

Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb.

La inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y bacterias incrementa el crecimiento y mejora la calidad fisiológica de *Pinus montezumae* Lamb.

José L. Barragán-Soriano¹; Jesús Pérez-Moreno^{1*}; Juan J. Almaraz-Suárez¹; Moisés G. Carcaño-Montiel²; Karla I. Medrano-Ortiz¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Microbiología, Edafología. Carretera México-Texcoco km 36.5. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

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

*Corresponding author: jperezm@colpos.mx, tel.: +52 (595) 952 0200 ext. 1280

Abstract

Introduction: Ectomycorrhiza and mycorrhiza helper bacteria are essential to the nutritional recycling of forest ecosystems.

Objective: Growth, photosynthetic rate, chlorophylls, carotenes, root colonization and N, P and K contents were evaluated in *Pinus montezumae* plants inoculated with the edible ectomycorrhizal fungus *Hebeloma mesophaeum* (Hm), alone and in combination with the bacteria *Cohnella* sp. (C) or *Azospirillum brasilense* (Ab).

Results and discussion: Plants inoculated only with the fungus or coinoculated with the fungus and the bacteria showed better physiological quality than the uninoculated plants and those inoculated exclusively with the bacteria, mainly in terms of growth, photosynthesis and nutrient content. Hm inoculation, alone or in combination with the bacteria, increased the chlorophyll a, b, and total concentrations. Bacterial inoculation increased the carotene concentration, while the fungus alone had no effect. There was synergism in the plants inoculated with Hm + Ab, which was reflected in shoot and total N contents, compared to plants inoculated with Hm or Ab separately. Ectomycorrhizal colonization ranged from 69 to 76 % in inoculated treatments.

Conclusion: There is biotechnological potential for coinoculation with edible ectomycorrhizal fungus and mycorrhiza helper bacteria in *P. montezumae*.

Resumen

Introducción: La ectomicorriza y las bacterias auxiliaadoras de la micorrización son fundamentales en el reciclaje nutrimental de los ecosistemas forestales.

Objetivo: El crecimiento, tasa fotosintética, clorofilas, carotenos, colonización de raíz y contenido de N, P y K se evaluaron en plantas de *Pinus montezumae* inoculadas con el hongo ectomicorrízico comestible *Hebeloma mesophaeum* (Hm), solo y en combinación con las bacterias *Cohnella* sp. (C) o *Azospirillum brasilense* (Ab).

Resultados y discusión: Las plantas inoculadas solamente con el hongo o coinoculadas con el hongo y las bacterias presentaron mejor calidad fisiológica que las plantas no inoculadas y las inoculadas exclusivamente con las bacterias, principalmente, en términos de crecimiento, fotosíntesis y contenido nutrimental. La inoculación con Hm, sola o combinada con las bacterias, incrementó la concentración de clorofilas a, b, y total. La inoculación bacteriana incrementó la concentración de carotenos, mientras que el hongo por sí solo no tuvo efecto. Existió sinergismo en las plantas inoculadas con Hm + Ab, el cual se reflejó en el contenido de N aéreo y total, en comparación con las plantas inoculadas con Hm o Ab por separado. La colonización ectomicorrízica varió de 69 a 76 % en los tratamientos inoculados.

Conclusión: Existe potencial biotecnológico de la coinoculación con hongos comestibles ectomicorrízicos y bacterias auxiliaadoras de la micorrización en *P. montezumae*.

Keywords: Mycorrhiza, photosynthetic rate, chlorophyll, *Hebeloma mesophaeum*, *Cohnella*, *Azospirillum brasilense*.

Palabras clave: Micorriza, tasa fotosintética, clorofila, *Hebeloma mesophaeum*, *Cohnella*, *Azospirillum brasilense*.

Introduction

Ectomycorrhiza is a mutualistic symbiosis of great ecological importance that is established between more than 20 000 species of fungi and the roots of more than 5 000 species of angiosperm and gymnosperm plants (Pérez-Moreno, Lorenzana, Carrasco, & Yescas-Pérez, 2010; Rinaldi, Comandini, & Kuyper, 2008). The main benefit of ectomycorrhizal symbiosis for plants is nutrient supply and protection against stress factors, while for fungi it is the provision of carbon by host plants (Smith & Read, 2008). In addition to accessing soil nutrients, ectomycorrhizal fungi and the mycorrhizosphere provide a unique niche for other microorganisms, including a vast community of bacteria. Due to their beneficial properties, various groups of rhizospheric bacteria are known as mycorrhiza helper bacteria (MHB), which are characterized by stimulating the development and establishment of mycorrhizae (Cumming, Zawaski, Desai, & Collart, 2015).

Currently, at international level, one of the criteria for selecting ectomycorrhizal fungi is their edibility, which makes them into another useful forest environment resource. Although there is potential for coinoculation with edible ectomycorrhizal fungi and bacteria (Sousa, Franco, Ramos, Oliveira, & Castro, 2015), information on its effect on the physiology, nutrition and growth of important forest plants is scarce. On the other hand, in Mexico, deforestation is an issue of great importance; from 2005 to 2010, 775 000 ha of forests and jungles were lost in the country (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2010). In addition to this problem, the survival of pines transplanted from the greenhouse to the field is highly variable and at some sites may be 0 % (Cetina, 2004).

Several species of *Pinus* are used in reforestation programs; however, their establishment has failed because in this process and during their growth they are dependent on ectomycorrhiza, which is not traditionally incorporated into plant production in Mexico (Pérez-Moreno, 2016; Valdés, Ambriz, Camacho, & Fierros, 2010). The aim of the present study was to evaluate the effect of the inoculation of an edible ectomycorrhizal fungus and two mycorrhiza helper bacteria on the growth, physiology and nutrient content of *Pinus montezumae* Lamb.

Materials and methods

The *P. montezumae* germplasm used comes from San Rafael, municipality of Tlalmanalco, State of Mexico. The seeds were sterilized with 30 % H₂O₂ for 20 min. The inoculum was prepared with spores from a

Introducción

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista de gran importancia ecológica que se establece entre más de 20 000 especies de hongos y las raíces de más de 5 000 especies de plantas angiospermas y gimnospermas (Pérez-Moreno, Lorenzana, Carrasco, & Yescas-Pérez, 2010; Rinaldi, Comandini, & Kuyper, 2008). El principal beneficio de la simbiosis ectomicorrízica para las plantas es el abastecimiento nutrimental y la protección a los factores de estrés, mientras que para los hongos es la provisión de carbono por las plantas hospederas (Smith & Read, 2008). Además de acceder a los nutrientes del suelo, los hongos ectomicorrízicos y la micorrizosfera proporcionan un nicho único para otros microorganismos, incluyendo una vasta comunidad de bacterias. Dadas sus propiedades benéficas, diversos grupos de bacterias rizosféricas se conocen como bacterias auxiliaadoras de la micorrización (BAM), las cuales se caracterizan por estimular el desarrollo y establecimiento de la micorriza (Cumming, Zawaski, Desai, & Collart, 2015).

En la actualidad, a nivel internacional, uno de los criterios de selección de los hongos ectomicorrízicos es su comestibilidad, lo cual los convierte en otro recurso aprovechable de los ambientes boscosos. Si bien existe potencial de coinoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles y bacterias (Sousa, Franco, Ramos, Oliveira, & Castro, 2015), la información sobre su efecto en la fisiología, nutrición y crecimiento de las plantas de importancia forestal es escasa. Por otro lado, en México, la deforestación es una problemática de gran relevancia; de 2005 al 2010 se perdieron 775 000 ha de bosques y selvas en el país (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2010). Aunado a este problema, la supervivencia de pinos trasplantados de invernadero a campo es muy variable y en algunos sitios puede ser de 0 % (Cetina, 2004).

En los programas de reforestación se usan diversas especies de *Pinus*; sin embargo, su establecimiento ha fallado porque en este proceso y durante su crecimiento son dependientes de la ectomicorriza, la cual no se incorpora tradicionalmente en la producción de planta en México (Pérez-Moreno, 2016; Valdés, Ambriz, Camacho, & Fierros, 2010). En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inoculación de un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias auxiliaadoras de la micorrización sobre el crecimiento, fisiología y contenido nutrimental de *Pinus montezumae* Lamb.

Materiales y métodos

El germoplasma utilizado de *P. montezumae* proviene de San Rafael, municipio de Tlalmanalco, Estado de México. Las semillas se esterilizaron con H₂O₂ al 30 %

pine forest in the municipality of Ozumba, State of Mexico. The inoculum was obtained from *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. pilei, which were cut from the stipes and dehydrated at 35 °C (Jersa® Rtray-type dehydrator, Mexico). Afterwards, the pilei were ground in an electric mill (Thomas Scientific®, Model 4 Wiley Mill, USA) through a 1-mm aperture sieve to obtain a homogeneous particle size. The inoculum was stored at 5 °C.

Substrate preparation and inoculation

The substrate consisted of a mixture of sand, bark and forest soil at a 2:2:1 ratio, which was sterilized three times with steam at a pressure of 1.3 kg·cm⁻² at 125 °C for 5 h. The seeds were sown in 125 cm³ black plastic tubes containing the described substrate. Each plant was inoculated with a concentration of 10⁷ to 10⁸ spores of *H. mesophaeum*, determined with a hemacytometer. Two spore inoculations of the fungus were made: the first simultaneously with the sowing and the second 90 days later.

Cultivation of bacterial strains

The bacterial strain *Cohnella* sp., isolated from the *P. montezumae* root, was provided by the Colegio de Postgraduados Microbiology Laboratory, and *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg et Dobereiner was provided by the Soil Microbiology Laboratory of the Center for Microbiological Science Research, part of the Science Institute of Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Both species were previously identified with molecular techniques in these laboratories. The strains were cultured in Merck® nutrient broth and kept in constant movement at 28 °C until reaching a concentration of 10⁸ cfu·mL⁻¹. The bacterial culture was centrifuged at 7 000 rpm and the supernatant was removed; the concentrate was washed with sterile distilled water to remove residues from the culture medium and resuspended in sterile distilled water to leave it at the same concentration of 10⁸ ufc·mL⁻¹. Subsequently, 10 days after the second inoculation with the ectomycorrhizal fungus, a single application of 3 mL of the bacterial suspension to each plant was made in the early hours of the day. The experiment was run for 420 days in a closed greenhouse without air filtration, temperature control or additional fertilization. The environmental conditions during the experiment were: mean annual temperature 20 °C (9 and 31 °C, minimum and maximum, respectively), average annual relative humidity 47 % (23 and 81 % minimum and maximum, respectively) and mean annual photoperiod of 11.9 h (10.9 and 13.1 h, minimum and maximum, respectively).

durante 20 min. El inóculo se preparó con esporomas provenientes de un bosque de pinos del municipio de Ozumba, Estado de México. El inóculo se obtuvo a partir de píleos de *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué., los cuales se cortaron de los estípites y se deshidrataron a 35 °C (deshidratador tipo charola Jersa®, México). Posteriormente, los píleos se molieron en un molino eléctrico (Thomas Scientific®, Model 4 Wiley Mill, EUA), a través de un tamiz de 1 mm de apertura, para obtener un tamaño de partícula homogéneo. El inóculo se almacenó a 5 °C.

Preparación del sustrato e inoculación

El sustrato consistió en una mezcla de arena, corteza y suelo forestal en una proporción 2:2:1, el cual se esterilizó en tres ocasiones con vapor de agua a una presión de 1.3 kg·cm⁻² a 125 °C durante 5 h. Las semillas se sembraron en tubetes de plástico negro de 125 cm³ que contenían el sustrato descrito. Cada planta se inoculó con una concentración de 10⁷ a 10⁸ esporas de *H. mesophaeum*, determinada con un hematocitómetro. Se hicieron dos inoculaciones esporales del hongo: la primera simultáneamente con la siembra y la segunda 90 días después.

Cultivo de cepas bacterianas

La cepa bacteriana *Cohnella* sp., aislada de la raíz de *P. montezumae*, fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados, y *Azospirillum brasilense* Terrand Krieg et Dobereiner fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Ambas especies fueron identificadas con técnicas moleculares de manera previa en dichos laboratorios. Las cepas se cultivaron en caldo nutritivo Merck® y se mantuvieron en movimiento constante a 28 °C hasta alcanzar una concentración de 10⁸ ufc·mL⁻¹. El cultivo bacteriano se centrifugó a 7 000 rpm y se eliminó el sobrenadante; el concentrado se lavó con agua destilada estéril, para eliminar los restos del medio de cultivo, y se resuspendió en agua destilada estéril para dejarlo a la misma concentración de 10⁸ ufc·mL⁻¹. Posteriormente, a los 10 días después de la segunda inoculación con el hongo ectomicorrízico, se efectuó una sola aplicación de 3 mL de la suspensión bacteriana a cada planta en las primeras horas del día. El experimento se mantuvo durante 420 días en un invernadero cerrado sin filtración de aire, control de temperatura ni fertilización adicional. Las condiciones ambientales durante el transcurso del experimento fueron: temperatura media anual 20 °C (9 y 31 °C, mínima y máxima, respectivamente), humedad media anual

Variables evaluated

Diameter and dry weight

The stem diameter of seven randomly-selected plants per treatment was measured with a digital Vernier caliper at 30, 120 and 420 days after bacterial inoculation (dabi). Biomass was also evaluated in seven randomly-selected plants per treatment to determine root, shoot and total dry weight, dehydrating each component separately, for three days at 70 °C until constant weight.

Photosynthetic rate and content of chlorophylls and carotenes

The photosynthetic rate was evaluated at 240, 300 and 360 dabi in three plants per treatment with an infrared gas analyzer (IRGA, PP-Systems® model Ciras-3, USA) and a gas assimilation chamber (PP-Systems®, original accessory of Ciras-3 CPY-4, USA) in a greenhouse. An evaluation was not carried out at the end of the experiment due to practical constraints related to weather conditions. The content of chlorophyll a, b, total and carotenes was determined by the acetone method (Zhang, 1986) and the concentration of chlorophylls and carotenes was obtained using the equations of Lichtenthaler (1987).

Nutrient analysis

Nutrients were analyzed in four plants per treatment; nitrogen (N) was determined by the semimicro-Kjeldahl method (Bremner, 1965), total phosphorus (P) according to the method of Allen, Grimshaw, Parkinson, and Quarmby (1997), and potassium (K) by extraction with ammonium acetate by flame photometry. Mycorrhizal colonization was evaluated using the techniques proposed by Agerer (1994) and Martínez-Reyes et al. (2012). The confirmation of mycorrhizal roots was carried out using microphotography techniques to reveal the characteristic structures of ectomycorrhiza, namely the mantle, Hartig net and external mycelium, under an optical microscope (Leica®, DM1000, EUA).

Experimental design and statistical analysis

The experiment was designed in random blocks with six treatments: 1) Uninoculated plants; and plants inoculated with: 2) *H. mesophaeum* (Hm), 3) *Cohnella* sp. (C), 4) *A. brasilense* (Ab), 5) Hm + C, and 6) Hm + Ab. Each treatment had 21 replicates, so in total there were 126 experimental units, each constituted by one plant. The data of the evaluated variables were subjected to an analysis of variance and Tukey's range test ($P = 0.05$) with the statistical package (Statistical Analysis System [SAS Institute Inc.], 2009). The mycorrhizal colonization

47 % (23 y 81 % mínima y máxima, respectivamente) y fotoperiodo promedio anual de 11.9 h (10.9 y 13.1 h, mínimo y máximo, respectivamente).

Variables evaluadas

Diámetro y peso seco

El diámetro del tallo de siete plantas por tratamiento, seleccionadas al azar, se midió con un vernier digital a los 30, 120 y 420 días después de la inoculación bacteriana (ddib). La biomasa también se evaluó en siete plantas por tratamiento, seleccionadas al azar, para determinar el peso seco de la raíz, parte aérea y total, deshidratando cada componente por separado, durante tres días a 70 °C hasta lograr peso constante.

Tasa fotosintética y contenido de clorofilas y carotenos

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

Análisis nutrimental

Los nutrimentos se analizaron en cuatro plantas de cada tratamiento; el nitrógeno (N) se determinó por el método de semimicro-Kjeldahl (Bremner, 1965); el fósforo total (P), según el método de Allen, Grimshaw, Parkinson, y Quarmby (1997); y el potasio (K), mediante extracción con acetato de amonio por fotometría de llama. La colonización micorrízica se evaluó mediante las técnicas propuestas por Agerer (1994) y Martínez-Reyes et al. (2012). La confirmación de las raíces micorrizadas se efectuó con técnicas de microfotografía de las estructuras características de la ectomicorriza: manto, red de Hartig y micelio externo en un microscopio óptico (Leica®, DM1000, EUA).

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se diseñó en bloques al azar con seis tratamientos: 1) Plantas sin inocular; y plantas inoculadas con: 2) *H. mesophaeum* (Hm), 3) *Cohnella* sp. (C), 4) *A. brasilense* (Ab), 5) Hm + C, y 6) Hm + Ab. Cada tratamiento tuvo 21 réplicas, por lo que en total se tuvieron 126 unidades experimentales, cada una

values, expressed as percentages, were transformed and the natural logarithm was used in the analyses of variance.

Results and discussion

Dry weight and stem diameter of *P. montezumae*

Table 1 contains information on the dry weight of *P. montezumae* plants under different inoculation treatments. The root, shoot and total dry weight values were higher in the plants inoculated with the ectomycorrhizal fungus, alone or coinoculated with either of the two bacteria, compared to the uninoculated plants. When inoculated exclusively with either of the two bacteria, dry weights were statistically similar ($P = 0.05$) to those of the uninoculated plants. In the case of root dry weight there was a synergistic effect when Hm + Ab was inoculated; in this treatment, the weight was up to 6.4 times greater compared to uninoculated plants.

With respect to stem diameter, Figure 1 shows that this variable increased to a greater extent in plants inoculated with both Hm and in plants with Hm + C and Hm + Ab at 30, 120 and 420 dabi. Inoculation with either bacterium did not cause differences in stem diameter compared to uninoculated plants.

Table 1. Dry weight of *Pinus montezumae* plants under different inoculation treatments with an edible ectomycorrhizal fungus and two plant growth promoting bacteria. Results at 420 days after bacterial inoculation*.

Cuadro 1. Peso seco de las plantas de *Pinus montezumae* bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Resultados a los 420 días después de la inoculación bacteriana*.

Treatments/Tratamientos	Dry weight (g)/Peso seco (g)		
	Root/Raíz	Shoot/Parte aérea	Total
Uninoculated plants/Plantas sin inocular	0.22 ± 0.02 c	0.26 ± 0.02 c	0.48 ± 0.04 c
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	1.10 ± 0.07 b	1.15 ± 0.12 ba	2.25 ± 0.19 ba
<i>Cohnella</i> sp. (C)	0.38 ± 0.05 c	0.34 ± 0.02 c	0.70 ± 0.07 c
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	0.50 ± 0.06 c	0.42 ± 0.04 c	0.92 ± 0.10 c
Hm + C	1.08 ± 0.05 b	0.96 ± 0.08 b	2.04 ± 0.12 b
Hm + Ab	1.41 ± 0.12 a	1.33 ± 0.08 a	2.75 ± 0.18 a

*Bacterial inoculation was done 100 days after sowing of *P. montezumae*. Values with the same letter in the same column are the same according to the Tukey test ($P = 0.05$). ± Standard error of the mean ($n = 7$).

*La inoculación bacteriana se hizo a los 100 días después de la siembra de *P. montezumae*. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey ($P = 0.05$). ± Error estándar de la media ($n = 7$).

constituida por una planta. Los datos de las variables evaluadas se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($P = 0.05$) con el paquete estadístico (Statistical Analysis System [SAS Institute Inc.], 2009). Los valores de colonización micorrízica, expresados como porcentajes, se transformaron y se utilizó el logaritmo natural en los análisis de varianza.

Resultados y discusión

Peso seco y diámetro del tallo de *P. montezumae*

El Cuadro 1 contiene la información del peso seco de las plantas de *P. montezumae* bajo los distintos tratamientos de inoculación. El peso seco de la raíz, parte aérea y total fue mayor en las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico, solo o coinoculado con cualquiera de las dos bacterias, en comparación con el de las plantas sin inocular. Cuando se inoculó exclusivamente con cualquiera de las dos bacterias se tuvieron pesos secos estadísticamente similares ($P = 0.05$) a los pesos de las plantas no inoculadas. En el caso del peso seco de la raíz existió un efecto sinérgico cuando se inoculó Hm + Ab; en este tratamiento, el peso fue hasta 6.4 veces mayor en comparación con las plantas sin inocular.

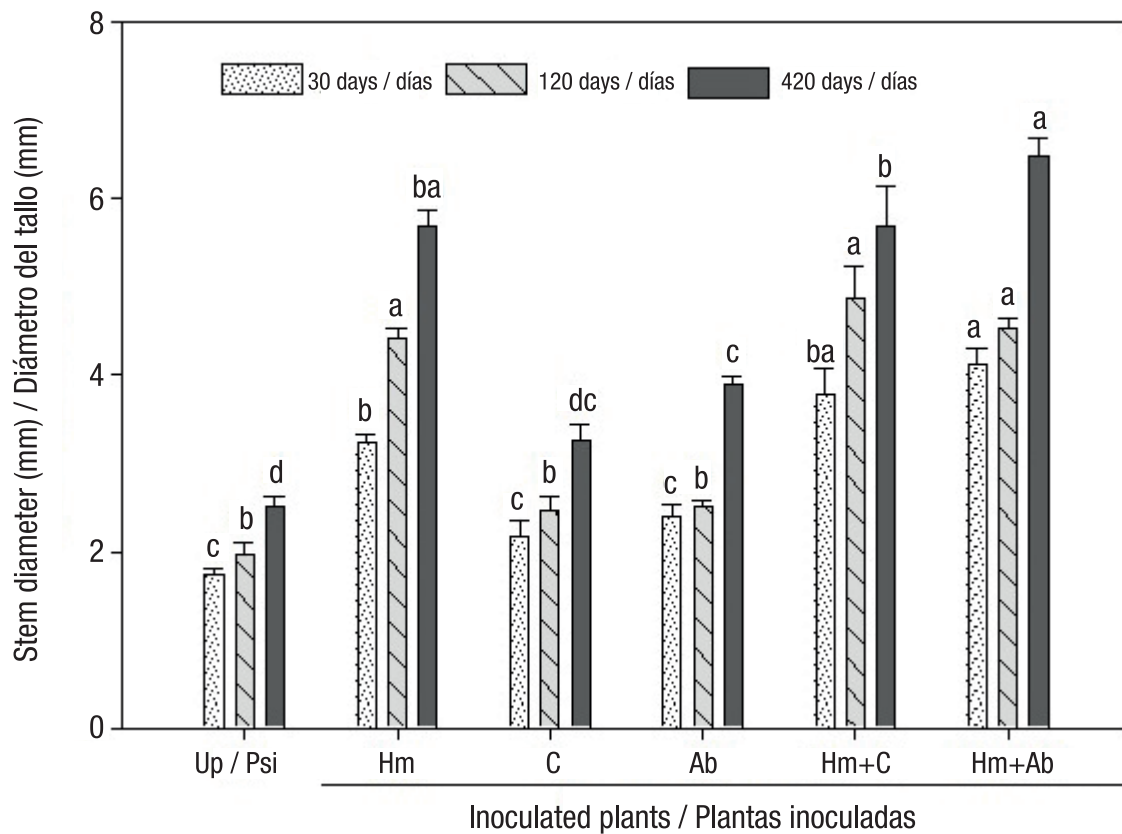


Figure 1. Stem diameter of *Pinus montezumae* plants under different inoculation treatments with an edible ectomycorrhizal fungus and two plant growth promoting bacteria. Up = uninoculated plants, Hm = *Hebeloma mesophaeum*, C = *Cohnella* sp., Ab = *Azospirillum brasilense*. The standard error of the mean (n = 7) is represented above the bars. Values with the same letter for each date are equal according to Tukey's test (P = 0.05).

Figura 1. Diámetro del tallo de plantas de *Pinus montezumae* bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Psi = plantas sin inocular; Hm = *Hebeloma mesophaeum*, C = *Cohnella* sp., Ab = *Azospirillum brasilense*. Sobre las barras se representa el error estándar de la media (n = 7). Valores con la misma letra para cada fecha son iguales según la prueba de Tukey (P = 0.05).

Growth stimulation, attributable to inoculation with ectomycorrhizal fungi, has been widely reported for the genus *Pinus*. Gómez-Romero, Lindig-Cisneros, and Del Val (2015) showed that *Pinus pseudostrobus* Lindl. increased shoot and root biomass when inoculated with *Pisolithus tinctorius* Pers. Perea-Estrada et al. (2009) recorded an increase in height, root dry weight and diameter of *Pinus patula* Schl. et Cham. and *Pinus hartwegii* Lindl. plants inoculated with *Hebeloma* spp., *Laccaria* spp. and *Clavulina* aff. *cinerea*. Similarly, Sebastiana, Tolentino, Alcantara, Salomé, and Bernardes (2013) reported that the dry weight of *Quercus suber* L. plants, inoculated with *P. tinctorius*, increased by 40% compared to uninoculated plants. The present study is the first one that evaluates the effect of the coinoculation of ectomycorrhizal fungi and bacteria on the growth and physiology of *P. montezumae*. The synergism recorded due to the coinoculation of ectomycorrhizal fungi and bacteria has also been previously reported. For

Con respecto al diámetro del tallo, en la Figura 1 se observa que dicha variable incrementó en mayor medida en las plantas inoculadas tanto con Hm como en las plantas con Hm + C y Hm + Ab a los 30, 120 y 420 ddib. La inoculación con cualquiera de las dos bacterias no originó diferencias del diámetro del tallo en comparación con las plantas sin inocular.

El estímulo en el crecimiento, atribuible a la inoculación con hongos ectomicorrízicos, ha sido ampliamente reportado para el género *Pinus*. Gómez-Romero, Lindig-Cisneros, y Del Val (2015) demostraron que *Pinus pseudostrobus* Lindl. incrementó la biomasa aérea y radical cuando se inoculó con *Pisolithus tinctorius* Pers. Perea-Estrada et al. (2009) registraron aumento en la altura, peso seco de raíz y diámetro de plantas de *Pinus patula* Schl. et Cham. y *Pinus hartwegii* Lindl. inoculadas con *Hebeloma* spp., *Laccaria* spp. y *Clavulina* aff. *cinerea*. De igual forma, Sebastiana, Tolentino, Alcantara, Salomé,

example, Kataoka and Futai (2009) reported increased root biomass in *Pinus thumbergii* Parl. coinoculated with *Suillus granulatus* L. and *Burkholderia* sp. On the other hand, Zhao, Xiao-Qin, Jian-Ren, Hao, and Gui-E (2014) showed that coinoculation with the bacterium *Bacillus* sp. and the fungi *P. tinctorius* and *Lactarius insulsus* (Fr.) Fr. (whose current valid name is *L. zonarius* [Bull.] Fr.) increased the growth and ectomycorrhizal colonization of *Populus deltoides* Marsh trees.

Photosynthetic rate of *P. montezumae*

According to Table 2, the differences in the photosynthetic rate of inoculated and uninoculated plants were observed from 300 dabi; the highest values were recorded in plants inoculated with Hm, Hm + C and Hm + Ab. The photosynthetic rate at 360 dabi was 3.7 and 4.0 times higher in plants inoculated with Hm + C and Hm + Ab, respectively, compared to uninoculated plants. As time elapsed, the photosynthetic rate increased in all treatments, particularly in Hm + Ab; in this case, the photosynthetic rate at 360 dabi was 2.6 times greater than at 240 days. At 300 and 360 dabi, no differences were observed between plants inoculated only with bacteria and those not inoculated. This is the first time that the photosynthetic rate in *P. montezumae* plants coinoculated with ectomycorrhizal fungi and bacteria has been evaluated.

y Bernardes (2013) registraron que el peso seco de plantas de *Quercus suber* L., inoculadas con *P. tinctorius*, incrementó 40 % en comparación con las plantas sin inocular. La presente investigación es la primera que evalúa el efecto de la coinoculación de hongos ectomicorrízicos y bacterias sobre el crecimiento y fisiología en *P. montezumae*. El sinergismo registrado debido a la coinoculación de hongos ectomicorrízicos y bacterias también se ha reportado previamente. Por ejemplo, Kataoka y Futai (2009) reportaron el incremento de biomasa en la raíz de *Pinus thumbergii* Parl. coinoculado con *Suillus granulatus* L. y *Burkholderia* sp. Por otra parte, Zhao, Xiao-Qin, Jian-Ren, Hao, y Gui-E (2014) demostraron que la coinoculación con la bacteria *Bacillus* sp. y los hongos *P. tinctorius* y *Lactarius insulsus* (Fr.) Fr. (cuyo nombre válido actualmente es *L. zonarius* [Bull.] Fr.) incrementó el crecimiento y la colonización ectomicorrízica de árboles de *Populus deltoides* Marsh.

Tasa fotosintética de *P. montezumae*

De acuerdo con el Cuadro 2, las diferencias en la tasa fotosintética de las plantas inoculadas y no inoculadas se observaron a partir de los 300 ddib; los valores más altos se registraron en las plantas inoculadas con Hm, Hm + C y Hm + Ab. La tasa fotosintética a los 360 ddib fue 3.7 y 4.0 veces mayor en las plantas inoculadas con Hm + C y Hm + Ab, respectivamente, en comparación

Table 2. Photosynthetic rate in *Pinus montezumae* plants under different inoculation treatments with an edible ectomycorrhizal fungus and two plant growth promoting bacteria.

Cuadro 2. Tasa fotosintética en plantas de *Pinus montezumae* bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Treatment/Tratamiento	Photosynthetic rate (g CO ₂ ·m ⁻² ·h ⁻¹)/Tasa fotosintética (g CO ₂ ·m ⁻² ·h ⁻¹)		
	240 dabi/240 ddib	300 dabi/300 ddib	360 dabi/360 ddib
Uninoculated plants/Plantas sin inocular	0.21 ± 0.14 a	0.24 ± 0.05 c	0.23 ± 0.07 c
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	0.73 ± 0.07 a	0.77 ± 0.06 ba	0.79 ± 0.16 ba
<i>Cohnella</i> sp. (C)	0.28 ± 0.09 a	0.28 ± 0.06 c	0.25 ± 0.06 c
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	0.32 ± 0.03 a	0.34 ± 0.05 bc	0.40 ± 0.03 bc
Hm + C	0.71 ± 0.01 a	0.73 ± 0.07 ba	0.84 ± 0.05 ba
Hm + Ab	0.36 ± 0.04 a	0.88 ± 0.07 a	0.94 ± 0.06 a

dabi: days after bacterial inoculation (performed 100 days after sowing of *P. montezumae*). Values with the same letter in the same column are the same according to the Tukey test ($P = 0.05$). ± Standard error of the mean ($n = 3$).

ddib: días después de la inoculación bacteriana (realizada 100 días después de la siembra de *P. montezumae*). Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey ($P = 0.05$). ± Error estándar de la media ($n = 3$).

The increase in the photosynthetic rate due to inoculation exclusively with mycorrhizal fungi has already been reported; however, to date, the effect of coinoculation with bacteria had not been investigated. Canton et al. (2016) indicated that inoculation of *P. tinctorius* in *E. grandis* resulted in higher photosynthetic rates than in uninoculated plants. Xu et al. (2015) mentioned that the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* Maire inoculated in *Picea glauca* (Moench) Voss not only increases the photosynthetic rate, but also causes greater transpiration.

Chlorophyll and carotene contents of *P. montezumae*

The content of chlorophylls a and b, total chlorophylls and carotenes was higher ($P = 0.05$) in inoculated plants, regardless of the treatment. Plants inoculated with Hm had a higher content of chlorophyll a compared to uninoculated plants, which did not occur in the case of chlorophyll b, total chlorophyll and carotene contents (Table 3). Yin, Deng, Chet, and Song (2014) indicated that the contents of chlorophylls a and b, and carotenes increased in *Pinus sylvestris* L. plants inoculated with *S. luteus* (L. ex Fr.) Gray.

The carotene concentration recorded in the present study was higher when the bacteria were inoculated

con las plantas sin inocular. Conforme el tiempo transcurrió, la tasa fotosintética incrementó en todos los tratamientos, particularmente en Hm + Ab; en este caso, la tasa fotosintética a los 360 ddib fue 2.6 veces mayor que a los 240 días. A los 300 y 360 ddib, no se observaron diferencias entre las plantas inoculadas únicamente con bacterias y las no inoculadas. Esta es la primera ocasión que se evalúa la tasa fotosintética en plantas de *P. montezumae* coinoculadas con hongos ectomicorrízicos y bacterias.

El incremento en la tasa fotosintética debido a la inoculación exclusivamente con hongos micorrízicos ya ha sido reportado; sin embargo, a la fecha, no se había investigado el efecto de la coinoculación con bacterias. Canton et al. (2016) indicaron que la inoculación de *P. tinctorius* en *E. grandis* originó mayores tasas fotosintéticas que en las plantas no inoculadas. Xu et al. (2015) mencionaron que el hongo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* Maire inoculado en *Picea glauca* (Moench) Voss no solo incrementa la tasa fotosintética, sino que también origina una mayor transpiración.

Contenido de clorofilas y carotenos de *P. montezumae*

El contenido de clorofilas a y b, clorofilas totales y carotenos fue mayor ($P = 0.05$) en las plantas inoculadas,

Table 3. Chlorophyll and carotene content in *Pinus montezumae* plants under different inoculation treatments with an edible ectomycorrhizal fungus and two plant growth promoting bacteria. Results at 420 days after bacterial inoculation*.

Cuadro 3. Contenido de clorofilas y carotenos en plantas de *Pinus montezumae* bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Resultados a los 420 días después de la inoculación bacteriana*.

Treatments/ Tratamientos	Chlorophyll (mg·g ⁻¹)/Clorofila (mg·g ⁻¹)			Carotenes (µg·g ⁻¹)/ Carotenos (µg·g ⁻¹)
	a	b	Total	
Uninoculated plants/ Plantas sin inocular	30.22 ± 1.59 b	31.91 ± 1.23 b	62.12 ± 2.50 b	10.73 ± 0.53 b
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	42.24 ± 2.84 a	42.43 ± 4.15 ba	84.65 ± 6.92 ba	10.83 ± 0.60 b
<i>Cohnella</i> sp. (C)	39.53 ± 2.49 ba	50.27 ± 3.39 a	89.77 ± 5.69 a	11.85 ± 0.72 ba
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	36.63 ± 2.24 ba	44.22 ± 2.83 ba	80.83 ± 4.99 ba	11.75 ± 0.51 ba
Hm + C	43.89 ± 3.61 a	49.08 ± 4.75 a	92.94 ± 8.26 a	13.41 ± 0.88 a
Hm + Ab	39.06 ± 2.13 ba	39.89 ± 1.74 ba	78.93 ± 3.80 ba	13.41 ± 0.48 a

*Bacterial inoculation was done 100 days after sowing of *P. montezumae*. Values with the same letter in the same column are the same according to the Tukey test ($P = 0.05$). ± Standard error of the mean (n = 7).

*La inoculación bacteriana se hizo a los 100 días después de la siembra de *P. montezumae*. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey ($P = 0.05$). ± Error estándar de la media (n = 7).

alone or in combination with the fungus Hm. This increase coincides with that reported by Mrnka, Tokárová, Vosátka, and Matejka (2009), who inoculated *Hebeloma bryogenes* Vesterh. and *Cadophora finlandica* C. J. K. Wang et H. E. Wilcox. in *Picea abies* L.

Mycorrhization of *P. montezumae*

Figure 2 shows the diagnostic structures of ectomycorrhiza. Treatments Hm, Hm + Ab and Hm + C produced the highest percentages of mycorrhizal live roots; 76.1, 76.4 and 68.7 %, respectively (Table 4).

independientemente del tratamiento. Las plantas inoculadas con Hm tuvieron mayor contenido de clorofila a en comparación con las plantas sin inocular, lo cual no ocurrió en el caso de los contenidos de clorofila b, clorofilas totales y carotenos (Cuadro 3). Yin, Deng, Chet, y Song (2014) indicaron que los contenidos de clorofila a y b, y carotenos incrementaron en plantas de *Pinus sylvestris* L. inoculadas con *S. luteus* (L. ex Fr.) Gray.

En el presente trabajo, la concentración de carotenos fue mayor cuando las bacterias se inocularon solas o

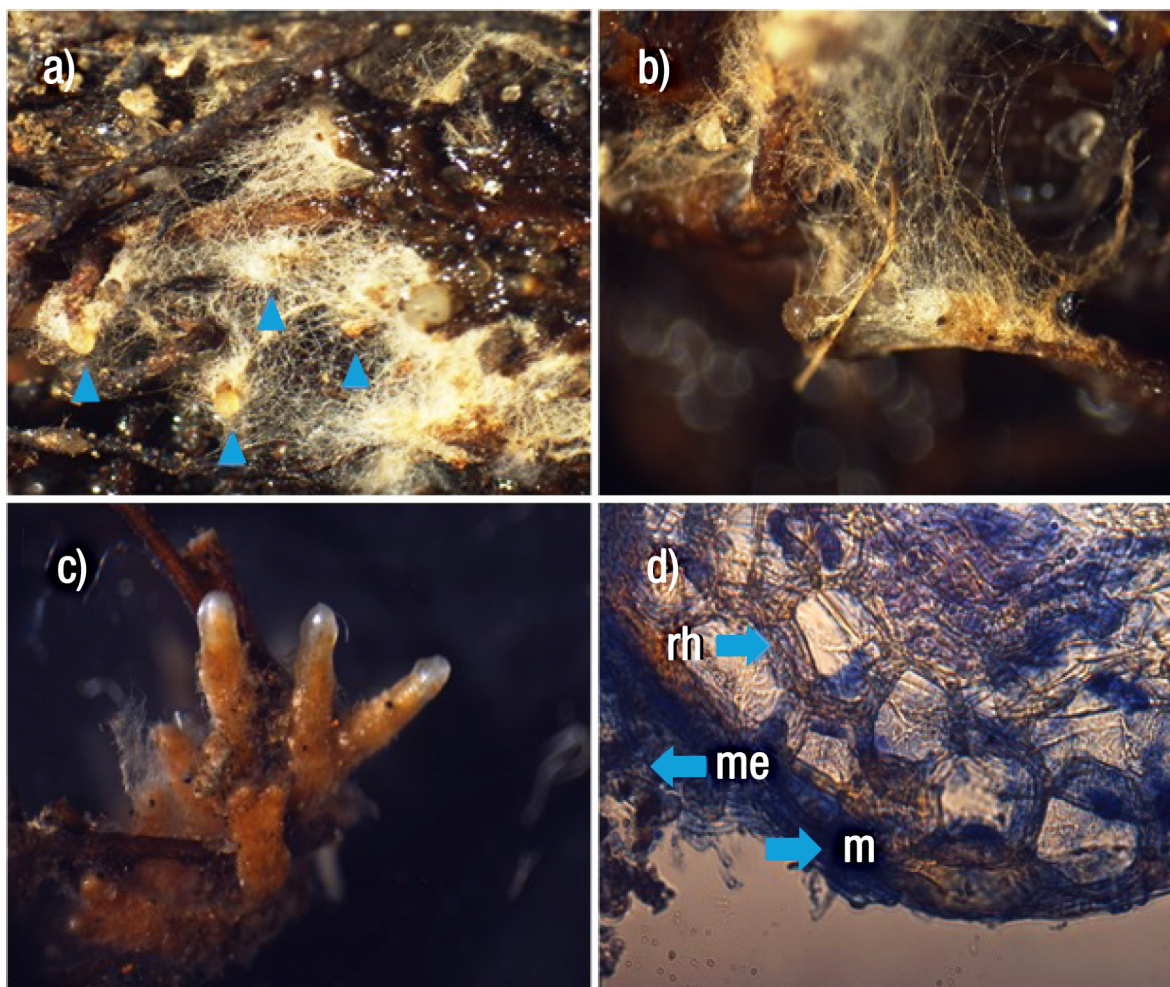


Figure 2. General characteristics of the ectomycorrhizae of *Hebeloma mesophaeum* (Hm). a) Overview of Hm morphotypes showing abundant, external, whitish to cream mycelium; b) Morphotype of Hm with *Azopirillum brasilense* showing the external mycelium covering the entire ectomycorrhiza; c) Morphotype of Hm + Ab, from which the external mycelium has been removed; d) Cross section: Hartig net (rh), mantle (m) and external mycelium (me).

Figura 2. Características generales de las ectomicorrizas de *Hebeloma mesophaeum* (Hm). a) Vista general de morfotipos de Hm mostrando micelio externo abundante de color blanquecino a crema; b) Morfotipo de Hm con *Azopirillum brasilense* mostrando el micelio externo que cubre la totalidad de la ectomicorriza; c) Morfotipo de Hm + Ab, de la cual se le ha retirado el micelio externo; d) Corte transversal: red de Hartig (rh), manto (m) y micelio externo (me).

Table 4. Mycorrhizal colonization of *Pinus montezumae* plants under different inoculation treatments with an edible ectomycorrhizal fungus and two plant growth promoting bacteria. Results at 421 days after bacterial inoculation*.

Cuadro 4. Colonización micorrízica de plantas de *Pinus montezumae* bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Resultados a los 421 días después de la inoculación bacteriana*.

Treatments/ Tratamientos	Living roots (%) / Raíces vivas (%)		Dead roots (%) / Raíces muertas (%)	
	Mycorrhized / Micorrizadas	Non-mycorrhized / No micorrizadas	Mycorrhized / Micorrizadas	Non-mycorrhized / No micorrizadas
Uninoculated plants / Plantas sin inocular	2.75 ± 0.25 c	84.60 ± 0.77 a	1.88 ± 0.27 b	10.74 ± 0.96 a
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	76.15 ± 1.36 a	8.62 ± 2.18 b	8.73 ± 2.31 a	6.47 ± 1.82 a
<i>Cohnella</i> sp. (C)	12.89 ± 7.85 c	66.81 ± 6.27 a	1.82 ± 0.59 b	18.35 ± 8.79 a
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	12.95 ± 5.37 bc	71.2 ± 5.95 a	4.57 ± 0.98 ba	11.27 ± 1.77 a
Hm + C	68.67 ± 2.18 a	10.85 ± 0.78 b	10.52 ± 2.07 a	9.94 ± 0.66 a
Hm + Ab	76.41 ± 5.13 a	5.02 ± 1.13 b	10.82 ± 2.01 a	7.70 ± 2.09 a

*Bacterial inoculation was done 100 days after sowing of *P. montezumae*. Values with the same letter in the same column are the same according to the Tukey test ($P = 0.05$). ± Standard error of the mean ($n = 3$).

*La inoculación bacteriana se hizo a los 100 días después de la siembra de *P. montezumae*. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según la prueba de Tukey ($P = 0.05$). ± Error estándar de la media ($n = 3$).

The mycorrhization values in this work are similar to those reported by Méndez-Neri, Pérez-Moreno, Quintero, Hernández, and Lara (2011), who determined 77 % colonization in *Pinus greggii* Engelm. inoculated with *H. mesophaeum*, *Laccaria laccata* Scop. and *Suillus* aff. *pseudobrevipes* A. H. Sm. These authors used the same spore concentrations and inoculation method as those employed in the present study. On the other hand, Sanchez-Zabala et al. (2013) recorded less than 30 % colonization in *Pinus pinaster* Aiton plants inoculated with *Lactarius deliciosus* L., *Lactarius quieticolor* Romagn., *Pisolithus arhizus* Scop. and *S. luteus*.

Content of N, P and K in *P. montezumae*

Table 5 shows the nutrient content in *P. montezumae* plants with the different inoculation treatments. When Hm was inoculated alone or coinoculated with either of the two bacteria, there was a greater amount of shoot, root and total N compared to uninoculated plants. When inoculated exclusively with either of the two bacteria, there were no differences in the amount of N, P and K compared to uninoculated plants, regardless of the part of the plant. The best treatment in the case of N was recorded in plants inoculated with Hm + Ab, whereas in the case of P and K it was constituted by the ectomycorrhizal fungus alone or coinoculated with

en combinación con el hongo Hm. Este incremento coincide con lo reportado por Mrnka, Tokárová, Vosátka, y Matejka (2009), quienes inocularon *Hebeloma bryogenes* Vesterh. y *Cadophora finlandica* C. J. K. Wang et H. E. Wilcox. en *Picea abies* L.

Micorrización de *P. montezumae*

La Figura 2 muestra las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza. Los tratamientos Hm, Hm + Ab y Hm + C produjeron los porcentajes más altos de raíces vivas micorrizadas; 76.1, 76.4 y 68.7 %, respectivamente (Cuadro 4).

Los valores de micorrización en este trabajo son similares a los reportados por Méndez-Neri, Pérez-Moreno, Quintero, Hernández, y Lara (2011), quienes determinaron 77 % de colonización en *Pinus greggii* Engelm. inoculado con *H. mesophaeum*, *Laccaria laccata* Scop. y *Suillus* aff. *pseudobrevipes* A. H. Sm. Dichos autores utilizaron las mismas concentraciones de esporas y método de inoculación que los empleados en la presente investigación. Por otra parte, Sanchez-Zabala et al. (2013) registraron menos de 30 % de colonización en plantas de *Pinus pinaster* Aiton inoculadas con *Lactarius deliciosus* L., *Lactarius quieticolor* Romagn., *Pisolithus arhizus* Scop. y *S. luteus*.

Table 5. Nutrient content in *Pinus montezumae* plants under different inoculation treatments with an edible ectomycorrhizal fungus and two plant growth promoting bacteria. Results at 420 days after bacterial inoculation*.

Cuadro 5. Contenido de nutrientes en plantas de *Pinus montezumae* bajo distintos tratamientos de inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Resultados a los 420 días después de la inoculación bacteriana*.

Nutrient/ Nutriente	Uninoculated plants/ Plantas sin inocular	Inoculated plants / Plantas inoculadas				
		Hm	C	Ab	Hm + C	Hm + Ab
N (mg)						
Shoot / Aéreo	1.96 ± 0.29 c	5.18 ± 1.40 b	1.82 ± 0.08 c	2.08 ± 0.29 c	4.28 ± 0.38 cb	10.52 ± 0.65 a
Root / Raíz	1.40 ± 0.20 b	6.47 ± 0.71 a	2.65 ± 0.29 b	2.45 ± 0.29 b	5.42 ± 0.38 a	6.02 ± 0.23 a
Total	3.36 ± 0.48 c	11.64 ± 1.73 b	4.48 ± 0.32 c	4.53 ± 0.57 c	9.69 ± 0.69 b	16.54 ± 0.8 a
P (mg)						
Shoot / Aéreo	0.48 ± 0.07 b	1.68 ± 0.34 a	0.35 ± 0.02 b	0.56 ± 0.08 b	1.69 ± 0.15 a	1.54 ± 0.09 a
Root / Raíz	0.37 ± 0.05 b	1.49 ± 0.16 a	0.53 ± 0.06 b	0.88 ± 0.10 b	1.62 ± 0.11 a	1.70 ± 0.07 a
Total	0.85 ± 0.12 b	3.17 ± 0.50 a	0.88 ± 0.06 b	1.44 ± 0.18 b	3.31 ± 0.24 a	3.24 ± 0.15 a
K (mg)						
Shoot / Aéreo	0.37 ± 0.05 c	3.08 ± 0.62 a	0.67 ± 0.03 c	1.48 ± 0.21 bc	3.10 ± 0.28 a	2.30 ± 0.14 ab
Root / Raíz	0.23 ± 0.03 c	1.41 ± 0.16 a	0.82 ± 0.09 b	0.90 ± 0.11 b	1.21 ± 0.09 a	1.60 ± 0.06 a
Total	0.60 ± 0.09 c	4.49 ± 0.77 a	1.49 ± 0.10 c	2.38 ± 0.31 bc	4.31 ± 0.34 a	3.89 ± 0.19 ba

*Bacterial inoculation was done 100 days after sowing of *P. montezumae*. Hm = *H. mesophaeum*, C = *Cohnella* sp., Ab = *Azospirillum brasilense*. Values with the same letter in the same row are equal according to the Tukey test ($P = 0.05$). ± Standard error of the mean ($n = 4$).

*La inoculación bacteriana se hizo a los 100 días después de la siembra de *P. montezumae*. Hm = *H. mesophaeum*, C = *Cohnella* sp., Ab = *Azospirillum brasilense*. Valores con la misma letra en la misma fila son iguales según la prueba de Tukey ($P = 0.05$). ± Error estándar de la media ($n = 4$).

either of the two bacteria. A synergistic effect of the Hm + Ab treatment on the amount of shoot and total N was observed.

The importance of N, P and K acquisition in mycorrhizal plants has been demonstrated and studied (Smith & Read, 2008). For example, recently: i) Kayama, Qu, and Koike (2015) indicated that the presence of ectomycorrhizal fungi stimulated increased N in *Larix kaempferi* Lamb. plants; ii) Zong et al. (2015) recorded a significantly higher P increase in *Pinus densiflora* Siebold and Zucc. and *Quercus variabilis* Blume. inoculated with *Pisolithus* sp., *Cenococcum geophilum* Fr. and *L. lacata* than in uninoculated plants; and iii) Martínez-Reyes et al. (2012) reported a positive effect on K translocation in *P. greggii* plants inoculated with *H. mesophaeum*.

Contenido de N, P y K en *P. montezumae*

El Cuadro 5 muestra el contenido de nutrientes en las plantas de *P. montezumae* con los distintos tratamientos de inoculación. Cuando se inoculó Hm solo o coinoculado con cualquiera de las dos bacterias existió mayor cantidad de N en la parte aérea, raíz y total, en comparación con las plantas no inoculadas. Cuando se inoculó exclusivamente con cualquiera de las dos bacterias, no existieron diferencias en la cantidad de N, P y K en comparación con las plantas no inoculadas, independientemente de la parte de la planta. El mejor tratamiento en el caso del N se registró en las plantas inoculadas con Hm + Ab, mientras que en el caso de P y K estuvo constituido por el hongo ectomicorrízico solo o coinoculado con

In the present study, the fungus Hm and the bacterium Ab showed a synergistic effect reflected in shoot and total N content. Xiao-Qin et al. (2012) also reported that ectomycorrhizal colonization, growth and mobilization of N, P and K increased in *P. thunbergii* Parl. inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* Rostk. and the bacterium *Bacillus cereus* Franklan bacteria, compared to uninoculated plants.

Conclusions

Inoculation of *Hebeloma mesophaeum*, alone or in combination with *Cohnella* sp. (C) and *Azospirillum brasilense* (Ab), improved the growth and physiological quality of *Pinus montezumae* plants, as the biomass, photosynthetic rate, chlorophyll and carotene concentration, and N, P and K content increased. By contrast, inoculation of C and Ab separately did not show significant effects on the variables evaluated, except for the carotene concentration. A synergistic effect in terms of root biomass and N content was observed in the shoot when inoculated with Hm + Ab. These effects were associated with ectomycorrhizal colonization of 69 to 76 % in treatments inoculated with Hm alone and coinoculated. The present study demonstrates that inoculation with Hm, alone or in combination with the mycorrhizal helper bacteria C and Ab, has potential for use in the production of quality *P. montezumae* plants, one of the species most used in reforestation and soil restoration programs in Mexico. In addition, Hm inoculation offers the opportunity to harvest edible basidiomas, which constitute a non-timber forest product of economic, social and cultural importance.

Acknowledgments

The first author thanks CONACYT for the financial support provided to carry out a Master of Science and the present research through the CONACYT-24667 project.

End of English version

References / Referencias

- Agerer, R. (1994). Characterization of ectomycorrhizal. In J. R. Norris, D. J. Read, & A. K. Varma (Eds.), *Techniques for mycorrhizal research* (pp. 25-73). London: Academic Press.
- Allen, S. E., Grimshaw, H. M., Parkinson, J. A., & Quarmby, C. (1997). Chemical analysis of ecological materials. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Bremner, J. M. (1965). Total nitrogen. *Agronomy*, 9, 1149-1178.
- Canton, C. C., Bertolazi, A. A., Cogo, A. J. D., Eutrópico, J. F., Melo,

cualquiera de las dos bacterias. Se observó un efecto sinérgico del tratamiento Hm + Ab sobre la cantidad de N en la parte aérea y total.

La importancia de la adquisición de N, P y K en plantas micorrizadas ha sido demostrada y estudiada (Smith & Read, 2008). Por ejemplo, recientemente: i) Kayama, Qu, y Koike (2015) indicaron que la presencia de hongos ectomicorrízicos estimuló el incremento de N de plantas *Larix kaempferi* Lamb.; ii) Zong et al. (2015) registraron un incremento de P significativamente mayor en *Pinus densiflora* Siebold y Zucc. y *Quercus variabilis* Blume. inoculados con *Pisolithus* sp., *Cenococcum geophilum* Fr. y *L. laccata* que en las plantas no inoculadas; y iii) Martínez-Reyes et al. (2012) reportaron el efecto positivo en la translocación de K en plantas de *P. greggii* inoculadas con *H. mesophaeum*.

En el presente trabajo, el hongo Hm y la bacteria Ab mostraron un efecto de sinergismo reflejado en el contenido de N aéreo y total. Xiao-Qin et al. (2012) también reportaron que la colonización ectomicorrízica, el crecimiento y la movilización de N, P y K incrementaron en las plantas de *P. thunbergii* Parl. inoculadas con el hongo ectomicorrízico *Boletus edulis* Rostk. y la bacteria *Bacillus cereus* Franklan, en comparación con las plantas no inoculadas.

Conclusiones

La inoculación de *Hebeloma mesophaeum*, solo o combinado con *Cohnella* sp. (C) y *Azospirillum brasilense* (Ab), mejoró el crecimiento y la calidad fisiológica de plantas de *Pinus montezumae*, que la biomasa, tasa fotosintética, concentración de clorofilas, carotenos, y contenido de N, P y K incrementaron. En contraste, la inoculación de C y Ab, por separado, no mostraron efectos significativos en las variables evaluadas, a excepción de la concentración de carotenos. Se observó un efecto sinérgico en términos de biomasa radical y contenido de N en la parte aérea de la planta cuando se inoculó con Hm + Ab. Estos efectos estuvieron asociados con colonizaciones ectomicorrízicas de 69 a 76 % en los tratamientos inoculados con Hm solo y coinoculado. El presente trabajo demuestra que la inoculación con Hm, solo o coinoculado con las bacterias auxiliaadoras de la micorrización C y Ab, posee potencial en la producción de plantas de calidad de *P. montezumae*, una de las especies más utilizadas en los programas de reforestación y restauración de suelos en México. Adicionalmente, la inoculación con Hm ofrece la oportunidad de cosechar basidiomas comestibles, los cuales constituyen un producto forestal no maderable de importancia económica social y cultural.

- J., de Souza, B. S., ...Ramos, C. A. (2016). Biochemical and ecophysiological responses to manganese stress by ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and in association with *Eucalyptus grandis*. *Mycorrhiza*, 26, 475–487. doi: 10.1007/s00572-016-0686-3
- Cetina, V. M. (2004). Deforestación y reforestación. In M. L. I. de Bauer (Ed.), *Temas ambientales del siglo XXI* (pp. 12–13). México: Colegio de Postgraduados.
- Cumming, J. R., Zawaski, C., Desai, S., & Collart, F. R. (2015). Phosphorus disequilibrium in the tripartite plant-ectomycorrhiza-plant growth promoting rhizobacterial association. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2), 464–485. doi: 10.4067/S0718-95162015005000040
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2010). *Global forest resources assessment 2010*. Rome, Italy: FAO.
- Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R., & Del Val, E. (2015). Efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus pseudostrobus* y *Pisolithus tinctorius*. *Botanical Sciences*, 93, 731–740. doi: 10.17129/botsci.193
- Kataoka, R., & Futai, K. (2009). A new mycorrhizal helper bacterium, *Ralstonia* species, in the ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus thunbergii* and *Suillus granulatus*. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 315–320. doi: 10.1007/s00374-008-0340-0
- Kayama, M., Qu, L., & Koike, T. (2015). Elements and ectomycorrhizal symbiosis affecting the growth of Japanese larch seedlings regenerated on slopes of an active volcano in northern Japan. *Trees*, 29, 1567–1579. doi: 10.1007/s00468-015-1238-8
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382. doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1
- Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J. J., & Honrubia-García, M. (2012). Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(2), 183–192. doi: 10.5154/r.rchscfa.2010.11.112
- Méndez-Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero, L. R., Hernández, A. E., & Lara, H. A. (2011). Growth and nutrimental content of *Pinus greggii* inoculated with three edible ectomycorrhizal fungi. *Terra Latinoamericana*, 29(1), 73–81.
- Mrnka, L., Tokárová, H., Vosátka, M., & Matejka, P. (2009). Interaction of soil filamentous fungi affects needle composition and nutrition of *Norway spruce* seedlings. *Trees*, 23, 887–897. doi:10.1007/s00468-009-0330-3
- Perea-Estrada, V. M., Pérez-Moreno, J., Villareal, R. L., Trinidad, S. A., De la I. de Bauer, M. L., Cetina-Alcalá, V. M., & Tijerina, C. L. (2009). Humedad edáfica nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32, 93–102. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v32n2/v32n2a4.pdf>

Agradecimientos

El primer autor agradece al CONACYT por el apoyo financiero para la realización de estudios de Maestría en Ciencias y de la presente investigación a través del proyecto CONACYT-24667.

Fin de la versión en español

- Pérez-Moreno, J. (2016). Los hongos silvestres y el cambio climático global y bosques. In M. L. de la Isla de Bauer (Ed.), *Producción de alimentos en casa: Agricultura urbana y periurbana* (pp.153–176). México: Comité de Acción para el Saneamiento Ambiental.
- Pérez-Moreno, J., Lorenzana, F. A., Carrasco H. V., & Yescas-Pérez, A. (2010). Aspectos biotecnológicos de los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. México: Colegio de Postgraduados-SEMARNAT- CONACyT.
- Rinaldi, A. C., Comandini, O., & Kuyper, T. W. (2008). Ectomycorrhizal fungal diversity: Separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*, 33, 1–45. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/37792709_Ectomycorrhizal_fungal_diversity_Separating_the_wheat_from_the_chaff
- Sanchez-Zabala, J., Majada, J., Martín-Rodríguez, N., Gonzales-Murua, C., Ortega, U., Alonso-Graña, M., ...Duñabeitia, M. K. (2013). Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza*, 23, 627–40. doi: 10.1007/s00572-013-0500-4
- Sebastiana, M., Tolentino, P. V., Alcántara, A., Salomé, P. M., & Bernardes, S. A. (2013). Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* increases the performance of *Quercus suber* L. (cork oak) nursery and field seedlings. *New Forest*, 44, 937–949. doi: 10.1007/s11056-013-9386-4
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd. edition). New York, USA: Academic Press. doi: 10.1016/B978-012370526-6.50002-7
- Sousa, R. N., Franco, R. A., Ramos, A. M., Oliveira, S. R., & Castro, L. M. P. (2015). The response of *Betula pubescens* to inoculation with an ectomycorrhizal fungus and a plant growth promoting bacterium is substrate-dependent. *Ecological Engineering*, 81, 439–443. doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.04.024
- Statistical Analysis System (SAS Institute Inc.). (2009). *SAS/STAT® 9.2 User's Guide* (Second edition). Cary, NC, USA: Author.
- Valdés, R. M., Ambriz, P. E., Camacho, V. A., & Fierros, G. A. M. (2010). Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2, 53–64. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v1n2/v1n2a5.pdf>

- Xiao-Qin, W., Liang-Liang, H., Jiang-Mei, S., Jia-Hong, R., Zheng, L., Chen, D., & Jian-Ren, Y. (2012). Effects of ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* and mycorrhiza helper *Bacillus cereus* on the growth and nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 385–391. doi: 10.1007/s00374-011-0638-1
- Xu, H., Kemppainen, M., El Kayal, W., Lee, H. E., Pardo, G. A., Cooke, K. E. J., & Zwiazek, J. J. (2015). Overexpression of *Laccaria bicolor* aquaporin JQ585595 alters root water transport properties in ectomycorrhizal white spruce (*Picea glauca*) seedlings. *New Phytologist*, 205, 757–770. doi: 10.1111/nph.13098
- Yin, D., Deng, X., Chet, I., & Song, R. (2014). Physiological responses of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seedlings to the interaction between *Suillus luteus* and *Trichoderma virens*. *Current Microbiology*, 69, 334–342. doi: 10.1007/s00284-014-0589-5
- Zhang, Z. X. (1986). Determination of chlorophyll content of plants - acetone and ethanol mixture method. *Liaoning Agricultural Science*, 3, 26–28.
- Zhao, L., Xiao-Qin, W., Jian-Ren, Y., Hao, L., & Gui-E, L. (2014). Isolation and characterization of a mycorrhiza helper bacterium from rhizosphere soils of poplar stands. *Biology and Fertility Soils*, 50, 693–601. doi: 10.1007/s00374-013-0880-9
- Zong, K., Huang, J., Nara, K., Chen, Y., Shen, Z., & Lian, C. (2015). Inoculation of ectomycorrhizal fungi contributes to the survival of tree seedlings in a copper mine tailing. *Journal of Forest Research*, 20, 493–500. doi: 10.1007/s10310-015-0506-1