. 4ª ed. Koetz Scientific Books. Federal Republic of Germany.

- South, D. B.; Boyer, J. E.; Bosch, L. 1984. Survival and growth of loblolly pine as influence by seedling grade: 13 years results Southern Forest Nursey Management Cooperative, Auburn University, Auburn, Ala. Rep. No 8. pp12.
- Sudhakara-Reddy, M. y K. Natrajan. 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7:133-138.
- Smith, S. E., y Read D. J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd. ed. Academic Press. London, England. pp 605.
- Smith, E. S. y D. J. Read. 2000. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2^a. Ed. Academic press, San Diego, California, USA. pp 589.
- Smith, S.E. y D.J. Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York, USA. pp 606.
- Tedersoo, L., T. May y M. Smith. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217-263.
- Thompson, B. E. 1984. Establishing a vigorous nursery crop: bed preparation, seed sowing, and early seedling growth. *In*: Duryea, M. L. y Landis T. D. (Eds.). *Forest Nursey Manual: production of bareroot seedlings*. MartinusNijhoff/Dr W. Junk Publishers. The Netherlands. pp 243-259.
- Valencia-Cantero, E., I. Flores-Cortez., J. Ambriz-Parra., P. López-Albarrán., C. Velázquez-Becerra. 2015. *Arthrobacter agilis* UMCV2 acelera el crecimiento de *Pinus devoniana*. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. *Phyton* ISSN 0031 9457 84: 58-63.
- Valdés Ramírez, M., E. Ambriz Parra., A. Camacho Vera y A. M. Fierros González. 2010. Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos identificación visual de la ectomicorriza. *Rev. Mex. Cien. For.* Vol. 1 Núm. 2
- Wallander, H. 1992. Regulation of ectomycorrhizal simbiosis in *Pinus sylvestris* L. seedlings. Influence of mineral nutrition. Departament of Forest Mycology and Pathology. Uppsala.

- Wild, A. 1990. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Rusell. McGRAW-HILL. Estado de México. pp. 581-588.
- Yamada, A., Oruga, T., Ohmasa, M. 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis. I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza* (11):59-66
- Yamada, A., Maeda, K., Kobayashi, H., Murata, H. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis *in vitro* between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* seedlings that resembles naturally occurring “shiro”. *Mycorrhiza* (16)111-116.
- Zarco-tejada, P., Miller, J., Harron, J., Hu, B., Noland, T., Goel, N., Mohammed, G., Sampson, P. 2004. Needle chlorophyll content estimation through model inversion using hyperspectral data from boreal conifer forest canopies. *Remote Sensing of Environment* 89(2): 189-199. DOI: 10.1016/j.rse.2002.06.002.

11. DICUSIÓN GENERAL

Los tres suelos procedentes de Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro utilizados para el crecimiento de *Pinus devoniana* son similares en las condiciones fisicoquímicas. En los suelos utilizados se tuvo una deficiencia de fósforo, esto de acuerdo al análisis de macronutrientes. El fósforo es un macronutriente que es requerido en gran cantidad por la planta (FAO, 2002).

Las bacterias UMCV1 y L254 tuvieron influencia en el crecimiento de las plantas de *P. devoniana*. Estas incrementaron en peso fresco de la parte aérea y longitud de raíz, lo cual coincide con trabajos previos en donde ya han probado tener efectos benéficos en otras plantas (López-Bucio *et al.*, 2009).

En el peso fresco de raíz las bacterias UMCV1 y L254 tuvieron efecto sobre ésta, teniendo valores mayores en las plantas inoculadas con respecto a las plantas del tratamiento control. El aumento en esta variable coincide con los resultados obtenidos en otros trabajos, donde se ha observado que la bacterias promueve el crecimiento de raíz y el aumento de biomasa en las plantas inoculadas (López-Bucio *et al.*, 2009).

En el suelo procedente de Ciudad Hidalgo las bacterias mostraron tener mayor efecto en el número de raíces laterales de las plantas, tal vez este sea el suelo con menor disponibilidad de nutrientes por lo que la bacteria tuvo un efecto mayor. Algunas bacterias promotoras del crecimiento funcionan mejor en sitios deficientes de nutrientes (Difuzza, 2007).

En los ensayos *in vitro* e invernadero, las bacterias promotoras del crecimiento tuvieron efectos diferentes en las variables de crecimiento de *P. devoniana*. En el experimento *in vitro* se observó que las baterias si influyeron en el crecimiento de las plantas, independientemente del tipo de batería. En el experimento en invernadero la bacteria no tuvo efecto sobre el crecimiento de las plantas. Lo anterior puede ser por las disponibilidad de nutrientes, ya que en el experimento *in vitro* se usaron suelos naturales y estos tenían la deficiencia de un macronutriente, mientras que en el experimento en invernadero se utilizó un fertilizante comercial y por lo cual se tenían los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta, por lo que no se vio algún cambio en el crecimiento de las plantas. En algunos

trabajos se ha sugerido que la inoculación de bacterias se realice en suelos que muestren deficiencia de nutrientes, en suelos que presenten degradación, entre otros (Pankurts *et al.*, 1997).

La inoculación de hongos ectomicorrízicos en plantas de *P. devoniana* fue importante para el aumento de algunas variables de crecimiento. La co-inoculación de *Laccaria* spp y *Lactarius deliciosus* en las plantas de *P. devoniana* aumentó el crecimiento de las plantas, siendo significativamente diferentes con las del tratamiento control. En algunos estudios se ha reconocido la importancia de las ectomicorrizas en ecosistemas forestales (Meyer *et al.*, 2010) y éstos demuestran que las ectomicorrizas han ayudado en problemas de crecimiento de plantas en viveros (Pera y Parladé, 2005).

12. CONCLUSIONES GENERALES

Las bacterias UMCV1 y L254 tienen influencia en el desarrollo de plantas de *P. devoniana* principalmente en la parte de raíz, pero este efecto depende del suelo donde se inocule. Las bacterias inoculadas tuvieron efecto principalmente en la parte de raíz, esto en el experimento *in vitro*. En invernadero las ectomicorrizas *Laccaria* spp, *Lactarius deliciosus* inoculadas simultáneamente funcionan mejor que cuando se inoculan de manera individual, reflejándose en una mejora en el crecimiento de las plantas *P. devoniana*. Los efectos de la co-inoculación se observaron en la parte aérea y en la parte de raíz.

13. LITERATURA CITADA GENERAL.

- Álvarez, J. F. 2009. Ecología de micorrizas arbusculares y restauración de ecosistemas. Las prensas de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 360.
- Artursson, V., R. D. Finlay, J. K. Jansson. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ. Microbiol.* 8, 1–10.
- Cetina-Alcalá, V., V. González-Hernández y J. Vargas-Hernández. 1999. Manejo en vivero de *Pinus greggii* Engelm. y la calidad de planta. *Agrociencia* 33(4):423-430.
- CONABIO. 2009. *Pinus devoniana*. www.conafor.gob.mx/portal/docs/secciones/reforestacion/FichasTecnicas/Pinusdeviana.pdf. Consultada octubre 2015.
- Difuzá E. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *applied soil ecology* 36.184–189.
- Farjon, A. y B. T. Styles. 1997. *Pinus (Pinaceae)*. The New York Botanical Garden, Nueva York. pp 147.
- FAO. 2011. Situación de los recursos forestales en México. Informe Final del proyecto TCP/MEX/3301/MEX (4).
- FAO. 2002. Fertilizantes y su uso. Cuarta edición. Revisada, FAO e IFA. Roma, ISBN 92-5-304414-4.
- FRA. 2010. Evaluación de recursos forestales mundiales. Informe nacional, México.
- Gómez-Romero, M., J. C. Soto-Correa, J. A. Blanco-García, C. Sáenz-Romero, J. Villegas y R. Lindig-Cisneros. 2012. Estudio de especies de pino para restauración de sitios degradados. *Agrociencia*. Ensayo de especies de pino para restauración de sitios degradados. Volumen 46, Número 8.
- Haselwandter, K. 1997. Soil micro-organisms, mycorrhiza and restoration ecology. *In*: K.M. Urbanska, N.R. Webb y P.J. Edwards, eds. Restoration

ecology and sustainable development. Cambridge University Press. Reino Unido. pp 65-80.

- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) 2007. Carta de uso de suelo y vegetación. Serie IV, escala 1:250000. México.
- Ledig, F.T. 1997. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. In: Vargas H., J., B. Bermejo V (Eds.). Manejo de Recursos Genéticos Forestales. Colegio de posgraduados. División de Ciencias
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, JC., Valencia-Cantero, E., Velázquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L.I. 2009. *Bacillus megaterium* modifica la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* independientemente de auxinas y etileno. *Biológicas*. 11:1-8.
- Martínez, M. 1992. Los Pinos mexicanos. 3er ed. Ediciones Botas, México. D.F. pp 38-78.
- Meyer, A., Grote, R., Polle, A. y Butterbach-Bahl, K. 2010. Simulating mycorrhiza contribution to forest C- and N cycling-the MYCOFON model. *Plant Soil* 327: 493-517.
- Pankhurst, C y Doube, B. M. 1997. Biological Indications of Soil Health. CAB International Washington, USA.
- Pera, J. y J. Parladé. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales* 14(3):419-433.
- Perry, J. P. Jr., A. Graham y M. D. Richardson. 1998. The history of pines in México and Central America. In: M. D. Richardson (ed). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp: 137-149.
- Perry, J. P. 1991. *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, OR, USA.
- Rzedowski, J. 2006. *Vegetación de México*. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 247-273.

- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255, 571-586
- Sáenz-Romero, C., S. Aguilar-Aguilar, M. Á. Silva-Farías, X. Madrigal-Sánchez, S. Lara-Cabrera y J. López-Upton. 2012. Variación morfológica altitudinal entre poblaciones de *Pinus devoniana* Lindl. y la variedad putativa *cornuta* en Michoacán. *Rev. Mex. Cien. For.* Vol. 3 Núm. 13.
- SEMARNAT. 2009. Restauración de ecosistemas forestales Guía básica para comunicadores. 1era Edición. Zapopan, Jalisco, México.
- Téllez Valdés O., Y. M. Chávez Huerta., A. Gómez-Tagle Chávez y M. V. Gutiérrez Garduño. 2004. Modelado bioclimático como herramienta para el manejo forestal: Estudio de cuatro especies de *pinus*. *Rev. Ciencia Forestal de México.* Vol.29. Núm. 95.

14. ANEXO 1

Cuadro 3.- Análisis estadístico multifactorial de longitud de la parte aérea de plantas de *Pinus devoniana* con los factores suelo y bacteria.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Intercepción	12426.27	1	12426.27	8566.568	0.000000
Suelo	0.06	2	0.03	0.02	0.980298
Bacteria	1.37	2	0.68	0.471	0.625049
Interacción	5.16	4	1.29	0.889	0.4719
Error	261.1	180	1.45		

Cuadro 4.- Análisis estadístico multifactorial de longitud de raíz de plantas de *Pinus devoniana* con los factores suelo y bacteria.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Intercepción	10199.12	1	10199.12	950.6549	0.000000
Suelo	487.72	2	243.86	22.7299	0.000000
Bacteria	78.84	2	39.42	3.6742	0.027313
Interacción	62.83	4	15.71	1.4641	0.215033
Error	1909.68	178	10.73		

Cuadro 5.- Análisis estadístico multifactorial de peso fresco de la parte aérea de plantas de *Pinus devoniana* con los factores suelo y bacteria.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Intercepción	12.85117	1	12.85117	1845.66	0.000000
Suelo	0.05816	2	0.02908	4.177	0.016879
Bacteria	0.16578	2	0.08289	11.904	0.000014
Interacción	0.0333	4	0.00832	1.196	0.31444
Error	1.2394	178	0.00696		

Cuadro 6.- Análisis estadístico multifactorial de peso fresco de raíz de plantas de *Pinus devoniana*, con los factores suelo y bacteria. Un análisis unifactorial (ANOVA) se realizó con el programa estadístico Statistic V7.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Intercepción	0.819698	1	0.819698	637.3115	0.000000
Suelo	0.016884	2	0.008442	6.5638	0.001777
Bacteria	0.039767	2	0.019884	15.4595	0.000001
Interacción	0.019042	4	0.004761	3.7013	0.006395
Error	0.228940	178	0.001286		

Cuadro 7.- Análisis estadístico unifactorial del número de raíces laterales de plantas de *Pinus devoniana* crecidas en tres suelos procedentes Ciudad Hidalgo, Cherán y Pátzcuaro.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Intercepción	10828.27	1	10828.27	358.8557	0.000000
Suelo	65.36	2	32.68	1.0830	0.340717
Error	5552.10	184	30.17		

Cuadro 8.- Análisis estadístico unifactorial del número de raíces laterales de plantas de *Pinus devoniana* con bacterias y sin inóculo en el suelo procedente de Ciudad Hidalgo.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Intercepción	2156.070	1	2156.070	162.1304	0.000000
Inóculo	102.657	2	51.328	3.8598	0.028052
Error	625.023	47	13.298		

Cuadro 9.- Macronutrientes y micronutrientes de dos diferentes soluciones nutritivas para el crecimiento de plantas.

Soluciones nutritivas	N ppm	P ppm	K ppm	Ca ppm	Mg ppm	Zn ppm	Fe Ppm
Hoagland	224	62	235	160	24	0.13	1.00-3.00
MS	9.8182	0.2843	7.6268	0.8159	0.1480	0.0068	0.0200