



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA  
FACULTAD DE INGENIERIA EN TECNOLOGÍA DE LA MADERA

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

EFFECTO DE *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y  
DIMETILHEXADECILAMINA EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE *Pinus*  
*devoniana* Y *Pinus greggii*

Tesis para obtener el Grado de:  
Maestro en Ciencias y Tecnología de la Madera.

Presenta:

WILBER MONTEJO MAYO

Director: Crisanto Velázquez Becerra  
Doctor en Ciencias Biológicas

Asesor externo: Roberto A. Lindig Cisneros.  
Doctor en Recursos Terrestres

Morelia, Michoacán, Marzo de 2015



## INDICE

INDICE DE CUADROS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Mecanismos de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV).....	6
2.1.1 Biofertilización.....	6
2.1.2 Rizorremediadores.....	7
2.1.3 Fitoestimuladores.....	8
2.1.4 Control de estrés.....	9
2.2 Promoción del crecimiento vegetal de forma indirecta.....	10
2.3 Bacterias auxiliares de la micorrización.....	11
2.4 <i>Arthobacter agilis</i> UMCV2.....	12
2.5 <i>Trichoderma harzianum</i> .....	14
2.5.1 Micoparasitismo.....	14
2.5.2 Competencia.....	15
2.5.3 Antibiosis.....	15
2.5.4 Inducción de resistencia en las plantas.....	16
2.5.5 Aplicación y resultados del uso de <i>Trichoderma</i> en el control de patógenos de plantas.....	16
2.6 Compuesto organico volátil (Dimetilhexadecilamina).....	18
III.-DESCRIPCION DE LAS ESPECIES.....	19
3.1 Descripción de <i>Pinus devoniana</i> Lindley.....	19
3.2 Descripción de <i>Pinus greggii</i> Englem.....	20
IV. JUSTIFICACIÓN.....	22
V. HIPÓTESIS.....	23
VI. OBJETIVOS.....	24

6.1 Objetivo general.....	24
6.2 Objetivos particulares.....	24
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
VIII. RESULTADOS.....	29
8.1 Efecto de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2, <i>Trichoderma harzianum</i> y dimetilhexadecilamina en la germinación de <i>Pinus devoniana</i> y <i>Pinus greggii</i> .....	31
8.2 Efecto de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2, <i>Trichoderma harzianum</i> y dimetilhexadecilamina en el crecimiento de <i>Pinus devoniana</i> y <i>Pinus greggii</i> .....	29
IX. DISCUSIÓN.....	46
X. CONCLUSIONES.....	49
XI. RECOMENDACIONES.....	50
XII.BIBLIOGRAFIA.....	51

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b> Porcentaje de germinación, longitud y peso de las radículas de <i>Pinus devoniana</i> .....	29
<b>Cuadro 3</b> Porcentaje de germinación, longitud y peso de las radículas de <i>Pinus greggii</i> .....	31
<b>Cuadro 4</b> Diámetro y cobertura de <i>Pinus devoniana</i> crecida en sustrato estéril y no estéril.....	33
<b>Cuadro 5</b> Diámetro y cobertura de <i>Pinus greggii</i> crecida en sustrato estéril y no estéril.....	40
<b>Cuadro 6</b> Porcentaje de supervivencia de <i>Pinus devoniana</i> y <i>Pinus greggii</i> a los 240 días.....	45

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Semillas de <i>Pinus devoniana</i> expuestas a <i>Arthobacter agilis</i> UMCV2, <i>Trichodema harzianum</i> y el compuesto dimetilhexadecilamina durante 9 días.....	30
<b>Figura 2</b> Altura de <i>Pinus devoniana</i> en sustrato estéril y no estéril a través del tiempo.....	32
<b>Figura 3</b> Peso fresco y seco de la parte aérea en <i>Pinus devoniana</i> crecido en sustrato estéril y no estéril.....	34
<b>Figura 4</b> Peso fresco y seco de raíz en <i>Pinus devoniana</i> crecido en sustrato estéril y no estéril.....	36
<b>Figura 5</b> Longitud y densidad de la raíz en <i>Pinus devoniana</i> crecido en sustrato estéril y no estéril.....	37
<b>Figura 6</b> Concentración de clorofila en <i>Pinus devoniana</i> crecido en sustrato estéril y no estéril.....	38
<b>Figura 7</b> Altura de <i>Pinus greggii</i> en sustrato estéril y no estéril.....	39
<b>Figura 8</b> Peso fresco y seco de la parte aérea en <i>Pinus greggii</i> crecido en sustrato estéril y no estéril.....	41
<b>Figura 9</b> Peso fresco y seco de raíz en <i>Pinus greggii</i> crecido en sustrato estéril y no estéril.....	42
<b>Figura 10</b> Longitud y densidad de la raíz en <i>Pinus greggii</i> crecido en sustrato estéril y no estéril.....	43
<b>Figura 11</b> Concentración de clorofila en <i>Pinus greggii</i> crecido en sustrato estéril y no estéril.....	44

## EFFECTO DE *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y DIMETILHEXADECILAMINA EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE *Pinus devoniana* Y *Pinus greggii*.

### RESUMEN

El género *Pinus* spp. incluye aproximadamente 110 especies, de las cuales alrededor del 50% habitan en México. En muchas ocasiones el proceso de crecimiento vegetal puede ser acelerado por la participación de microorganismos del suelo. La dimetilhexadecilamina es secretada por la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2, ha demostrado promover el crecimiento en plantas como *Medicago sativa* y *Medicago truncatula*. En este trabajo tenemos por objetivo evaluar el efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y dimetilhexadecilamina en la germinación y crecimiento de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii*. Las semillas de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii* fueron colocadas en cajas de Petri en medio Agar bacteriológico, el cual fue adicionado con dimetilhexadecilamina a concentraciones: Cero, 1, 10, 20 y 30  $\mu\text{M}$ . Los tratamientos con microorganismos se remojaron las semillas con las células de *A. agilis* UMCV2 y en co-acción *T. harzianum* se colocaron en agar bacteriológico. Los resultados nos muestran que a 10 $\mu\text{M}$  promueve la germinación de *P. devoniana* en un 72% y el tratamiento con bacteria presento mayor longitud de radículas. La concentración 1  $\mu\text{M}$  promueve la germinación de *P. greggii* 65%. En otro experimento que consistió en aplicar dimetilhexadecilamina, *A. agilis* UMCV2 y *T. harzianum* en un sistema donde las plantas crecieran en sustrato estéril y no estéril adicionada como agua de riego. Resultando después de un periodo de 240 días de exposición con los microorganismos encontramos mayor crecimiento en las plantas de *P. devoniana* en sustrato estéril reflejado en longitud de la parte aérea, peso fresco y seco de la raíz. En conclusión la dimetilhexadecilamina a concentraciones bajas promueve la germinación de las semillas de *P. devoniana* y *P. greggii*. La rizobacteria *A. agilis* UMCV2 y en co-acción con *T. harzianum* promueve el crecimiento solamente las plantas de *P. devoniana*.

**Palabras claves:** *Arthrobacter agilis* UMCV2, dimetilhexadecilamina, *Trichoderma harzianum*, *Pinus devoniana* y *Pinus greggii*.

EFFECT OF *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* and DIMETHYLHEXADECYLAMINE ON GERMINATION AND GROWTH OF *Pinus devoniana* and *Pinus greggii*

**ABSTRACT**

The genus *Pinus* spp. includes approximately 110 species, of which around 50% live in Mexico. In many occasions the process of plant growth can be accelerated by the participation of soil microorganisms. The dimethylhexadecylamine is secreted by the *Arthrobacter agilis* UMCV2, has demonstrated the promotion of growth in plants as *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. In this work we have for objective to evaluate the effect of *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* and dimethylhexadecylamine in germination and growth of *Pinus devoniana* and *Pinus greggii*. The seed of *Pinus greggii* and *Pinus devoniana* and were placed in Petri dishes in bacteriological agar, which was complimented with dimethylhexadecylamine to concentrations: 0, 1, 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$ . The treatments with microorganisms were soaked the seeds with cells from *A. agilis* UMCV2 and in co-action *T. harzianum* were placed on agar bacteriological. The results show us that to 10  $\mu\text{M}$  promotes germination of *P. devoniana* in 72% and treatment with bacteria introduced greater length radículas. The 1  $\mu\text{M}$  concentration promotes germination of *P. greggii* 65%. In another experiment that was to apply dimethylhexadecylamine, *A. agilis* UMCV2 and *T. harzianum* in a system where the plants grow in substrate sterile and non sterile added as irrigation water. Resulting after a period of 240 days of exposure with the organisms we find a greater growth in the plants of *P. devoniana* in sterile substrate reflected in length of the aerial part, fresh and dry weight of the root. In conclusion the dimethylhexadecylamine at low concentrations promotes germination of the seeds of *P. devoniana* and *P. greggii*. The rizobactreria *A. agilis* UMCV2 and in co-action with *T. harzianum* promotes the growth of plants only *P. devoniana*.

Key words: *Arthrobacter agilis* UMCV2, dimethylhexadecylamine, *Trichoderma harzianum*, *P. devoniana* and *Pinus greggii*.

## I. INTRODUCCIÓN

La cubierta vegetal de México es una de las más ricas y variables del planeta; dentro de los bosques de coníferas en México, los pinos son catalogados como el primer género de árboles en distribución y área, de hecho, México ocupa el primer lugar en diversidad de especies del género *Pinus*, el género de mayor importancia económica como ecológico en el país (Vargas, 2003; Sáenz-Romero *et al.*, 2003). El género *Pinus* incluye aproximadamente 111 especies a nivel mundial (Price *et al.*, 1998). En México y América Central se localizan alrededor de 46 especies de pinos, con diversas variedades y formas (Perry *et al.*, 1998). El estado Michoacán existe el 35% de las especies reportadas a nivel nacional, y conjuntamente con otras coníferas se agrupan en cuatro familias, seis géneros y 22 especies, con tres variedades y tres formas (COFOM, 2000). A nivel estatal posee importantes recursos forestales por su cantidad, diversidad e importancia económica. Ocupa el tercer lugar nacional en producción de madera (aproximadamente  $1 \times 10^6$  m<sup>3</sup> /año, después de Chihuahua y Durango) y el primer lugar nacional en producción de resina (35 000 t/año), no obstante que ocupa el sexto lugar nacional en existencias maderables (SEMARNAT, 2004 y 2005).

En México una de las especies que destaca por su amplia distribución e importancia económica es *Pinus devoniana* Lindley, también conocida como *Pinus michoacana* Martínez. Esta especie es endémica de México y Guatemala, y se encuentra en las zonas cálido-templadas en altitudes de 1,500 a 2,500 msnm (Perry, 1991). En nuestro país está distribuido en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Guanajuato, Estado de México, Morelos, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Oaxaca, Veracruz, Zacatecas y Chiapas (Perry, 1991; Farjon *et al.*, 1997). Por su parte, en el estado de Michoacán a *P. devoniana* lo encontramos distribuido en localidades como Uruapan, Cherán, Nahuatzen, Paracho, Pátzcuaro, Los Reyes, Salvador Escalante, Tacámbaro, Tingambato, Tumbiscatío y Tuxpan (SEMARNAT, PROCYMAF, 2005). Muchas veces a esta especie se localiza en asociación con *P.*

*montezumae* Lambert, *P. pseudostrobus* Lindley, *P. leiophylla* Schiede, *P. maximinoi* y *P. douglasiana* Martínez.

Por otro lado, *Pinus greggii* Engelm es una especie nativa de México (Martínez, 1948) parecida fenotípicamente a *P. patula*, pero se diferencia por sus hojas cortas, derechas y gruesas; aunque pertenecen al mismo grupo botánico. Se le conoce también como “pino prieto” en Coahuila, “pino ocote” en Hidalgo, en los estados del norte como “pino garabatillo” y en las poblaciones del centro como “ocote” u “ocote chino” (Eguiluz, 1978; Perry, 1991; Farjon *et al.*, 1997). El pino prieto se desarrolla en climas con temperatura media de 16.8°C, con máximas extremas de 45°C y mínimas de -9°C. Los sitios con *P. greggii* en el norte de México son secos, con precipitación anual de 400 a 600 mm, las procedencias del centro de México tienen una precipitación anual de 700 a 1,600 mm. En forma natural crece en las montañas de la Sierra Madre Oriental en altitudes de 1,300 a 3,000 msnm y de 2,000 a 3,100 msnm. Sin embargo, el intervalo altitudinal de distribución varía, diferentes autores lo ubican de 1,200 a 2,700 msnm (Din, 1958; Eguiluz, 1978; Dvorak y Donahue, 1993). Habita en suelos delgados de textura migajón areno-arcilloso, pedregosos, café rojizos y calizos, normalmente pobres en materia orgánica y con pH casi neutro (Eguiluz, 1978).

Roman *et al.*, (2004) señalan que *P. greggii* se ha convertido en una de las predilectas de los viveristas en México debido a sus características de crecimiento, variabilidad genética y adaptabilidad, tolerancia a la sequía y a otras condiciones adversas, además de que se tasa de crecimiento en altura, se mantiene en toda la amplitud de su distribución natural, aún al ser remplazada hacia sitios relativamente alejados de sus fuentes de producción de semilla.

El suelo constituye un hábitat bastante complejo, no sólo por la riqueza de componentes que presenta sino por la gran diversidad de organismos presentes en él. La abundancia de bacterias en comparación con otros microorganismos se puede deber a su rápido crecimiento y habilidad de utilizar un amplio rango de

sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno. Se considera que el suelo es uno de los ambientes más complejos en cuanto a vida microbiana se refiere, que puede contener cerca de  $10^9$  células bacterianas/gramo de suelo y un estimado de  $10^4$  especies microbianas diferentes por gramo de suelo (Cavaletti *et al.*, 2006).

Un suelo rico en materia orgánica y microbiota es un indicador de alta fertilidad y disponibilidad de nutrientes, la microbiota descompone los residuos orgánicos liberando agua y sustancias minerales (mineralizan el humus), transforman los elementos no disponibles en disponibles (hierro), participan en los procesos de fijación biológica del nitrógeno atmosférico y en la oxidación reducción de los nutrientes. La microbiota utiliza la energía del carbono para su metabolismo, fertilidad del suelo y contenido de materia orgánica en el suelo (Gómez, 2000).

De toda la comunidad microbiana que se tiene en el suelo, existen rizobacterias que tienen un efecto benéfico en la planta son usualmente referidas como promotoras del crecimiento vegetal o PGPR, por sus siglas en inglés (plant growth promoting rhizobacteria). Muchas de éstas han sido propagadas y usadas como inoculantes bacterianos, principalmente para mejorar la producción y el rendimiento de cultivos agrícolas (Davison, 1988).

Las PGPRs pueden promover el crecimiento mediante mecanismos de biofertilización que incluyen la fijación de nitrógeno (Hassan y Hassan, 2013), solubilización del fosfato (Koh y Song, 2007) y de hierro (Valencia-Cantero *et al.*, 2007), producción de fitohormonas (Barriuso *et al.*, 2005; Ortíz-Castro *et al.*, 2008), inhibición de actividad antifúngica y producción de compuestos orgánicos volátiles que actúan como moléculas señal (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011 y 2013).

Hay reportes de que las PGPRs naturalmente presentes en la rizósfera de plantas, han logrado incrementar el crecimiento en el porte arbóreo. Así por ejemplo, la inoculación de *Bacillus licheniformis* CECT 5106 y *Bacillus pumilus* CECT 5105

promueven el crecimiento de *Pinus pinea* y *Quercus ilex* induciendo cambios en la comunidad microbiana rizosférica (Domenech *et al.*, 2004; Probanza *et al.*, 2002).

En nuestro grupo de trabajo hemos mostrado que la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 promueve el crecimiento de plantas leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa* y *M. truncatula* (Valencia-Cantero *et al.*, 2007; Velázquez-Becerra *et al.*, 2011 y Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013) por diversos mecanismos que incluyen la solubilización de nutrientes y la producción del aminolípido “dimetilhexadecilamina” (DMHD), pero no existe reporte alguno del efecto que se pudiera tener entre la bacteria UMCV2 con especies de interés forestal. En el presente trabajo se tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 y la adición del compuesto DMHD en co-acción con *Trichoderma harzianum* sobre el crecimiento de la especie arbórea *Pinus devoniana* y *Pinus greggii* en escala de viveros.

## II. ANTECEDENTES

La microbiota edáfica es responsable de muchos procesos que son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas, como son: las transformaciones de elementos minerales (P, Ca, Fe, Mn, entre otros), supresión de algunas enfermedades de las plantas, mineralización de la materia orgánica, disponibilidad de nutrientes, síntesis compuestos orgánicos, fijación biológica de N<sub>2</sub> y degradación de compuestos contaminantes del suelo (Gómez y Corlay, 2007), además participan en el ciclo de nutrientes y agregación de partículas (Silva *et al.*, 2009).

La rizosfera de las plantas es de elevada importancia, es la zona del suelo que rodea inmediatamente la raíz de la planta, aquí se llevan a cabo procesos biológicos y químicos, ya que está directamente influenciada por la raíz, mediante la secreción de exudados, así como por los microorganismos que habitan en ella y a su vez estos ven beneficiados de dichos compuestos. Entre los compuestos que son liberados por parte de la raíz tenemos los de bajo peso molecular como los aminoácidos, iones, oxígeno libre, agua, ácidos orgánicos, azúcares, fenoles, vitaminas y fitosideróforos. Entre los exudados de alto peso molecular se encuentran compuestos como mucilagos y proteínas (Bais *et al.*, 2006). El papel que juegan estos exudados es muy complejo, ya que actúan como mensajeros que estimulan las interacciones biológicas y físicas entre las raíces y los microorganismos del suelo, también modifican las propiedades químicas y físicas de la rizósfera y contribuyen al crecimiento de las raíces y la planta en general. Sin embargo, el destino de los exudados en la rizósfera y la naturaleza de sus reacciones del suelo siguen siendo poco conocidas (De la Peña *et al.*, 2008).

En muchas ocasiones el proceso de crecimiento vegetal puede ser acelerado por la participación de microorganismos del suelo. Entre las interacciones que se generan, existen las establecidas entre las plantas y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs (en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria),

estas interacciones pueden ser alteradas o mediadas por mecanismos directos o indirectos:

## **2.1 Mecanismos de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)**

Los mecanismos empleados para ejercer la promoción del crecimiento vegetal de forma directa pueden clasificarse como sigue:

### **2.1.1 Biofertilización**

Las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Frankia* pueden formar nódulos en las raíces de plantas tales como la soya, frijol, cacahuate, alfalfa, aile y casuarina que convierten el nitrógeno atmosférico en amoníaco, de esta forma el nitrógeno atmosférico puede ser utilizado por los vegetales como fuente de nitrógeno (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995).

*Azospirillum* es una bacteria de vida libre fijadora de nitrógeno que contribuye a la fertilización del trigo, sorgo y maíz. A pesar de la capacidad de fijación de *Azospirillum*, el incremento de la producción causada por la inoculación por *Azospirillum* se atribuye principalmente al desarrollo de la raíz y por lo tanto a un aumento de las tasas de absorción de agua y minerales. Otro elemento que disminuye el crecimiento de las plantas es el fosfato. Algunas bacterias PGPRs solubilizan fosfato para las plantas, lo que facilita su crecimiento. Varias enzimas tales como fosfatasas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas liberan fosfato soluble a partir de compuestos orgánicos en el suelo. Las C-P liasas rompen los enlaces C-P en fosfonatos y así la liberación de fósforo de los minerales se relaciona con la producción de ácidos orgánicos, como el ácido glucónico (Rodríguez *et al.*, 2006).

Por su parte, los arboles del género *Pinus* como *P. sylvestris* y *Pinus radiata*, presentan microorganismos simbioses naturales, tanto micorrizas como bacterias. Así, por ejemplo, ha sido establecido que el hongo micorrízico *Trichoderma*

*harzianum* y en conjunto con la composta permite un incremento significativo en altura y biomasa de las plantas de *P. radiata* así como el desarrollo del sistema radical (Donoso *et al.*, 2008). En *P. radiata* se presentan organismos como: *Betaproteobacteria*, *Bacilli*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Sphingobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Acidobacteria*, generando ventajas en cuanto a la fijación de nitrógeno y la oxidación de amonio, así como en el crecimiento de la planta y el control biológico de organismos patógenos (Lottmann *et al.*, 2010). Otro ejemplo lo tenemos con *P. sylvestris*, ya que presenta principalmente en su comunidad bacterias simbiote del género *Burkholderia* y especies de *Paenibacillus*. Algunas de estas bacterias puede ayudar a los árboles con la adquisición de nitrógeno, ya que las bacterias potencialmente diazotróficas albergar nitrógeno reductasa (Timonen y Hurek 2006).

Por último, Chávez *et al.*, (2014) destaca la importancia de inoculantes biológicos formulados con los hongos saprobios o con la mezcla de hongos saprobios y ectomicorrícicos, estos organismos estimularon el crecimiento de plantas en *P. radiata* respecto a los controles (plantas sin inoculación fúngica). Además, la presencia de granos de trigo en los inóculos favoreció el efecto estimulante producido por los hongos sobre el crecimiento de *P. radiata*. El inoculante formulado con la mezcla *Corioloopsis rigida* y *Rhizopogon luteolus* produjo las plantas de *P. radiata* con mayores índices de calidad bajo condiciones de invernadero, siendo una alternativa viable para su uso como potencial biofertilizante en la producción de especies vegetales forestales (Chávez *et al.*, 2014).

### **2.1.2 Rizadorremediadores**

Existen bacterias capaces de solucionar problemas de contaminación, las bacterias de este tipo han resultado ser eficaces en laboratorio pero poco eficaces en condiciones de campo. Su principal metabolismo depende de la degradación de los contaminantes. Una estrategia para poder utilizar estas bacterias en el suelo es desacoplar la energía necesaria del metabolismo primario para la energía necesaria en la degradación de contaminantes. Con este fin, (Kuiper *et al.*, 2001) desarrollaron

un sistema llamado rizorremediación. La estrategia consistió en seleccionar rizobacterias degradadoras de contaminantes que viven o están cerca de la raíz para que puedan utilizar los exudados de la raíz como fuente importante de nutrientes (Kuiper *et al.*, 2001). Estos autores desarrollaron un sistema eficaz para enriquecer bacterias partiendo de una mezcla cruda. Una de las cepas resultantes es *P. putida* PCL1444, efectivamente utiliza el exudado de la raíz y degrada el naftaleno alrededor de la raíz, protege a las semillas de ser muertas por la naftalina y permite a la planta crecer normalmente, mutantes incapaces de degradar naftaleno no protegen a la planta (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

### **2.1.3 Fitoestimuladores**

Algunas bacterias producen sustancias que estimulan el crecimiento de plantas en ausencia de patógenos. El mejor ejemplo es la producción de la fitohormona auxina, así como ciertos compuestos volátiles y del cofactor pirrolquinolina quinona (PQQ) que estimula el crecimiento de plantas. La hormona auxina promueve el crecimiento de la raíz y está presente en los exudados de la raíz, es por lo general sintetizada a partir del aminoácido triptófano (Kamilova *et al.*, 2006). La inoculación de semillas con la auxinas sintetizadas por *P. fluorescens* WCS365 no dio lugar a un aumento en el peso de las raíces o ramas de *Cucumis sativus* (pepino), ni en pimiento de *Solanum lycopersicum*, pero sí dio lugar a un significativo aumento en el peso de la raíz de *Raphanus sativus* (rábano). El rábano produce por lo menos nueve veces más triptófano en su exudado que las plántulas de pepino, pimiento o tomate (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Otro ejemplo lo tenemos con *Azotobacter paspali*, mejora el crecimiento de una variedad de dicotiledóneas y monocotiledóneas, mediante la fijación de nitrógeno. Experimentos con nitrógeno añadido sugieren que la promoción del crecimiento vegetal se debe a la producción de los factores de crecimiento vegetal tales como el ácido indolacético, giberelinas y citoquininas y no por la fijación de nitrógeno en sí (Okon *et al.*, 1998).

También los compuestos volátiles juegan un papel importante en la interacción planta-bacteria. Tenemos evidencia del papel que juegan dichos compuestos de origen bacteriano sobre el crecimiento vegetal, rizobacterias tales como las cepas de *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a promueven el crecimiento de las plantas mediante la liberación de compuestos volátiles. Estas dos cepas promovieron el aumento del área foliar de plántulas de *A. thaliana* en un sistema experimental de compartimientos separados donde las plantas y las bacterias no entran en contacto pero comparten el espacio de cabeza. Ambas bacterias producen los compuestos volátiles 2,3-butanediol y acetoina, mientras que bacterias no promotoras del crecimiento vegetal (*E. coli* DH5α) no los producen y las bacterias mutantes de *B. amyloliquefaciens* IN937a y *B. subtilis* GB03 bloqueadas en la biosíntesis de estos compuestos tampoco promovieron el crecimiento en la planta (Ryu *et al.*, 2003).

Más recientemente Zhang *et al.*, (2008) encontraron que *B. subtilis* GB03 aumenta la eficiencia fotosintética y el contenido de clorofila de *A. thaliana* a través de la modulación de la señalización endógena de la glucosa y ácido abscísico. Llegaron a la conclusión de que la bacteria juega un papel regulador en la adquisición de energía para la planta. El cofactor PQQ fue descrito como un promotor del crecimiento de plantas (tomate y pepino). Los resultados sugieren que el PQQ actúa como un antioxidante en las plantas, sin embargo no se puede excluir que el efecto es indirecto porque PQQ es un cofactor de varias enzimas que participan en la actividad antifúngica y la inducción de resistencia sistémica en la planta (Lugtenberg y Kamilova 2009).

#### **2.1.4 Control de estrés**

Algunas PGPRs como *Enterobacter* spp (Ping y Boland 2004) contienen la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa que facilita el crecimiento y desarrollo de la planta mediante la disminución de los niveles de etileno en plantas. Tales bacterias toman el precursor del etileno (ACC) para convertirlo en 2-oxobutanoato y NH<sub>3</sub>. Varias formas de estrés son desahogadas por la producción

de ACC deaminasa, tales como los efectos de las bacterias fitopatógenas y la resistencia al estrés por hidrocarburos poliaromáticos, metales pesados como el  $Cd^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  y resistencia al estrés salino y desecación (Glick *et al.*, 2007).

## **2.2 Promoción del crecimiento vegetal de forma indirecta**

Las PGPRs promueven el crecimiento de las plantas por mecanismos directos e indirectos, ahora bien, en los mecanismos indirectos está involucrada la habilidad de las bacterias PGPRs para reducir el crecimiento de organismos patógenos para las plantas. Las PGPRs indirectamente pueden provocar el crecimiento de la planta vía la supresión de fitopatógenos por una variada cantidad de mecanismos. Esto incluye la habilidad para sintetizar moléculas como los sideróforos que quelan el hierro dejando un ambiente rizosférico libre de hierro para los fitopatógenos y de esta manera queda debilitando su estatus nutricional para los fitopatógenos; también tenemos la capacidad de producir metabolitos anti-fúngicos como es el caso de los antibióticos, enzimas que lisan paredes celulares, cianuros y toda clase de compuestos que desencadenan la eliminación de organismos patógenos de plantas (Nelson, 2004). Un ejemplo bien documentado es donde se demuestra la PGPRs *B. subtilis* G8 produce compuestos orgánicos volátiles anti-fúngicos. En estos experimentos se demostró que diversos organismos fitopatógenos en los que se encontraba *S. sclerotiorum* y *B. cinerea* se veían reprimidos en el crecimiento del micelio y la germinación de esporas en porcentajes muy importantes, debido a la exposición de los compuestos volátiles provenientes de *B. subtilis* G8. Posteriormente en este mismo trabajo, mediante un análisis cromatográfico se observó que esta bacteria sintetizaba y liberaba compuestos como alcoholes, ésteres, cetonas, ácidos y aminas entre otros, los autores del trabajo apuestan que sean la causa de dicha represión (Liu *et al.*, 2008).

### 2.3 Bacterias auxiliares de la micorrización

Las bacterias auxiliares de la micorrización (MHBs por sus siglas en inglés) es la asociación de bacterias que de manera consistente favorecen el desarrollo de las micorrizas y que mejoran el crecimiento de las plantas y considera cinco hipótesis de mecanismos cuyo efecto está implicado en la especificidad fúngica de algunos MHBs (Garbaye, 1994).

La inoculación exitosa de bacterias auxiliares de las micorrizas para promover el establecimiento de los hongos micorrizicos en *Acacia* y el crecimiento de las plantas, y señalan que este tipo de rizobacterias pueden tener gran importancia ecológica en aéreas tropicales a través de la utilización en los programas de reforestación (Founoune *et al.*, 2002).

Por lo tanto, la combinación de los tipos de organismos (micorrizas y RPCV) en un biofertilizante podría ser de enorme interés para la producción de plantas en viveros (Barriusco *et al.*, 2005).

Barriuso *et al.*, (2008) estudiaron la capacidad de diez rizobacterias para incrementar el crecimiento de *Pinus pinea* y la micorrización; observaron que casi todas las cepas afectaron positivamente el crecimiento y encontraron que una de las cepas bacterianas ensayadas fue la mejor en promover la simbiosis ectomicorrizica, y sugieren que ésta es una buena candidata para ser utilizada en la producción de un biofertilizante bacteriano dirigido a incrementar el crecimiento del pino y su micorrización, lo cual podría resultar en una mejor tasa de establecimiento de las plantas usadas en reforestación. Estos investigadores concluyen que existe cierta especificidad entre bacterias inoculadas y las micorrizas que la planta seleccionan, implicado un uso potencial de la biotecnología en la producción de hongos con valor añadido.

Los resultados de Barriuso *et al.*, (2005) sugieren que *Pinus pinaster*, selecciona para bacterias de la micorrizósfera que movilizan nutrientes, mientras que *Pinus pinea* selecciona para bacterias que tienen la capacidad de incrementar el crecimiento de la raíz mediante la producción de reguladores del crecimiento vegetal.

Recientemente Zhang *et al.*, (2010) investigaron los efectos de inoculación con tres especies de hongos ectomicorrízicos, en la biomasa microbiana y diversidad funcional de comunidades microbianas en la rizósfera de plántulas de pino Chino (*Pinus tabulaeformis* Carr.) en condiciones experimental de campo. Los resultados mostraron que la inoculación con hongos ectomicorrízicos incrementaron significativamente la colonización ectomicorrízica comparados con las plántulas que no fueron inoculadas. Las inoculaciones con hongos ectomicorrízicos tuvieron una alta biomasa microbiana del suelo respecto del testigo. Además encontraron que los tratamientos inoculados presentaron los índices más altos de diversidad funcional con respecto a los testigos.

La importancia de la asociación bacteriana con las raíces micorrizadas, se ha destacado en la identificación de micorrizas y de bacterias que ayudan a mejorar el crecimiento de las plantas, y en la identificación de la diversidad de grupos de bacterias como  $\alpha$ -proteobacteria y  $\beta$ -proteobacteria, que pueden asociarse con la micorrizosfera de árboles forestales, en donde se puede tener una estrecha relación entre las micorrizas y bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>, cuya importancia funcional radica en que pueden contribuir significativamente a las entradas de nitrógeno al suelo (Khetmalas *et al.*, 2002).

#### **2.4 *Arthobacter agilis* UMCV2**

*Arthobacter* es un género de bacterias gram positivas ampliamente distribuido en el ambiente, encontradas frecuentemente en el suelo. Los cultivos de células jóvenes son bastones irregulares de 0.8 a 1.2 X y de 1.0 a 8.0  $\mu\text{m}$ , a menudo con forma de V y con terminación en forma de garrote sin presencia de filamentos.

Conforme el crecimiento continua los bastones se segmentan en pequeños cocos, de 0.6 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro arregladas singularmente en pares y en cúmulos irregulares (Holt *et al.*, 1994).

Velásquez-Becerra *et al.*, (2003), aísla una bacteria de color rojo de la rizósfera de maíz (*Zea mays*), que denomina UMCV2, la cual más tarde mediante el análisis del gen 16S ribosomal, se le identifica como *Arthrobacter agilis*. La cepa de *A. agilis* ha demostrado aumentar el estatus nutrimental de la planta *Phaseolus vulgaris* L., generando un marcado aumento en su biomasa (peso fresco de la planta). (Valencia-Cantero *et al.*, 2007).

La rizobacteria *A. agilis* UMCV2 también promueve el crecimiento de *Medicago sativa*, como en la longitud de la parte aérea, densidad de raíces laterales y peso fresco entre otros, esto mediante la secreción de moléculas como la dimetilhexadecilamina, ya que esta molécula de origen bacteriano se pudo observar que es la razón del aumento en el crecimiento de *M. sativa* (Velásquez-Becerra *et al.*, 2011).

Hernández-Calderón en el (2006), realiza un trabajo sobre la disponibilidad de hierro en las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con 4 cepas bacterianas entre ellas la *A. agilis* UMCV2, consistió en crecer plantas de frijol crecidas en condiciones in vitro y en un suelo alcalino estéril. Se inoculó a las plantas ya mencionadas con la cepa *A. agilis* UMCV2, encontrándose tres cosas, primero que la bacteria es capaz de colonizar exitosamente la rizósfera de frijol. Segundo esta bacteria tiene la capacidad de reducir hierro en la rizósfera, y tercero que tiene un efecto promotor en el crecimiento; teniendo la capacidad de aumentar la longitud de la raíz, así como de provocar la longitud de las raíces laterales.

Se ha reportado que algunas bacterias del genero *Arthrobacter* son endófitas de plantas, un ejemplo es la bacteria *Arthrobacter globiformis* que es endófito de maíz (Chelius y Triplett, 2000).

## **2.5 Genero *Trichoderma***

Es un hongo imperfecto perteneciente a la Subdivisión Deuteromycotina: Clase: Deuteromycetes (Aleuxopulus, 1979). El género *Trichoderma* se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, encontrándose en prácticamente todos los suelos y otros hábitats naturales, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica. *Trichoderma* es un colonizador secundario pudiendo ser aislado de materia orgánica descompuesta, superficie de raíces de plantas, madera en descomposición y en esclerocios o propágulos de otros hongos. (Papavizas, 1985; Howell 2002).

El género *Trichoderma* es uno de los más estudiados, entre numerosos agentes de control biológico, por sus características de antagonismo en condiciones naturales. Se comporta como hiperparásito frente a diversos patógenos, atacando directamente y produciendo la ruptura del micelio de los hongos productores de enfermedades de las plantas. Las especies de este género son hongos de vida libre, altamente interactivos en las raíces suelo y ambiente foliar, también se ha descrito en este género una gran capacidad de inactivar exudados originados en las semillas en germinación, que estimulan el desarrollo de propágulos de hongos patógenos de plantas en el suelo, (Howell, 2002; Harman 2004), su estudio ha estado dirigido a aumentar la densidad del inóculo, mediante prácticas agrícolas o por introducción directa en el suelo (Chet, 1987).

Los Mecanismos de acción el género *Trichoderma* como antagonista, puede tener diferentes mecanismos de acción entre los que se encuentran el micoparasitismo, competencia, antibiosis e inducción de resistencia en las plantas.

### **2.5.1 Micoparasitismo**

Este proceso de micoparasitismo sería uno de los principales mecanismos involucrados en el antagonismo de *Trichoderma* como agente biocontrolador. Este

proceso incluiría el crecimiento del antagonista hacia el patógeno, desarrollándose alrededor de éste o formando estructuras similares a ganchos o apresorios en la superficie del hospedero, que le permitirían, penetrar al interior (del patógeno) y por acción de enzimas líticas (quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa) degradar su pared celular (Elad *et al.*, 1993, Garza *et al.*, 1997; Metcalf y Wilson 2001; Brunner *et al.*, 2003).

### **2.5.2 Competencia**

La competencia por sustrato y nutrientes sería otro mecanismo que explicaría el efecto antagónico de *Trichoderma*. Este proceso ocurre cuando dos o más organismos requieren el mismo recurso y el uso de éste por uno, reduce la cantidad disponible para el otro. La competencia fundamentalmente se produce por recursos esenciales como carbono, nitrógeno, hierro y espacio físico. Un mecanismo que recientemente ha ganado adherentes es la competencia que se produce a nivel de la rizosfera cuando se aplican cepas de *Trichoderma* a las semillas, produciéndose un rápido crecimiento en conjunto con el desarrollo radicular de las plantas tratadas, compitiendo entonces a este nivel por nutrientes y espacio (Howell *et al.*, 2000; Harman 2000).

### **2.5.3 Antibiosis**

La actividad antibiótica de *Trichoderma* se debería a la secreción de sustancia antibióticas o metabolitos que inhiben la actividad parasítica de los patógenos (Dubos, 1987). Estos metabolitos serían volátiles y no volátiles, del tipo antibióticos como viridín, trichodermin, glioviridin, gliotoxin y harzaniolide (Lumsden *et al.*, 1992). De todas estas micotoxinas la más representativa es Trichodermin que actuaría inhibiendo la actividad ribosomal de los patógenos, por lo tanto su reproducción (Ghisalberti, 1991).

#### **2.5.4 Inducción de resistencia en las plantas**

Otro mecanismo propuesto para explicar la actividad biocontroladora de especies de *Trichoderma*, es la inducción de resistencia en las plantas hospederas tratadas con el agente biocontrolador. Este concepto ha sido fundamentado por Yedidia *et al.*, (1999) y Yedidia *et al.*, (2000), quien demostró que raíces de cucurbitáceas inoculadas con *T. harzianum*, presentan una respuesta defensiva tanto en las raíces como en las hojas de las plantas tratadas, demostraron que las hifas del hongo biocontrolador penetran la epidermis y corteza superior de la raíz de la cucurbitácea. La planta responde con una marcada actividad de la enzima peroxidasa frecuentemente asociada con la producción de fungitoxinas, un incremento en la actividad quitinasa y la deposición de celulosa en la superficie interna de la pared celular. Se ha comparado esta relación a la que se establece entre vegetales y micorrizas. Se han identificado tres tipos de compuesto producidos por cepas de *Trichoderma* que son responsables de inducir resistencia en las plantas, entre ellas se encuentran: proteínas con función enzimática, homólogos de proteínas, oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular, que son liberados desde el hongo o pared celular de la planta por la actividad de enzimas de *Trichoderma* (Beker *et al.*, 1997; Harman 2004).

#### **2.5.5 Aplicaciones y resultados del uso de *Trichoderma* en el control de patógenos de plantas.**

Numerosos trabajos señalan a distintas especies de *Trichoderma* como importantes agentes de biocontrol de las enfermedades producidas por un amplio rango de patógenos, entre los cuales están *Armillaria mellea*, *Phytium* spp, *Phytophthora* spp, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinérea* y *Fusarium* spp. (Chet, 1987; Harman, 2004). Se ha demostrado que *Trichoderma* es capaz de colonizar las flores desplazando al patógeno de su habitual sitio de infección, constituyendo ésta la principal forma de antagonismo contra *B. cinerea*, además produce enzimas capaces de degradar las paredes celulares de este patógeno, (Chet, 1987). Por ello se recomiendan los tratamientos con *Trichoderma* durante etapas tempranas,

desde la floración, tanto para vid como frutillas (Dubos *et al.*, 1983, Sutton y Perg, 1993). A partir de evaluaciones de la capacidad inhibitoria de algunos antagonistas, aislados de huertos de manzano, sobre la producción de pseudotecios y ascosporas de *Venturia inaequalis* se realizaron aplicaciones foliares de algunos antagonistas para el control de *V. inaequalis* en otoño, logrando una reducción significativa en la producción de ascosporas, tanto en hojas incubadas a temperatura controlada, como en el huerto. De estos antagonistas, *Trichoderma* redujo un 75,2% la producción de ascosporas, indicándolo como un importante y potencial controlador del inóculo inicial de este patógeno (Philon *et al.*, 1997; Odile *et al.*, (1999).

Aplicaciones de antagonista, directas al suelo o mezcla con sustratos de crecimiento han logrado un eficiente control para diversos patógenos principalmente los relacionados con la caída de plantas. Tres aislados de *Trichoderma* y *Gliocladium virens*, tolerantes a bajas temperaturas y con actividad antibiótica a *Phytophthora cactorum* (Smith *et al.*, 1998) fueron evaluadas para el control de la pudrición radical y de la corona del manzano en plantas de invernadero. Obteniendo una significativa reducción en el daño de las raíces y un incremento en el peso de las plantas (Smith *et al.*, 1990).

Conjuntamente a la acción supresora de patógenos, numerosos estudios indican a este antagonista, como promotor o estimulador del crecimiento de las plantas. Esto último es producto de su capacidad colonizadora, que permite controlar o eliminar a los patógenos, así como sobrevivir por largos periodos en la rizósfera utilizando los exudados de las superficies radiculares, lo que además les proporciona una protección a ciertos estrés de tipo físicos, determinando un rápido crecimiento de las raíces (Bjorkman, 1999, Smith *et al.*, 1990, Venegas, *et al.*, 1996).

Un estudio realizado con especie forestal indican que la presencia conjunta de compost y *T. harzianum* permite un incremento significativo en altura y biomasa de las plantas, así como el desarrollo del sistema radical. Por su parte, la presencia de compost estimula un incremento poblacional del hongo *T. harzianum*, indicando que

la inoculación de los sustratos utilizados para producción de plántulas de *P. radiata* con *T. harzianum* generaría un incremento significativo en el vigor de las plántulas producidas. Los mecanismos involucrados no han sido dilucidados (Donoso *et al.*, 2008).

## **2.6 Compuesto orgánico volátil (VOCS) dimetilhexadecilamina.**

El compuesto orgánico volátil dimetilhexadecilamina es un lípido aminado con una longitud de una cadena hidrocarbonada de 16 átomos y dos grupos metilo. En un trabajo realizado por medio de un análisis cromatográfico (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011), se encontró la presencia de la dimetilhexadecilamina dentro del perfil de compuestos orgánicos volátiles emitidos por *A. agilis* UMCV2.

En otro experimento se presentó el efecto de compuestos que son secretados por PGPR las cuales capaces de reprimir el crecimiento de hongos patógenos como *Botrytis cinérea* y el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* que limitan fuertemente la producción agrícola y forestal (Jardel, 2006, Velázquez-Becerra *et al.*, 2011). Una de esas rizobacterias es *A. agilis* UMCV2 que produce el VOCs dimetilhexadecilamina, que adicionado al medio de cultivo, es capaz de inhibir completamente el crecimiento de dichos agentes fitopatógenos. Sin embargo su capacidad para inhibir el desarrollo de los patógenos infectando plantas in vivo no ha sido probado. La capacidad de *A. agilis* UMCV2 para vivir como bacteria endófito podría representar una ventaja para su empleo como agente de control biológico de fitopatógenos. Como compuesto puro, la *Phytophthora cinnamoni* a partir de concentraciones de 50  $\mu$ M, mostrando una actividad inhibitoria superior a la del captan (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013).

### III. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIE

#### 3.1 Descripción de *Pinus devoniana* Lindley

FAMILIA: Pinaceae

NOMBRE CIENTIFICO: *Pinus devoniana* Lindley

NOMBRE COMÚN: Pino lacio - Michoacán y Nayarit; tsihirén – Michoacán; ocote escobetón - Tecatitlán y otros lugares de Jalisco; pino blanco – Nochistlán, Zacatecas; ocote gretado - Telixtlahuaca, Oaxaca (Martínez, 1979).

SINONIMIA: *Pinus michoacana* Mart.

ORIGEN: Esta especie es endémica de México y Guatemala (Perry, 1991).

FORMA BIOLÓGICA: Árbol de 20-30 m de alto y 1 m de diámetro normal (Perry, 1991) durante los primeros 5 años permanece en estado cespitoso.

FRUTOS: Octubre a febrero (Patiño *et al.*, 1983), en diciembre (Chávez, 1990).

Se extiende desde el centro de México hasta el centro de Guatemala; en México se distribuye en los estados de Nayarit, Zacatecas, Jalisco, Colima, Michoacán, Hidalgo, México, Puebla, Morelos, Guanajuato, Tlaxcala, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas (Perry, 1991). Se establece en laderas de bosque de pino y bosque de pino- *Quercus*. Se localizan a los 16° 35' y 21°15' de latitud norte y los 92° 15' y 102° 05' de longitud oeste (Chávez, 1990). Se encuentra en las zonas cálido-templadas en altitudes de 1,500 a 2,500 msnm (Perry, 1991). Por su parte, en el estado de Michoacán a *P. devoniana* lo encontramos distribuido en localidades como Uruapan, Cherán, Nahuatzen, Paracho, Pátzcuaro, Los Reyes, Salvador Escalante, Tacámbaro, Tingambato, Tumbiscatío y Tuxpan (SEMARNAT, PROCYMAF, 2005). La madera es de buena calidad, se utiliza en ebanistería, en la fabricación de muebles, duelas, parquet, leña y para la producción de resinas en los estados de Michoacán, México y Oaxaca (Eguiluz, 1978).

Las semillas probablemente son ortodoxas (Hong, 1996), este tipo de semillas puede almacenarse con contenidos de humedad de 6 a 7% y temperaturas  $\leq 0^{\circ}\text{C}$ ; tales condiciones permiten mantener la viabilidad por varios años. Aunque generalmente las semillas ortodoxas presentan algún periodo de letargo (Arriaga *et al.*, 1994), al parecer las semillas de esta especie no presentan latencia (Vázquez, 1996). Las semillas se almacenan en recipientes secos o latas de metal, a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , y contenidos de humedad en las semillas (CH) de 6 a 8 % (Patiño *et al.*, 1983). En cajas metálicas selladas a  $0^{\circ}\text{C}$  con 12 % de humedad en las semillas (Navarro, 1992). El tiempo de viabilidad estimado bajo condiciones de almacenamiento más de 4 años (Patiño *et al.*, 1983) a CH de 6 a 8% y  $4^{\circ}\text{C}$ ; a CH de 12% y  $0^{\circ}\text{C}$  en 4 años la viabilidad de las semillas desciende hasta un 90% (Navarro, 1992). El tiempo necesario para la germinación de las semillas de 6 a 10 días.

### **3.2 Descripción de *Pinus greggii* Englem**

FAMILIA: Pinaceae

NOMBRE CIENTÍFICO: *Pinus greggii* Englem.

NOMBRE COMÚN: Pino greggii, palo prieto, pino ocote-Hidalgo (Anónimo, 1998); pino prieto-Coahuila (Martínez, 1994).

SINONIMIA: *Pinus patula stricta Benth ex Endl*; *Pinus patula macrocarpa* Gard. Chron (Martínez, 1992).

ORIGEN: Nativo de la Sierra Madre Oriental de México (Eguiluz, 1982).

FORMA BIOLÓGICA: Árbol pequeño de 10 a 25 cm de altura, de crecimiento rápido (Anónimo, 1998).

FRUTOS: Los conos maduran de noviembre a marzo. Debido a que los conos son serótinos y pueden permanecer cerrados más de dos años, es posible encontrar cono en cualquier época del año (Anónimo, 1998; Anónimo, 2000).

Se distribuye sobre la Sierra Madre Oriental en los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí e Hidalgo (Anónimo, 1998; Eguiluz, 1982). Forma asociaciones con Bosque de *Quercus* y bosques de coníferas (Rzedowski, 1978). Se localizan entre los 20° 00' y 25° 40' de latitud norte y los 97° 40' a 101° 20' de longitud oeste (Anónimo, 1998, Eguiluz, 1982). Los sitios con *P. greggii* en el norte de México son secos, con precipitación anual de 400 a 600 mm, las procedencias del centro de México tienen una precipitación anual de 700 a 1,600 mm. En forma natural crece en las montañas de la Sierra Madre Oriental en altitudes de 1,300 a 3,000 msnm y de 2,000 a 3,100 msnm. Sin embargo, el intervalo altitudinal de distribución varía, diferentes autores lo ubican de 1,200 a 2,700 msnm (Din, 1958; Eguiluz, 1978; Dvorak y Donahue, 1993). Su madera se destina a la industria de la celulosa y el aserrío, para la fabricación de muebles, durmientes, pilones, vigas, postes para cerca y leña para combustible. También se utiliza como especie ornamental (Anónimo, 1998; Martínez, 1994).

Probablemente las semillas son ortodoxas (Hong *et al.*, 1996) este tipo de semillas puede almacenarse con contenidos de humedad de 6 a 7% y temperaturas  $\leq 0^{\circ}\text{C}$ ; tales condiciones permiten mantener la viabilidad por varios años. Aunque generalmente las semillas ortodoxas presentan algún tipo de latencia (Arriaga *et al.*, 1994) en el caso concreto de esta especie no parece haber periodo de letargo en las semillas (Anónimo, 1998). La semilla debe almacenarse en recipientes herméticamente cerrados, con un contenido de humedad de 5 a 7% y temperaturas aproximadas a  $1^{\circ}\text{C}$ . Se recomienda utilizar cubetas de plástico o tambos de cartón con bolsa de plástico interior (Anónimo, 2000). Con el procedimiento antes descrito es posible mantener la viabilidad de las semillas por más de cinco años (Eguiluz, 1982). El Tiempo necesario para la germinación de las semillas de 12 a 15 días (Anónimo, 1998).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Las especies de *P. devoniana* y *P. greggii* son de interés forestal para nuestro país, en dichas especies es necesario mejorar su rendimiento en las primeras etapas de crecimiento. La rizobacteria *A. agilis* UMCV2 es una habitante común del suelo y ha sido estudiada en especies de interés agrícola, pero en especies forestales no se han explorado sus efectos. Por lo tanto, en éste trabajo se evalúa se evalúa el efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y dimetilhexadecilamina en la germinación y crecimiento de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii*.

## V. HIPÓTESIS

Los microorganismos *A. agilis* UMCV2 y *T. harzianum* así como el compuesto dimetilhexadecilamina tienen la propiedad de promover el crecimiento de *P. devoniana* y *P. greggii* en etapa juvenil.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la rizobacteria *A. agilis* UMCV2, la micorriza *T. harzianum* y el compuesto dimetilhexadecilamina sobre la germinación y crecimiento en plántulas de *P. devoniana* y *P. greggii*.

### 6.2. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de *A. agilis* UMCV2, *T. harzianum* y el compuesto dimetilhexadecilamina sobre la germinación en semillas de *P. devoniana* y *P. greggii*.
- Determinar los efectos producidos por el compuesto dimetilhexadecilamina en plántulas de *P. devoniana* y *P. greggii*.
- Evaluar los efectos producidos por la inoculación radical de *A. agilis* UMCV2 sobre plántulas de *P. devoniana* y *P. greggii*.
- Evaluar los efectos producidos por la inoculación radical de *A. agilis* UMCV2 y *T. harzianum* sobre plántulas de *P. devoniana* y *P. greggii*.

## VII.-MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

- Se utilizaron semillas de *P. devoniana* y *P. greggii* que se obtuvieron de la Comisión Forestal del Estado de Michoacán (COFOM).
- En cuanto la cepa *Arthrobacter agilis* UMCV2 fue donada por el Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas-UMSNH.
- La micorriza *Trichoderma harzianum* se obtuvo de la casa comercial BIOSUSTENTA<sub>MR</sub>.

- Por otra parte el compuesto dimetilhexadecilamina (DMHD) se adquirió de la casa comercial Sigma-Aldrich México (40460-100ML), CAS: 112-69-6.
- Por último el sustrato que se utilizó fue Peat-Moss adquirida en “The Home Depot<sup>MR</sup>” y se combinó con arena comúnmente usada para la construcción en proporción 1:1.

## **Metodología.**

### **Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y dimetilhexadecilamina en la germinación de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii*.**

Las semillas de *P. devoniana* y *P. greggii* se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 20% (Cloralex<sup>MR</sup>) durante 10 minutos y después se enjuagaron con agua desionizada estéril. A las semillas se le aplicó un tratamiento pre-germinativo, el remojo en agua durante 12 horas y posteriormente se colocaron en cajas de Petri con aproximadamente 25 ml de Agar-Agua (AA). Para cada tratamiento se usaron 4 réplicas, con 10 semillas, dando un total de 40 semillas por tratamiento. Los tratamientos fueron:

- **Tratamiento control:** Solo contiene AA.
- **Tratamiento 1:** AA adicionado con DMHD a una concentración final de 1  $\mu$ M.
- **Tratamiento 2:** AA adicionado con DMHD a una concentración final de 10  $\mu$ M.
- **Tratamiento 3:** AA adicionado con DMHD a una concentración final de 20  $\mu$ M.
- **Tratamiento 4:** AA adicionado con DMHD a una concentración final de 30  $\mu$ M.
- **Tratamiento 5:** Esterilización superficial de semillas, para posteriormente ser expuestas 12 horas en 20 ml de una solución con *A. agilis* UMCV2 (9X10<sup>8</sup> ufc/ml) y ser colocadas en cajas de Petri en AA.

- **Tratamiento 6:** Esterilización superficial de semillas, para posteriormente ser expuestas 12 horas en 20 ml de una solución que con *A. agilis* UMCV2 ( $9 \times 10^{-8}$  ufc/ml) y 24 horas más tarde ser inoculadas con *T. harzianum* una vez colocadas en cajas de Petri en AA.

Los parámetros evaluados para las semillas fueron: Porcentaje de germinación, longitud de radículas y peso fresco de radículas.

### **Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y dimetilhexadecilamina en el crecimiento de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii*.**

Para este experimento se utilizó sustrato peat moss con arena (1:1) tanto en condiciones de esterilidad y no esterilizado. Los tratamientos contenían 19 repeticiones en sustrato estéril y no estéril y se describen a continuación:

**Tratamiento control:** Las plántulas de *P. devoniana* y *P. greggii* permanecieron en tubetes con sustrato (estéril y no estéril) por un periodo de 8 meses.

**Tratamiento 1:** Las plántulas (1 mes de edad) de *P. devoniana* y *P. greggii* se colocaron en tubetes con sustrato (estéril y no estéril) que periódicamente se inoculaban cada 8 días con la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 hasta el final del experimento.

**Tratamiento 2:** Las plántulas (1 mes de edad) de *P. devoniana* y *P. greggii* se colocaron en tubetes con sustrato (estéril y no estéril). Estas plántulas fueron inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y 24 horas después se inoculó con *T. harzianum*. Cada 8 días se re-inoculaba el sustrato con una solución que contenía *A. agilis* UMCV2 ( $9 \times 10^{-6}$  ufc/ml) hasta el final del experimento.

**Tratamiento 3:** Las plántulas (1 mes de edad) de *P. devoniana* y *P. greggii* se colocaron en tubetes con sustrato (estéril y no estéril), los cuales se adicionó DMHD a una concentración final de 10  $\mu$ M. Se realizaron aplicaciones periódicas del compuesto cada 8 días hasta el final del experimento.

Para el Tratamiento 3, el compuesto DMHD se suspendió previamente en 5 ml de etanol 96° y se diluyó en 550 ml de agua (el volumen usado en la capacidad de campo del suelo).

El tratamiento 1 se preparó de la siguiente manera:

La rizobacteria *A. agilis* UMCV2 se creció previamente en cajas de Petri con aproximadamente 30 ml de agar nutritivo (AN), por un periodo de 5 días en la oscuridad a 27 °C ±1. Posteriormente recuperar las células en 10 ml de agua desionizada estéril por caja de Petri hasta conseguir un volumen final de 250 ml ( $9 \times 10^{-6}$  ufc/ml). Este último volumen obtenido se re-suspendió en un volumen de agua corriente estéril de acuerdo a la capacidad de campo del suelo usado para cada planta.

El tratamiento 2 se preparó de la siguiente manera:

Se realizó el procedimiento descrito en el tratamiento 1, 24 horas después se inoculó la raíz de las plántulas con la micorriza *T. harzianum* en una suspensión de esporas con  $1 \times 10^9$  esporas/ml aplicadas en agua de riego/planta.

La esterilización de los sustratos se realizó de la siguiente manera: se colocó en tubetes con capacidad de 375 gramos de sustrato, se esterilizó usando una autoclave a 15 lbs de presión/120 °C durante 30 minutos/3 días consecutivos.

Los parámetros evaluados para las plantas en cada tratamiento se evaluaron a los 60, 120, 180 y 240 días y fueron:

**Altura de la parte aérea (cm).**

**El diámetro a la altura de la base (mm):** Se calculó mediante la herramienta "Vernier AutoTEC Digital". Se evaluaron a los 60, 120, 180 y 240 días de edad de la plántula.

**Cobertura vegetal (cm):** Con una regla de 30 cm se midieron los diámetros del follaje, para determinar la cobertura mediante la fórmula de la elipse. En la que a y b son los dos semiejes de la elipse ( $\pi r_1 r_2$ ).

Después de los 240 días del experimento, se utilizaron estas plántulas para evaluar otras variables mediante métodos destructivos:

**Biomasa del tejido fresco de la parte aérea y del sistema radical (g):** Cuidadosamente se separaron ambas partes y determinó su peso por separado, mediante el uso de una balanza analítica digital (OHAUS Adventurer™ Pro).

**Biomasa del tejido seco de la parte aérea y del sistema radical (g):** Una vez determinado el peso fresco, las partes de la planta se cubrieron en papel y colocaron durante 72 horas a 70 °C en una estufa, después se obtuvo el peso seco de cada parte de la planta mediante el uso de una balanza analítica digital (OHAUS Adventurer™ Pro).

**Densidad de raíces laterales:** Una vez colectada las plántulas se procedió a limpiar la raíz y posteriormente de la raíz principal se contó  $1\text{cm}^3$ .

**Porcentaje de supervivencia:** La supervivencia se determinó mediante la relación del número de plantas vivas entre el número de plantas totales encontradas (vivas/muertas).

**Determinación del contenido de clorofila:** La cuantificación de la clorofila se llevó a cabo de acuerdo con el método de Jeffrey and Humphrey (1975). El tejido de la plántula se trituró en un mortero con una solución de etanol al 96%. Las muestras fueron aforadas a 4 ml con etanol y mediante el uso de un espectrofotómetro se cuantificaron las muestras para un posterior cálculo de la concentración (664 y 647 nm de absorbancia). La concentración de clorofila se calculó utilizando las siguientes fórmulas: Clorofila-A (mg/L) =  $(11.93) \cdot (E_{664}) - (1.93) \cdot (E_{647})$ , Clorofila-B (mg/L) =  $(20.36) \cdot (E_{647}) - (5.50) \cdot (E_{664})$ , clorofila total 0 ([mL etanol] · [Contenido de pigmento]) / peso de la muestra.

Los datos obtenidos bimestralmente y final del experimento, fueron analizados con el paquete estadístico “Statistica 7.0 de Statsoft”, aplicando un análisis de varianza (ANOVA) completamente al azar y prueba de Duncan a una significancia de 0.05.

## VIII. RESULTADOS

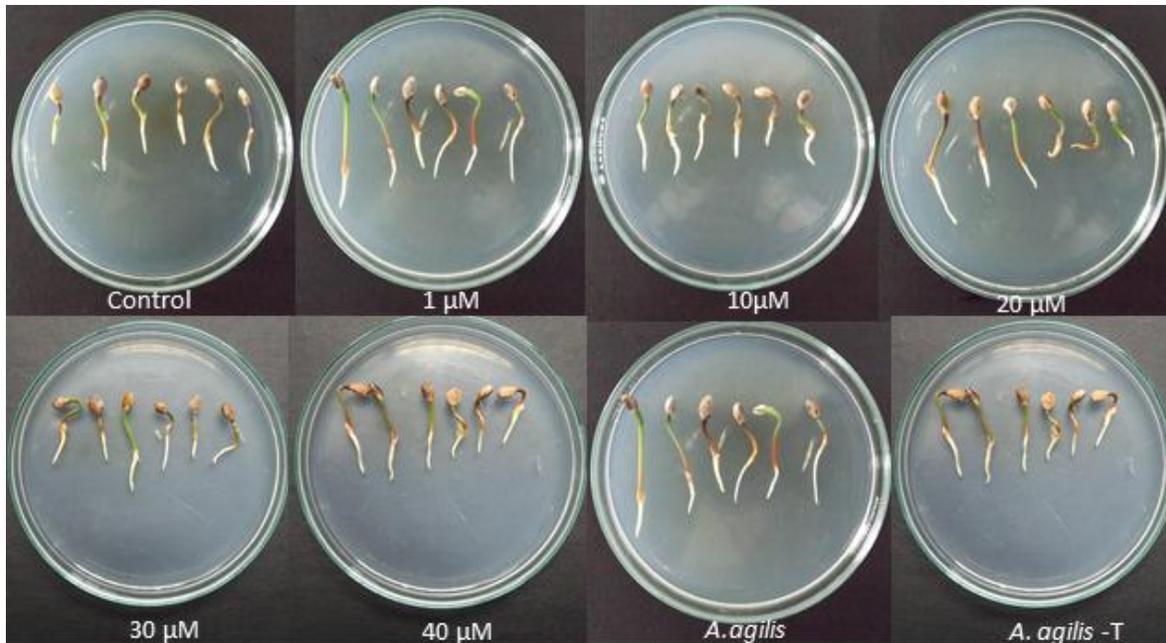
### 8.1. Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y dimetilhexadecilamina en la germinación de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii*.

El compuesto dimetilhexadecilamina (DMHD) en una concentración 10  $\mu$ M al estar expuesto con las semillas de *P. devoniana* durante 9 días fue capaz de promover la germinación, obteniendo valores de hasta 72 % en comparación con el resto de los tratamientos en los que se obtuvieron valores menores (Cuadro 1). La bacteria al exponerla frente a semillas de *P. devoniana* se observó una promoción evidente en la longitud de radículas (Figura 1) presentando diferencias estadísticamente significativas con valores promedio de 2.9 cm, seguida del tratamiento bacteria en co-acción con el hongo mostrando radículas de hasta 2.4 cm de longitud. Las diferentes concentraciones de DMHD 1, 10, 20 y 30  $\mu$ M no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. En cuanto al peso de las radículas no presentaron diferencias significativas en los tratamientos con microorganismos y el compuesto DMHD, los valores oscilaron entre 0.06 y 0.15 g (Cuadro 1).

**Cuadro 1** Porcentaje de germinación, longitud y peso fresco de las radículas de *Pinus devoniana*.

Tratamientos	Germinación (%)	Longitud (cm)			Peso (g)		
		Media	Error estándar	p< 0.05	Media	Error estándar	p< 0.05
Control	57	1.9 ± 0.15		b	0.10 ± 0.02		a
1 $\mu$ M	45	1.7 ± 0.20		b	0.15 ± 0.05		a
10 $\mu$ M	72	1.8 ± 0.18		b	0.09 ± 0.03		a
20 $\mu$ M	57	1.4 ± 0.24		b	0.14 ± 0.08		a
30 $\mu$ M	45	1.4 ± 0.19		b	0.06 ± 0.00		a
Bacteria	65	2.9 ± 0.21		a	0.08 ± 0.00		a
Bacteria-hongo	55	2.4 ± 0.11		b	0.08 ± 0.00		a

Tratamientos con la misma letra muestran que no se tiene diferencia significativa, Duncan (P<0.05). Las diferentes concentraciones de DMHD 1, 10, 20,30  $\mu$ M, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*.



**Figura 1** Semillas de *Pinus devoniana* expuestas a *Arthobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y el compuesto dimetilhexadecilamina durante 9 días.

En *P. greggii* el compuesto DMHD a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  promovió la germinación en semilla, con un 65 % en comparación con los restantes tratamientos que presentaron valores menores. En cuanto a la longitud de las radículas se obtuvo un promedio de 7.95 cm en el tratamiento inoculado tanto con la bacteria y el hongo (Cuadro 2) pero sin encontrar una diferencia significativa. El tratamiento inoculado con la bacteria la longitud de radículas fue de 7.45 cm en promedio y el compuesto DMHD de 1  $\mu\text{M}$  con un promedio de la longitud de radículas de 7.63 cm, y tampoco encontramos diferencia estadística entre ellas. La concentración 20 y 30  $\mu\text{M}$  de DMHD presentaron valores promedio por debajo del resto de los tratamientos.

Finalmente las diferencias en el peso fresco de las radículas en *P. greggii* presentaron valores estadísticamente significativos, observándose que los tratamientos 20 y 30  $\mu\text{M}$  fueron menores comparados con el resto.

**Cuadro 2** Porcentaje de germinación, longitud y peso fresco de las radículas de *Pinus greggii*.

Tratamientos	Germinación (%)	Longitud (cm)			Peso (g)		
		Media	Error estándar	p< 0.05	Media	Error estándar	p< 0.05
Control	45	7.33 ± 0.22		a	0.11 ± 0.00		a
1µM	65	7.63 ± 0.30		a	0.10 ± 0.00		a
10µM	47	7.16 ± 0.32		a	0.09 ± 0.00		a
20µM	22	3.13 ± 0.50		b	0.05 ± 0.00		b
30µM	22	1.52 ± 0.19		c	0.04 ± 0.00		b
Bacteria	32	7.45 ± 0.36		a	0.10 ± 0.00		a
Bacteria-hongo	35	7.95 ± 0.54		a	0.11 ± 0.00		a

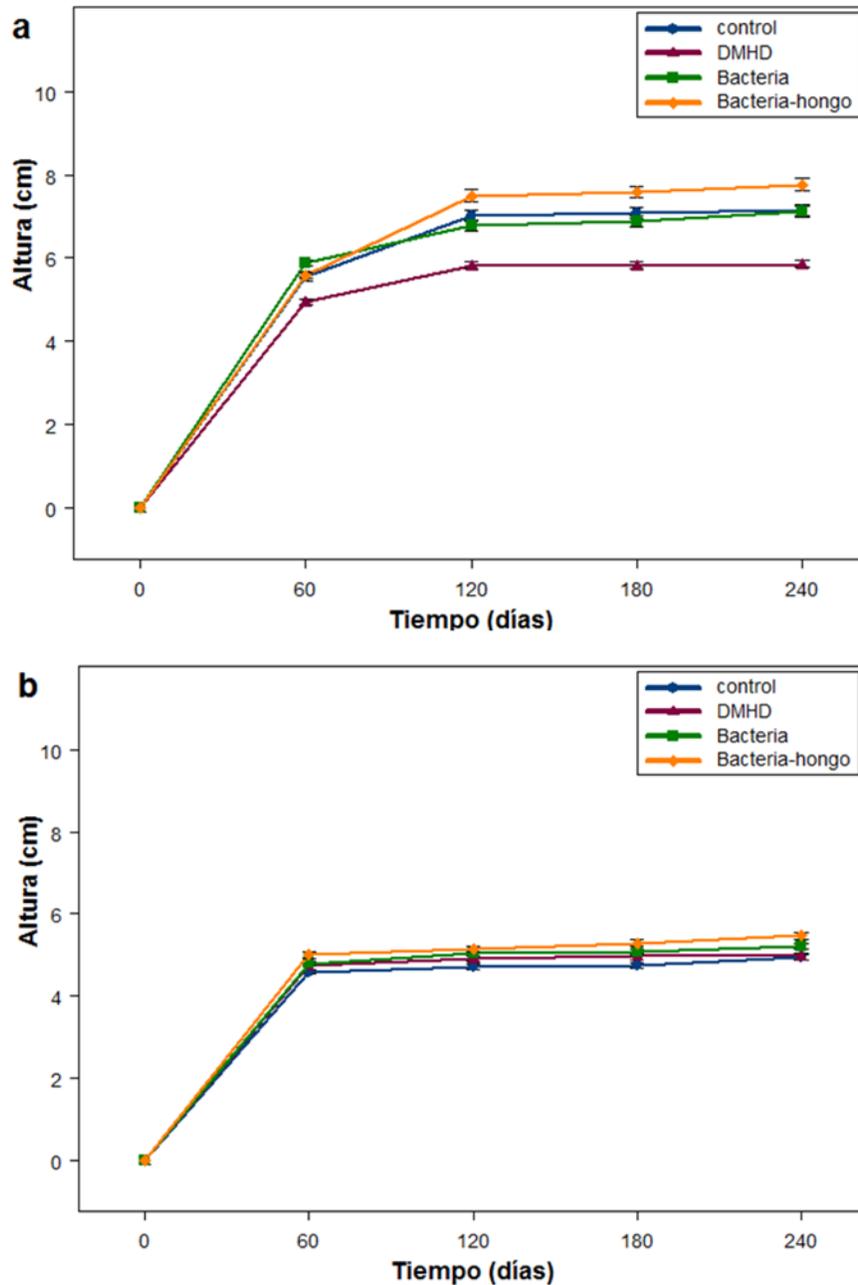
Tratamientos con la misma letra muestran que no se tiene diferencia significativa, Duncan (P<0.05). Las diferentes concentraciones de DMHD 1, 10, 20,30 µM, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*.

## 8.2. Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Trichoderma harzianum* y dimetilhexadecilamina en el crecimiento de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii*.

### -*Pinus devoniana*

Las plantas de *P. devoniana* crecidas en sustrato estéril presentaron diferencias significativas (Figura 2a). El tratamiento adicionado al compuesto DMHD alcanzó alturas menores durante el transcurso de la evaluación, esto comparando con los microorganismos y el control.

En cuanto a la altura de las plantas de *P. devoniana* en sustrato no estéril no se presentaron diferencias significativas durante el transcurso del experimento. También se observa que el tratamiento inoculado con la bacteria y la micorriza crecidas en sustrato estéril mostró un aumento superior comparando con los tratamientos restantes. En el sustrato no estéril las plántulas inoculadas con la bacteria en coacción con el hongo también presenta altura promedio superior en comparación a los tratamientos restantes (Figura 2b), de la misma forma que se mostró en el tratamiento crecido en sustrato estéril.



**Figura 2** Altura de *Pinus devoniana* en sustrato estéril(a) y no estéril (b) a través del tiempo. Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

Además de la altura de las plántulas, también valoramos el diámetro a la altura de la base de las mismas. En plántulas crecidas en sustrato estéril si se observaron diferencias significativas, los tratamientos con *A. agilis* UMCV2 en co-acción con *T. harzianum* y el control, fueron significativamente mayores a DMHD (Cuadro 3). En

el sustrato no estéril el tratamiento control mostró plántulas con un diámetro de 2 mm, por encima de los tratamientos inoculados con los microorganismos y el compuesto DMHD (Cuadro 3).

Para la cobertura de las plántulas de *P. devoniana* en sustrato estéril se muestran diferencias significativas (Cuadro 3). Las plántulas cuando son inoculados con *A. agilis* UMCV2 en conjunto con *T. harzianum* presentan un diámetro promedio de 75.6 cm seguida del control con 73 cm. Por su parte, los tratamientos restantes mostraron una menor cobertura estadísticamente. En sustrato no estéril el tratamiento control presentó una cobertura promedio por encima del resto de nuestros tratamientos, siendo estadísticamente significativa la diferencia.

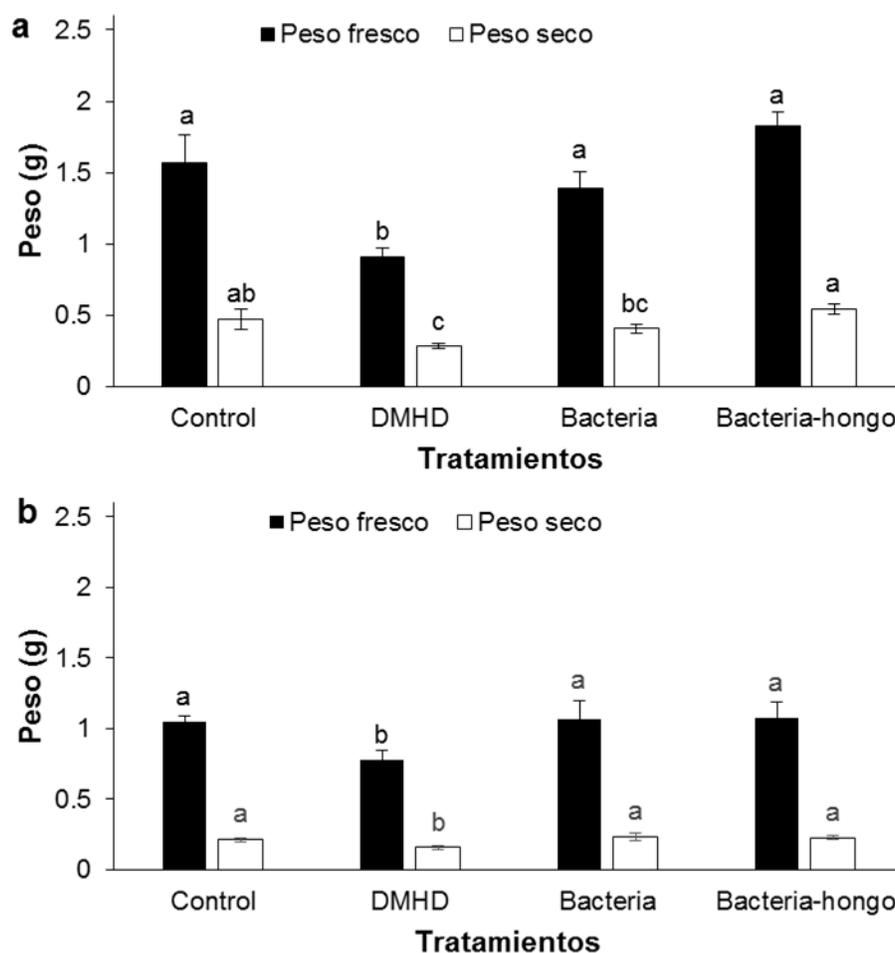
**Cuadro 3** Diámetro y cobertura de *Pinus devoniana* crecidas en sustrato estéril y no estéril.

Sustrato estéril						
Tratamientos	Diámetro a la altura de la base (mm)			Cobertura (cm)		
	Media	Error estándar	P≤0.05	Media	Error estándar	P≤0.05
Control	2.3 ± 0.14		a	73.8 ± 8.25		a
DMHD	1.6 ± 0.05		b	35 ± 4.64		c
Bacteria	2.2 ± 0.09		a	57.3 ± 4.76		b
Bacteria-hongo	2.3 ± 0.10		a	75.6 ± 6.26		a
Sustrato no estéril						
Control	2.0 ± 0.05		a	36.0 ± 5.80		a
DMHD	1.6 ± 0.05		b	22.2 ± 2.59		b
Bacteria	1.7 ± 0.06		b	30.4 ± 3.34		b
Bacteria-hongo	1.7 ± 0.08		b	28.7 ± 2.79		b

Tratamientos con la misma letra muestran que no se tiene diferencia significativa, Duncan (P<0.05). Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*.

El peso fresco de la parte aérea de las plántulas crecidas en sustrato estéril (Figura 3a) presenta un mayor valor en el tratamiento inoculado con ambos

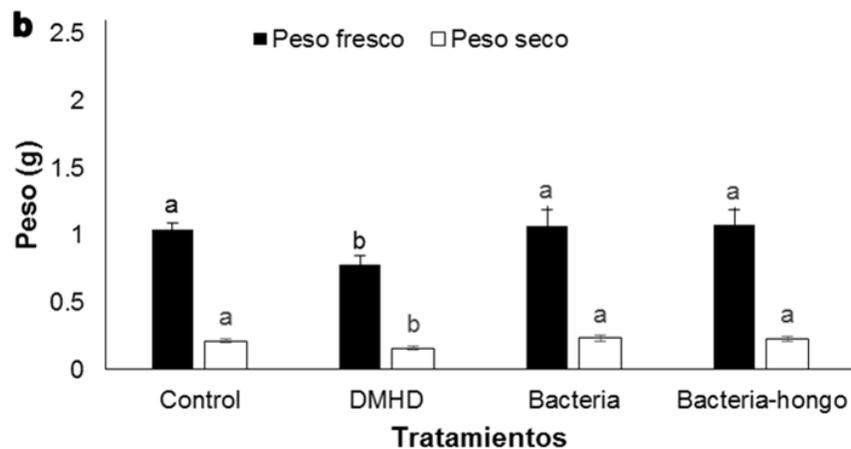
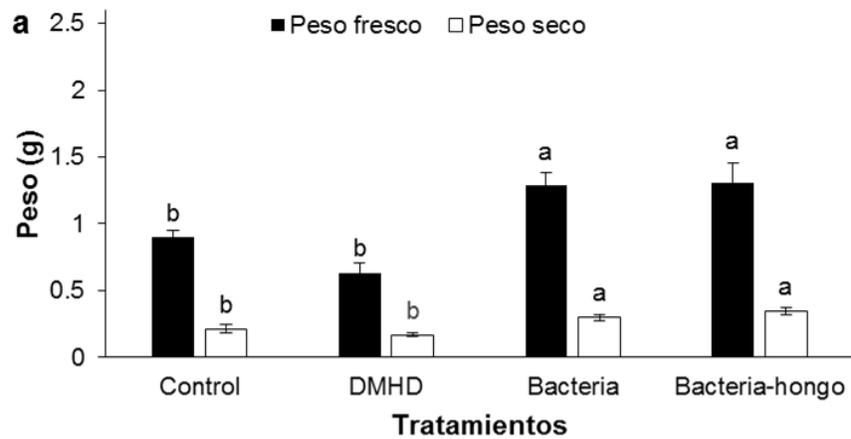
microorganismos, pero sin que existan diferencias significativas entre tratamientos control. Por su lado el tratamiento adicionado con DMHD estuvo por debajo del resto, con tan solo 0.9 g de peso fresco. Para el peso seco de la parte aérea el tratamiento control y los inoculados con los microorganismos se obtienen promedios mayores, esto comparando al tratamiento que contenía DMHD (Figura 3a). Por otra parte, el peso fresco y seco de las plántulas crecidas en sustrato no estéril (3b) mostró que los tratamientos inoculados con microorganismos no presento diferencias significativas con el control. Por su lado el tratamiento adicionado con DMHD estuvo por debajo del resto, con tan solo 0.77 g de peso fresco.



**Figura 3** Peso fresco y seco de la parte aérea en *Pinus devoniana* crecido en sustrato estéril (a) y no estéril (b). Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las letras iguales sobre las columnas muestran no tener diferencia significativa, las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

El peso fresco y seco de la raíz en plántulas crecidas en sustrato estéril presenta diferencias estadísticamente significativas (Figura 4a). Las plántulas cuando son inoculados con la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 y la micorriza *T. harzianum* presentan un mayor peso fresco en la raíz, superior al tratamiento control y DMHD donde mostró una disminución. Por su lado, el peso seco de las plántulas cuando son inoculados con la bacteria y el hongo presentan un mayor peso seco en la raíz, superior al tratamiento control y el compuesto DMHD donde mostró una disminución.

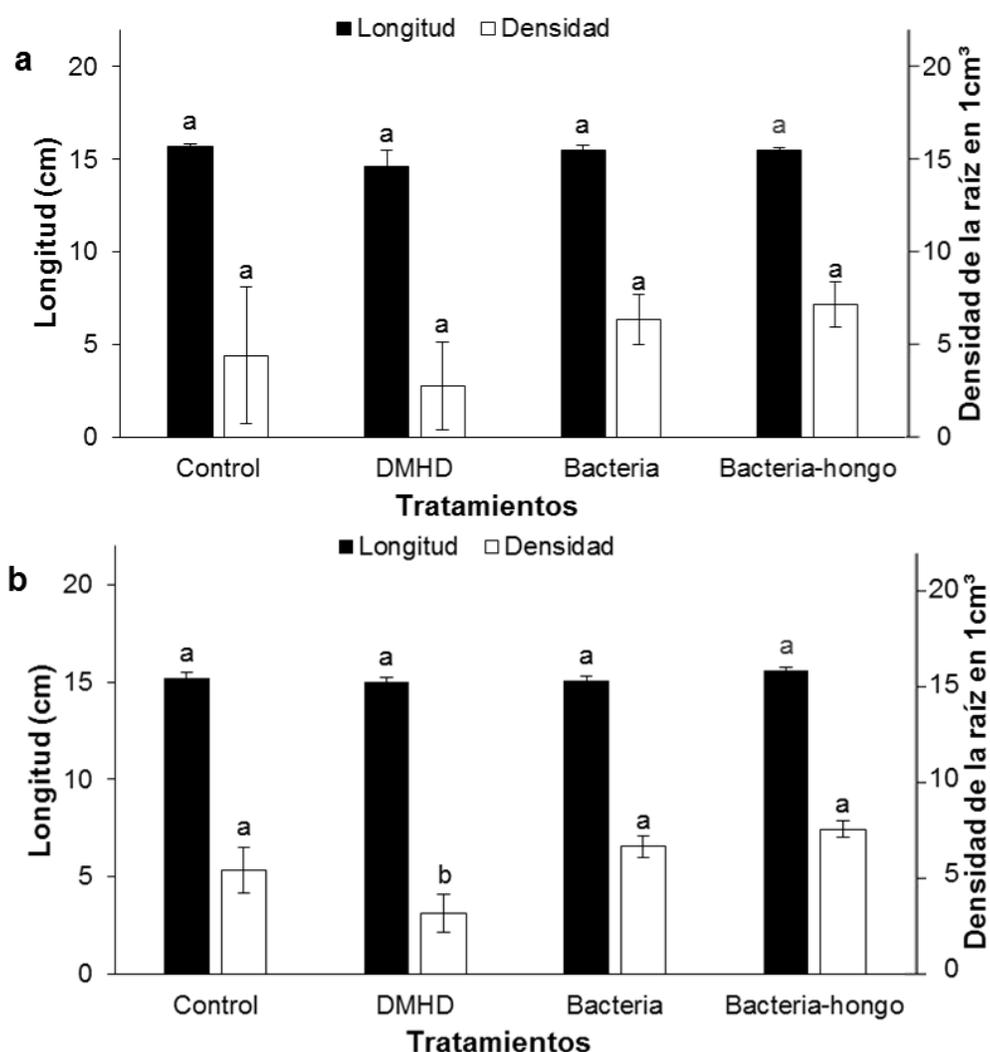
En sustrato no estéril, el peso fresco y seco de la raíz de plántulas de *P. devoniana* se presentan diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 4b). Las plántulas inoculadas con microorganismos y el control muestran valores superiores al compuesto DMHD donde claramente observamos una pérdida de peso fresco y seco en las plántulas.



**Figura 4** Peso fresco y seco de raíz en *Pinus devoniana* crecido en sustrato estéril (a) y no estéril (b). Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las letras iguales sobre las columnas muestran no tener diferencia significativa, las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

En la longitud de la raíz en sustrato estéril no se presentó diferencias estadísticamente significativas. En todos los tratamientos alcanzan una longitud promedio de 15 cm sin importar el tipo de sustrato (Gráfica 5). En cuanto a la densidad de raíces laterales, en sustrato estéril (Gráfica 5a) no hay diferencias significativas entre los tratamientos, pero nos muestra un ligero aumento en el número de raíces cuando es inoculado con la bacteria y la micorriza. En el sustrato no estéril, hay diferencias estadísticamente significativas en la densidad de raíces laterales (Gráfica 5b). Las plántulas inoculadas con los microorganismos y el

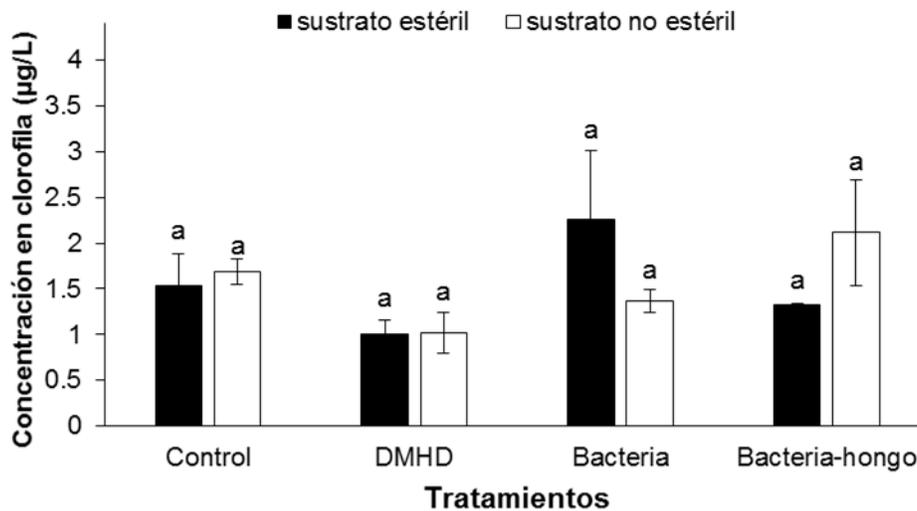
control presentan mayor densidad de raíces laterales comparando con nuestro tratamiento DMHD.



**Figura 5** Longitud y densidad de la raíz en *P. devoniana* crecido en sustrato estéril (a) y no estéril (b). Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las letras iguales sobre las columnas muestran no tener diferencia significativa, las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

Los resultados para las plántulas de *P. devoniana* nos muestran que en sustrato estéril presenta mayor concentración de clorofila cuando las plántulas son inoculadas con la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 comparando con el control. En sustrato no estéril presenta mayor concentración de clorofila las plántulas inoculadas con *A. agilis* UMCV2 en conjunto con *T. harzianum* comparando con el control. En cuanto al tratamiento con el compuesto DMHD hubo una disminución de

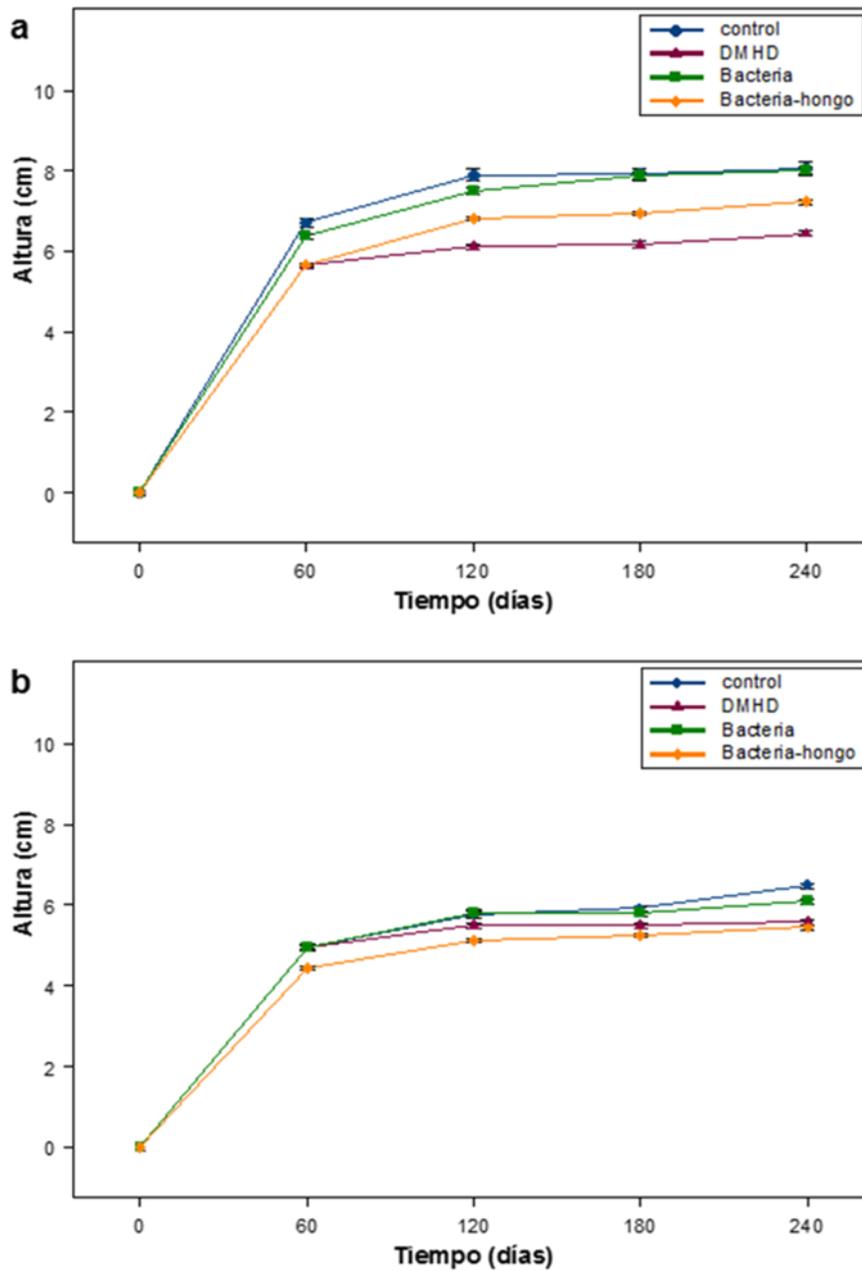
concentración de clorofila para ambos sustratos, sin embargo no se vio una diferencia significativa (Figura 6).



**Figura 6** Concentración de clorofila en *Pinus devoniana* crecido en sustrato estéril no estéril. Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las letras iguales sobre las columnas muestran no tener diferencia significativa, las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

### **-*Pinus greggii***

En nuestros resultados encontramos que la altura de plántulas de *P. greggii* (Figura 7a) en sustrato estéril, favorece su desarrollo, obteniendo promedio de 7.8 cm si comparamos este valor con los tratamientos con sustrato no estéril (Figura 7b) donde el valor promedio fue de 5.8 cm. En plántulas crecidas con sustrato estéril se observó que desde el inicio del experimento (60 días) en el tratamiento Control el valor promedio siempre estuvo por encima del compuesto DMHD y los microorganismos.



**Figura 7** Altura de *Pinus greggii* en sustrato estéril(a) y no estéril (b) a través del tiempo. Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

El resultado del diámetro a la altura de la base, las plántulas de *P. greggii* mostraron que el tratamiento control está por encima de los valores promedios del resto de los tratamientos adicionados con el compuesto DMHD y los microorganismos. Esta diferencia es significativa tanto en sustrato estéril y no estéril.

En la cobertura de *P. greggii*, los datos obtenidos nos indican que el control presenta una mayor cobertura que los tratamientos inoculados con la bacteria y micorriza, esto se presenta en sustrato estéril y no estéril (Cuadro 5), aunque si se puede observar mayor cobertura en las plantas crecidas en sustrato estéril.

**Cuadro 4** Diámetro y cobertura de *Pinus greggii* crecida en sustrato estéril y no estéril.

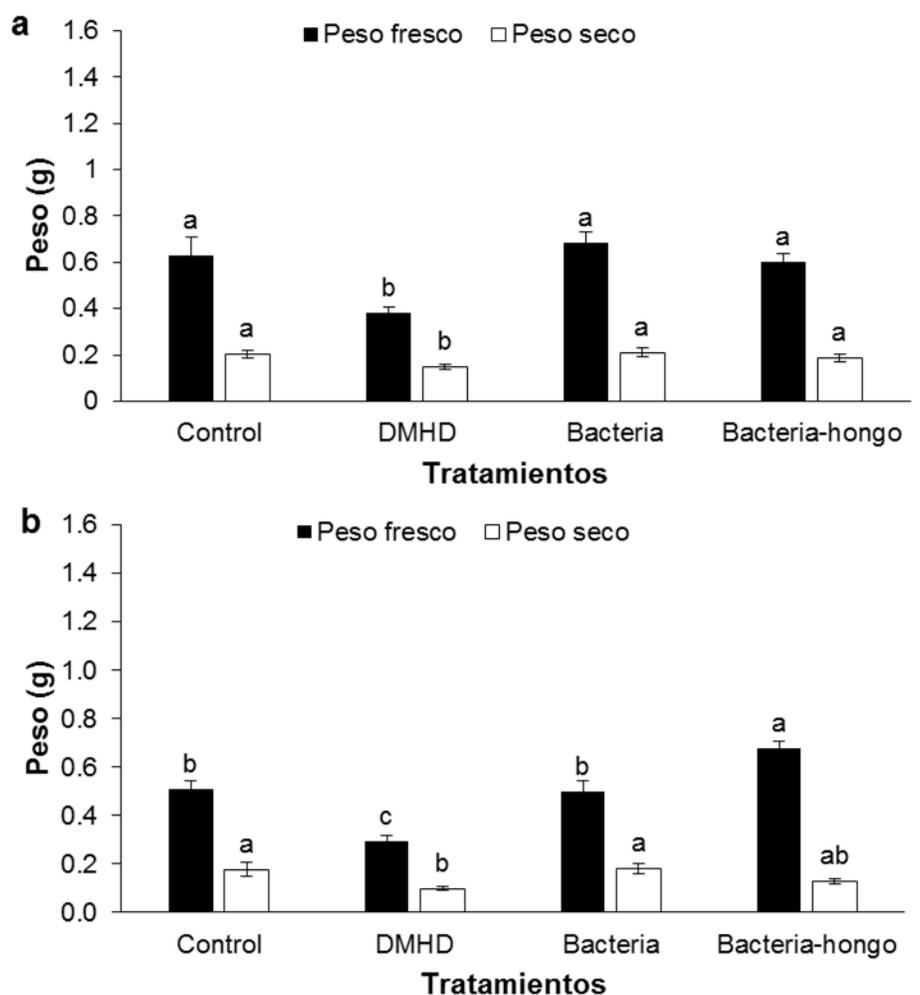
sustrato estéril						
Tratamientos	Diámetro a la altura de la base (mm)			Cobertura (cm)		
	Media	Error estándar	P<0.05	Media	Error estándar	P<0.05
Control	1.5 ± 0.07		a	30.9 ± 3.86		a
DMHD	1.3 ± 0.06		b	19.6 ± 1.28		c
Bacteria	1.3 ± 0.04		b	26.1 ± 1.39		ab
Bacteria-hongo	1.2 ± 0.02		b	24.2 ± 1.72		ab
sustrato no estéril						
Control	1.3 ± 0.04		a	21.6 ± 2.17		a
DMHD	1.2 ± 0.05		b	11.7 ± 1.33		c
Bacteria	1.2 ± 0.04		b	18.9 ± 1.67		ab
Bacteria-hongo	1.2 ± 0.04		b	14.9 ± 1.24		cb

Tratamientos con la misma letra muestran que no se tiene diferencia significativa, Duncan (P<0.05). Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*.

El peso fresco y seco de la parte aérea en plántulas de *P. greggii* crecidos en sustrato estéril presentan diferencias estadísticamente significativas, se obtuvo un mayor peso cuando las plántulas fueron inoculadas con los microorganismos en contraste con el control y el resto de los tratamientos (Figura 8a).

Las plántulas crecidas en sustrato no estéril, encontramos diferencias significativas (Figura 8b). Las plántulas inoculadas con bacteria-hongo muestran un efecto positivo, obteniendo mayor peso fresco, siendo significativa la diferencia respecto a la bacteria y el control. Al igual que las variables anteriores, el compuesto DMHD es perjudicial para las plántulas. El peso seco se presenta con diferencias en los

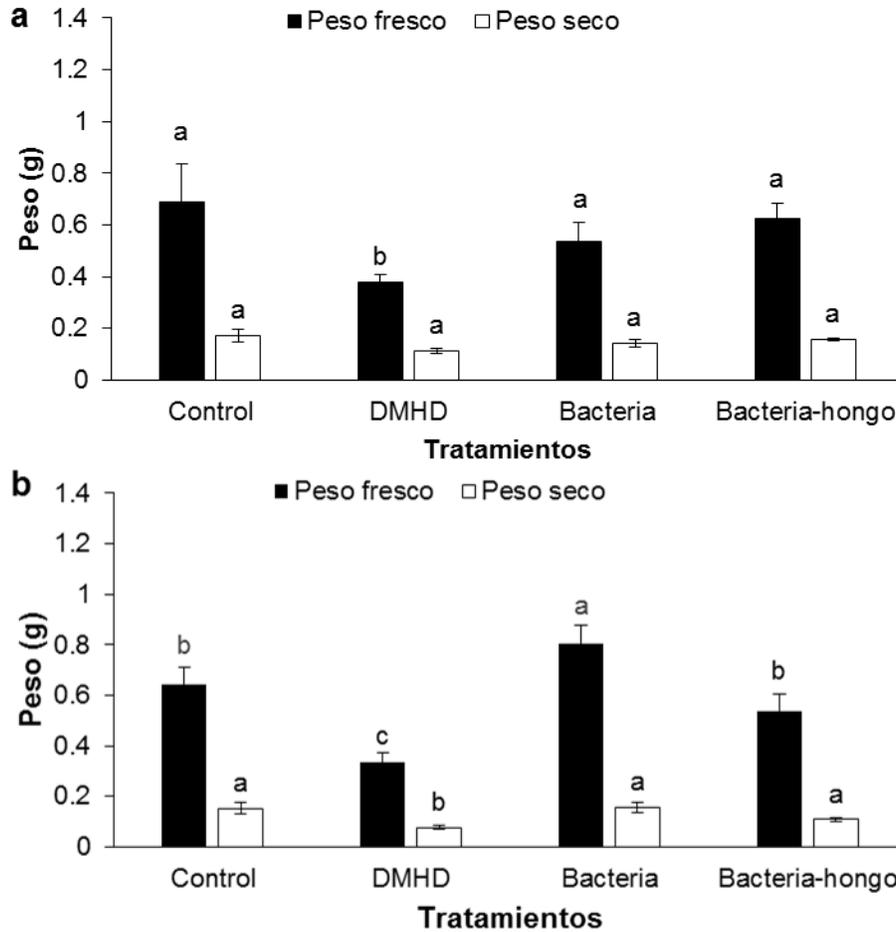
tratamientos, debido a que tratamientos adicionados con compuesto DMHD se obtienen plántulas con valores por debajo del control y el resto de los tratamientos.



**Figura 8** Peso fresco y seco de la parte aérea en *Pinus greggii* crecido en sustrato estéril (a) y no estéril (b). Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las letras iguales sobre las columnas muestran no tener diferencia significativa, las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

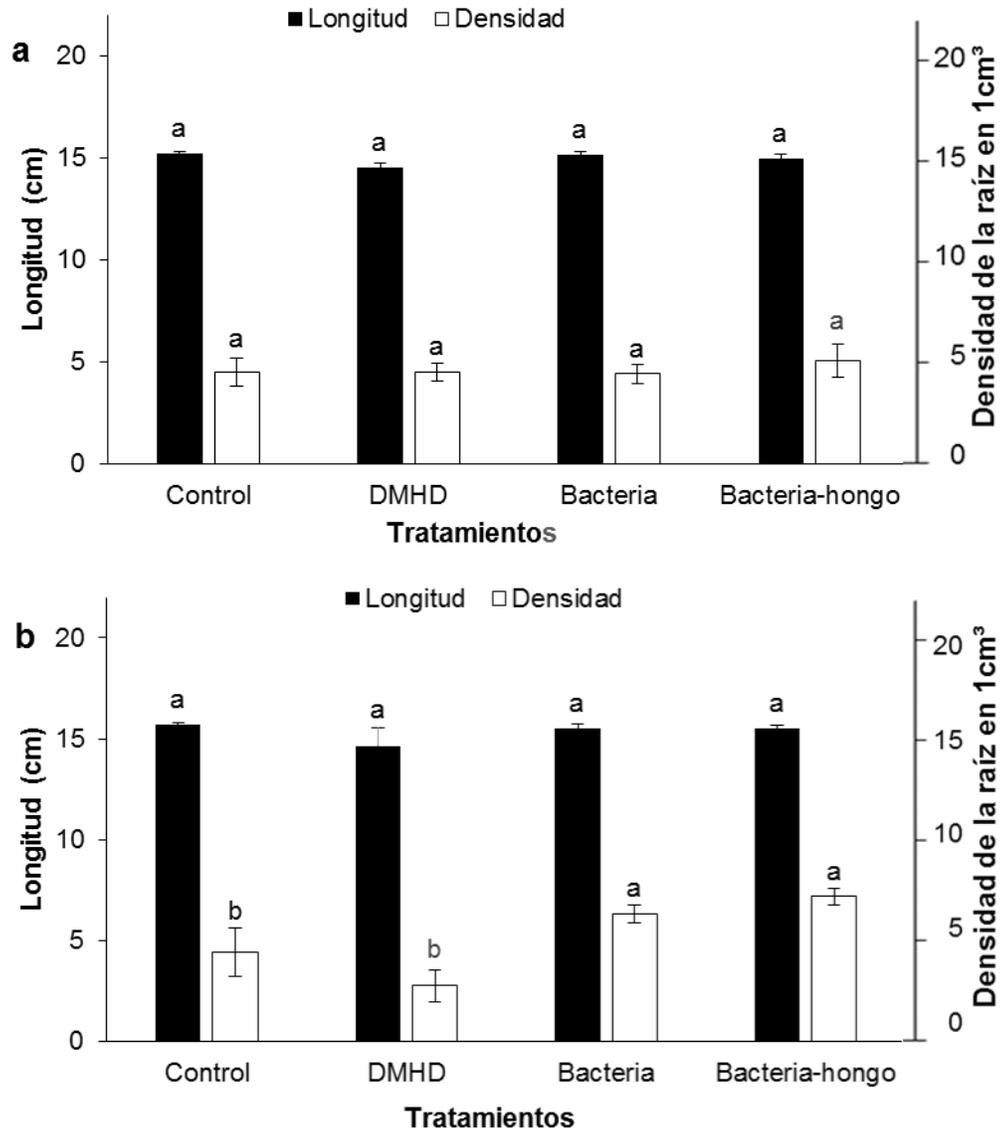
El peso fresco de la raíz en plántulas de *P. greggii* crecidas en sustrato estéril, no mostraron diferencias significativas. Se observa que el control está por encima de los tratamientos que fueron inoculados con microorganismos (Figura 9a). En cuanto al peso seco de las plántulas no se presentaron diferencias en los tratamientos. En cuanto al peso fresco de la raíz en plántulas de *P. greggii* crecidas en sustrato no

estéril mostraron diferencias significativas (Figura 9b). El tratamiento *A. agilis* UMCV2 presentó mayor peso fresco de la raíz, seguida de la bacteria-hongo y el control.



**Figura 9** Peso fresco y seco de raíz en *Pinus greggii* crecido en sustrato estéril (a) y no estéril (b). Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las letras iguales sobre las columnas muestran no tener diferencia significativa, las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

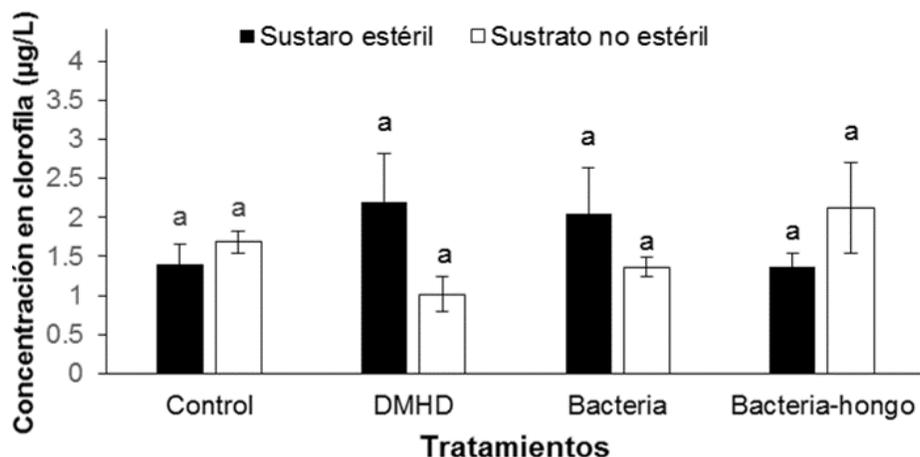
La longitud y densidad de la raíz de *P. greggii* en sustrato estéril y no estéril (Figura 10a) no muestra diferencias significativas en los tratamientos. En cuanto a la densidad de la raíz observamos promedios mayores cuando son inoculados con la rizobacteria y la micorriza en sustrato no estéril (Figura 10b).



**Figura 10** Longitud y densidad de la raíz en *P. greggii* crecido en sustrato estéril (a) y no estéril (b). Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las letras iguales sobre las columnas muestran no tener diferencia significativa, las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

Por su parte, el análisis de contenido de clorofila para plántulas de *P. greggii* mostraron que cuando crecen en sustrato estéril existe una mayor concentración en el tratamiento DMHD (2.19  $\mu\text{g/L}$ ) y plántulas inoculadas con la bacteria (2.04  $\mu\text{g/L}$ ). Ahora bien, lo visto en sustrato no estéril muestra una mayor concentración (2.11  $\mu\text{g/L}$ ) de clorofila cuando son inoculadas con la bacteria y la micorriza, al igual que

el tratamiento Control (1.68 µg/L) mostró valores elevados de concentración de clorofila. Los tratamientos adicionados con DMHD se observó un aumento positivo solamente cuando la plántula crece en sustrato estéril (Figura 11).



**Figura 11** Concentración de clorofila en *Pinus greggii* crecido en sustrato estéril y no estéril. Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*. Las letras iguales sobre las columnas muestran no tener diferencia significativa, las barras indican el error estándar, Duncan ( $P < 0.05$ ).

Las plántulas de *P. devoniana* y *P. greggii* inoculadas con los microorganismos y el compuesto DMHD presentaron un alto porcentaje de supervivencia sin importar las condiciones del sustrato donde fueron crecidas (Cuadro 6).

**Cuadro 5** Porcentaje de supervivencia de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii* a los 240 días.

Tratamientos	<i>Pinus devoniana</i>		<i>Pinus greggii</i>		
	suelo estéril	suelo no estéril	suelo estéril	suelo no estéril	no estéril

control	89	100	100	89
DMHD	100	94	100	100
Bacteria	100	100	94	100
Bacteria-hongo	100	100	94	100

Los tratamientos son: DMHD: dimetilhexadecilamina, Bacteria: *A. agilis* UMCV2, Bacteria-hongo: *A. agilis* UMCV2-*T. harzianum*

## IX. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos vimos que el compuesto DMHD a una concentración 10  $\mu\text{M}$  fue capaz de promover la germinación de las semillas de *P. devoniana* en un 72 %. Por su lado, las semillas de *P. greggii* a una concentración 1  $\mu\text{M}$  se observó una germinación en un 65 %. La germinación es un proceso que consiste en la absorción de agua, la reactivación del metabolismo y la iniciación del crecimiento del embrión de una semilla (Bidwell, 1990). Cabe mencionar que es la primera vez que se utiliza el compuesto DMHD como promotor de germinación de semillas de especies forestales. Estudios anteriores con compuestos orgánicos volátiles en particular el monoterpeno Camfeno, en una concentración 10  $\mu\text{g}$  promueve la germinación *Amaranthus retroflexus* en un 80 % (Saban Kordali *et al.*, 2007).

Con respecto a la evaluación de la longitud radicular de las plántulas de *P. devoniana*, la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 mostró un incremento en relación a los otros tratamientos. En *P. greggii* los tratamientos con la rizobacteria en co-acción con la micorriza alcanzaron un promedio de 7.95 cm de longitud seguida del tratamiento con la rizobacteria. Después de haberse humedecido las semillas, se observó el crecimiento del microorganismo *A. agilis* UMCV2 en las cajas de Petri, esto pudiera haber influido en el rápido desarrollo radicular. Este tipo de microorganismos son capaces de sobrevivir a la inoculación sobre semillas y al suelo, multiplicándose en la esfermosfera como respuesta a los exudados de la raíz (Kloepper, 1993). Por otro lado la inoculación de semillas del abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)) con *Bacillus polymyxa* aumentó significativamente el peso seco de raíces y brotes en plántulas de esta conífera (Bashan *et al.*, 1996), aunque en este experimento no hubo diferencia en el peso seco.

La presencia de la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 solamente presentó un efecto promotor de crecimiento en plántulas *P. devoniana* cuando se encuentra en co-acción con *T. harzianum* en sustrato estéril. No sabemos con exactitud cómo es que interactúan estos dos microorganismos, pero algunos estudios han demostrado que las PGPRs tienen un fuerte impacto estimulante sobre el crecimiento de hongos micorrízicos (Linderman, 1997). La interacción de bacterias de la rizósfera y los

hongos son altamente dependientes de las asociaciones con las plantas que están claramente reguladas por exudados de las raíces (Bonfante y Anca, 2009). Investigaciones recientes nos mencionan que *Rhizobium* y *Glomus* spp. promueven el crecimiento y productividad de plantas, pero ahora han demostrado jugar también un importante papel en la reducción de la enfermedad (Guo *et al.*, 2004; Alije *et al.*, 2008; Yasir *et al.*, 2009). También sabemos que la micorriza *Trichoderma* spp. y bacterias como *Pseudomonas* spp. pueden controlar enfermedades en plantas, recientemente se ha demostrado un efecto en la estimulación del crecimiento de la planta en la usencia de patógenos.

En nuestro trabajo, en plántulas de *P. devoniana* observamos el mayor valor del peso de la raíz en tratamientos con *A. agilis* UMCV2 y en co-acción con la micorriza *T. harzianum*. La inclusión de *A. agilis* UMCV2 y *T. harzianum* puede ser una de las mejores opciones para la inoculación de las plántulas de *P. devoniana*. La presencia de bacterias del genero *Arthrobacter* ya se ha reportado en la interacción con pinos (Pokosjska, 1982), el autor describe en su trabajo un incremento del 69 % en la longitud del tallo; *Arthrobacter oxydans* reporta un incremento de la altura y biomasa de un 68 % en arboles de *Pseudotsuga menziesii* (Chanway y Holl 1994); *Arthrobacter citreus* genera un aumento en la biomasa en arboles de *Picea mariana* (Beall y Tipping 1989).

Las plántulas de *P. greggii* inoculadas con *A. agilis* UMCV2 presentó un efecto significativo solamente en el peso fresco de la parte aérea crecida en sustrato no estéril. Con base al resultado obtenido, la inoculación de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*A. agilis* UMCV2) responden de manera distinta en cada planta y por supuesto a cada especie forestal. Nuestros datos coinciden con lo reportado con Bashan y Bashan (2005) y Saeed *et al.* (2007), en donde se muestra que una inoculación microbiológica con bacterias fijadoras no necesariamente significa una promoción de crecimiento. La respuesta de las plantas a la inoculación depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción, entre los componentes microbianos; así arroja diferentes respuestas, dependiendo de la combinación de los microorganismos (Vázquez *et al.*, 2000).

En cuanto al compuesto DMHD en *P. devoniana* y *P. greggii* presentaron un efecto deletéreo en todas las variables que fueron evaluadas sin importar el sustrato donde se desarrollen las plántulas. Hay antecedentes donde nos menciona que el compuesto DMHD es capaz de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* así como sobre el oomiceto fitopatógeno *Phytophthora cinnamoni* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013). En nuestro experimento creemos que pudo haber sucedido que el compuesto orgánico volátil DMHD esterilizó por completo el sustrato inhibiendo el crecimiento de los microorganismos y como resultado la disminución en el crecimiento de las plántulas de *P. devoniana* y *P. greggii*.

En cuanto al sustrato que utilizamos (peat moss-arena 1:1) se observó en las plántulas que al final de experimento presentaron una supervivencia alta, sin importar las condiciones del sustrato donde fueron crecidas. La supervivencia de las plántulas a nivel vivero es un aspecto de vital importancia para el mantenimiento de las poblaciones, ya que es uno de los factores que determina el reclutamiento de nuevos individuos y con ello la regeneración natural de los bosques (Harper, 1977).

La rizobacteria *A. agilis* UMCV2 y en co-acción con *T. harzianum* pueden tener efectos diferentes en el crecimiento de las plántulas, es importante más y mejores estudios para explorar esta herramienta biotecnológica para el mejoramiento y aprovechamiento de nuestros recursos forestales.

## X. CONCLUSIONES

El compuesto dimetilhexadecilamina a concentraciones bajas promueve la germinación de *Pinus devoniana* y *Pinus greggii*. Sin embargo en las plantas no presento la capacidad de promover el crecimiento.

En cuanto a la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 presento la capacidad de promover el crecimiento de las plantas reflejándose en: desarrollo radicular, peso fresco y seco de la raíz en *Pinus devoniana* en sustrato estéril. Finalmente la combinación de *A. agilis* UMCV2 y *T. harzianum* promovieron el desarrollo de las plantas reflejándose en: altura de la parte aérea, peso fresco y seco de la raíz de *Pinus devoniana* en sustrato estéril.

## **XI.-RECOMENDACIONES**

El presente trabajo sirvió para conocer el comportamiento de las plántulas de *P. devoniana* y *P. greggii* bajo inoculación con los microorganismos y el compuesto dimetilhexadecilamina, por lo tanto las recomendaciones pertinentes son:

- ✓ Que el experimento se monte en el lugar de origen de las especies.
- ✓ Que se aumente el número de réplicas de los tratamientos.
- ✓ Que sean llevados a campo las plántulas.

## **XII. BIBLIOGRAFIA**

Alije, N., Finanza, C.; Hispías, Y. 2008. Evaluación of rhizosphere bacteria antagonistas foro teñir potencial to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacteria wilt (*Ralstonia solanacearum*). Biol. Control. 47:282-288.

Alexopoulos, C.J. 1979. Introductory mycology. Third Edition. John Wiley and Sons, New York. E.U.A. 632pp

Anónimo. 1998. Ficha técnica N° 2 de especies forestales estratégicas. Gaceta de la Red mexicana de germoplasma forestal, 1: 58-62.

Anónimo .2000. Períodos de recolección, almacenamiento y tratamiento pregerminativo. Gaceta de la Red mexicana de germoplasma forestal, 4:40-48.

Arriaga, V., V. Cervantes y A. Vargas-Mena. 1994. Manual de Reforestación con Especies Nativas: Colecta y Preservación de Semillas, Propagación y Manejo de Plantas. SEDESOL / INE – Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

Bais Harsh P., Tiffany L. Weir, Laura G. Perry, Simon Gilroy, and Jorge M. Vivanco .2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233–66, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.

Barriuso, J., Pereyra, M., Lucas G. J., Megías, A., Mañero, M. y Ramos. B. 2005. Screening for Putative PGPR to improve Establishment of the Symbiosis *Lactarius deliciosus-Pinus* sp. *Microbial Ecology.* 50: 82-89.

Barriuso, J., Solano, R., Santamaría, C., Daza, A y Mañero, G. 2008. Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *Journal of Applied Microbiology*, 105:1298-1309.

Bashan Y, H Levanony, R Ferrera-Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: II bacterias asociativas de la rizósfera. *Terra* 14(1): 159-183

Bashan Y, LE de Bashan. 2005. Plant growth promoting. Consultado 20 ene. 2008. Disponible en <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/bacterias.pdf>

Beall F. and Tipping B.1989. Plant growth promoting rhizobacteria in forestry. (Forestry Res. Market. Proc., Omt. For. Res. Com., Toronto), (abstract 117).

Beker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. y Dinesh-Kumar, S. P .1997. Signaling in plant microbe interactions. *Science* 276,726-733

Bidwell, R.G. 1990. *Fisiología Vegetal*. AGT Editor, S.A. México, D.F. 784

Bjorkman, Th. 1999. Proceeding : New England vegetable and berry growers conference and trade show. Sturbridge, MA. P 310-312.

Bonfante P, Anca I. 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Rev. Microbiol.*, 63: 363–383

Brunner, K, et al. 2003. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviridae* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.* 43, 289-295

Cavaletti, L., Monciardini, P., Bamonte, P. & Schumann, P. 2006. New lineage of filamentous, spore-forming, gram-positive bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72:4360-4369.

Chanway, C.P., Holl, F.B. 1994. Ecological growth response specificity of two Douglas- fir ecotypes inoculated with coexistent beneficial bacteria. *Canadian Journal of Botany*. 72, 582-586.

Chávez, M. Y. M. 1990. Caracterización de Suelos e Índice de Sitio Edáfico para Especies de *Pinus* en Atenquique, Jalisco. Tesis de Maestría en Ciencias (Edafología). Facultad de Ciencias. UNAM.

Chávez D, Pereira G, Machuca A. 2014. Estimulación del crecimiento en plántulas de *Pinus radiata* utilizando hongos ectomicorrícicos y saprobios como biofertilizantes. *BOSQUE* 35(1): 57-63, 2014 DOI: 10.4067/S0717-92002014000100006.

Chelius, M. K. y Triplett, E. W. 2000. Diazotrophicus endophytes associated with maize. Páginas 779-791. En *Prokaryotic nitrogen fixation; A model system for analysis of biological process*. Horizon scientific press, Wymondham, UK.

Chet I. 1987. Trichoderma- application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soliborne plant pathogenic fungi. In *Innovative approaches to plant disease control* (I. Chet, Ed.), pp. 137-159. Wiley, New York.

COFOM (Comisión Forestal del Estado de Michoacán). 2000. Las coníferas de Michoacán. 67 pp.

Davison J. 1988. Plant beneficial bacteria. *Nature Biotech.* 6:282-286

De la Peña C., Lei Z., Watson B.S., Sumner L.W. & Vivanco J.M. 2008. Root-microbe communication through protein secretion. *Journal of Biological Chemistry* 283, 25247–25255.

Din U., A. 1958 . *Pinus* para las regiones tropicales. UNASYLVA. 12 (3) 12-13.

Domenech J., Ramo-Solano B., Probanza A., Lucas-Garcia J.A., Colón J.J., Gutierrez-Mañero F.J. 2004 . *Bacillus* spp. And *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* spp. Ballota: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management* 194: 293-303.

Donoso E, A Lobos G, Rojas N. 2008 . Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *BOSQUE* 29(1): 52-57.

Dubos. B. 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. In: Innovative approaches to plant disease control (I. Chet, Ed.), pp. 107-135. Wiley, New York.

Dvorak, W. S. y J. K. Donahue. 1993. Reseña de investigaciones de la cooperativa CAMCORE 1980-1992. Departamento Forestal, Colegio de Recursos Forestales. Universidad Estatal de Carolina del Norte. Raleigh, NC. USA. 94 pp.

Eguiluz P., T. 1978 . Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género *Pinus* en México. Tesis Profesional. Departamento de Bosques. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo. Chapingo. Edo de Méx., México. 64 pp.

Eguiluz, T. 1982. Clima y distribución del género *Pinus* en México. *Rev. Ciencia Forestal*. 38 (7): 31-44.

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Henis, Y. 1993. Parasitism of *Trichoderma* spp. On *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73:85-88

Founoune, H., Duponnois, R., Mayer, J.; Thioulouse, M., Masee J., Chotte, D. and Neyra, M. 2002. Interaction between ectomycorrhizal symbiosis and fluorescent pseudomonads on *Acacia holosericeae*: isolation of mycorrhiza helper bacteria (MHB) from a Soudano-Sahelian soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 1370:1-10.

Garbaye, J. 1994. Helper bacteria; a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197-210

Farjon A., J. A. Pérez de la Rosa and B. T. Styles. 1997. A field guide to the pines of México and Central America. The Royal Botanic Gardens. Kew, U.K. 151 pp.

Gómez, Á. 2000. Elaboración de abonos orgánicos con bajos insumos en las condiciones del productor rural. Memoria del primer seminario de investigación científica y tecnológica sobre el istmo de los Estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco y Oaxaca". ECOSUR, Unidad Tabasco.

Gómez, C. y Corlay, L. 2007. Microbiota edáfica y su importancia en la agricultura. In: Ferrera-Cerrato R. y Alarcón, A. pp 39-55. *Microbiología Agrícola*. (eds) Trillas.

Guo, J.H.; Qi, H.Y.; Guo, Y.H.; Ge, H.L.; Gong, L.Y.; Zhang, L.X.; Sun, P.H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control*. 29:66-72.

Ghisalberti, E.L. and Sivasithamparan, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.* 23(11)1011-1020.

Glick B. R., Cheng Z., Czarny J. and Duan J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.*119:329–39.

Harman, G., E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84:379-393.

Harman, G.E.; Howell .Ch; Viterbo, A; Chet. I. and Lorito. M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology* 2:43-56.

Harper, J. L. 1977. *Population biology of plants*. Academic Press, London, UK.

Hassan, S., Hassan, T. 2013. Effect of biofertilization by using three *Azotobacter* isolates and two levels of mineral nitrogen fertilizer on Jerusalem Antichoke (*Helianthus tuberosus* L.) growth, yield and some chemical constituents. *Journal of american Science*, 9 (1):437-446.

Hernández-Calderon, E. 2006. Influencia de las bacterias ferrirreductoras en las disponibilidad de hierro en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.v. Flor de Mayo Bajío). Tesis de Maestría. Instituto de investigaciones Químico-Biológicas Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México. 104 pp.

Holt, G. J., N. Krieg, A. H. P. Sneath, T. J. Staley y T.S. Williams. 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Nith edition, Lipponcott Williams and Wikins, USA, 787 pp.

Hong, T.D., S. Linington y R.H. Ellis. 1996. *Seed Storage Behaviour: a Compendium. Handboock for Genebanks*. No. 4. IPGRI. Roma.

Howell, C.R., Hanson, L., Stipanovic, R. and Puckhaber, L. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seeds treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90:248-252.

Howell, C.R. 2002. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant disease* 87(1): 4-10.

Jardel Peláez Enrique J. 2006. Viejos y nuevos problemas en el sector forestal de México, Instituto Manantlán de Ecología y Conservación de la Biodiversidad, Centro universitario de la costa Sur Universidad de Guadalajara.

Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. – *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191-194.

Koh RH, Song HG. 2007. Effects of application of *Rhodopseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. *J Microbiol Biotechnol* 17:1805-1810

Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Makarova N, and Lugtenberg B. 2006. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:1121–26.

Khetmalas, M., Egger, K., Massicotte, H., Tackaberry, L. and Clapperton M. 2002 . Bacterial diversity associated with subalpine fir (*Abies lasiocarpa*) ectomycorrhizae following wildfire and salvage-logging in central British Columbia. *Journal Microbiol.* 48: 611-625.

Klopper, J.W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: soil microbial ecology; applications in agriculture, forestry and environmental management .F. Blaine, Jr. (Ed). Marcel Dekker, New York, USA p.255-274.

Kuiper I., Bloemberg G.V. and Lugtenberg B. 2001. Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1197–205.

Linderman RG. 1997. Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. In Carroll GC, Tudzynski P (eds), *The Mycota*, pp. 117–128. Berlin, Germany: Springer-Verlag,

Liu W., Wei Mu, Bingyu Zhu and Feng Liu. 2008. Antifungal Activities and Components of VOCs Produced by *Bacillus subtilis*G8. *Current Research in Bacteriology*, 1: 28-34.

Lottmann J., Maureen O'Callaghan, David Baird and Christian Walter. 2010. Bacterial and fungal communities in the rhizosphere of field-grown genetically modified pine trees (*Pinus radiata* D.), *Environ. Biosafety Res.* 9 25–40, DOI: 10.1051/ebr/2010007.

Lugtenberg. y Faina Kamilova. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria, *Annual Review of Microbiology*, DOI: 10.1146/annurev.micro 62.081307.162918

Lumsden, R.D., Locke, J., Adkins, S., Walter, J., and Ridout, C. 1992. Isolation and localization of the antibiotics gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. *Phytopathology* 82:230-235

Martínez M. 1948. Los pinos mexicanos. Editorial Botas. 2° edición. México. D. F. México. 361 pp.

Martínez, M. 1979. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. D.F.

Martínez, M. 1992. Los Pinos Mexicanos. Ediciones Botas. México D.F.

Martínez, M. 1994 Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de las Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura económica, México, D.F.E

Metcalf, D.D., and Wilson, C.R. 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Patol. 50:249-257.

Navarro, E. 1992. Determinación de Puntos Críticos y Duración de la Viabilidad en Semillas de Especies del Género Pinos. Tesis profesional (Ing. Agrícola). FES - Cuautitlán, UNAM. México.

Nelson L. M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. Crop Management doi: 10.1094/CM-2004-0301-05-RV.

Odile, C. Pillion, V. Rolland, D. And Bernier, J. 1999. Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospores production of apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. Phytopathology 90:31-37

Okon Y., Bloemberg G.V. and Lugtenberg B. 1998. Biotechnology of biofertilization and phytostimulation. In *Agricultural Biotechnology*, ed. A Altman, pp. 327–49. New York: Marcel Dekker.

Orozco-Mosqueda & Velázquez-Becerra & Macías-Rodríguez & Gustavo Santoyo & Flores-Cortez & Alfaro-Cuevas & Valencia-Cantero. 2013. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. Plant Soil. 362:51–66 DOI 10.1007/s11104-012-1263-y

Ortiz-Castro R., M. Martínez-Trujillo, J. López-Bucio. . 2008. N-acyl-L-homoserine lactones: A class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 31:1497-1509.

Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23:23-54.

Patiño, F., P. de la Garza, A. Villagómez, I. Talavera y F. Camacho. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. Boletín Divulgativo No. 63. INIF.

Pokojska burdziej A. 1982. The effect of microorganisms, microbial metabolites and plant growth regulators IAA and GA3 on the growth of pine seedlings *Pinus sylvestris* L. *Pol. J. Soil Sci.* 15:137-143.

Perry, J. P. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, Oregon. 231 pp.

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.

Philon, V. Carisse,O. and Paulitz, T. 1997. In vitro evaluation of fungical isolate for their ability to influence leaf rheology, production of pseudothecia, and ascospores of *Venturia inaequalis*. *Eur. J.Plant Pathol.* 103:441-452

Ping L, Boland W. 2004. Signals from underground: Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 9:263–266

Price. R.A., A. Liston y S.H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. In: M. D. Richardson (ed). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. Pp: 49-68.

Probanza A, Lucas García J. A., Ruiz Palomino M. 2002. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). Applied Soil Ecology. Volume 20, Issue 2, May 2002, Pages 75–84

Rodríguez H., Fraga R, González T. and Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287:15–21.

Roman, J.; Vargas, A.; Baca, H.; Trinidad, C. y Alarcón B. 2001. Crecimiento de plántulas de *Pinus greggii* Engelm. En respuesta a la fertilización. *Rev. Ciencia Forestal en México*.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Pare P.W. & Kloepper J.W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4927-4932. [sigmaaldrich.com/mexico.html](http://sigmaaldrich.com/mexico.html)

Rzedowski, J. 2006. *Vegetación de México*. 1ra edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de La Biodiversidad, México. 504 pp.

Saeed B, M Sajjad, A Bano, K Malik. 2007. Coinoculation of chickpea with *Rhizobium* isolates from roots and nodules and phytohormone-producing *Enterobacter* strains. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 47 (8): 1008–1015.

Saban Kordali, Ahmet Cakir, and Sunay Sutay. 2007. Inhibitory Effects of Monoterpenes on Seed Germination and Seedling Growth. *Z. Naturforsch.* 62c, 207D214.

Sáenz-Romero, C., A. E. Snively y R. Lindig-Cisneros. 2003. Conservación and Reforestation of Pine Forest Genetic Resources in México. *Silvae Genetica*. 52: 5-6.

Smith, V.L.; Wilcox. W.F. and Harman, G.E. 1990. Potential for biological control of phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80:880-885.

Sutton, J.C. and Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry leaves. *Phytopathology* 83:615-621.

SEMARNAT. Anuario Estadístico de la Producción Forestal. Años 2000, 2002 y 2003. México. 2004 y 2005.

SEMARNAT. 2005. Especies con Usos No Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino-Encino en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. PROCYMAF. In: [http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/Pinus_Michoacana.html) Pinus Michoacana.html (Disponible 29 de Noviembre del 2005).

Silva, L. Abrahao, A.; Barberi, N.; Da Silva, K, Furtado, F. and De Suza, F. 2009. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of sirato (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil*, 319:127-145.

Timonen S. and Thomas Hurek. 2006. Characterization of culturable bacterial populations associating with *Pinus sylvestris*– *Suillus bovinus* mycorrhizospheres, *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52:769-778, 10.1139/w06-016.

Valencia-Cantero E., Hernández Calderón E., Velázquez Becerra C., López Meza L.E., Alfaro Cuevas R. & López Bucio J. 2007. Role of dissimilatory fermentative iron-

reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant & Soil* 291, 263–273.

Van Rhijn P. y Vanderleyden J. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59:124–42.

Vargas, H. J. 2003. Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques en el norte de México, Documentos de trabajo. Recursos Genéticos Forestales. Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales, Dirección de Recursos Forestales, FAO, Roma.

Vázquez, M.M.; César, S.; Azcón, R.; Barea, J.M. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology*. 15:261-272.

Vázquez Collazo I. 1996. Microorganismos asociados a la semilla de tres especies de pino y técnicas de desinfección. *Revista Ciencia Forestal en México*. Vol 21.Num.79.

Velázquez-Becerra, C. 2003. Contribución de las bacterias ferireductoras al suministro de hierro en plantas de maíz (*Zea mays*) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de licenciatura. Facultad de Biología UMSNH. Morelia, Michoacán. 50 pp.

Velázquez-Becerra & L Macías-Rodríguez & López-Bucio & J Altamirano-Hernández & Flores-Cortez & 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 Soil*. 339:329–340 DOI 10.1007/s11104-010-0583-z

Velázquez-Becerra, Macías-Rodríguez, López-Bucio, Flores-Cortez, Gustavo Santoyo, Hernández-Soberano, Valencia-Cantero. 2013. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits the growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma*. 10.1007/s00709-013-0506-y

Venegas, V., R., Palazuelos, F., P., Hirsch-Reinschagen, B.P.1996. Aplicación de *Trichoderma* en la protección de almácigos de lechuga *Lactuca sativa*. Memoria Congreso de Agronomía.

Yasir, M.; Asalm, Z.; Kim, S.W.; Lee, S.W.; Jeon, C.O.; Chung, Y.R. 2009 . Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity. *Bioresource Technology*. 100:4396- 4403.

Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1061-1070.

Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. 2000. Induction and accumulation of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem.* 38:863-873.

Zhang H., Xie X., Kim M.S., Korniyev D.A., Holaday S. and Pare P.W. 2008. Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in plants. *Plant J.* 56:264–73

Zhang, H., Tang, M., Chen, H. and Zheng, C. 2010. Effects of inoculation with ectomycorrhizal fungi on microbial biomass and bacterial functional diversity in the rhizosphere of *Pinus tabulaeformis* seedlings. *European Journal of Soil Biology*

