



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



DOCTORADO EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

**Estudio de microorganismos involucrados en la germinación de
*Pinus chiapensis***

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
CIENCIAS (MICROBIOLOGIA)**

PRESENTA

M.C. Cristina Domínguez Castillo

DIRECTORES DE TESIS:

D.C. Ricardo Carreño López

D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

PUEBLA, PUE

MAYO 2021

“No importa la lentitud con la que avances,
siempre y cuando no te detengas”

Confucio

Agradecimientos

A Dios por haberme dado las fuerzas para poder lograr este objetivo

A mi esposo Jesús, mi hija Shirel y mi hijo Luis, por su apoyo, comprensión, paciencia y amor. Por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón y mente, los amo.

A mis padres Benjamín y Amalia, por apoyarme en todo momento, por su amor, consejos y motivación a lo largo de toda mi vida.

A mis hermanos Lucia, Beatriz y David, por el apoyo, confianza, amor y animo brindado siempre.

A mis sobrinas Xime y Sofi por darme su alegría y amor.

A todos los estudiantes que compartimos el laboratorio en todos estos años, Moy, Paco, Miriam, Flor, Mauricio, Lupita, Jesús, Luis, entre tantos que me apoyaron e hicieron tan gratos momentos en el laboratorio, pero en especial a Moni gracias por ser mi brazo fuerte y apoyarme a lo largo de este camino.

A Julia, por sus palabras de aliento y todo el apoyo recibido en este trabajo.

A mis directores de tesis D.C. Ricardo Carreño López y D. C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez, gracias por su amistad, apoyo, enseñanzas, consejos, recomendaciones y dedicación a lo largo de este proyecto.

A mi comité tutorial D.C. José Antonio Munive, D.C. Rebeca D. Martínez, D.C. Jesús Francisco Olgúin, D.C. Ricardo Mungia, por su tiempo, dedicación, enseñanzas y apoyo en todo este tiempo.

A D.C. Vianey Marín Cebada y D.C. Sandra Reyes Carmona, por ser parte de mi comité revisor de tesis, por su tiempo y recomendaciones, por ayudarme a concluir esta etapa.

Índice

I. Índice de Tablas.....	5
II. Índice de Figuras	6
III. Índice de Gráficas	8
Resumen.....	9
Abstract.....	11
1. Introducción.	13
1.1 Pinos en México	15
1.2 <i>Pinus chiapensis</i>	18
2. Antecedentes.....	22
2.1 Bacterias presentes en rizosfera	23
2.2 Hongos presentes en rizosfera	26
2.3 Relaciones de microorganismos en la rizosfera	29
3 Antecedentes específicos	33
3. Justificación.....	35
4. Hipótesis.	36
5. Objetivos	36
5.1 Objetivo General	36
5.2 Objetivos particulares.....	36
6. Material y Métodos	37
6.1 Sitios muestreados.....	37
6.2 Muestreo de suelo para análisis fisicoquímico.	37
6.3 Análisis fisicoquímico de suelos.....	38
6.4 Muestreo de suelo para aislamiento de bacterias	38
6.5 Aislamiento de suelos rizosférico de cepas bacterianas	38
6.6 Nomenclatura de los aislados	39
6.7 Tratamiento de semillas	39
6.8 Germinación de semillas de <i>P. chiapensis</i> con cepas bacterianas aisladas	40
6.9 Aislamiento de bacterias y hongos de semillas de <i>P. chiapensis</i>	40
6.10 Identificación molecular de aislados bacterianos	41
6.11 Identificación molecular de aislados bacterianos y fúngicos de las semillas... ..	42
6.12 Compatibilidad de crecimiento de cepas bacterianas	44
6.13 Recuperación de bacterias en semillas germinadas.	44
6.14 Determinación de auxinas y Giberelinas	44

6.15 Determinación de solubilización de fosfatos	45
6.16 Ensayo de antagonismo	45
6.17 Ensayo de hidrólisis de almidón	46
6.18 Análisis Estadísticos.....	46
7. Resultados	48
7.1 Análisis fisicoquímico de suelo.....	48
7.2 Aislamiento de bacterias autóctonas de rizosfera de <i>P. chiapensis</i>	50
7.3 Bacterias promotoras de la germinación de <i>P. chiapensis</i>	52
7.4 Análisis de correlación canónica entre las propiedades fisicoquímicas de los rodales Hueyapan, San Diego y Cuateman de <i>Pinus chiapensis</i>	62
7.5 Identificación de bacterias promotoras de la germinación de <i>P. chiapensis</i>	64
7.6 Compatibilidad de cepas bacterianas que disminuyen el tiempo de germinación con efecto calendario	75
7.7 Características PGPR de bacterias promotoras de la germinación de <i>P.</i> <i>chiapensis</i>	77
7.8 Solubilización de fosfatos	80
7.9 Capacidad de hidrólisis de almidón por bacterias promotoras de la germinación de <i>P. chiapensis</i>	85
7.10 Aislamiento e identificación de cepas fúngicas y bacterianas de semillas de <i>P.</i> <i>chiapensis</i>	85
7.11 Ensayos de antagonismo de bacterias aisladas de rizosfera y de semillas de <i>P. chiapensis</i> contra cepas fúngicas aisladas de semillas de <i>P. chiapensis</i>	95
8. Discusión.....	97
9. Conclusiones.....	114
10. Perspectivas.....	115
11. Bibliografía	116
Anexos	142
Artículo.....	146

I. Índice de Tablas

1. Listado de pinos localizados en México y su categoría de riesgo	17
2. Características climáticas de lugares de muestreo.....	50
3. Análisis fisicoquímico de rodales muestreados	52
4. Datos de tiempos de germinación, longitud de germinados y tasa de germinación de cepas que promovieron la germinación de <i>P. chiapensis</i>	59
5. Población de cepas con un efecto calendario en la germinación de <i>P. chiapensis</i> en semillas inoculadas.....	63
6. Características fenotípicas en medio LB de las cepas bacterianas.....	66
7. Análisis de poblaciones de PGPRs en co-cultivo.....	78
8. Evaluación de mecanismos PGPRs de las cepas bacterianas con efecto benéfico en la germinación de <i>P. chiapensis</i>	83
9. Descripción de las cepas fúngicas aisladas de semillas de <i>P. chiapensis</i>	88

II. Índice de Figuras

1. Características físicas de <i>P. chiapensis</i>	20
2. Esquema de proceso de clonación del amplicon 16S rDNA en el vector pGEM.....	43
3. Esquema del amplificado utilizado para la identificación molecular de los aislados fúngicos.....	44
4. Localización geográfica de rodales de <i>P. chiapensis</i>	49
5. Germinados de semillas de <i>P. chiapensis</i> inoculadas con bacterias aisladas de rizosfera de los rodales Hueyapan y San Diego con efecto positivo en la germinación	57
6. Germinados de semillas de <i>P. chiapensis</i> inoculadas con bacterias sin efecto positivo en la germinación	58
7. Análisis de correlaciones canónicas de los rodales muestreados	64
8. Amplificación del gen 16S rDNA y clonado en el vector pGEM.....	67
9. Árbol filogenético de las cepas bacterianas SD1330RC, SD530TM, SD437RC, SD1330LB, SD730LB, H3430LGI, SD1730LB, H1830TM, SD1537RC, SD237RC y H537RC.....	68
10.Árbol filogenético de las cepas bacterianas H1830LGI, H1330LGI y H130LGI.....	69
11.Árbol filogenético de las cepas bacterianas H5630LGI y H630LGI.....	70
12.Árbol filogenético de la cepa bacteriana H1637RC.....	71
13. Árbol filogenético de la cepa bacteriana SD2037TM.....	72
14. Árbol filogenético de la cepa bacteriana H830LGI.....	73
15. Árbol filogenético de la cepa bacteriana SD330TM.....	74
16. Árbol filogenético de la cepa bacteriana SD2430LB.....	75
17. Crecimiento de bacterias en agar NBRIP.....	84
18. Hidrólisis de almidón de cepas bacterianas aisladas de rizosfera de <i>P. chiapensis</i>	85
19. Daño de semilla y germinados de <i>Pinus chiapensis</i> y microorganismos de semillas.....	87

20. Amplificaciones de cepas bacterianas y fúngicas.....	90
21. Árbol filogenético de las cepas bacterianas A, B, C, D y E.....	91
22. Árbol filogenético de la cepa fúngica 1.....	92
23. Árbol filogenético de las cepas fúngicas 2, 3, 4, 5 y 6.....	93
24. Árbol filogenético de la cepa fúngica 7.....	94
25. Árbol filogenético de la cepa fúngica 8.....	95
26. Efecto inhibitorio de hongos de semillas de <i>P. chiapensis</i> por cepas bacterianas.....	97

III. Índice de Gráficas

1. Tiempos de germinación de cepas bacterianas.....	54
2. Longitud de germinados.....	56
3. Cepas bacterianas con efecto en tiempo de germinación de semillas de <i>P. chiapensis</i>	61
4. Producción de indoles.....	76
5. Producción de giberelinas.....	81
6. Solubilización de fosfatos.....	82

Resumen

México es un país rico en ecosistemas forestales, en ellos habitan una gran variedad de especies vegetales, dentro de estos se encuentra *Pinus chiapensis*. árbol que se ubica en centro América siendo nativo de Guatemala y México. En México, se encuentra en los estados de Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Puebla y Veracruz en forma de pequeños rodales esparcidos, pero muy pocos de ellos en buenas condiciones.

La madera y derivados de este pino han sido explotados, disminuyendo drásticamente su población. Como consecuencia, *P. chiapensis* se ha catalogado en México y a nivel internacional como una especie amenazada y con protección especial, lo que justifica que se realice investigación básica y aplicada que contribuya a generar conocimiento para su reproducción y conservación.

En este trabajo se aislaron cepas bacterianas nativas de *P. chiapensis* de los rodales ubicados en las localidades de Hueyapan y San Diego en el estado de Puebla. Estos rodales fueron catalogados como no alterados. En dichos lugares se aislaron bacterias que fueron capaces de promover la germinación de las semillas de este pino.

Los resultados obtenidos muestran que aislados bacterianos pertenecientes a los géneros *Dyella*, *Paraburkholderia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Cupriavidus*, *Escherichia*, *Luteimonas* y *Enterobacter* disminuyeron significativamente el tiempo de germinación relacionado con el control no inoculado, aumentando además el tamaño y número de semillas germinadas.

A los aislados bacterianos promotores de la germinación se les identificaron propiedades PGPR, como producción de indoles, giberelinas y solubilización de fosfatos, además de tener la capacidad de hidrolizar almidón.

A su vez se aislaron e identificaron microorganismos endófitos de semillas de *P. chiapensis* relacionados con la pérdida de viabilidad de las semillas, encontrando bacterias pertenecientes al género *Bacillus* y hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Trichoderma*, *Diaphorte* y *Cladosporium*. Se realizó un ensayo de antagonismo entre los aislados promotores de la germinación y los aislados bacterianos de las semillas contra los aislados fúngicos relacionados con la pérdida de la viabilidad de las semillas, observando que las cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, pueden inhibir el crecimiento de los hongos presentes en las semillas de *P. chiapensis*.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las cepas promotoras de la germinación tienen el potencial para ser utilizadas como inoculantes, para mejorar la tasa de germinación y aumentar la población de *P. chiapensis*.

Abstract

Mexico is a country rich in forest ecosystems, where a great variety of plant species inhabit, inside these is *Pinus chiapensis*, located in Central America, being native to Guatemala and Mexico. In Mexico, it is found in Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Puebla, and Veracruz in small scattered stands, regrettably very few of them in good conditions.

The wood and derivatives of this pine have been exploited, drastically reducing the plant populations. Consequently, *P. chiapensis* has been classified as a threatened species with outstanding protection in Mexico and other countries.

In this work, native bacterial strains of *P. chiapensis* were isolated from stands placed in Hueyapan and San Diego villages, all located in Puebla. Those stands were classified as not altered. Bacteria that were able to promote the germination of the seeds of this pine were isolated. Interestingly bacteria showing that characteristics could be isolated only from not altered stands.

The results showed that bacterial isolates belonging to the genera *Dyella*, *Paraburkholderia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Cupriavidus*, *Escherichia*, *Luteimonas*, *Enterobacter* significantly decreased the germination time related to the non-inoculated control, also increasing the size and number of germinated seeds.

Germination-promoting bacterial isolates possessed PGPR properties, such as the indoles and gibberellins production and phosphates solubilization, besides the ability to hydrolyze starch.

In turn, endophytic microorganisms from *P. chiapensis* seeds related to the loss of seed viability were isolated and identified. They belonged to the bacterial genus

Bacillus and the fungal genera *Penicillium*, *Trichoderma*, *Diaphorte*, and *Cladosporium*. An antagonism test was carried out with the germination promoting isolates and the seeds' bacterial isolates against the fungal isolates related to the loss of seed viability of the seeds. The *Bacillus* strains inhibited the fungal growth that was present in the seeds of *P. chiapensis*.

The results obtained in this study suggest that germination-promoting strains can be used as inoculants to improve the germination rate and increase the *P. chiapensis* populations.

1. Introducción.

Los bosques son un ecosistema donde la vegetación predominante la constituyen los árboles. Estas comunidades de plantas cubren grandes áreas del planeta y pueden tener diferentes funciones como son hábitats para los animales, moduladores de flujos hidrológicos y conservadores del suelo, constituyendo uno de los aspectos más importantes de la biosfera de la Tierra (Broeker W.S., 2006). Los bosques a veces contienen muchas especies de árboles dentro de una pequeña área (como la selva lluviosa tropical y el bosque templado caducifolio), o relativamente pocas especies en áreas grandes (por ejemplo, la taiga y bosques áridos montañosos de coníferas). Estos ecosistemas se encuentran habitados por una gran diversidad tanto animal como vegetal (Pregitzer K. S. & Uskirchen E. S., 2004).

Se calcula que en el mundo existen 4000 millones de hectáreas (ha) de bosques, lo que corresponde al 31 por ciento de la superficie total del suelo del planeta (FAO, 2012). México cuenta con aproximadamente 64 millones de ha de bosques de clima templado y selvas que abarcan el 32% del territorio nacional. Adicionalmente el país cuenta con 56 millones de ha de matorrales y cerca de 2 millones de ha de vegetación hidrófila (FRA, 2010).

La degradación de los bosques es un proceso paulatino que en muchos de los casos concluye en deforestación, que es la conversión de bosques a otro uso del suelo, la tierra o la reducción a largo plazo de la cubierta forestal por debajo del 10% (FRA, 2015). El aumento progresivo de la población y la actividad económica han tenido como consecuencia la deforestación. Se estima que a lo largo de 5000 años la desaparición total de terreno forestal en todo el mundo ha ascendido a 1800 millones de ha, lo cual supone un promedio neto de pérdida de 360,000 ha al año (Williams M., 2002). Cerca de 13 millones de ha de bosque se transformaron para otros usos –especialmente agrícolas– o se perdieron por causas naturales cada año en la década 2000-2010. El crecimiento demográfico y el auge de la demanda

de productos básicos e indispensables han provocado un acelerado ritmo de desmonte, llegando en los últimos 10 años al promedio anual neto de desaparición de bosques de 5.2 millones de hectáreas (FAO, 2012). Las pérdidas de bosques afectan significativamente a todo lo que comprende el ecosistema forestal, que va desde la pérdida de diversidad biológica (flora, fauna y microbiota), pérdida de productos maderables y no maderables, disminución de la producción de oxígeno, de la fijación de carbono, hasta la alteración del ciclo del agua, entre otros. Estos eventos conllevan a graves consecuencias como inundaciones, deslaves, altos niveles de gases de efecto invernadero, disminución en la disponibilidad de agua, enfermedades respiratorias, erosión del suelo, altas temperaturas en el planeta y consecuentemente incremento en la producción de incendios, todo en un ciclo que lleva a cambios climáticos cada vez más graves. Asimismo, la conservación de los bosques mantiene la estabilidad del ambiente al regular la temperatura y la humedad de los suelos y contribuir a la supervivencia de las especies, además de incrementar la calidad de vida de las poblaciones humanas, ya que éstos son fuente de madera y de productos no maderables (Sanchez L. *et al*, 2018).

En México existe una gran gama de ecosistemas forestales que incluyen selvas bajas en el trópico seco, diversas selvas altas en las zonas tropicales más húmedas, bosques templados, bosques de clima frío, vegetación hidrófila e inducida, así como de matorrales y pastizales, todos los cuales dan cabida a una enorme variedad de ambientes y grupos biológicos (CONABIO, 2010).

Dentro de la gran variedad de bosques que existen en México, se encuentra el bosque mesófilo de montaña, el cual se encuentra cubierto de manera frecuente o persistente con nubes a nivel de vegetación, por lo que también se le conoce como bosque de niebla. Éste es un área que se considera dentro de los ecosistemas más amenazados en México (CONABIO, 2010).

En este tipo de bosque se encuentran una muy variada composición de especies de arbustos y árboles, incluyendo los encinos (*Quercus*), hayas (*Fagus*) y pinos (*Pinus*) (Pereira R.M *et al*, 2006; Lau E. *et al*, 2007; Holmes A.J. *et al*, 1999).

1.1 Pinos en México

Los pinos se encuentran entre los organismos genéticamente más diversos. Su sistema genético favorece la creación y recombinación de la variación genética, lo que les ha permitido evolucionar en concierto con los cambios ambientales, tanto espaciales como temporales, a los que han estado sometidos desde que iniciaron su divergencia de su forma ancestral, hace poco más de 200 millones de años (Ledig F.T., 1998). Sin embargo, últimamente esta diversidad se ha visto seriamente amenazada, debido entre otros factores, a la alta tasa de deforestación que se ha ido produciendo. Se estima que anualmente se deforestan alrededor de 212 mil ha por diversas causas. Entre ellas por: desmonte, incendios forestales, cambios del uso de suelo, plagas, enfermedades y tala ilegal. Todo ello ha conducido a que México —considerado como Centro Secundario de especiación de los pinos— ocupe el cuarto lugar en tasa anual de deforestación (Ledig F. T., 1998; Sánchez-González A., 2008; Global Forest Watch 2019). Este aspecto cobra una connotación especial si se tiene en cuenta que gran parte de este rico patrimonio, constituido en muchos casos por poblaciones genéticamente únicas, se encuentra en serio peligro de extinción.

En el mundo se estima que existen entre 90 y 120 especies de pinos, de los cuales 50-70 existen en México cubriendo el 34% de la superficie arbolada del país. De ellas, 35 especies son endémicas y desgraciadamente quince de éstas han tenido que llegar a algún grado de protección (Romeu E., 1995; NOM-059-SEMARNAT, 2010). De las especies presentes en México tanto endémicas como no endémicas se estima que 22 especies poseen algún grado de protección (Tabla 1).

Tabla 1. Listado de pinos localizados en México y su categoría de riesgo.

GÉNERO	ESPECIE	SUBESPECIE	DISTRIBUCION	CATEGORIA	AÑO DEL DECRETO
<i>Pinus</i>	<i>arizonica</i>	<i>cooperi</i>	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>arizonica</i>	<i>arizonica</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>arizonica</i>	<i>stormiae</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>attenuata</i>	-	No endémica	P	2001
<i>Pinus</i>	<i>ayacahuite</i>	<i>ayacahuite</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>ayacahuite</i>	<i>veitchii</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>caribaea</i>	<i>hondurensis</i>	No endémica	P	2001
<i>Pinus</i>	<i>cembroides</i>	<i>cembroides</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>cembroides</i>	<i>lagunae</i>	Endémica	A	2001
<i>Pinus</i>	<i>cembroides</i>	<i>orizabensis</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>contorta</i>	<i>murrayana</i>	No endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>coulteri</i>	-	No endémica	P	2001
<i>Pinus</i>	<i>culminicola</i>	-	Endémica	P	2001
<i>Pinus</i>	<i>devoniana</i>	-	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>douglasiana</i>	-	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>durangensis</i>	-	Endémica	A	2013
<i>Pinus</i>	<i>edulis</i>	-	No endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>engelmannii</i>	-	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>flexilis</i>	<i>reflexa</i>	Endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>hartwegii</i>	-	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>herrerae</i>	-	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>greggii</i>	<i>australis</i>	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>greggii</i>	<i>greggii</i>	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>jaliscana</i>	-	Endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>jeffreyi</i>	-	No endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>johannis</i>	-	Endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>lagunae</i>	-	Endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>lambertiana</i>	-	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>lawsonii</i>	-	Endémica	-	-

Lista basada en la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).
Categoría: Amenazada (A), Sujetas a protección especial (Pr), Peligro de extinción (P)

Continuación tabla 1. Listado de pinos localizados en México y su categoría de riesgo

GÉNERO	ESPECIE	SUBESPECIE	DISTRIBUCION	CATEGORIA	AÑO DEL DECRETO
<i>Pinus</i>	<i>leiophylla</i>	<i>leiophylla</i>	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>leiophylla</i>	<i>chihuahuana</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>lumholtzii</i>	-	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>martinezii</i>	-	Endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>maximartinezii</i>	-	Endémica	P	2001
<i>Pinus</i>	<i>maximinoi</i>	-	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>monophylla</i>	-	No endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>montezumae</i>	<i>montezumae</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>muricata</i>	<i>muricata</i>	Endémica	A	2001
<i>Pinus</i>	<i>muricata</i>	-	No endémica	P	2001
<i>Pinus</i>	<i>nelsonii</i>	-	Endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>oocarpa</i>	<i>oocarpa</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>oocarpa</i>	<i>trifoliata</i>	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>patula</i>	<i>patula</i>	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>patula</i>	<i>longepedunculata</i>	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>pinceana</i>	-	Endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>ponderosa</i>	<i>scopulorum</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>praetermissa</i>	-	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>pringlei</i>	-	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>pseudostrobus</i>	<i>pseudostrobus</i>	No endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>pseudostrobus</i>	<i>apulcensis</i>	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>quadrifolia</i>	-	No endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>radiata</i>	<i>binata</i>	Endémica	A	2005
<i>Pinus</i>	<i>remota</i>	-	Endémica	Pr	2010
<i>Pinus</i>	<i>rzedowskii</i>	-	Endémica	Pr	2001
<i>Pinus</i>	<i>strobiformis</i>	-	No endémica	Pr	2010
<i>Pinus</i>	<i>strobus</i>	<i>chiapensis</i>	No endémica	Pr	2010
<i>Pinus</i>	<i>tecunumanii</i>	-	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>teocote</i>	-	Endémica	-	-
<i>Pinus</i>	<i>reflexa</i>	-	No endémica	Pr	2001

Lista basada en la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).
Categoría: Amenazada (A), Sujetas a protección especial (Pr), Peligro de extinción (P)

Uno de los pinos amenazados es *Pinus chiapensis*. Este pino se encuentra en los estados de Puebla, Oaxaca, Veracruz, Chiapas y Guerrero en forma de pequeños rodales esparcidos, pero muy pocos de ellos en buenas condiciones (Perry J. P., 1991). Las perturbaciones que se observan son en su mayoría antrópicas. La madera y derivados de este pino han sido explotados por la población local, disminuyendo drásticamente su población. Como consecuencia, *P. chiapensis* se ha catalogado en México y a nivel internacional como una especie amenazada y con protección especial (Thomas P. & Farjon A., 2013; NOM-059-SEMARNAT, 2010; Zamora S. C y Velasco F, 1977; Wright J.A. *et al*, 1996).

1.2 *Pinus chiapensis*

Pinus chiapensis, una especie de pino con escama suave (haploxylon), taxonómicamente ubicado hasta 1964 como *Pinus strobus var. chiapensis* Martínez (Martínez M., 1940), es un árbol nativo de Guatemala y México. En México, se encuentra en los estados de Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Puebla y Veracruz, en cuanto a Guatemala se puede localizar en los departamentos de El Quiché y Huehuetenango (Perry J. P., 1991; Rodríguez M. *et al*, 2005). Se encuentra en las laderas bajas de las montañas y cañones aislados, a una altitud media de 1,200 y los 1,800 msnm, aunque se ha ubicado en altitudes que van desde los 600 hasta los 2,200 msnm (Rzedowski J. & Vela L., 1966; Eguiluz T., 1982), los suelos suelen ser ácidos (pH 4.5 – 5.5), bien drenados y de una profundidad mayor a 1 m (Donahue J. K. *et al*, 1991).

Se distribuye tanto en climas tropicales y subtropicales y condiciones geológicas y edafológicas muy diversas (Del Castillo R.F. & Acosta F., 2002). Son árboles que poseen un tronco recto, de 25 a 30 metros de altura o más, con un diámetro de 1 metro aproximadamente, corteza muy fisurada y ramas extendidas. Las hojas están dispuestas en fascículos de cinco, aglomerados en los extremos de las ramillas, formando penachos. Miden de 8 a 12 centímetros de longitud y son de color verde

claro, ligeramente amarillento. Las vainas son escamosas, rápidamente caedizas, de 13 a 15 milímetros de longitud (Figura 1) (Martínez M., 1940; Andresen J.W., 1964). Una cualidad es su rápido crecimiento, que alcanza un máximo de hasta 3 centímetros anuales en diámetro (Donahue J.K. *et al*, 1991).

P. chiapensis es una especie reconocida por los pobladores de las áreas donde se encuentra y su madera se utiliza localmente para la fabricación de muebles y herramientas para construcción. Desde el punto de vista comercial, se le considera como una especie prometedora para plantaciones en regiones tropicales y subtropicales, cuya madera es considerada dentro de las maderas finas de mediana calidad, apreciada por su ligereza, de color claro, uniforme y su suavidad, que la hace de fácil manejo para la construcción de muebles y con finalidades decorativas.



Figura 1. Características físicas de *P. chiapensis*. Tomada de *Pinus chiapensis*, un orgullo forestal de Chiapas, México, para el mundo por Joaquín Becerra Zavaleta.

La utilización del pino no solo es por su madera, también extractos de su resina se han utilizado en las regiones endémicas como un remedio contra los dolores reumáticos y afecciones respiratorias (CONAFOR, 2012).

Su elevada explotación, el desplazamiento sufrido por otros árboles y poca habilidad de la especie para multiplicarse ha orillado a que su explotación se haya limitado a las comunidades autóctonas de las regiones endémicas, en este sentido 12 grupos étnicos (Canjobals, Chatinos, Chinantecs, Cuicatecs, Mazatecs, Mixes, Mixtecs, Triquis, Tzeltales, Tzotziles, Zapotecs y Zoques) reconocen el árbol y lo utilizan. Algunas organizaciones internacionales han visto el potencial económico del pino y han realizado plantaciones (Del Castillo R.F. y Acosta S., 2002).

Central America and Mexico Coniferous Resources Cooperative (CAMCORE), inició una colecta de semillas de este pino, con el propósito de conservar la especie y establecer plantaciones pilotos en diferentes países de América Latina y África (Dvorak W.S. & Brouard J., 1987; Dvorak W.S. *et al*, 1996).

P. chiapensis se encuentra en programas de cruzamiento en África del sur, Australia y Brasil (Dvorak W.S. & Brouard J., 1987; Dvorak W.S. *et al*, 1996, Málán F.S., 2001). En dichos programas se observó que la viabilidad de la semilla disminuía conforme aumentaba el tiempo de almacenaje y las semillas no fueron capaces de retener su viabilidad al ser almacenadas por periodos prolongados (Wright J. A. *et al*, 1996).

Debido a la gran explotación y a la baja reproducción y establecimiento de *P. chiapensis*, actualmente sólo se encuentran en pequeños manchones de bosque, muy pocos de ellos con establecimiento silvestre, buena reproducción y establecimiento, siendo estos considerados como rodales no alterados.

Se han realizados varios esfuerzos para poder reforestar áreas donde antes existía dicho pino, miles de árboles son plantados anualmente, sin embargo, los resultados no han sido los que se esperaban. Aún no se ha solucionado el estado de peligro

de desaparición del pino y se han sufrido grandes pérdidas económicas (Wright J. A. *et al*, 1996; FAO, 2010).

La incapacidad de reforestar o aumentar la población de *P. chiapensis* en los rodales afectados pone cada vez más en riesgo a esta especie, aunado a esto la baja en su población puede afectar su linaje. En estudios previos se han analizado rodales de *P. chiapensis* con diferente población. Utilizando análisis de isoenzimas y RAPD se ha observado que la diversidad genética varía dependiendo del tamaño poblacional. Así, se han reportado rodales con una variación genética aceptable en poblaciones con alto número de individuos, mientras que en rodales con población bajas de este pino la variación genética se ve disminuida (Newton A. C. *et al*, 2002; Del Castillo R.F. *et al*, 2010)

2. Antecedentes.

Los pinares son un recurso forestal de primera importancia en México, tanto por la variedad de especies como por su explotación. A la fecha, son pocos los bosques que gozan de salud y cada vez más se restringen a manchones dispersos. De acuerdo con la Gerencia de Inventario Forestal y Geomática de México, a nivel mundial, México se posiciona en el 12° lugar en cuanto a existencia de superficie de bosques y selvas, sin embargo, está posicionado en el lugar número 51 respecto a su tasa de cambio. En el periodo 2010-2015 la FAO reportó que el 14% de la degradación de suelos en el mundo ocurre en América latina y el Caribe y se estimó una tasa de cambio forestal de 2.2 millones de ha por año (Velásquez A. *et al*, 2002; FAO, 2012; Noticias FAO, 2018).

Esta pérdida de ecosistemas naturales es un problema mundial. El cambio neto en área cubierta por bosque en el período 2000-2010 se estimó en 5.2 millones de ha por año en el planeta (FAO, 2012). En México en el periodo 2000-2005 hubo una pérdida anual de 235,000 hectáreas de bosques y selvas, mientras que para el periodo 2005-2010 fue del orden de las 155,000 hectáreas anuales (FAO 2012).

Se han realizado estudios nacionales e internacionales con respecto al deterioro y deforestación de bosques, mostrando a éstos como un problema multifactorial, de difícil solución. En México los gobiernos federales y estatales han implementado diferentes programas para la recuperación de dichos bosques, con resultados variables. Sin embargo, la solución a este problema aún se vislumbra lejana. Una de las razones es quizás la manera como se plantean y abordan las posibles soluciones, ya que la mayoría de las veces sólo se toma en cuenta la macrobiología de los sistemas forestales, dejando a un lado el aspecto microbiológico.

Actualmente no existen estudios microbiológicos publicados sobre *P. chiapensis*, sin embargo, varios estudios han mostrado cómo diferentes microorganismos

influyen directa y decisivamente en el establecimiento de plantas incluyendo otros pinos.

El suelo contiene las comunidades más ricas en especies del planeta (Zwolinski M.D., 2007) y está formado por al menos cinco componentes: materia mineral, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos. La cantidad de estos constituyentes es variable dependiendo de la localidad y el tiempo. Los organismos vivos son los que mayormente influyen en su composición y dentro de éstos, las plantas y los microorganismos son primordiales. La comunidad microbiana es también responsable del reciclamiento y movimiento de nutrientes (C, N, P), posee un impacto sobre la fertilización de suelos y almacén de carbono (Chaparro J. M. *et al*, 2012; Lakshmanan V. *et al*, 2014) y consecuentemente los microorganismos en las raíces producen un suelo saludable, productivo y sustentable (Wagg C. *et al*, 2014). Clemmensen y colaboradores (2013), determinaron que del 50 al 70 % del carbono almacenado bajo tierra es derivado de las raíces de las plantas y de los microorganismos asociados a las raíces.

Estas comunidades microbianas que se encuentran en el suelo son capaces de influir en numerosos procesos fisiológicos y en las características de las plantas, incluyendo germinación de la semilla, vigor de la plántula, crecimiento y nutrición de éstas y hasta en el desarrollo de enfermedades (Brimecombe M.J. *et al*, 2000; Bais H. *et al*, 2006; Hohmann P. *et al*, 2011).

2.1 Bacterias presentes en rizosfera

La rizosfera es un lugar donde ocurren actividades microbiológicas altas y sostenidas, sobre todo influenciada por los exudados de las plantas (Bias H. *et al*, 2006). Ellas proporcionan nutrientes aumentando la actividad microbiana, lo cual puede estimular o inhibir el crecimiento de otros microorganismos o plantas (Brimecombe M.J. *et al*, 2000; Bais H. *et al*, 2006; Hohmann P. *et al*, 2011). Por ejemplo: los exudados del *Pinus radiata*, influyen de manera positiva en la mayoría

de los microorganismos de suelo, pero también de manera negativa en un número reducido de microorganismos (Shengjing S. *et al*, 2011). Por otro lado, la presencia de bacterias endófitas provee también ciertas ventajas a su hospedero como son el incremento en la adquisición de nutrientes, la promoción de crecimiento a través de mecanismos como la producción de factores de crecimiento, tolerancia a diversos estreses, la resistencia a patógenos o enfermedades, además de la capacidad de degradar ciertos contaminantes xenobióticos (Cook R. J. *et al*, 1995; Ryan R. P. *et al*, 2008; Doty S. L. *et al*, 2009). La inoculación de una cepa de *Burkholderia vietnamiensis* aislada del álamo (*Populus trichocarpa*) en el pasto “Bluegrass” (*Poa abbreviata*) produjo un aumento en su contenido de nitrógeno y en su biomasa (Xin G. *et al*, 2009). De manera similar, *Paenibacillus polymyxa* P32b-2R de *Pinus contortia* presentó la capacidad de fijar nitrógeno en esta especie y en el cedro rojo (*Cedrela odorata*) (Anand R. *et al*, 2013). En pinos del mediterráneo se encontró *Enterobacter cloacae* productor de ácido indol-3-acético (IAA) como endófito obligado. También se ha observado que *Bacillus fungorum* DBT1 provoca la tolerancia de los árboles a hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) (Andreolli M. *et al*, 2013).

Carrell y Frank (2014) encontraron que algunas especies de pinos en ambientes limitados de nutrientes tienen específicas comunidades endófitas, siendo dominantes especies diazotróficas de *Gluconacetobacter*.

También se ha reportado que ciertas bacterias que habitan la rizosfera son capaces de mineralizar el fitato *in vitro* (Jorquera M. *et al*, 2008; Maougal R.T. *et al*, 2014). Irshad y colaboradores (2012) demostraron que la presencia de *Bacillus subtilis* inoculada a través de un nematodo del género *Rhabdits* sp., incrementa la cantidad de fósforo en *Pinus pinaster*.

Son abundantes los reportes de las cualidades de las bacterias de suelo para mejorar el crecimiento de plantas (Bashan Y. H. *et al*, 1996). *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus* etc., son algunos ejemplos de géneros bacterianos con esas cualidades.

La reducción de la producción agrícola por rotaciones sucesivas de cultivos no se ha esclarecido totalmente, algunos autores indican que el suelo pierde su salud por el cambio de su estructura. Por ejemplo: la pérdida de galerías de insectos y égusanos, la pérdida de bioporos, la producción de fitotóxicos durante la descomposición de residuos de raíces viejas, producción de ácido cianhídrico y benzaldehído por hidrólisis de glucósidos cianogénicos como prunasina y amigdalina de los vestigios de raíces, producción de taninos y a la acción de nematodos y hongos (Gur A. & Cohen Y., 1989; Tagliavini M. & Marangoni B., 1992). Sin embargo, existen estudios que demuestran la participación de bacterias en la reducción de la fertilidad del suelo. En ese sentido Benizri y colaboradores (2005), encontraron cambios significativos en grupos microbianos en la rizosfera de durazno provenientes de suelos sanos y suelos no fértiles, por metodologías de “Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) y evaluación de bacterias cultivables metabólicamente activas. El 60% de las cepas aisladas en suelos sanos eran *Pseudomonas* sp. y el 58% de cepas aisladas en suelos infértiles fueron *Bacillus* sp. Estos últimos capaces de producir compuestos derivados de cianuro de hidrógeno (HCN), inhibidores de la respiración celular, que afectan a los microorganismos aerobios estrictos, indicando como el uso de monocultivos puede cambiar sustancialmente la composición de microorganismos rizosféricos, con los efectos adversos que lo acompañan.

Se sabe también que las reacciones de meteorización fisicoquímicas que existen en el suelo son importantes para otorgar ciertos nutrientes a las plantas. Actualmente existe evidencia que apunta que existen cepas bacterianas en el suelo que son capaces de aumentar la desintegración y descomposición de los materiales formadores de los suelos, conocida como meteorización y además mejorar la nutrición de plantas (Calvaruso C. *et al*, 2006). A su vez, las plantas a través de los exudados de las raíces pueden alterar la estructura y actividad de las comunidades bacterianas (Brant J. B. *et al*, 2006) y de forma selectiva pueden favorecer a ciertas bacterias con potencial a ser benéficas para ellas mismas (Cook R. J. *et al*, 1995). Una hipótesis para el desarrollo sostenible de los bosques

propone que las raíces del árbol seleccionan a las bacterias que proporcionan nutrientes necesarios para el crecimiento de este (Frey-Klett P. *et al*, 2005).

2.2 Hongos presentes en rizosfera

La mayoría de los estudios sobre diversidad microbiana se refieren a las bacterias, sin embargo, los hongos realizan funciones de gran importancia para mantener el equilibrio en la naturaleza. Éstos en conjunto con las bacterias descomponen materia orgánica reciclándola, produciendo el humus del suelo, muy importante para su fertilidad e indispensable en la biosfera. Pero también los hongos participan en el biodeterioro, fenómeno que implica alteraciones de las propiedades fisicoquímicas de los materiales.

La cantidad de hongos presentes en el suelo es controversial, algunos investigadores tomando en cuenta la cantidad de micelio en suelo, indican que la proporción de hongos excede al bacteriano en la mayor parte de los suelos (Honorato P., 2000). De igual manera su diversidad es controversial dado los pocos trabajos en esta área que existen. Hawksworth y Rossman (1997) indican que existen aproximadamente 1,500,000 especies de hongos, dato que corresponde al número de plantas fanerógamas existentes, asumiendo que por lo menos un hongo infecta a una especie de fanerógama. Otros trabajos moleculares estiman 5.1 millones de especies (Blackwell M., 2011), de éstas se piensa que al menos doscientos mil crecen en México (Guzmán G., 1995), sin embargo, sólo se conocen aproximadamente seis mil. La influencia del ecosistema en donde se encuentra el hongo dictamina el estado biológico del microorganismo, es decir, si el hongo es saprofito o parásito, su capacidad de cambio del estado sexual al asexual, el tipo de esporas, su producción, dispersión y la longevidad de estas o del micelio (Moreno G. *et al*, 2013).

Se sabe que el 95% de los árboles establecen una ectomicorriza mutualista con hongos simbióticos. La relación simbiótica entre micorrizas y plantas a nivel

individuo, población, comunidad y ecosistema es de gran importancia (Johnson N. C. & Gehring C. A., 2007; Smith S. E. & Read D. J., 2008). La interrupción entre la asociación de micorriza y planta puede inclinar a una competencia entre plantas nativas y no nativas (Vogelsang K. M. & Bever J. D., 2009; Meinhardt K. A. & Gehring C. A., 2012). Se sabe que *Pinus edulis* es micorrizado por *Geopora* a pesar de diversos factores, distintas especies de este género se encuentra presente siempre en dicho pino (Gehring C. A. *et al*, 2014).

La relación que puede existir entre hongos y plantas puede variar según la etapa de desarrollo, principalmente a través de una disminución en el número de interacciones y en la proporción de especialistas dentro de la comunidad microbiana. El mutualismo establecido entre micorrizas arbusculares y árboles es dinámica en toda la etapa de crecimiento provocando un aumento de especies relacionadas de acuerdo con la etapa en la sucesión ecológica, posiblemente reflejando los cambios en las condiciones bióticas y abióticas (Bennett A. E. *et al*, 2013).

Esta dinámica de interacciones entre semilla-planta-hongo está cambiando según el estadio de la planta, se sabe que el viento es el principal dispersador tanto de semillas de pinos como de las esporas producidas por hongos. Este factor puede estar jugando un papel importante en dicha dinámica, a su vez favoreciendo la interacción planta-hongo y logrando un establecimiento y desarrollo favorable (Nuñez M. A. *et al*, 2013).

Se ha reportado que los árboles que se encuentran micorrizados proporcionan el 30% de sus carbohidratos derivados de la fotosíntesis a las ectomicorrizas. A cambio, el árbol recibe el 70% de sus necesidades de nitrógeno y fósforo, los cuales son recibidos a través de la red hifal que se extiende profundamente dentro del suelo (Nehls U., 2008; Martin F. & Nehls N., 2009). Para poder establecer esta interacción simbiótica de ectomicorriza-planta es necesaria la comunicación entre ellos, desde su inicio y durante el mantenimiento de esta interacción. Una de estas

simbiosis ecológicamente importantes es la establecida entre hongos basidiomicetos y árboles (Buscot F. *et al*, 2000).

Algunos árboles forman asociaciones con diferentes hongos, pero algunos hongos interactúan sólo con una planta hospedera, como es el caso de *Tricholoma terreum* el cual es usualmente asociado con pinos. Para que *T. terreum* forme la micorriza, es esencial, que produzca la morfología de setas, por lo tanto, éstas se localizan normalmente sólo bajo el pino. Estas especificidades de hospedero se pueden utilizar para identificar genes implicados en las interacciones con anfitriones no nativos (Mankel A. *et al*, 2002).

Se conoce que existen diversas proteínas de las ectomicorrizas que son reconocidas por la planta hospedera y que gracias a esta interacción es posible el establecimiento de la simbiosis. Pellegrin C. y colaboradores (2015) determinaron que la proteína efectora MiSSP7 del hongo mutualista *Laccaria bicolor* es requerida para poder establecer la simbiosis entre la micorriza y la planta hospedera, el blanco de esta proteína se encuentra en el núcleo de la planta hospedera donde interacciona con el co-receptor JAZ6, el cual suprime la reacción de defensa y permite el desarrollo de la red “Hartig” en el apoplasto. La red de Hartig es una red de hifas de hongos micorrizos que se extiende dentro de las raíces de las plantas, penetrando entre las células epidérmicas y corticales, esta red es un sitio de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta hospedante. En *Populus trichocarpa*, la proteína MiSSP7 producida por *Laccaria bicolor*, interactúa con un represor transcripcional PtJAZ6 en el núcleo de la planta hospedera, donde este represor induce la degradación de ácido jasmónico promoviendo el mutualismo entre planta-hongo (Plett J. M. *et al*, 2014).

Por otro lado, existen hongos que ocasionan daño o enfermedad a los árboles como es el caso de *Cronartium quercuum* sp., el cual es un hongo patógeno que ataca la pared celular de pinos sureños mediante la secreción de diversas proteínas (Pendleton A. L. *et al*, 2014), o en el caso de *Pinus pinaster* que es atacado por *Fusarium circinatum* el cual le ocasiona la enfermedad denominada “chancro

resinoso” (Vivas M. *et al*, 2013). También se ha observado que *Melampsora* spp., es patógeno de álamos y en especial *Melampsora larici* es el agente causal de la mayoría de los álamos enfermos de las plantaciones de Europa (Pinon J. & Frey P., 2005). Por otro lado, *Verticillium dahliae* es el mayor agente causal del marchitamiento de árboles de olivo (López-Escudero F.J. & Mercado-Blanco J., 2011).

Los patógenos de plantas y los endófitos coexisten, y a menudo interactúan con la planta hospedera y con la comunidad microbiana. Estas interacciones pueden favorecer o enfermar a la planta. En un estudio realizado por Ragazzi A. y colaboradores (1995) se aislaron 210 hongos y 14 bacterias asociadas al deterioro del roble. Entre los hongos aislados están *Apiognamonia quercina*, *Amphicytostroma quercinum*, *Armillaria* spp., *Biscogniauxia mediterránea*, *Colpoma quercinum*, entre otras. En el deterioro del roble están implicados varios microorganismos (Balci Y. & Halmschlager E., 2003) y su microbiota es extremadamente diversa y abundante. Actualmente se conoce que *Discula quercina* es directamente responsable de la enfermedad en el roble conocida como antracnosis (Monicca S. & Ragazzi A., 2008)

2.3 Relaciones de microorganismos en la rizosfera

Existen interacciones entre los diversos microorganismos del suelo que pueden favorecer a la planta hospedera como es el caso de *Pinus contorta*, en el cual se ha observado que existen bacterias que pueden contrarrestar el daño del hongo patógeno *Grosmannia clavigera*. Esta actividad se lleva a cabo de una manera indirecta, ya que se ha observado que estas bacterias metabolizan limoneno produciendo metabolitos que inhiben a *Grosmannia Clavigera* (Wang Y. *et al*, 2014).

Por otro lado, se conoce bien como la colonización de un cierto tipo de microorganismo influye en el establecimiento posterior de otro. Un ejemplo es la

influencia del sistema micorrízico de algunos pinos que influyen en el establecimiento de bacterias (Nurmiahlo L. *et al.*, 1997), o bien en la fisiología de las plantas, mediante la expresión diferencial enzimática en pinos micorrizados y no micorrizados (Timonen S. & Sen R., 1998). De igual manera, bacterias aisladas de la rizosfera influyen en diferente grado en la micorrización de *Pinus silvestris* por *Lactarius rufus* (Poole E. J. *et al*, 2001).

Otro ejemplo, es el estrés causado por *Fusarium circinatum* en *Pinus radiata* que favorece el establecimiento del patógeno endofítico *Diplodia scrobiculata* relacionado con la enfermedad de acronecrosis “dieback” y “cankers” que se caracterizan por la muerte progresiva de las ramitas, ramas, brotes o raíces, empezando por las puntas (Burgess T. I. *et al.*, 2004). Por su parte, las bacterias endófitas se encuentran de manera persistente en algunos pinos, como es el caso de *Bacillus* y *Paenibacillus* y algunas diazotroficas en *Pinus contorta* var. *Latifolia* (Bal A., 2003), o *Methylobacterium extorquens* y *Pseudomonas synxantha* dentro de botones de *Pinus silvestris* (Pirttila A. M. *et al*, 2000).

El establecimiento y funcionalidad de la simbiosis micorrizales pueden ser influenciadas positivamente por ciertas cepas bacterianas que han sido categorizadas como bacterias ayudadoras de micorrizas (MHB por sus siglas en inglés Mycorrhiza Helper Bacteria) (Fitter A. H. & Garbaye J. A., 1994; Frey-Klett P. *et al*, 2007). Dentro de estas bacterias existe una variedad de gramnegativas (Barea J. M. *et al*, 1998) y grampositivas (Budi S. W. *et al*, 1999). Varias cepas bacterianas han sido reportadas que son capaces de promover la simbiosis de las endo y ectomicorrizas (Fitter A. H. & Garbaye J. A., 1994; Barea J. M. *et al*, 2002; Johansson J. F. *et al.*, 2004, Pivato B. *et al.*, 2009).

También se ha observado que la simbiosis entre el roble y la ectomicorriza de *Scleroderma citrinum* seleccionan comunidades bacterianas que son más eficientes en la interperización mineral. Esto sugiere que la simbiosis micorrizal tiene un efecto indirecto sobre la nutrición de la planta a través de la presión de selección sobre la diversidad funcional de la comunidad bacteriana (Calvaruso C. *et al*, 2007).

En este sentido se ha observado la simbiosis entre bacterias del orden *Burkholderiales* y el hongo *Scleroderma atrinum* en tres diferentes árboles forestales. Además de que Frey-Klett y colaboradores (2005), demostraron que la simbiosis entre el pino *Pseudotsuga menziesii* y la ectomicorriza *Laccaria bicolor* seleccionan a *Pseudomonas flourencens*, probablemente porque esta bacteria es capaz de beneficiar tanto la nutrición como la eficaz movilización de hierro y fosfato.

Existen bacterias que producen metabolitos secundarios que estimulan el crecimiento del micelio como es el caso del auxofuran. Así mismo, la formación de micorrizas también puede ser favorecida o promovida por la capacidad de estas bacterias de reducir el estrés del suelo y por el aumento de contacto planta-hongo por la estimulación de la formación de raíces laterales (Duponnois R. & Garbaye J., 1991; Duponnois R. & Plenchette C., 2003).

Los disturbios causados en los ecosistemas por el hombre se han incrementado en el último siglo. Un ejemplo se dio por la introducción del hongo *Cronartium ribicola* en bosques de *Pinus albicaulis* en el parque Yellowstone, y como consecuencia ahora esta especie arbórea se encuentra bajo gran amenaza. *C. ribicola* tiene otros hospederos alternativos por lo que ahora es difícil su erradicación (Newcomb M. & Six D., 2001; Hatala J. A. *et al*, 2011).

Los ejemplos anteriores y muchos más muestran que las interacciones entre diferentes microorganismos pueden estar alterando la capacidad de establecimiento de distintas especies arbóreas. Todas estas conexiones se encuentran moduladas por diversos mecanismos, dándonos un panorama de que la relación entre bacterias, hongos y otros microorganismos como las arqueas y virus juegan un papel muy importante para la germinación, crecimiento y establecimiento de las diferentes especies de árboles que se encuentran en los ecosistemas de los bosques, y que estas relaciones son esenciales para poder tener poblaciones exitosas de todas las especies de árboles localizados en estos ecosistemas (Müller H. *et al*, 2015).

Los distintos aspectos de toda esta red de comunicación entre los microorganismos y los organismos asociados son objeto de estudio para entender esta interacción. El conocimiento de las moléculas participantes y sus blancos en los hospederos nos ayuda a comprender como se da dicha interacción y poder transpolar dichas interacciones en otras especies.

Existe una variedad de métodos para restaurar y expandir los bosques nativos y conservar los hábitats de vida silvestre. La aplicación de estos métodos puede estar limitada por las condiciones climáticas, la calidad del suelo, las características específicas de la planta en cuestión, etc., (Smithers B., 2017). Aunque se ha demostrado que los métodos químicos aplicados son eficientes para aumentar las tasas de germinación, a menudo tienen efectos secundarios nocivos para el medio ambiente; de ahí la necesidad de innovar en métodos más eficientes para mejorar la restauración forestal. Para ello los recursos de la biotecnología podrían ser prometedores.

3 Antecedentes específicos

Estudios preliminares realizados en rodales de *P. chiapensis*, en la sierra norte del estado de Puebla en las poblaciones de Apulco, Hueyapan y Cuatempan, rodales no alterados los dos primero y alterado el último, nos han mostrado una gran diferencia entre ellos. En los rodales alterados existen árboles de gran tamaño productores de semillas, pero con una baja, o en algunos casos nula germinación de las semillas en el lugar, dando lugar a un reclutamiento escaso; mientras que en los rodales no alterados existen árboles en distintos grados de desarrollo y con germinación apreciable (Vera C., 2014).

En ambas localidades se realizaron recolecta de suelos de rizosfera y aislados en el mes de agosto de 2012 (Vera C., 2014).

Vera B.C. aisló 80 cepas bacterianas del rodal localizado en la comunidad de Cuatempan, se les analizó su capacidad de promover la germinación de semillas de *P. chiapensis*, observando que ninguna de ellas fue capaz de promover la germinación. El rodal analizado fue clasificado como alterado debido a que presentaba modificaciones o alteraciones por presencia del hombre, llegando al extremo de ser ocupado por algunos habitantes como basurero. En este rodal se pudo visualizar una disminución en la población de *P. chiapensis*, además que sólo se detectaron pinos adultos. Cabe aclarar que los pinos adultos eran productores de semillas viables, pero estas no eran capaces de germinar en el suelo de dicho rodal.

En los rodales de ubicados en Apulco y Hueyapan mostraron la presencia de bacterias con potencial de promover la germinación de *P. chiapensis*, aislando una cantidad mayor de bacterias promotoras en la comunidad de Hueyapan.

Las variaciones de estos rodales nos hacen preguntarnos qué es lo que está pasando en estos dos tipos de rodales, ¿Por qué *P. chiapensis* está bien establecido en rodales no alterados mientras que en rodales alterados se ve disminuida su población? La respuesta a esta pregunta puede variar según el enfoque, podría estar relacionado con cuestiones físicas: temperatura, humedad, altitud del lugar o relacionarse a las características del suelo, es decir que sean factores fisicoquímicos los que le estén afectando al establecimiento de *P. chiapensis* en los rodales alterados, o puede deberse a una alteración en la rizosfera de dicha especie, es decir que, en los suelos alterados exista una modificación de la comunidad presente en la rizosfera o una combinación de ambos.

El estudio de *P. chiapensis* es de gran importancia por varias razones, entre ellas, se trata de un espécimen sujeta a protección especial en México y catalogada como una especie de pino amenazada por la Unión Internacional de la Conservación de la Naturaleza (UICN), además de ser considerada como especie prioritaria para la reforestación en México por razones de ecológicas, económicas y sociales (CONAFORT; FAO, 2012). Este trabajo de tesis contribuye al conocimiento para la diferenciación de las poblaciones de *P. chiapensis* en los rodales alterados y no alterados, con un enfoque de investigación en sus propiedades microbiológicas de sus suelos.

3. Justificación.

Los pinares son un recurso forestal de gran importancia en nuestro país, *Pinus chiapensis* es un pino de interés económico que posee una buena calidad de madera y su resina propiedades medicinales. Se localiza en forma de pequeños rodales esparcidos, pero actualmente muy pocos de ellos se encuentran en buenas condiciones en México. Las perturbaciones que se observan son en su mayoría antrópicas y es catalogado como un pino en proceso de desaparición y con protección especial por el gobierno mexicano e instituciones internacionales.

Actualmente en el estado de Puebla se pueden apreciar rodales perturbados como no perturbados. Estudios preliminares microbiológicos han mostrado bacterias provenientes de los rodales no alterados y con potencial a ser promotoras de la germinación de *P. chiapensis*, así mismo se han observado hongos en semillas que provocan su pudrición y muerte. El estudio de este tipo de microorganismos que influyen el proceso de germinación de *P. chiapensis* será sin duda importante, para mejorar la sobrevivencia y desarrollo del pino en su ambiente natural, evitando así su inminente extinción.

4. Hipótesis.

Bacterias y hongos provenientes de rizosfera de rodales no alterados y de semillas de *Pinus chiapensis* del estado de Puebla, influyen en la germinación del pino.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Estudiar las bacterias y hongos asociadas en la germinación de *Pinus chiapensis*

5.2 Objetivos particulares

- Aislamiento e identificación de bacterias con función en la germinación de *Pinus chiapensis*.
- Estudiar posibles mecanismos PGPRs de las bacterias seleccionadas
- Estudiar hongos con un efecto adverso en la germinación de *Pinus chiapensis*.

6. Material y Métodos

Suelos de diferentes rodales de *P. chiapensis* fueron muestreados. Se les realizaron análisis fisicoquímicos. A partir de los suelos se aislaron bacterias rizosféricas y a partir de semillas certificadas (CONAFOR) provenientes de la UMA: El ranchito, Ejido Temimilco, Altotonga (Veracruz). Ambos se identificaron preliminarmente con marcadores moleculares y de los aislados bacterianos provenientes de suelos rizosféricos se caracterizaron propiedades de promoción de la germinación de *P. chiapensis* y características de PGPRs.

6.1 Sitios muestreados

Las localidades fueron muestreadas a finales del mes de julio del 2013. Uno de los rodales muestreados se ubica en el municipio de Hueyapan, Puebla, con coordenadas geográficas 19° 52' 02" latitud N y 97° 19' 42" longitud W. Otro sitio que se muestreó, una plantación en la localidad de San Diego ubicada en el municipio de Teziutlán-Puebla-México, teniendo sus coordenadas geográficas en los paralelos 19° 47' 46" latitud norte y los meridianos 97° 05' 40".

6.2 Muestreo de suelo para análisis fisicoquímico.

En cada una de las dos regiones analizadas (Hueyapan y San Diego), se tomaron ocho muestras de suelo para su análisis. Cada muestra es la mezcla de 10 submuestras, es decir 10 lugares diferentes al azar dentro del mismo rodal. Por lo tanto, se incluyeron un total de 80 lugares de submuestreo en toda la región. El sistema de muestreo se realizó en zigzag, con un punto de partida aleatorio a una profundidad de aproximadamente 30 cm de suelo. Se llevaron 1.5 kg de suelo de cada muestra al laboratorio para su trabajo posterior.

6.3 Análisis fisicoquímico de suelos

Se evaluó el contenido de nitrógeno total, fósforo, hierro, zinc, sodio, potasio y calcio de los suelos. Así mismo, se determinó pH, conductividad y textura, de acuerdo con los protocolos estándar. Los análisis físicos y químicos se realizaron bajo las metodologías y parámetros establecidos en el manual de procedimientos para el análisis de suelos (Technical Paper 9, 2002). Este análisis se realizó por la D.C. Castañeda Antonio Ma. Dolores.

6.4 Muestreo de suelo para aislamiento de bacterias

En cada una de las dos regiones analizadas (Hueyapan y San Diego), se tomaron 10 muestras de suelo rizosférico de ejemplares de *P. chiapensis* adultos de cada uno de los rodales analizados. Se recolectaron suelos y raíces a una profundidad de 30 a 40 centímetros de profundidad. Los muestreos se realizaron en el mes de julio del 2013. El suelo se pasó por un tamiz de 3 mm de malla y se procedió a realizar el aislamiento de bacterias.

6.5 Aislamiento de suelos rizosférico de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se aislaron de la rizosfera de *P. chiapensis*. Se suspendió un gramo de suelo en 99 ml de agua estéril y se diluyó serialmente hasta 10^{-10} . De dichas diluciones se sembraron 10 microlitros en placas Petri. Se incubaron las placas tanto a 30° C como a 37° C en seis diferentes medios: TESMES, PY, LB, LGI, Congo Red y MM9 glucosa, (Muñoz-Rojas J. *et al*, 2005; Muñoz-Rojas J. *et al*, 2006). Para poder asegurar cepas puras se hicieron diluciones seriadas analizando su morfología colonial y celular al microscópico óptico. Las cepas purificadas se mantuvieron en glicerol al 20% (v/v) a -80 °C.

6.6 Nomenclatura de los aislados

Para poder nombrar a los aislados bacterianos se procedió a realizar una abreviatura de los nombres de las localidades aisladas, seguido del número de muestra, la temperatura en la cual se pudieron aislar y el medio de cultivo en el cual se aisló. Teniendo que las cepas denominadas SD indican que son de la localidad de San Diego, las denominadas H provienen de la localidad de Hueyapan, estas abreviaturas van seguidas de 30 o 37 indicando la temperatura en la cual se aislaron, por último, les sigue las abreviaturas RC indicando el medio de cultivo Rojo Congo, TM indicando el medio Tesmes, LB indicando el medio Luria Bertani, LGI indicando el medio LGI, siendo este el medio donde se aisló la cepa. Teniendo por ejemplo que la cepa SD2037TM, proviene de la localidad San Diego, seguido por el número de aislamiento, aislada a 37° C en medio Tesmes.

6.7 Tratamiento de semillas

Las semillas utilizadas en este experimento son semillas certificadas provenientes de Teziutlán, Puebla, (CONAFOR). Estas semillas fueron sometidas a una desinfección superficial. Esta esterilización comprendió en los siguientes pasos:

- Enjuagar las semillas con agua tridestilada estéril.
- Agregar 50 ml de la solución de tween 20 al 0.1%, colocar en agitación por 10 minutos
- Realizar cuatro enjuagues de las semillas con agua tridestilada estéril.
- Realizar desinfección de las semillas con 50 ml de solución de hipoclorito. de sodio al 0.8%, colocar en agitación por 10 minutos.
- Realizar cuatro enjuagues con agua tridestilada estéril.
- Realizar desinfección de las semillas con 50 ml de etanol al 50%, colocar en agitación por 10 minutos.
- Enjuagar cuatro veces las semillas con agua tridestilada estéril.
- Por último, colocar las semillas sobre un soporte estéril para el secado parcial de éstas.

6.8 Germinación de semillas de *P. chiapensis* con cepas bacterianas aisladas

Para probar si las cepas bacterianas aisladas de rizosfera eran capaces de promover la germinación de las semillas de *P. chiapensis* se inoculó a cada semilla con 10 µl de cada una de las cepas con una concentración de 10^8 por mililitro. El soporte para realizar la germinación de las semillas de *P. chiapensis* fue medio agar-agua a una concentración de 0.8% en placas Petri, colocando 20 semillas en cada caja. Estas se incubaron en una cámara ambiental hasta por 25 días con ciclo luz-obscuridad 12 por 12, con una humedad relativa del 70% a una temperatura de 27 °C. Las semillas no inoculadas se usaron como controles. Este experimento se realizó por triplicado.

Los parámetros que se determinaron en las semillas germinadas fueron el tiempo que tardaban las semillas en germinar y el tamaño total del brote después de 10 días de su germinación

6.9 Aislamiento de bacterias y hongos de semillas de *P. chiapensis*

Para el aislamiento de bacterias y hongos presentes en semillas de *P. chiapensis*, se utilizaron las semillas certificadas (CONAFOR) provenientes de la UMA: El ranchito, Ejido Temimilco, Altotonga (Veracruz).

Las semillas fueron sometidas a una desinfección superficial con el método ya mencionado. Se procedió a colocar a las semillas para su germinación. El soporte para realizar la germinación de las semillas de *P. chiapensis* fue medio agar-agua a una concentración de 0.8% en placas Petri, colocando 10 semillas en cada caja. Estas se incubaron en una cámara ambiental por 20 días en oscuridad, con una humedad relativa del 70% a una temperatura de 27 °C. Cada 24 horas se observó si existía el crecimiento de algún microorganismo. Cuando se observó el crecimiento de algún microorganismo se aisló en los medios TESMES, PY, LB, LGI, Congo Red y MM9 glucosa.

Las cepas fúngicas se caracterizaron en medio sólido Sabouraud. Se tomaron colonias únicas con características tanto macroscópicas como microscópicas iguales. Su morfología macroscópica se describió después de 5 días de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se analizaron sus características de colonias como su color en ambos lados de la placa, la textura de la colonia es decir si eran cremosas, arenosas o con micelio aéreo, entre otras, mientras que para la descripción microscópica se procedió a realizar microcultivos teniendo como soporte el mismo agar. Éstos se incubaron durante 7 días a temperatura ambiente, se desmontaron y se tiñeron con azul de algodón. Las cepas purificadas se mantuvieron en glicerol al 20% (v/v) a -80 °C.

Las cepas bacterianas se caracterizaron en medio LB. Para poder asegurar cepas puras se hicieron diluciones seriadas analizando su morfología colonial y celular al microscópico óptico. Las cepas purificadas se mantuvieron en glicerol al 20% (v/v) a -80 °C.

6.10 Identificación molecular de aislados bacterianos

Los aislados bacterianos que mostraron efecto en la germinación de las semillas de *P. chiapensis*, así como los aislados de las semillas y los controles negativos, se identificaron mediante la secuencia del gen 16S DNA ribosomal, utilizando los oligonucleótidos UN27F 5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y UN1392R 5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3' (Biodiversa Inc., México). Los amplificados de las cepas con efecto en la germinación de las semillas de *P. chiapensis*, fueron clonados en el plásmido pGEM. Éstos fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Las secuencias de 16S DNAr obtenidas se compararon con las existentes en las bases de datos de GenBank. Las alineaciones de las secuencias de nucleótidos se realizaron usando CLUSTAL_X (Thompson J.D. *et al*, 1997) y se corrigieron manualmente usando GeneDoc (Nicholas K. B. y Nicholas H. B., 1997). La distancia evolutiva se infirió mediante el uso de un análisis de

Neighbor joining realizado con MEGA versión 7 (Kumar S. *et al*, 2016) y se realizaron con 1000 réplicas.

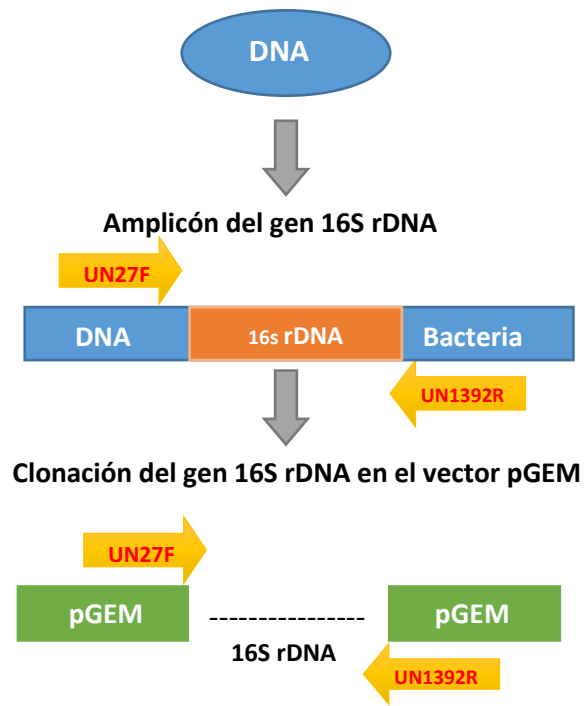


Figura 2. Esquema de proceso de clonación del amplicón 16S rDNA en el vector pGEM. Diagrama de clonación del amplicón 16S rDNA en el vector pGEM-T utilizado para las 18 cepas aisladas de los rodales ubicados en las localidades de San Diego y Hueyapan con efecto en la germinación.

6.11 Identificación molecular de aislados bacterianos y fúngicos de las semillas

Los aislados fúngicos de las semillas de *P. chiapensis* se identificaron mediante la secuencia de la región intergenica entre los genes 18S y 28S y el gen 5.8S DNA ribosomal, utilizando los oligonucleótidos ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y ITS4 5'-TCCTCCGCCTTATTGATATGC-3' (White T. J. *et al*, 1990).

Los aislados bacterianos que mostraron efecto en la germinación de las semillas de *P. chiapensis*, así como los aislados de las semillas y los controles negativos, se identificaron mediante la secuencia del gen 16S DNA ribosomal, utilizando los oligonucleótidos UN27F 5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y UN1392R 5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3' (Biodiversa Inc., México).

Los productos obtenidos tanto de bacterias y hongos fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Las secuencias obtenidas se compararon con las presentes en las bases de datos GenBank. Las alineaciones de la secuencia de nucleótidos se realizaron usando CLUSTAL_X (Thompson J.D. *et al*, 1997) y se corrigieron manualmente usando GeneDoc (Nicholas K. B. y Nicholas H. B., 1997). La distancia evolutiva se infirió mediante el uso de un análisis de Neighbor joining realizado con MEGA versión 7 (Kumar S. *et al*, 2016) y se realizaron con 1000 réplicas de arranque.

Las secuencias nucleotídicas de los amplificados fueron analizadas utilizando los programas BioEdit 7.0.9, Blast, Clustal X2 2.1, GeneDoc 2.7, Mega 6.06. Construyendo árboles filogenéticos calculando la distancia evolutiva por bootstrap con el método Neighbor joining.

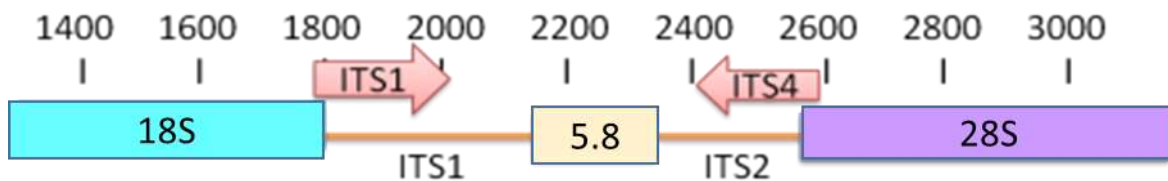


Figura 3. Esquema del amplificado utilizado para la identificación molecular de los aislados fúngicos: Representación de los genes amplificados para la identificación de los aislados fúngicos de semillas de *P. chiapensis*

6.12 Compatibilidad de crecimiento de cepas bacterianas

Las cepas analizadas se crecieron por triplicado tanto en medio rico LB como en un medio mínimo base K con fuente de carbono malato. En todas las cepas el inóculo se llevó a una densidad óptica de 0.001. El crecimiento se determinó por cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas con diferentes antibióticos a 30° C. Siendo la cepa SD2037TM resistente a ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (20 µg/ml), la cepa SD330TM a espectomicina (150 µg/ml) y ácido nalidíxico (10 µg/ml) y la cepa SD2430LB a tetraciclina (30 µg/ml) y ácido nalidíxico (10 µg/ml).

6.13 Recuperación de bacterias en semillas germinadas.

De las semillas de *P. chiapensis* inoculadas con las cepas SD2037TM, SD2430LB y SD330TM se procedió a realizar macerados de los germinados a los 5, 10 y 14 días de cada una. Se colocó el germinado en un mortero y se le agregó 1 ml de agua. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-10} y se inocularon 5 microlitros en placas de agar LB con antibiótico. El crecimiento se determinó por cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de LB con diferentes antibióticos a 30 °C. Siendo la cepa SD2037TM resistente a ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (20 µg/ml), la cepa SD330TM a espectomicina (150 µg/ml) y ácido nalidíxico (10 µg/ml) y la cepa SD2430LB a tetraciclina (30 µg/ml) y ácido nalidíxico (10 µg/ml).

6.14 Determinación de auxinas y Giberelinas

Para la determinación de auxinas se utilizó el medio de cultivo King B con 1 µg/ml triptófano (King *et al*, 1954). La producción de ácido indol-3 acético se cuantificó por un método colorimétrico modificado de Salkowski (Glickmann E. & Deessaux Y., 1995; Mayer A.M, 1958) utilizando ácido Indol-3-acético (Sigma-Aldrich 15148) como control. La evaluación de ácido indol acético (AIA) se realizó de cultivos de 24 y 48 horas.

La giberelina se determinó a través de un método cuantitativo de fluorescencia (Reyes C. *et al*, 1991). Se tomaron 0.2 ml del sobrenadante del cultivo de 72 horas y se adicionaron 0.2 ml etanol, una vez homogenizado se le adicionó 2 ml de una mezcla de ácido sulfúrico: etanol (50:50), se incubó a 48 °C durante 30 minutos. La lectura de fluorescencia se realizó a 464 nm de emisión y 406 nm en excitación en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse. Como control se tomó una solución stock de Gibberellin A₃ (Sigma-Aldrich G7645) desde 1 hasta 19 ug/ml.

Tanto las mediciones de auxinas como de giberelinas fueron normalizadas por cuantificación de proteínas presentes en los cultivos bacterianos analizados.

6.15 Determinación de solubilización de fosfatos

La determinación de la capacidad de solubilizar fosfatos se realizó mediante el método colorimétrico Mo-blue (Murphy J. and Riley J. P., 1962). El medio seleccionado fue NBRIP (National Botanical Institute's Phosphate). Además, se utilizó el medio sólido adicionado con azul de bromotimol para poder visualizar el cambio del pH. Se realizaron mediciones de las cepas identificadas como promotoras de la germinación a las 24 y 48 horas.

6.16 Ensayo de antagonismo

Se realizó un pre inóculo de las cepas fúngicas en el medio líquido YPD a 27 °C con una agitación de 80 rpm por 3 días, mientras que las cepas bacterianas se incubaron toda la noche a 30 °C con una agitación de 250 rpm en medio LB. Para montar la prueba se colocó un mililitro de cultivo fúngico en 25 ml de agar papa dextrosa previamente esterilizado y se vertió en placas Petri. Una vez gelificado el agar se coloca 5 µl de cultivo bacteriano previamente ajustado a una densidad óptica de 0.5. El halo de inhibición se midió después de 3 días.

6.17 Ensayo de hidrólisis de almidón

Se realizó en medio mínimo base K adicionado con papa molida (100 mg de papa por cada litro de medio). Se colocaron 5 µl de cultivo bacteriano con una densidad óptica de 0.5. Las placas se incubaron a 30 °C y a 4 °C. El halo de hidrólisis se midió cada 24 horas hasta las 72 horas a partir de las 24 horas. Para determinar el halo de hidrólisis se realizó un índice entre el halo del crecimiento bacteriano y el halo de la hidrólisis de almidón.

6.18 Análisis Estadísticos

Se realizaron pruebas de varianza (ANOVA simple) con una prueba *pos-hoc* de Tukey-HSD y Dunett, teniendo un nivel de confianza del 95%, utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI. La tasa de germinación se calculó como el número de semillas germinadas dividido por el número de semillas totales, multiplicado por 100.

Además, se realizó un análisis de regresión logística multinivel para determinar el tiempo al evento, específicamente en la germinación de las semillas con la presencia de bacterias utilizando STATA versión 12 para modelos multinivel. En este análisis de regresión, se pueden determinar dos efectos. El efecto de "intensidad" se refiere a una proporción de semillas germinadas durante un período en comparación con el control, donde el tiempo no se considera como una variable. El efecto "calendario" se refiere a la tasa de germinación en ciertos momentos. Para este efecto, se podrían analizar los casos de disminución de los tiempos de germinación causados por bacterias, alcanzando la misma proporción de semillas germinadas, pero en un tiempo más corto que el control sin inoculación. Ambos efectos se pueden observar trazando la relación de germinación de semillas contra

el tiempo (días), donde: la proporción de semillas germinadas es igual al número de semillas germinadas sobre el total de semillas.

Las características fisicoquímicas además se les realizó un análisis de correspondencia canónica. La composición del suelo, el contenido de nutrientes y la clasificación de los suelos de las regiones arbóreas se separaron en función de la presencia o ausencia de bacterias PGPR junto con el eje 1 y el eje 2, respectivamente.

7. Resultados

7.1 Análisis fisicoquímico de suelo

Se analizaron diferentes parámetros del suelo y clima en las dos localidades muestreadas. La localidad de San Diego presentó 60% de humedad relativa, y una altitud de 1643 msnm. La localidad de Hueyapan presentó 52.3% de humedad relativa y una altitud de 1500 msnm (Figura 4). El clima que presentan los dos lugares muestreados es un clima transitorio que va de templado húmedo a semicálido húmedo. Estas condiciones se compararon con las del rodal alterado ubicado en Cuatempan (Tabla 2).

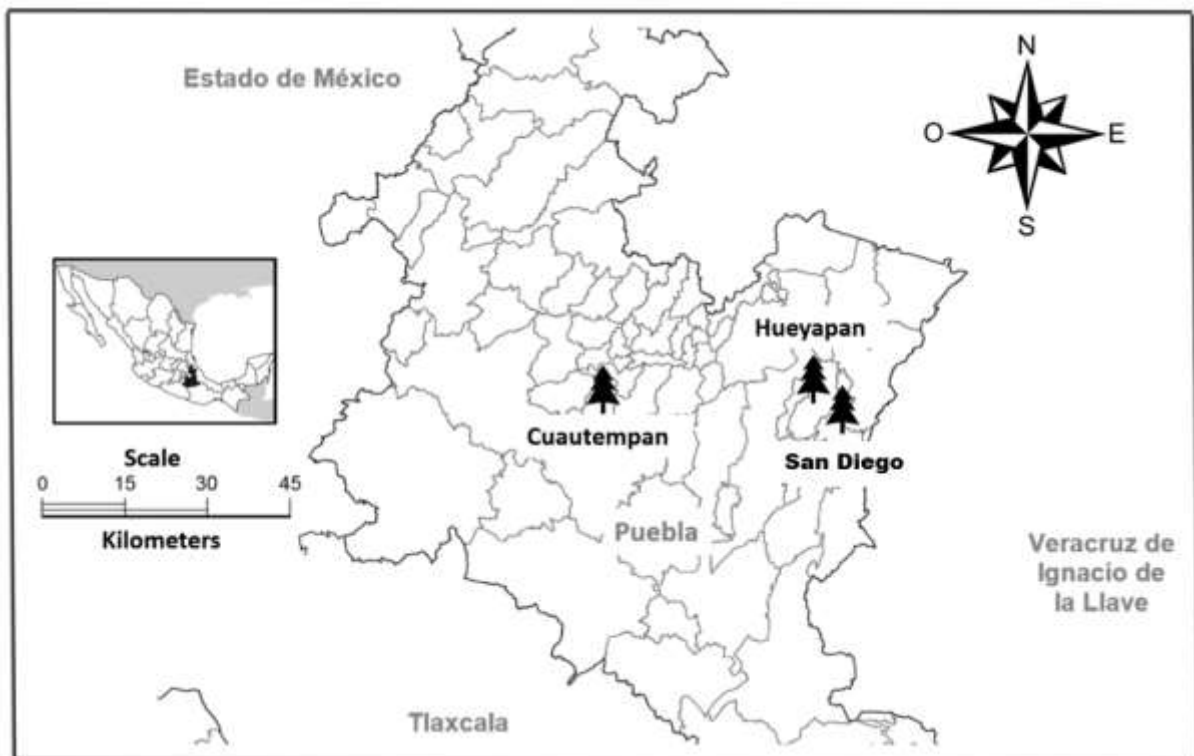


Figura 4. Localización geográfica de rodales de *P. chiapensis*. En el mapa se muestra la ubicación de los rodales muestreados San Diego, Teziutlán y Hueyapan de donde se obtuvo la muestra de rizosfera para el aislamiento de cepas bacterianas, además se muestra la localidad de Cuatempan catalogada como perturbada.

En cuanto al análisis de suelo se observó que para la localidad Hueyapan la consistencia del suelo es 38.2% limo, 18.32% de arcilla y 43.48% de arena teniendo una textura de tipo franco con apariencia de sedimento, para el caso de San Diego fue de 66.64% de limo 22% de arcilla y 11.36% de arena lo que indica un suelo de textura franco con apariencia de sedimento.

El análisis del pH del suelo de la localidad San Diego mostró un pH de 6.36, siendo considerado un suelo con un pH de ligeramente ácido a neutro y óptimo para el crecimiento de vegetación. En el caso de la localidad de Hueyapan el valor de pH fue de 7.82, indicando un pH medianamente alcalino. El porcentaje de materia orgánica se observó con valores de 7.7% para la localidad de Hueyapan indicando que su nivel de materia orgánica es muy alto, en el caso de la plantación de San Diego se obtuvieron valores de 2.48% indicando que su nivel en materia orgánica es media. En cuanto el análisis de conductividad presente en el suelo, los resultados obtenidos para las localidades analizadas fueron de 4.91 y 3.59 decisiemens (dS) para Hueyapan y San Diego respectivamente, indicándonos que la localidad de San Diego es suelo ligeramente salino, mientras de Hueyapan se le considera un suelo salino.

Tabla 2. Características climáticas de lugares de muestreo.

<i>Lugar</i>	<i>Humedad</i>	<i>P atm</i>	<i>Altitud</i>
Hueyapan	52.3%	845.5	1500 m
San Diego	60%	570	1643m
Cuatempan	53.2%	858.3	1377m

Clima

Transición: Templado húmedo / Semicálido húmedo

Valores de las condiciones climáticas de los rodales San Diego, Hueyapan y Cuatempan

La cuantificación de las concentraciones de fósforo se reportó 4.29 mg/kg para Hueyapan y 0.23 mg/kg para la localidad de San Diego, estos valores nos indica que la concentración de fosforo en el suelo de las dos comunidades es baja.

Las concentraciones de nitrógeno presente en los suelos de las dos comunidades fueron de 0.98% para la localidad de Hueyapan presentando una concentración muy alta de nitrógeno total y para la localidad de San Diego se obtuvo un valor de 0.14%, presentando una concentración media de nitrógeno total. Se analizaron otros componentes como hierro, zinc, calcio, potasio y sodio todos estos se encontraron en las dos localidades dentro de los parámetros adecuados (NOM-021-RECNAT-2000). En las dos localidades muestreadas se pudo observar que poseen las características de suelo tipo Andisol. Se compararon los valores obtenidos de estos rodales no alterados con los valores reportados del rodal alterado ubicado en Cuatempan (Vera C.B., 2014). Aunque los valores en las tres localidades varían entre ellos, se pueden localizar dentro los valores reportados como adecuados para el crecimiento y reproducción *P. chiapensis* (CONAFOR) (Tabla 3).

7.2 Aislamiento de bacterias autóctonas de rizosfera de *P. chiapensis*.

Con el fin de aislar bacterias autóctonas de la rizosfera de *P. chiapensis* se eligieron dos sitios de muestreo: El primer sitio donde se observó *P. chiapensis* en diferentes edades y con buena germinación denominado Hueyapan y un segundo sitio que es una plantación donde se observó un crecimiento favorable de dicho pino denominado San Diego, localizada en Teziutlán. Las localidades de Hueyapan y San Diego se tomaron muestras de las zonas rizosféricas de *P. chiapensis* en el mes de Julio del 2013. Se tomaron las muestras en dicho mes, debido a que es cuando *P. chiapensis* esparce sus semillas en México y éstas entran en contacto con el suelo y la microbiota presente en el suelo.

Tabla 3. Análisis fisicoquímico de rodales muestreados.

Parámetros	Localidades		
	Cuatempan	Hueyapan	San Diego
pH	7.05±0.5 ^a	7.82±1.39 ^b	6.36±0.6
Materia orgánica (%)	7.5±0.47 ^b	7.7±2.84 ^b	2.48±1.2 ^a
Conductividad (dS)	3.43±0.5 ^a	4.91 ±0.5 ^b	3.59±0.2 ^a
Textura (%):			
Limo	22.0±0.81 ^a	38.2±8.8 ^b	66.64±2.4 ^c
Arcilla	49.96±0.82 ^b	18.32±0.5 ^a	22.00±0.7 ^b
Arena	28.04±0.90 ^b	43.48±4.0 ^c	11.36±0.5 ^a
Tipo de suelo:	Andisol	Andisol	Andisol
Fósforo (mg/kg)	12.23±0.5 ^c	4.29 ±0.3 ^b	0.23±0.08 ^a
Nitrógeno total (%)	0.21±0.1 ^a	0.98±0.2 ^b	0.14±0.01 ^a
Hierro (mg/kg)	111±1.2 ^c	28 ±0.6 ^b	7.74±0.65 ^a
Zinc (mg/kg)	170±4.8 ^c	36±2.4 ^b	0.02±0.002 ^a
Sodio (mg/kg)	<0.045±0.02 ^a	13.30±0.70 ^b	1146.35±1.10 ^c
Potasio (mg/kg)	1024.00±3.09 ^c	1128.20±2.70 ^b	40.09±1.40 ^a
Calcio (mg/kg)	402.00±2.86 ^c	265.00±2.52 ^b	209.40±2.70 ^a

Datos del análisis fisicoquímico de los suelos de los tres rodales muestreados localizados en las comunidades de San Diego, Hueyapan y Cuatempan.

*abc Diferente letra dentro de una misma fila indica una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Una vez obtenidas las muestras de rizosfera se procedió a realizar diluciones seriadas 1:10, hasta 10^{-10} . Todas las diluciones fueron sembradas en los medios de cultivo LGI, TESMES, PY, LB, M9 y Rojo Congo y se incubaron a dos diferentes temperaturas, 30 °C y 37 °C. El crecimiento se monitoreó cada 24 horas hasta por 7 días, lográndose aislar un total de 418 cepas bacterianas entre los rodales de San Diego y Hueyapan.

7.3 Bacterias promotoras de la germinación de *P. chiapensis*

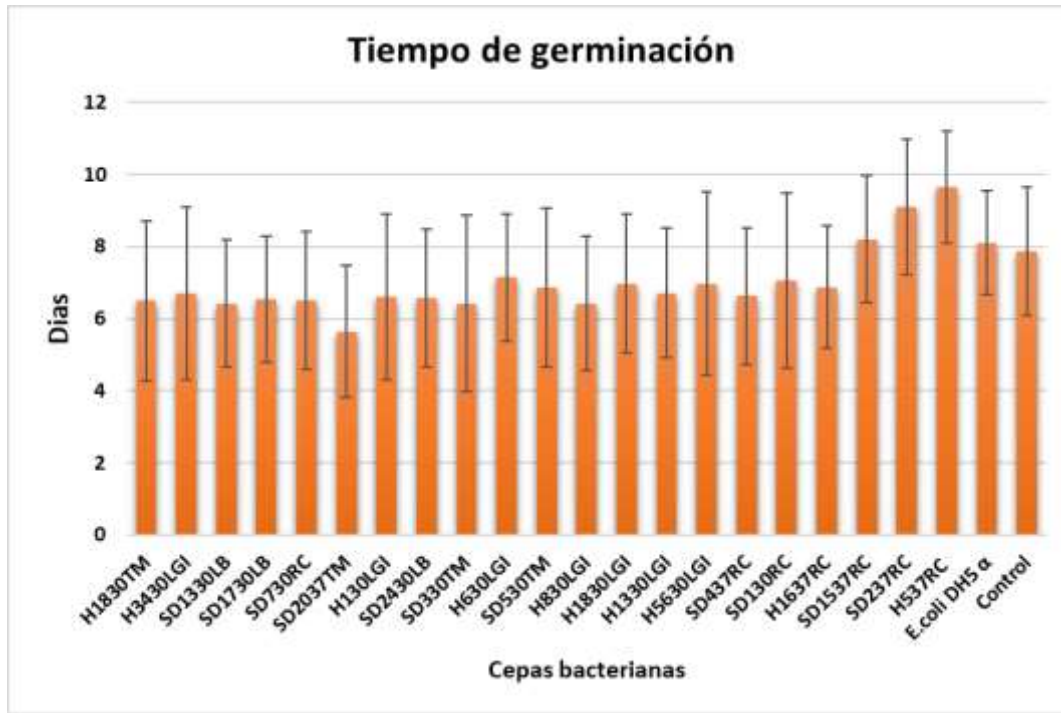
Se aislaron en total **418** cepas bacterianas provenientes de dos localidades muestreadas, siendo 177 de San Diego y 241 de Hueyapan.

Los 418 aislados bacterianos de las localidades San Diego y Hueyapan fueron inoculados a semillas axénicas de *P. chiapensis* y diariamente se evaluó la germinación de la semilla hasta el día 25. Dicho experimento se realizó por triplicado. Los parámetros analizados fueron el tiempo que tardaban las semillas en germinar y el tamaño total del brote después de 10 días de su germinación. Estos datos se procesaron en el programa Statgraphics Centurion XVI, mediante un análisis de varianza (Anova simple) utilizando la prueba múltiple de rangos con el procedimiento de Tukey-HSD, teniendo como control semillas sin inocular.

En dicho análisis se observó que, de las 418 cepas bacterianas, sólo 18 tuvieron un efecto positivo en el proceso de germinación, al disminuir significativamente el tiempo de germinación y aumentar significativamente el tamaño del germinado de *P. chiapensis* ($p < 0.05$) en comparación de semillas control no inoculadas. De estas 18 cepas promotoras de la germinación nueve fueron aisladas del rodal localizado en San Diego y son las siguientes: SD1330LB, SD1730LB, SD730RC, SD2037TM, SD2430LB, SD330TM, SD530TM, SD437RC, SD130RC, mientras que las otras 9 fueron del rodal localizado en Hueyapan y son las siguientes; H1830TM, H3430LGI, H130LGI, H1330LGI, H630LGI, H830LGI, H1830LGI, H5630LGI, H1637RC.

En las Gráficas 1 y 2 se muestra que la germinación por las 18 cepas antes mencionadas fue modificada en comparación a los controles no inoculados. Esas cepas tuvieron efectos positivos como la disminución del tiempo de germinación y el incremento del tamaño del germinado. En ambas gráficas se muestran cepas que no mostraron tener efecto positivo en ninguno de los parámetros mencionados (SD1537RC, SD237RC y H537RC), a estas cepas se les tomaron como controles negativos al igual que *Escherichia coli* DH5 α . Las semillas utilizadas como control

recibieron el mismo tratamiento de desinfección que las cepas inoculadas, pero estas semillas no fueron inoculadas con ningún microorganismo.



Grafica 1. Tiempo de germinación de cepas bacterianas: Efecto en cuanto a tiempo de germinación en semillas de *P. chiapensis* inoculadas con las cepas bacterianas aisladas de los rodales San Diego y Hueyapan. Las líneas negras indican la desviación estándar.

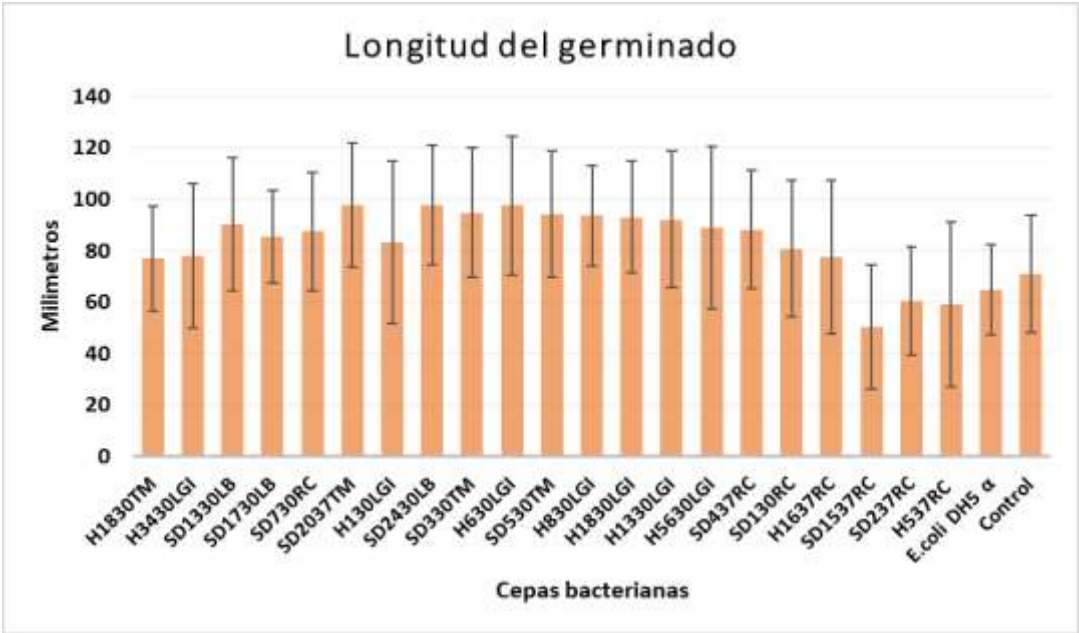
En la disminución en tiempos de germinación se pudo observar que en las cepas aisladas del rodal ubicado en la localidad de Hueyapan, la que tuvo la mayor reducción en cuanto tiempos de germinación fue H830LGI con una media de 6.42 días, seguida por las cepas H1830TM con una media de 6.5 días, H130LGI con una media de 6.42 días, H3430LGI y H1330LGI con una media de 6.71, H1637RC con una media de 6.87 días, H1830LGI y H5630LGI con una media de 6.97 días y H630LGI con una media de 7.14 días, mientras que para el control fue de 7.86 días.

Respecto al rodal ubicado en la localidad de San Diego la cepa con la mayor disminución de tiempos de germinación fue SD2037TM con una media de 5.64 días seguida por las cepas SD1330LB y SD330TM con una media de 6.42 días,

SD730RC con una media de 6.5 días, SD1730LB con una media de 6.53 días, SD2430LB con una media de 6.57 días, SD437RC con una media de 6.62 días, SD530TM con una media de 6.86 días y SD130RC con una media de 7.06 días. Se utilizaron cuatro cepas como controles negativos, tres provenientes de los rodales muestreados y una es la cepa de *E. coli* DH5 α , siendo una cepa modificada genéticamente utilizada en el laboratorio. De las cepas provenientes de los rodales muestreados dos provinieron del rodal ubicado en la localidad de San Diego y una de la localidad de Hueyapan, teniendo valores de media para las cepas del rodal de San Diego de 8.2 y 9.1 días para las cepas SD1537RC y SD237RC respectivamente, mientras que el valor de la media de la cepa proveniente de la localidad de Hueyapan fue de 9.64 para la cepa H537RC. La cepa *E. coli* DH5 α tuvo una media de 8.1 días en cuanto tiempo de germinación. En el análisis de los tiempos de germinación tomando en cuenta las cepas de ambos rodales, se pudo apreciar que la cepa bacteriana SD2037TM proveniente del rodal localizado en San Diego fue la cepa que mostró una mayor diferencia, disminuyendo en 28.24% el tiempo de germinación en comparación con las semillas no inoculadas con un valor de media de 7.86 días (Tabla 4).

Otra característica analizada fue el aumento en el tamaño del germinado, en estos resultados se pudo observar que en las 18 cepas hubo un aumento en el tamaño del germinado. De las cepas aisladas del rodal ubicado en la localidad de Hueyapan la cepa que tuvo un mayor aumento en el tamaño del germinado fue H630LGI con un valor de media de 97.5 milímetros, seguida por las cepas bacterianas H830LGI con un valor de media de 93.6 milímetros, H1830LGI con un valor de media de 93 milímetros, H1330LGI con un valor de media de 92.2 milímetros, H5630LGI con un valor de media de 88.9 milímetros, H130LGI con un valor de media de 83.38 milímetros, H3430LGI con un valor de media de 77.82 milímetros, H1637RC con un valor de media de 77.7 milímetros y H1830TM con un valor de media de 76.91 milímetros. La cepa que tuvo un mayor aumento del tamaño del germinado del rodal ubicado en la localidad de San Diego fue SD2430LB con un valor de media de 97.76 milímetros seguido por las cepas

bacterianas SD2037TM con un valor de media de 97.74 milímetros, SD330TM con un valor de media de 94.81 milímetros, SD530TM con un valor de media de 94.17 milímetros, SD1330LB con un valor de media de 90.23 milímetros,SD437RC con un valor de media de 88.12 milímetros, SD730RC con un valor de media de 87.52 milímetros, SD1730LB con un valor de media de 85.46 milímetros y SD130RC con un valor de media de 80.81 milímetros (Figura 5). Los valores de medias para las cepas tomadas como controles negativos aisladas del rodal ubicado en la localidad de San Diego fueron de 50.34 y 60.56 milímetros para las cepas SD1537RC y SD237RC respectivamente, mientras que la cepa aislada del rodal ubicado en la localidad de Hueyapan H537RC tuvo una media de 59.23 milímetros, respecto al control que tuvo una media de 70.75 milímetros (Figura 6).



Grafica 2. Longitud de germinado. Efecto en tamaño del germinado de *P. chiapensis* inoculados con las cepas bacterianas con efecto en la germinación aisladas de los rodales localizados en las comunidades de San Diego y Hueyapan. Las líneas negras indican la desviación estándar

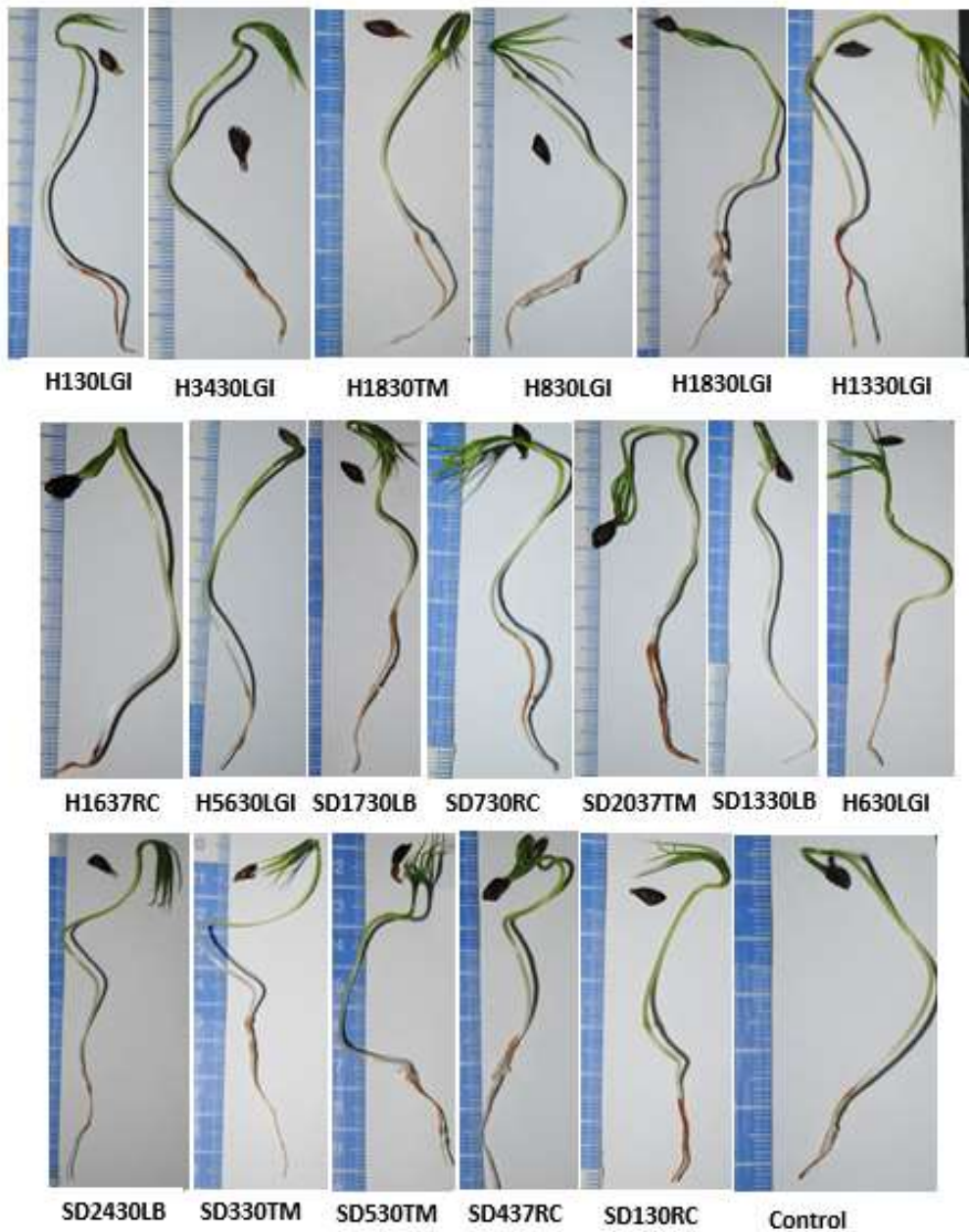


Figura 5: Germinados de semillas de *P. chiapensis* inoculadas con bacterias aisladas de rizosfera de los rodales Hueyapan y San Diego con efecto positivo en la germinación: Fotos de germinados inoculados con las 18 bacterias aisladas de rizosfera de *P. chiapensis* que mostraron un aumento en el tamaño del germinado en comparación del control. El germinado control es una semilla sin inoculo de microorganismos.



Figura 6: Germinados de semillas de *P. chiapensis* inoculadas con bacterias sin efecto positivo en la germinación: Fotos de germinados inoculados con las 4 bacterias que no mostraron efecto positivo en el tamaño del germinado en comparación del control. Las cepas H537RC, SD1537RC y H537RC son bacterias aisladas de rizosfera de *P. chiapensis*, mientras que *E. coli* DH5 α es una cepa de laboratorio. El germinado control es una semilla sin inoculo de microorganismos.

Respecto al aumento en el tamaño de longitud en el germinado de la semilla, tomando en cuenta las cepas de ambos rodales, la cepa bacteriana que mostró un mayor efecto fue la SD2430LB proveniente del rodal localizado en la localidad de San Diego, tiendo un aumento en la longitud del germinado del 38.18% en comparación del control no inoculado. En cuanto a la cepa SD2037TM el incremento en el tamaño del germinado es de un 38.15% y la cepa SD2430LB disminuye el tiempo de germinación en un 16.36 % (Tabla 4).

Para poder corroborar que el tiempo de germinación era una variable importante en el efecto que ejercía la bacteria inoculada, se procedió a realizar un análisis de regresión logística multinivel del tiempo al evento, donde la variable dependiente fue la presencia o ausencia de germinación por semilla y las variables independientes evaluadas fueron dos, una fue el tiempo de germinación en días y la otra fue la cepa inoculada por semilla comparándolo con el control no inoculado.

Tabla 4. Datos de tiempos de germinación, longitud de germinados y tasa de germinación de semillas de *P. chiapensis* inoculadas con cepas provenientes de las localidades Hueyapan y San Diego.

Cepa	Tasa de germinación (Porcentaje)	Tiempo de germinación (Días)	Longitud del germinado (Milímetros)	Tipo de efecto	Valor de p según efecto
H1830TM	60	6.50 ± 2.22 ^{ab}	76.91 ± 20.56 ^{cde}	Intensidad	0.015
H3430LGI	68	6.71 ± 2.40 ^b	77.82 ± 28.04 ^{cdef}	Intensidad	0.014
H130LGI	60	6.60 ± 2.31 ^b	83.38 ± 31.63 ^{efgh}	Intensidad	0.004
H830LGI	66	6.42 ± 1.85 ^{ab}	93.60 ± 19.60 ^{hi}	Ninguno	---
H1830LGI	64	6.97 ± 1.92 ^{bc}	93.00 ± 21.75 ^{hi}	Ninguno	---
H1330LGI	64	6.71 ± 1.80 ^b	92.20 ± 26.35 ^{ghi}	Ninguno	---
H630LGI	72	7.14 ± 1.76 ^{bcd}	97.50 ± 27.04 ⁱ	Ninguno	---
H1637RC	62	6.87 ± 1.70 ^{bc}	77.70 ± 29.78 ^{cdef}	Ninguno	---
H5630LGI	72	6.97 ± 2.55 ^{bc}	88.90 ± 31.44 ^{fghi}	Ninguno	---
SD1730LB	64	6.53 ± 1.76 ^{ab}	85.46 ± 18.04 ^{efgh}	Intensidad	0.010
SD730RC	72	6.50 ± 1.90 ^{ab}	87.52 ± 23.05 ^{efghi}	Intensidad	0.013
SD2037TM	72	5.64 ± 1.84 ^a	97.74 ± 24.28 ⁱ	Combinado	I=0.0001 C3=0.024
SD1330LB	66	6.42 ± 1.77 ^{ab}	90.23 ± 25.78 ^{ghi}	Intensidad	0.019
SD2430LB	70	6.57 ± 1.90 ^b	97.76 ± 23.33 ⁱ	Combinado	I=0.001 C2=0.018 C3=0.007
SD330TM	72	6.42 ± 2.45 ^{ab}	94.81 ± 25.14 ^{hi}	Combinado	I=0.001 C2=0.038 C3=0.013
SD530TM	56	6.86 ± 2.19 ^{bc}	94.17 ± 24.41 ^{hi}	Ninguno	---
SD437RC	70	6.62 ± 1.90 ^b	88.12 ± 23.08 ^{efghi}	Ninguno	---
SD130RC	66	7.06 ± 2.44 ^{bcd}	80.81 ± 26.73 ^{defg}	Ninguno	---
SD1537RC	44	8.20 ± 1.76 ^{ef}	50.34 ± 24.20 ^a	Ninguno	---
SD237RC	42	9.10 ± 1.89 ^{fg}	60.56 ± 21.00 ^{ab}	Ninguno	---
H537RC	42	9.64 ± 1.56 ^g	59.23 ± 32.00 ^{ab}	Ninguno	---
<i>E.coli</i> DH5 α	40	8.10 ± 1.44 ^{def}	64.94 ± 17.54 ^{abc}	Ninguno	---
Control	56	7.86 ± 1.78 ^{cde}	70.75 ± 22.80 ^{bcd}	Ninguno	---

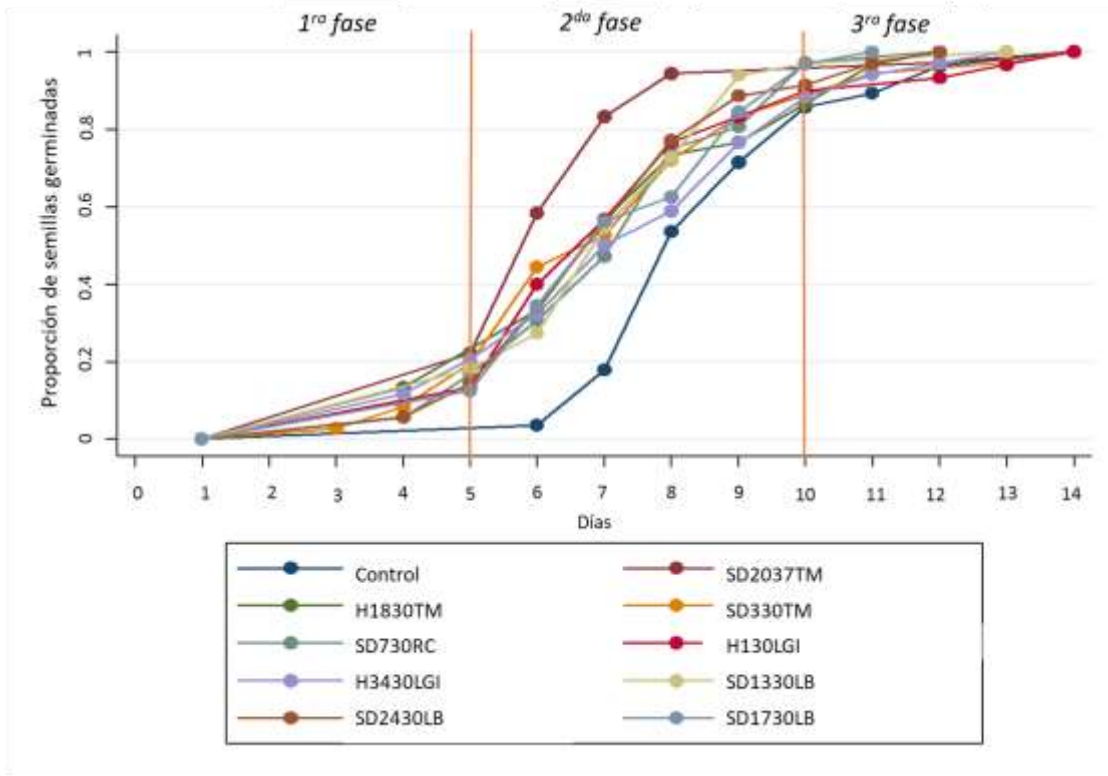
*abcdefghi Diferente letra dentro de una misma columna indica una diferencia significativa (p < 0.05).

En esta regresión se pueden determinar dos tipos de efectos nombrados calendario e intensidad. El efecto positivo intensidad se refiere a que hay una mayor proporción de semillas germinadas en un mismo periodo de tiempo con respecto al control. El efecto positivo de tipo calendario se refiere a que existe una misma proporción de semillas germinadas en tiempos anticipados en comparación al control no inoculado. Y por último hay cepas que pueden tener los dos efectos, mayor proporción de germinados a tiempos cortos en comparación al control no inoculado.

A las 18 cepas aisladas de las semillas del *P. chiapensis* de los rodales ubicados en las localidades de San Diego y Hueyapan, se les realizó el análisis de regresión logística multinivel donde se observó que el comportamiento para todas las cepas bacterianas es diferente. De las cepas aisladas en el rodal ubicado en la localidad de Hueyapan solo tres tuvieron un efecto de tipo intensidad es decir que una mayor proporción de semillas germinó en un mismo periodo de tiempo con respecto al control, las cepas que mostraron este efecto fueron H130LGI, H3430LGI y H1830TM.

Para las cepas bacterianas aisladas del rodal ubicado en la localidad de San Diego seis cepas mostraron tener un efecto intensidad; SD2030TM, SD330TM, SD730RC, SD1330LB, SD2430LB y SD1730LB. De estas seis cepas con efecto intensidad tres mostraron también tener un efecto calendario es decir que además de tener una mayor proporción de semillas germinadas en un mismo periodo de tiempo con respecto al control, existe una misma proporción de semillas germinadas en tiempos anticipados en comparación al control. Las cepas que mostraron un efecto combinado, es decir un efecto tanto calendario como intensidad, fueron las cepas SD2030TM, SD330TM, SD2430LB. Contemplando las cepas bacterianas de los rodales ubicados en la localidad de Hueyapan y San Diego se obtuvo que nueve cepas poseen el efecto intensidad, y de estas solo tres tienen el efecto calendario, solo las cepas provenientes del rodal ubicado en San Diego se pudo apreciar el

efecto calendario es decir que aumentan la proporción de semillas germinadas en comparación con el control (Tabla 4).



Grafica 3. Cepas bacterianas con efecto en tiempos de germinación de semillas de *P. chiapensis*. Cepas bacterias que ejercen un efecto de tipo calendario o intensidad en la germinación de semillas de *P. chiapensis* aisladas de los rodales localizados en las localidades de San Diego y Hueyapan. Fase 1 abarca del día 1^o al 5^o día, se refiere al inicio de la germinación; fase dos abarca del 6^o al 9^o día, se observa el incremento exponencial de germinados en comparación al control; fase 3 abarca del 10^o al 13^o día observando el término de la germinación.

Respecto al efecto calendario, se observa que dicho efecto presenta tres fases bien diferenciadas. La primera fase abarca del primero al quinto día, donde se puede observar el arranque de la germinación, pero con una tendencia al incremento de la germinación con las cepas inoculadas, la segunda fase abarca del sexto al noveno día, en esta se puede observar un incremento exponencial del número de germinados en comparación al control y finalmente del día decimo al décimo tercero se observa el término de la germinación. En las tres fases mencionadas se percibe

que las tres cepas aisladas del rodal localizado en San Diego (SD2030TM, SD330TM, SD2430LB) actúan promoviendo la germinación con ambas características, teniendo un efecto calendario e intensidad (Grafica 3).

A su vez, se analizaron los tres periodos de tiempo en el análisis de regresión logística multinivel, para las nueve cepas bacterianas. En el tiempo uno ninguna de las bacterias probadas tuvo efecto significativo con respecto a los controles no inoculados. Sin embargo, hubo una tendencia al incremento de la germinación, donde se observa que, en las semillas tomadas como control al quinto día, aún no hay ningún germinado en comparación con semillas inoculadas con las cepas H130LGI, H3430LGI, H1830TM, SD2030TM, SD330TM, SD730RC, SD1330LB, SD2430LB y SD1730LB (Gráfica 3). En éstas se observa una proporción de germinación de semillas de 0.1 a 0.2, sin embargo, en esta fase no se apreció un efecto calendario significativo. En los periodos dos y tres se observa efectos positivos de tipo calendario de alguna de las tres cepas bacterianas aisladas del rodal ubicado en la localidad de San Diego (SD2030TM, SD330TM y SD2430LB).

La cepa SD2037TM tuvo un efecto significativo en el tercer periodo ($p=0.0001$), la cepa SD330TM tuvo un efecto significativo tanto en el segundo periodo ($p=0.038$), como en el tercer periodo ($p=0.013$), mientras que la cepa SD2430LB, también tuvo un efecto significativo tanto en el segundo periodo ($p=0.018$), como en tercer periodo ($p=0.007$).

Las bacterias que mejoraron el porcentaje de germinación en un 12% en comparación del control son SD2037TM, SD330TM y SD730RC; las dos primeras tienen efecto tipo calendario ya que germinan antes que el control mientras que SD730RC sólo tiene el efecto intensidad.

La cepa SD2430LB superó al control con el 10% más de germinación, aunándose el efecto de tipo calendario. Las siguientes cepas tuvieron un efecto significativo en la intensidad de germinación: H3430LGI con más del 8% de germinación,

SD1330LB con 6%, H1637RC con 2%; H1830TM y H130LGI estas últimas germinaron igual que el control.

A las cepas que fueron capaces de ejercer un efecto tanto de intensidad como de calendario se analizaron sus poblaciones en los dos periodos donde se observó el efecto calendario, para lo cual se colocaron inóculos de 10^7 UFC por semilla. En el primer periodo se observaron poblaciones semejantes a la inoculada, en el segundo y tercer periodo las poblaciones aumentaron de 10^9 a 10^{10} UFC, lo que indica que estas bacterias (SD2037TM, SD2430LB y SD330TM) se establecen y aumentan su población en la semilla conforme el paso del tiempo (Tabla 5).

Tabla 5. Población de cepas con un efecto calendario en la germinación de *P. chiapensis* en semillas inoculadas.

Cepa	UFC en el 1^{er} periodo	UFC en el 2^{do} periodo	UFC en el 3^{er} periodo
SD2037TM	5×10^7	9×10^9	8×10^{10}
SD2430LB	2×10^6	7×10^9	5×10^{10}
SD330TM	5×10^5	6×10^9	8×10^9
Control	---	---	---

Población de las tres cepas bacterianas en las tres fases observadas en efecto de tipo calendario. Cepas aisladas del rodal ubicado en la localidad de San Diego

Con estos análisis pudimos establecer que las 18 cepas bacterianas analizadas de los rodales localizados en las localidades de Hueyapan y San Diego son capaces de promover la germinación de *P. chiapensis*.

7.4 Análisis de correlación canónica entre las propiedades fisicoquímicas de los rodales Hueyapan, San Diego y Cuatempan de *Pinus chiapensis*.

Se analizaron las propiedades fisicoquímicas de los suelos de estos tres lugares pudiendo observar variantes en la composición de sus suelos. En estos rodales se

procedió al aislamiento de bacterias que promovieran la germinación de *P. chiapensis*. Sólo en los rodales catalogados como no alterados se pudieron obtener aislamientos de cepas promotoras de la germinación (Vera B. C., 2014). Al observar los datos antes mencionados se procedió a realizar un análisis de correlación canónica para observar el comportamiento entre los dos tipos de rodales en relación con la composición de sus suelos.

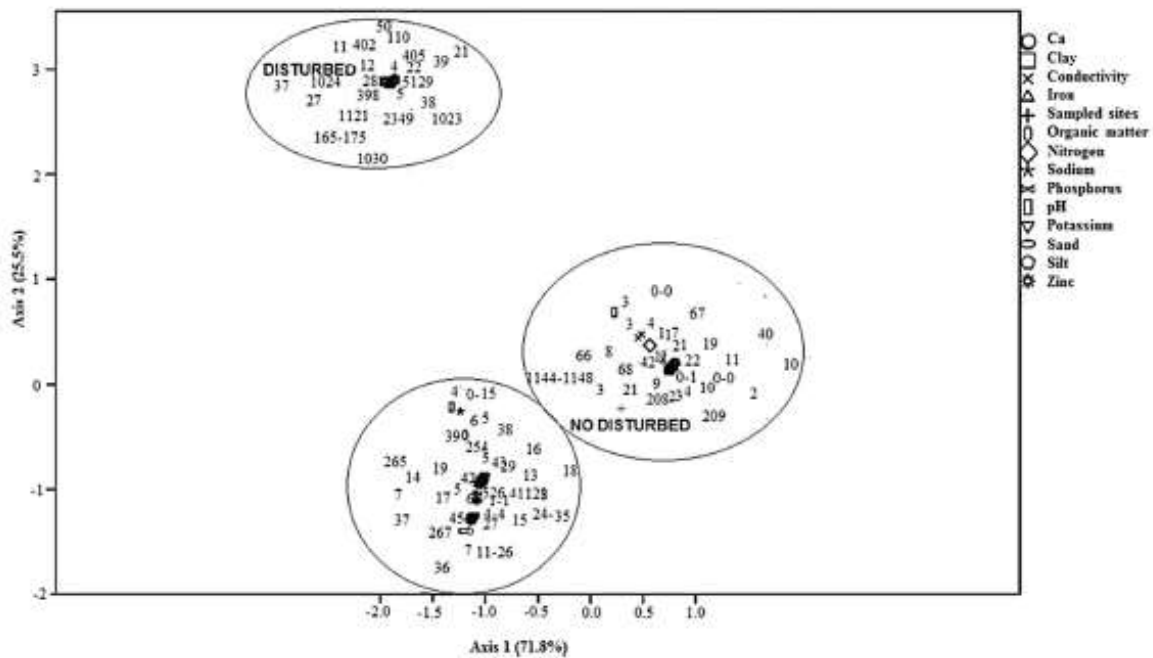


Figura 7. Análisis de correlación canónica de los rodales muestreados. Relación de las propiedades fisicoquímicas de los suelos de los tres rodales muestreados ubicados en las localidades de San Diego, Hueyapan y Cuatempan. Correspondiendo a los rodales no alterados los ubicados en las localidades de San Diego y Hueyapan y mientras que el rodal alterado corresponde a la localidad de Cuatempan

Este análisis mostró que los datos del sitio perturbado están claramente separados al formar un grupo independiente al de los sitios no perturbados (Figura 7). En la primera dimensión se obtuvo un valor alfa de Cronbach mayor a 0.970 explicando el 71.8% de la varianza, mientras que en la segunda dimensión fue de 0.776 correspondiendo al 25.54% de la varianza. Las variables del suelo zinc, potasio, limo, fósforo, hierro, sodio, arena, material orgánico y calcio fueron representativas

en la primera dimensión, lo que indica que estas variables contribuyen principalmente al agrupamiento, mientras que en la segunda dimensión la arcilla y el sitio muestreado fueron representativos. Las variables más estrechamente relacionadas en el sitio perturbado o alterado fueron arcilla, zinc, calcio, hierro y fósforo. El sodio fue agrupado en los rodales no alterados y en otro grupo aislado, mientras que las otras variables estaban relacionadas con ambos sitios muestreados o incluso agrupados en otro grupo no relacionado con los sitios muestreados.

7.5 Identificación de bacterias promotoras de la germinación de *P. chiapensis*

Inicialmente se realizó una identificación fenotípica en el medio LB y posteriormente la identificación genotípica.

A los aislados analizados se les caracterizó macroscópica y microscópicamente. Las colonias mostraron morfología, color y consistencia constantes en agar LB. En cuanto la caracterización microscópica se analizó su morfología celular, tamaño, movilidad a dos diferentes temperaturas de crecimiento, así como el tipo de tinción de Gram que presentaban. Para ambas caracterizaciones se hicieron 5 repeticiones, observando consistencia en los datos analizados (Tabla 6).

Para la identificación genotípica se utilizó el gen que codifica para el 16S RNA ribosomal, el cual es un marcador molecular que es capaz de diferenciar entre géneros bacterianos (Weisburg W. G. *et al*, 1991). Los amplicones del gen 16S rDNA fueron clonados en el vector pGEM (Figura 8). Las construcciones se verificaron por PCR del gen 16S rDNA clonado en el vector pGEM con los oligonucleótidos UN27F 5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y UN1392R 5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3' (Biodiversa Inc., México). Dicho procedimiento se realizó con las 18 cepas bacterianas aisladas de los rodales localizados en las comunidades San Diego y Hueyapan (Figura 8).

Tabla 6. Características fenotípicas en medio LB de las cepas bacterianas.

epa	Tamaño y forma de la colonia	Color de la colonia	Movilidad		Morfología microscópica	Tinción de Gram
			30 °C	37 °C		
SD2037TM	Mediana, irregular	Blanca-amarillenta opaca	Móviles	Movilidad baja	Bacilo, pequeño	-
H1330LGI	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo, pequeño	-
H1830TM	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo, pequeño	+
H1830LGI	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo, pequeño	-
H3430LGI	Mediana. Irregular	Blanca-amarillenta opaca	Móviles	Movilidad nula	Bacilo, medio	+
SD2430LB	Mediana. Irregular	Blanca-amarillenta opaca	Movilidad baja	Movilidad baja	Bacilo, medio	-
SD130RC	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta opaca	Móviles	Móviles	Bacilo, medio	+
SD1330LB	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo, medio	+
H830LGI	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo, pequeño	-
SD37RC	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo, pequeño	+
H5630LGI	Pequeña, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Movilidad baja	Movilidad nula	Coco, pequeño	+
H630LGI	Pequeña, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Coco, pequeño	+
SD330TM	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo., pequeño	-
H130LGI	Pequeña, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo, medio.	-
H1637RC	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Movilidad baja	Móviles	Bacilo. medio	-
SD1730LB	Mediana, irregular	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo, medio	+
SD730RC	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta brillante	Móviles	Móviles	Bacilo, pequeño	+
SD530TM	Mediana, uniforme	Blanca- amarillenta opaca	Móviles	Movilidad baja	Bacilo, medio	+
SD1537RC	Mediana, uniforme	Blanca-amarillenta opaca	Móviles	Móviles	Bacilo, pequeño	+
SD237RC	Mediana, irregular	Blanca-amarillenta opaca	Móviles	Móviles	Bacilo, pequeño	+
H537RC	Mediana irregular	Blanca-amarillenta opaca	Móviles	Móviles	Bacilo, pequeño	+

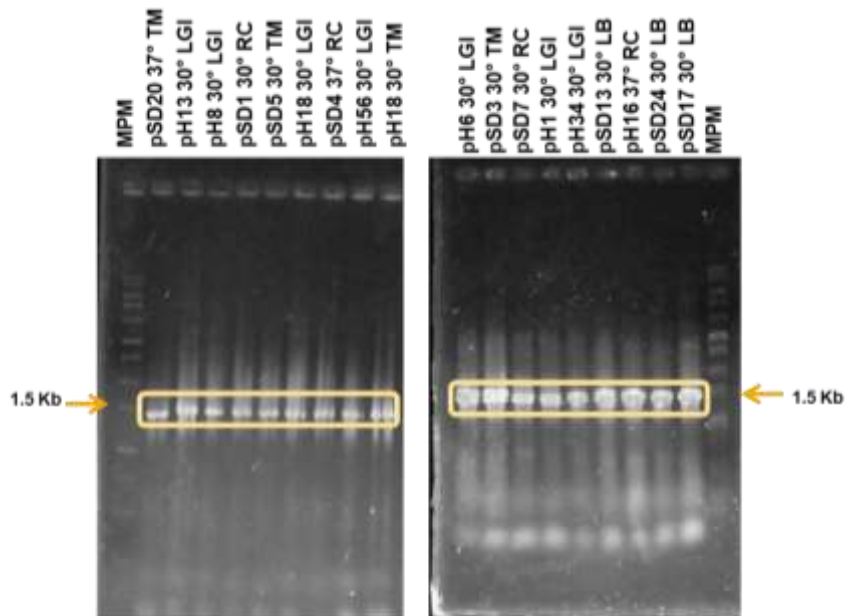


Figura 8. Amplificación del gen 16S rDNA clonado en el vector pGEM. Amplicón del gen 16 rDNA ribosomal clonado en el plásmido pGEM. Se muestran las 18 cepas bacterianas aisladas de los rodales ubicados en las localidades San Diego y Hueyapan.

Las construcciones obtenidas fueron secuenciadas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias del programa BLAST, con las secuencias recopiladas de cada una de las 18 secuencias obtenidas, se construyeron árboles filogenéticos para cada una de ellas. La distancia evolutiva se infirió mediante el uso de un análisis de Neighbor joining.

Los aislados SD130RC, SD530TM, SD437RC, SD1330LB, SD730LB, H3430LGI, SD1730LB, H1830TM se localizaron cercana del género *Bacillus* (Figura 9); los aislados H1330LGI, H1830LGI y H130LGI cerca de *Paraburkholderia* (Figura 10); los aislados H5630LGI Y H630LGI cerca de *Staphylococcus* (Figura 11); el aislado H1637RC próximo a *Cupriavidus* (Figura 12); el aislado SD2037TM cerca de *Dyella* (Figura 13); el aislado H830LGI cerca de *Escherichia* (Figura 14); el aislado SD2430LB cerca de *Luteimonas* (Figura 15); y el aislado SD330TM próximo a *Enterobacter* (Figura 16). Las tres cepas utilizadas como controles negativos aisladas de los dos rodales ubicado en la localidad de San Diego y Hueyapan; SD1537RC, SD237RC y H537RC fueron localizadas cerca del género *Bacillus* (Figura 9).

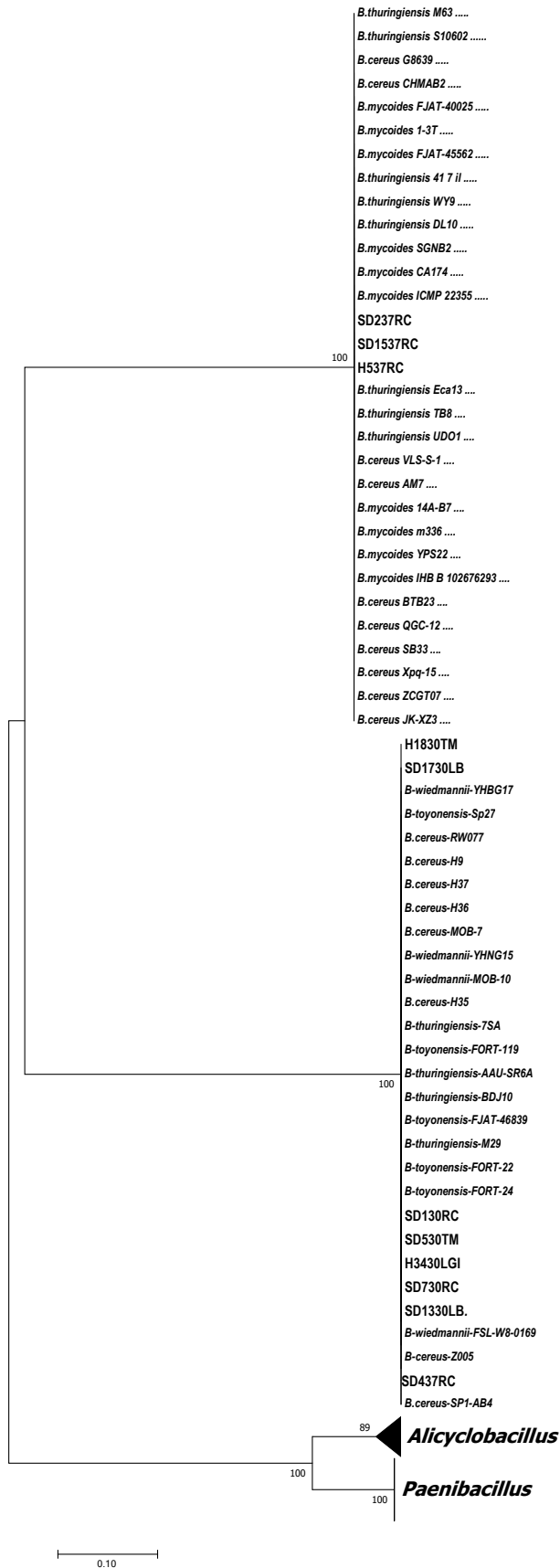


Figura 9: Árbol filogenético de las cepas bacterianas SD130RC, SD530TM, SD437RC, SD1330LB, SD730LB, H3430LGI, SD1730LB, H1830TM, SD1537RC, SD237RC y H537RC: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama =1.22256098. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 112 secuencias de nucleótidos. B: *Bacillus*.

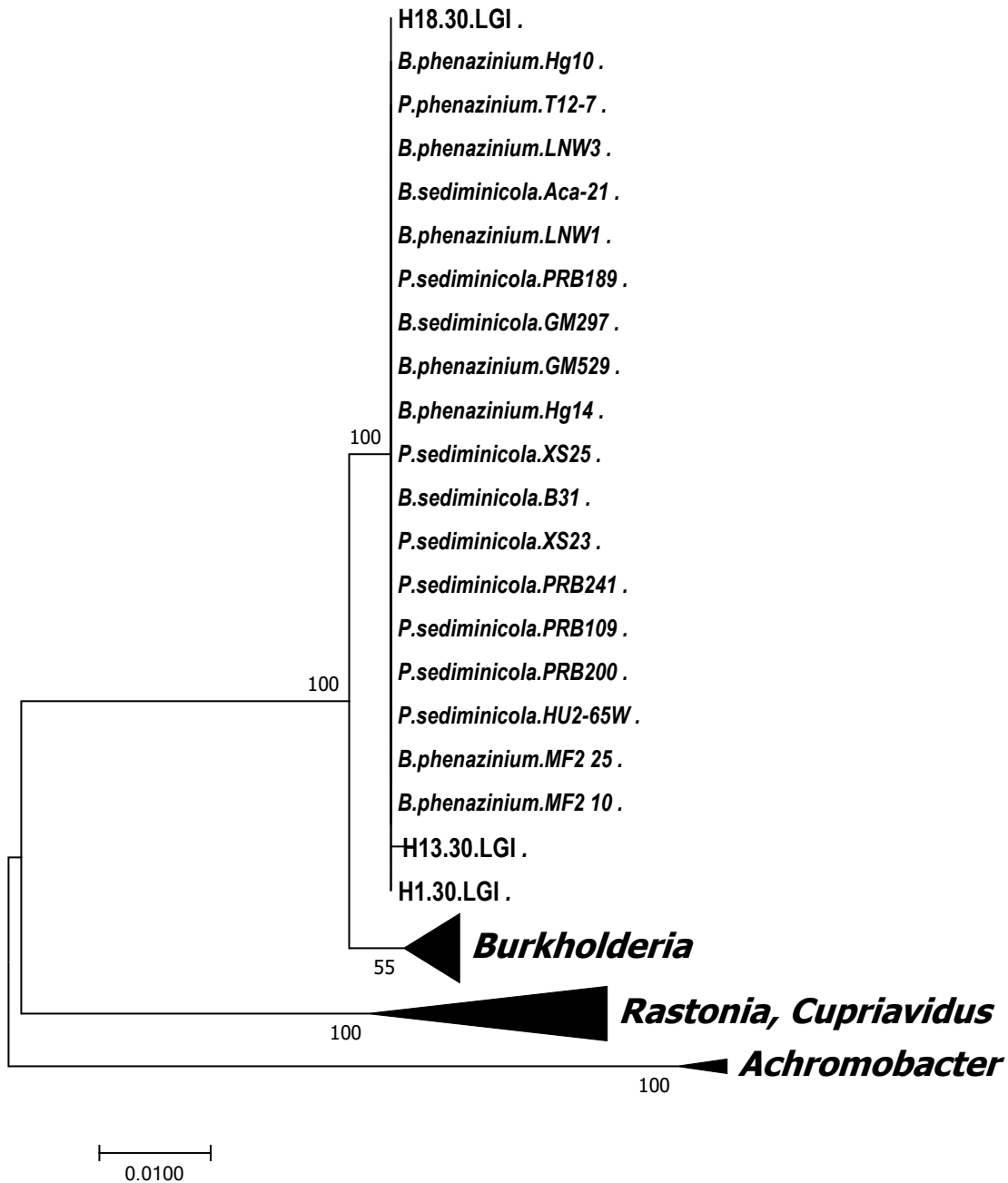


Figura 10: Árbol filogenético de las cepas bacterianas H1830LGI, H130LGI y H1330LGI: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.7819341. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 59 secuencias de nucleótidos. P: *Paraburkholderia*, B: *Burkholderia*.

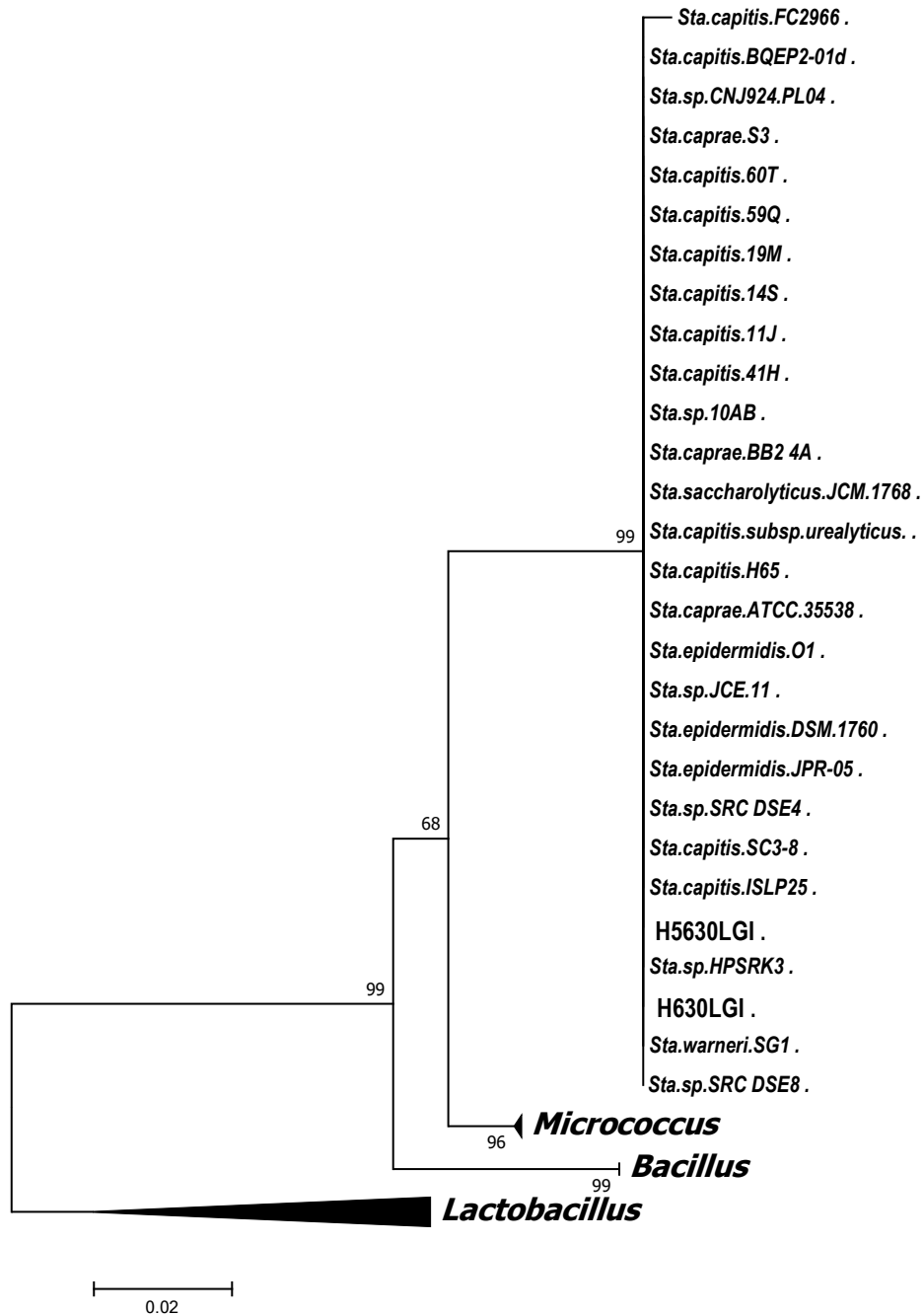


Figura 11: Árbol filogenético de las cepas bacterianas H5630LGI y H630LGI: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.403262030. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 48 secuencias de nucleótidos. Sta: *Staphylococcus*.

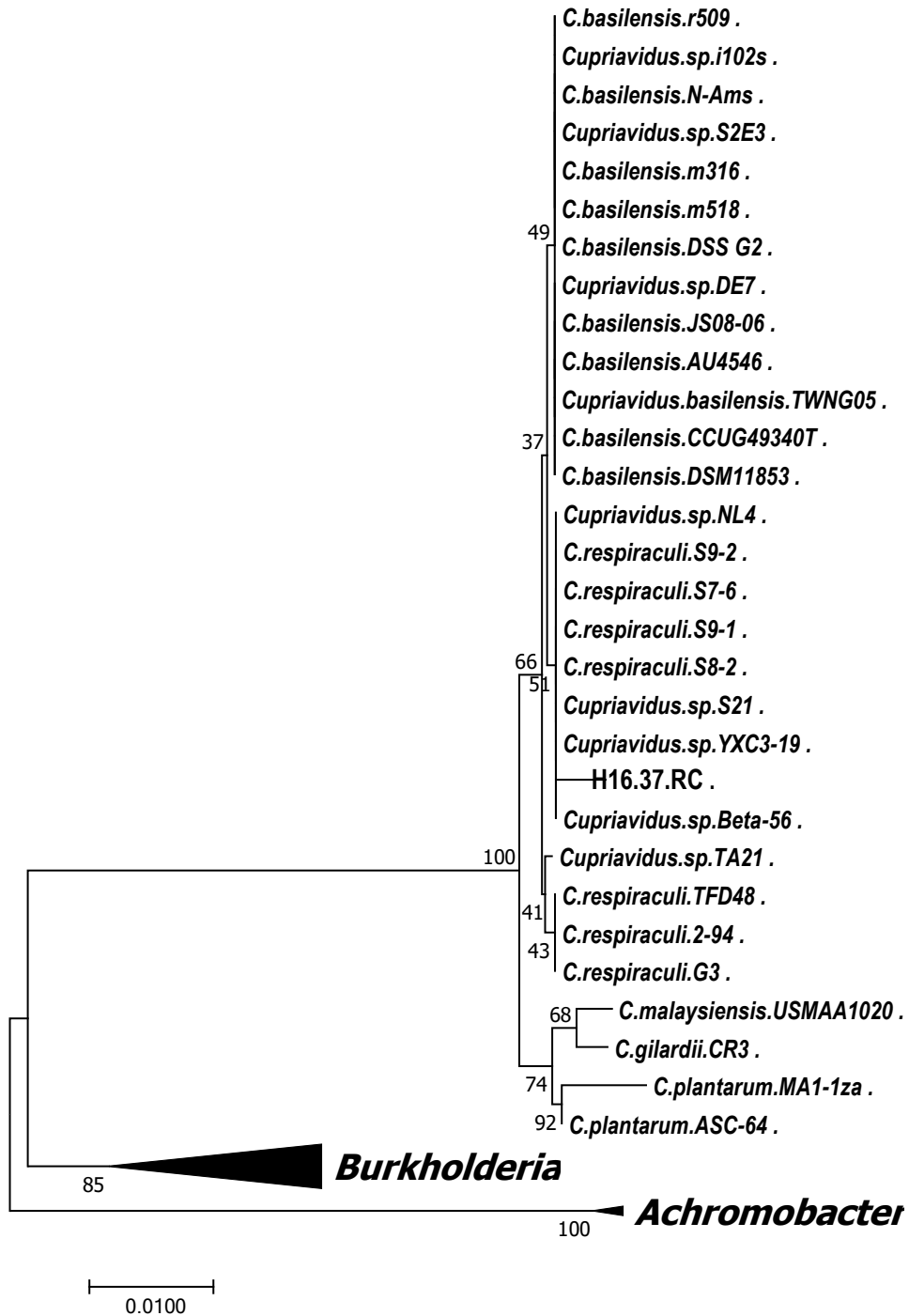


Figura 12: Árbol filogenético de cepa bacteriana H1637RC: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.3459058. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 47 secuencias de nucleótidos. C: *Cupriavidus*.

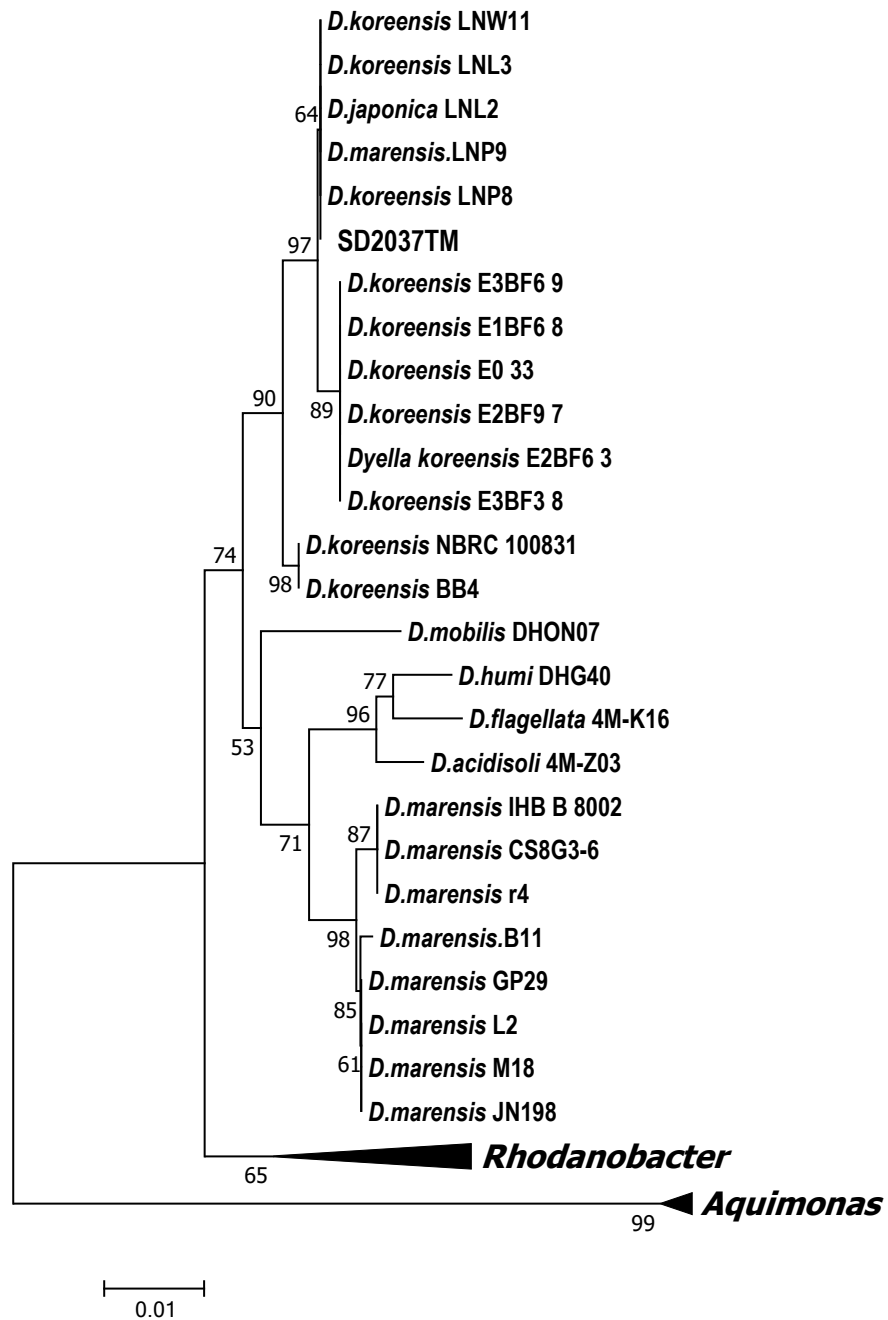


Figura 13: Árbol filogenético de cepa bacteriana SD2037TM: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.28829402. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 39 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes. D: *Dyella*.

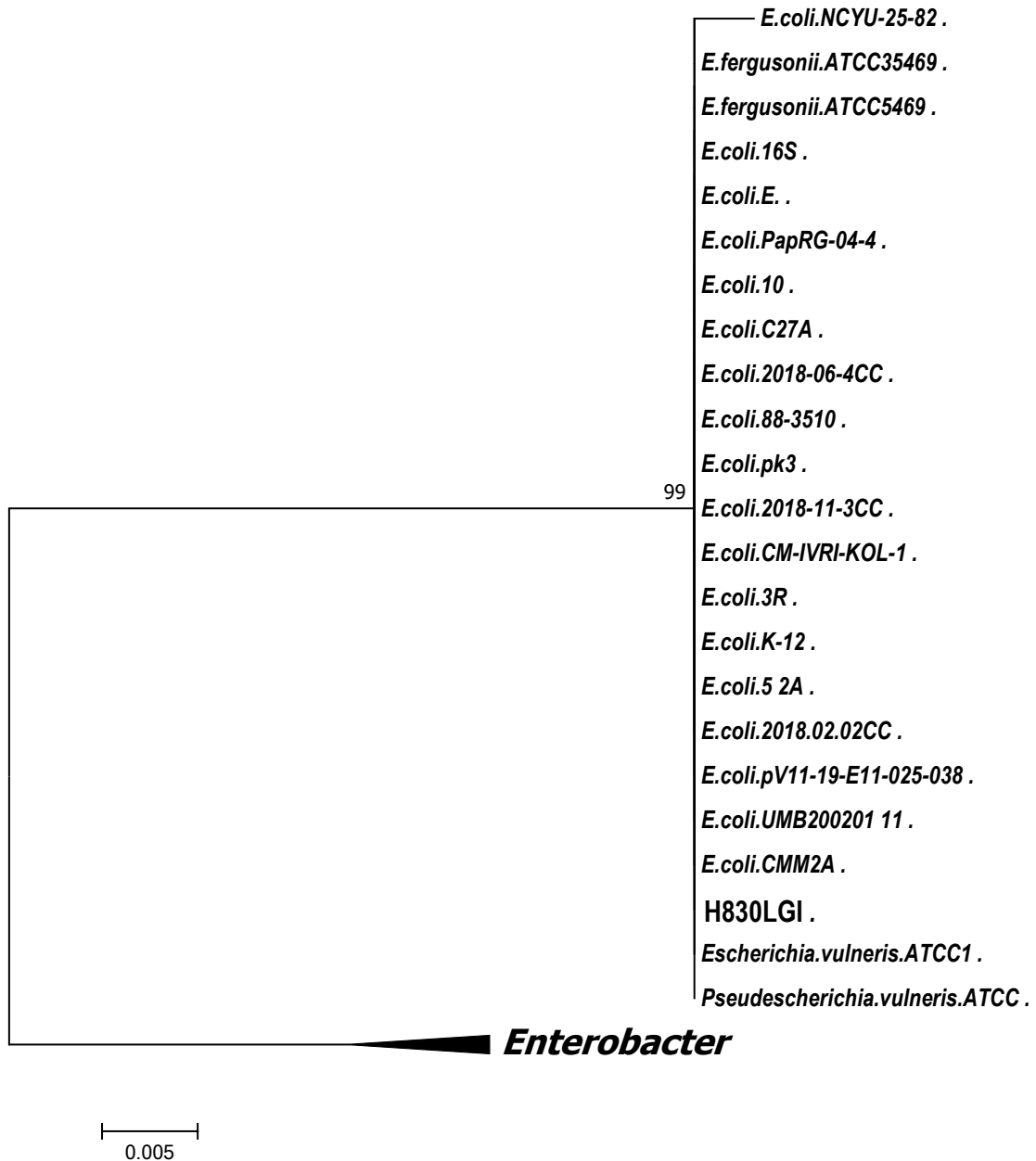


Figura 14: Árbol filogenético de la cepa bacteriana H830LGI: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.8780352. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 28 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes. E: *Echerichia*.

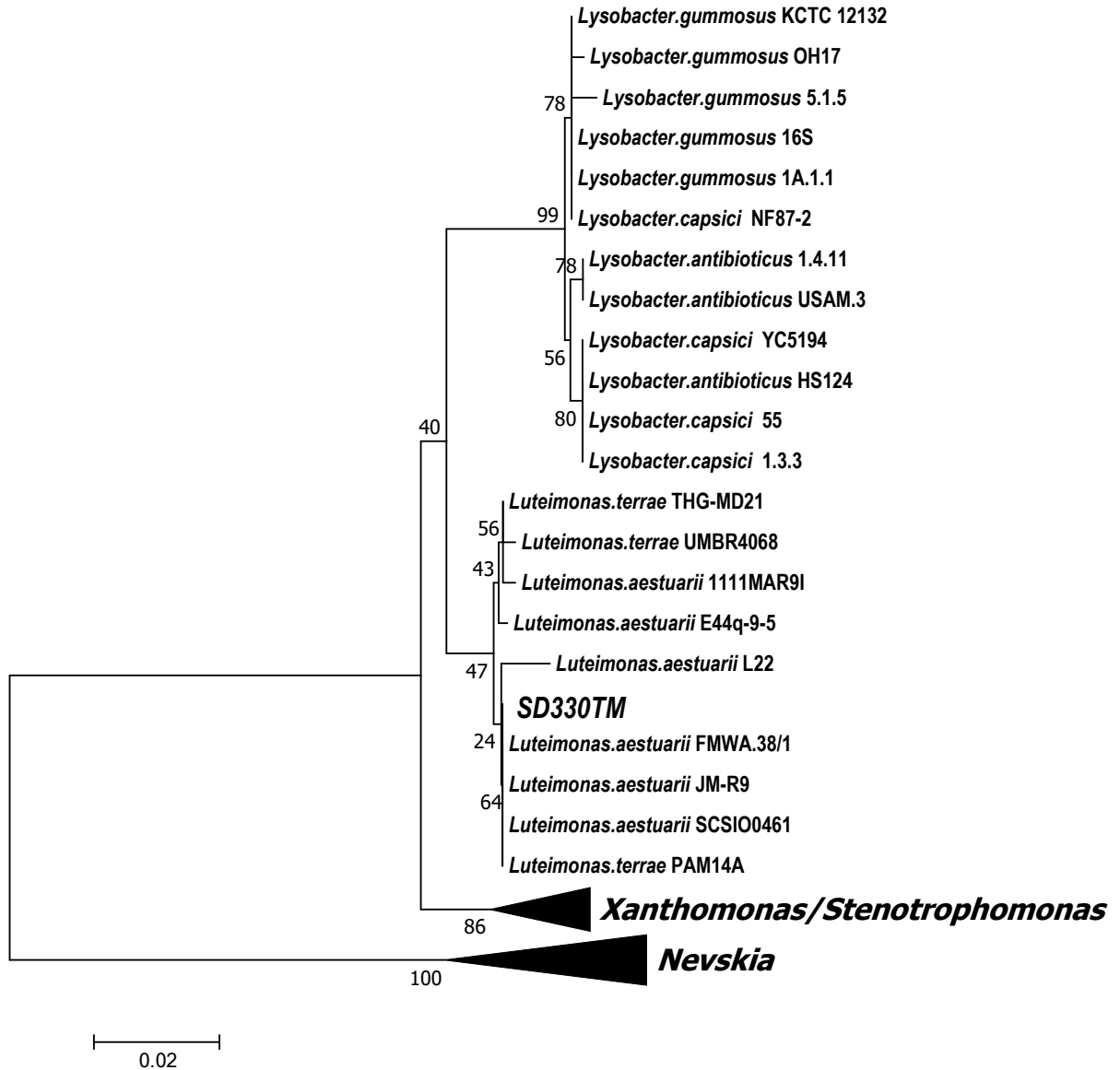


Figura 15: Árbol filogenético de la cepa bacteriana SD330TM: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.41380602. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 50 secuencias de nucleótidos.

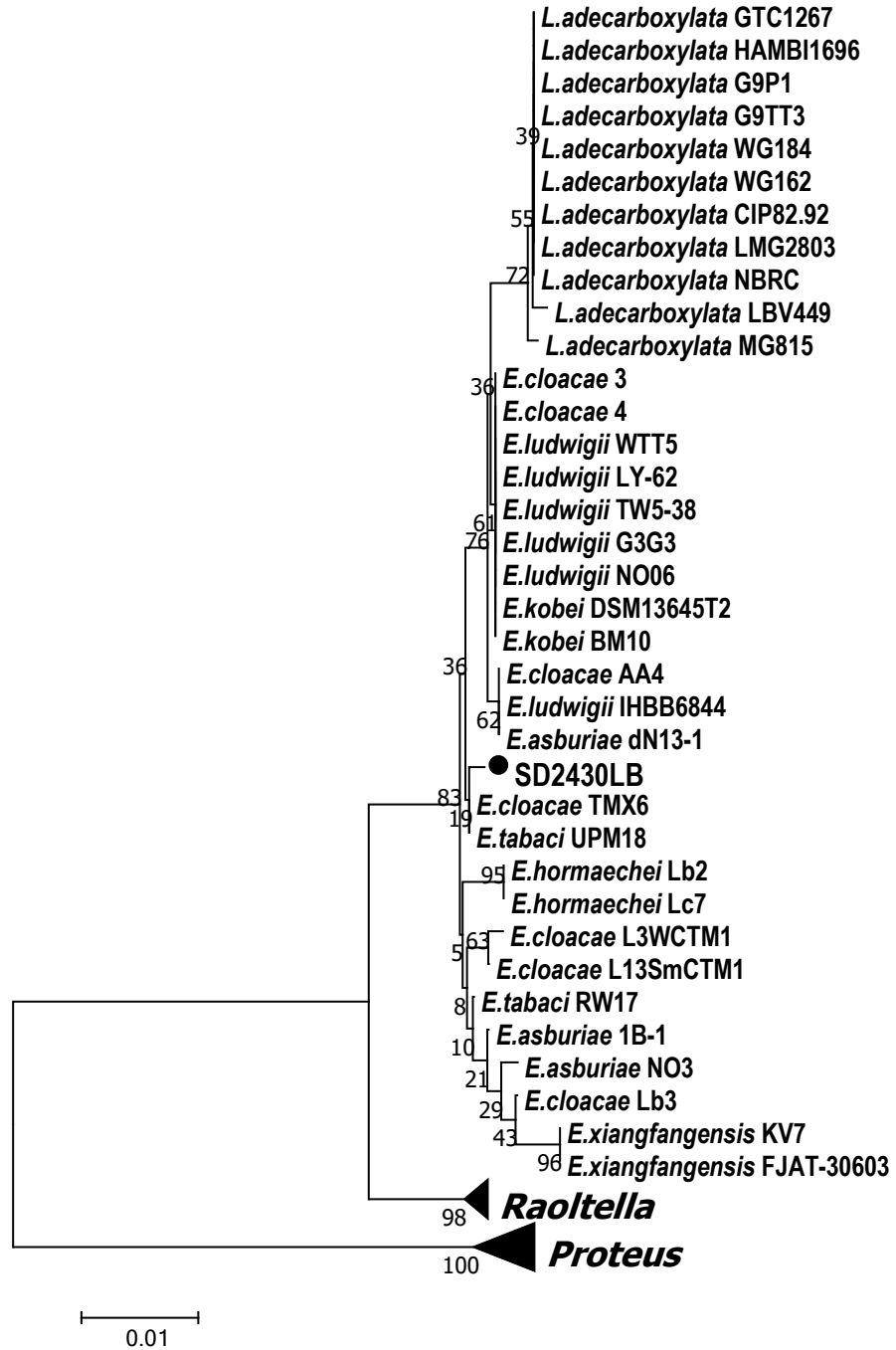


Figura 16: Árbol filogenético de la cepa bacteriana SD2430LB: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.14355345. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 69 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes. E: *Enterobacter*.

7.6 Compatibilidad de cepas bacterianas que disminuyen el tiempo de germinación con efecto calendario

Para poder visualizar si las cepas bacterianas que ejercieron el efecto calendario en la germinación de *P. chiapensis* (SD2037TM, SD2430LB y SD330TM) eran capaces de coexistir en un mismo ambiente y poder visualizar como era la dinámica de sus poblaciones respecto al tiempo, se procedió a sembrarlas juntas en un medio rico (LB), en un medio mínimo (medio K malato) y en el medio papa dextrosa. Para comprobar que las cepas tenían la capacidad de crecer solas en dichos medios se sembraron cada una ellas por separado, pudiendo observar un buen crecimiento en estos medios. Se colocó un inoculo de 500 microlitros de las tres cepas bacterianas con una densidad óptica de 0.01.

Se observó que al coinocular las tres cepas bacterianas en medio LB se aisló la cepa SD2430LB perteneciente al género *Luteimonas* en poblaciones de 10^5 UFC, a las 24, 48 y 72 horas. Sin embargo, la cepa SD330TM perteneciente al género *Enterobacter* sólo se detectó a las 72 horas en poblaciones de 4×10^2 UFC, mientras que la cepa SD2037TM perteneciente al género *Dyella* no fue detectada en ninguno de los tiempos analizados (Tabla 7).

En medio mínimo base K a las 24 horas se pudo aislar la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) y la cepa SD330TM (*Enterobacter*) en poblaciones de 4×10^6 y 2×10^5 UFC, respectivamente. A las 48 horas las poblaciones de la cepa SD330TM (*Enterobacter*) disminuyeron a 2×10^3 UFC, mientras que la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) aumentó a 2×10^8 UFC. Por último, a las 72 horas la cepa SD330TM (*Enterobacter*) ya no se logró detectar y la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) bajo su población a 8×10^4 UFC. Respecto a la cepa SD2037TM (*Dyella*) no pudo detectar a ningún tiempo analizado (Tabla 7).

En el medio papa dextrosa la coinoculación de las tres cepas bacterianas tuvo un comportamiento similar a los dos medios de cultivos anteriores y se observó que las tres cepas bacterianas no son capaces de coexistir. La cepa SD2430LB

(*Luteimonas*) es capaz de crecer de manera constante en las 72 horas analizadas, observando a las 24 horas una población de 2×10^9 UFC, a las 48 horas de 7×10^8 UFC y a las 72 horas una población de 1×10^9 UFC (Tabla 7).

A la vez se analizó el crecimiento de estas cepas bacterianas en pareja. Aunque de manera individual crecieron en medio mínimo base K cuando fueron coinoculadas no crecieron en ninguna combinación en los tres tiempos analizados (Tabla 7).

En el ensayo de co-cultivo en pares en medio LB de la cepa SD2037TM (*Dyella*) con SD330TM (*Enterobacter*) no se pudo detectar la cepa SD2037TM (*Dyella*), sólo la cepa SD330TM. Las poblaciones de dicha cepa fueron disminuyendo con el paso del tiempo pudiendo detectar una población de 2×10^7 UFC a las 24 horas, 3×10^2 UFC a las 48 horas y a las 72 horas 4×10^1 UFC. En la coinoculación en el medio LB de las cepas SD2037TM (*Dyella*) y SD2430LB (*Luteimonas*) no se pudo detectar el crecimiento de ninguna cepa. Al combinar las cepas SD330TM (*Enterobacter*) y la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) sólo la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) fue capaz de crecer inhibiendo por completo el crecimiento de la cepa SD330TM (*Enterobacter*). Las poblaciones de SD2430LB fueron de 4×10^5 a las 24 horas, 2×10^8 a las 48 horas y 2×10^9 a las 72 horas (Tabla 7).

En co-cultivo en papa dextrosa, las cepas SD2037TM (*Dyella*) y SD330TM (*Enterobacter*) mostraron crecimiento retardado y sólo pudieron ser detectadas hasta las 72 horas en poblaciones de 2×10^1 y 2×10^2 , respectivamente. Las cepas SD2037TM (*Dyella*) y SD2430LB (*Luteimonas*) no crecieron en ninguno de los tiempos analizados. En co-cultivo de SD330TM (*Enterobacter*) y SD2430LB (*Luteimonas*), sólo la última mostró crecimiento, obteniendo poblaciones de 2×10^9 a las 24 horas, 8×10^8 a las 48 horas y de 3×10^9 a las 72 horas (Tabla 7).

Estos resultados nos dan una idea de la interacción que poseen estas cepas *in vitro* y con poblaciones previamente estandarizadas, sin embargo, en la rizosfera no es posible controlar dichas condiciones.

Tabla 7. Análisis de poblaciones de PGPRs en co-cultivo.

Grupo	Cepas	Medio rico LB			Medio mínimo base K			Medio Papa dextrosa		
		24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Cocultivo de 3 cepas	<i>Dyella sp.</i> (SD2037TM)	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	<i>Enterobacter sp.</i> (SD330TM)	NC	NC	4 x 10 ² UFC	2 x 10 ⁵ UFC	2 x 10 ³ UFC	NC	NC	NC	NC
	<i>Luteimonas sp.</i> (SD2430LB)	6 x 10 ⁵ UFC	5 x 10 ⁵ UFC	7 x 10 ⁵ UFC	4 x 10 ⁶ UFC	2 x 10 ⁸ UFC	8 x 10 ⁴ UFC	2 x 10 ⁹ UFC	7 x 10 ⁸ UFC	1 x 10 ⁹ UFC
<i>Dyella sp.</i> (SD2037TM) / <i>Enterobacter sp.</i> (SD330TM)	<i>Dyella sp.</i> (SD2037TM)	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	2 x 10 ¹ UFC
	<i>Enterobacter sp.</i> (SD330TM)	2 x 10 ⁷ UFC	3 x 10 ² UFC	4 x 10 ¹ UFC	NC	NC	NC	NC	NC	2 x 10 ² UFC
<i>Dyella sp.</i> (SD2037TM) / <i>Luteimonas sp.</i> (SD2430LB)	<i>Dyella sp.</i> (SD2037TM)	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	<i>Luteimonas sp.</i> (SD2430LB)	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<i>Enterobacter sp.</i> (SD330TM) / <i>Luteimonas sp.</i> (SD2430LB)	<i>Enterobacter sp.</i> (SD330TM)	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	<i>Luteimonas sp.</i> (SD2430LB)	4 x 10 ⁵ UFC	2 x 10 ⁸ UFC	2 x 10 ⁹ UFC	NC	NC	NC	2 x 10 ⁹ UFC	8 x 10 ⁸ UFC	3 x 10 ⁹ UFC
<i>Dyella sp.</i> (SD2037TM)	<i>Dyella sp.</i> (SD2037TM)	3 x 10 ⁷ UFC	6 x 10 ⁸ UFC	5 x 10 ⁸ UFC	2 x 10 ⁷ UFC	7 x 10 ⁸ UFC	6 x 10 ⁸ UFC	1 x 10 ⁷ UFC	9 x 10 ⁷ UFC	5 x 10 ⁸ UFC
<i>Enterobacter sp.</i> (SD330TM)	<i>Enterobacter sp.</i> (SD330TM)	6 x 10 ⁷ UFC	3 x 10 ⁸ UFC	6 x 10 ⁸ UFC	1 x 10 ⁷ UFC	9 x 10 ⁸ UFC	8 x 10 ⁸ UFC	5 x 10 ⁷ UFC	3 x 10 ⁸ UFC	8 x 10 ⁸ UFC
<i>Leclercia sp.</i> (SD2430LB)	<i>Leclercia sp.</i> (SD2430LB)	5 x 10 ⁷ UFC	8 x 10 ⁹ UFC	2 x 10 ⁹ UFC	2 x 10 ⁷ UFC	8 x 10 ⁸ UFC	8 x 10 ⁸ UFC	8 x 10 ⁷ UFC	8 x 10 ⁹ UFC	9 x 10 ⁹ UFC

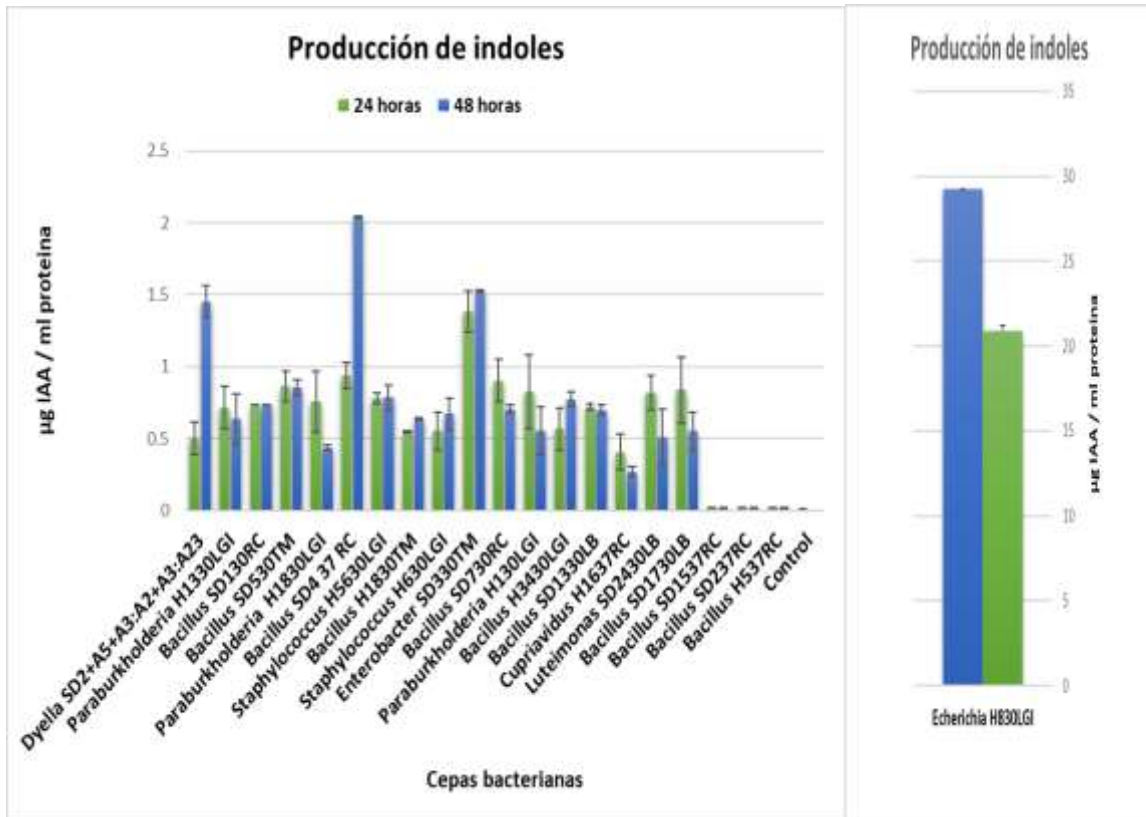
Análisis de las cepas SD2430LB, SD2037TM y SD330TM con efecto de proporción de germinación tipo calendario en semillas de *P. chiapensis*.

NC: No Creció

7.7 Características PGPR de bacterias promotoras de la germinación de *P. chiapensis*.

Para poder conocer si las cepas bacterianas con capacidad de promover la germinación poseían algún mecanismo PGPRs se les analizó la capacidad de producir compuestos involucrados en la promoción de crecimiento de plantas como la producción de auxinas (Ácido Indol Acético (AIA) y giberelinas (AG)).

Esta evaluación se realizó con un pre cultivo de toda la noche y se estandarizaron todas las cepas bacterianas a una densidad óptica de 0.05. La cuantificación de Ácido indol-3-acético se realizó a las 24 y 48 horas, observando que todas las cepas tienen la capacidad de producirlo a estos tiempos (Grafica 4).



Grafica 4: Producción de indoles. Indoles detectados a las 24 y 48 horas en las cepas bacterias promotoras de la germinación de semillas de *P. chiapensis* aisladas de los rodales ubicados en las localidades San Diego y Hueyapan

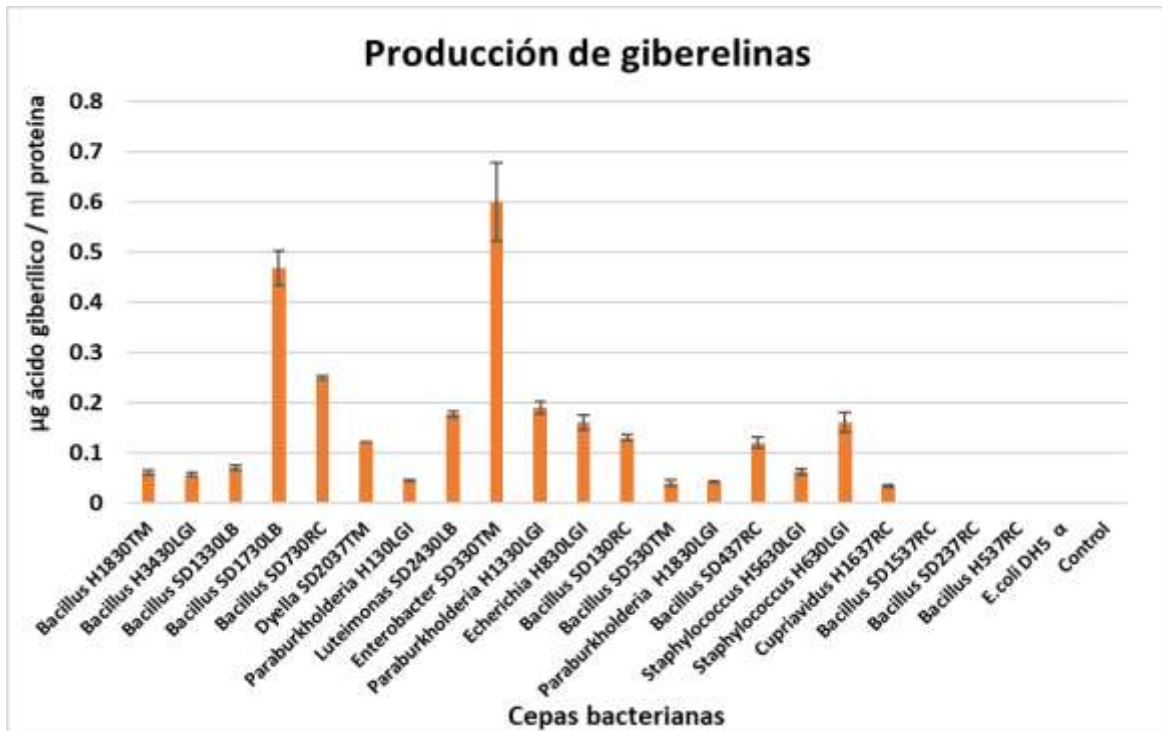
Las 18 cepas bacterianas evaluadas produjeron ácido indol-3 acético en un rango de 0.4 hasta 21 µg/ml de proteína a las 24 horas y de 0.44 hasta 29 microgramos de ácido indol-3 acético por mililitro de proteína a las 48 horas. Los valores más altos detectados a las 24 horas fueron de 21 µg/ml de proteína para la cepa H830LGI (*Echerichia*), 1.38 µg/ml de proteína para la cepa SD330TM (*Enterobacter*), 0.94 µg/ml de proteína para la cepa bacteriana SD437RC (*Bacillus*), 0.90 µg/ml de proteína para la cepa SD730RC (*Bacillus*), 0.87 µg/ml de proteína

para la cepa SD530TM (*Bacillus*), 0.82 µg/ml de proteína para la cepa H130LGI (*Paraburkholderia*) y 0.82 µg/ml de proteína para la cepa bacteriana SD2430LB (*Luteimonas*) (Tabla 8).

Algunos de los valores detectados a las 48 horas de producción de indoles fueron de 29.2 µg/ml de proteína para la cepa H830LGI (*Echerichia*), 2.03 µg/ml de proteína para la cepa SD437RC (*Bacillus*), 1.52 µg/ml de proteína para la cepa SD330TM (*Enterobacter*), 1.45 µg/mg de proteína para la cepa SD2037TM (*Dyella*), 0.85 µg/ml de proteína para la cepa SD530TM (*Bacillus*), 0.78 µg/ml de proteína para la cepa H3430LGI (*Bacillus*), 0.73 µg/ml de proteína para la cepa SD130RC (*Bacillus*), 0.70 µg/ml de proteína para la cepa SD1330LB (*Bacillus*), 0.70 µg/ml de proteína para la cepa SD730RC (*Bacillus*), 0.64 µg/ml de proteína para la cepa H1830TM (*Bacillus*), 0.55 µg/ml de proteína para la cepa H130LGI (*Paraburkholderia*) y 0.51 µg/ml de proteína para la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) (Tabla 8).

Las mediciones de la producción de giberelinas se tomaron a las 72 horas, teniendo valores de 0.468 µg/mg de proteína para la cepa SD1730LB (*Bacillus*), 0.249 µg/mg de proteína para la cepa SD730RC (*Bacillus*), 0.177 µg/mg de proteína para la cepa SD2430LB (*Luteimonas*), 0.6 µg/mg de proteína para la cepa SD330TM (*Enterobacter*), 0.13 µg/mg de proteína para la cepa SD130RC (*Bacillus*), 0.121 µg/mg de proteína para la cepa SD2037TM (*Dyella*) y 0.069 µg/ml de proteína para la cepa H1830TM (*Bacillus*) (Grafica 5).

La cuantificación de giberelinas se realizó 72 horas, detectando valores de 0.468 µg/mg de proteína para la cepa SD1730LB (*Bacillus*), 0.249 µg/ml de proteína para la cepa SD730RC (*Bacillus*), 0.177 µg/ml de proteína para la cepa SD2430LB (*Luteimonas*), 0.6 µg/ml de proteína para la cepa SD330TM (*Enterobacter*), 0.13 µg/ml de proteína para la cepa SD130RC (*Bacillus*), 0.121 µg/ml de proteína para la cepa SD2037TM (*Dyella*) y 0.069 µg/ml de proteína para la cepa H1830TM (*Bacillus*) (Tabla 8).

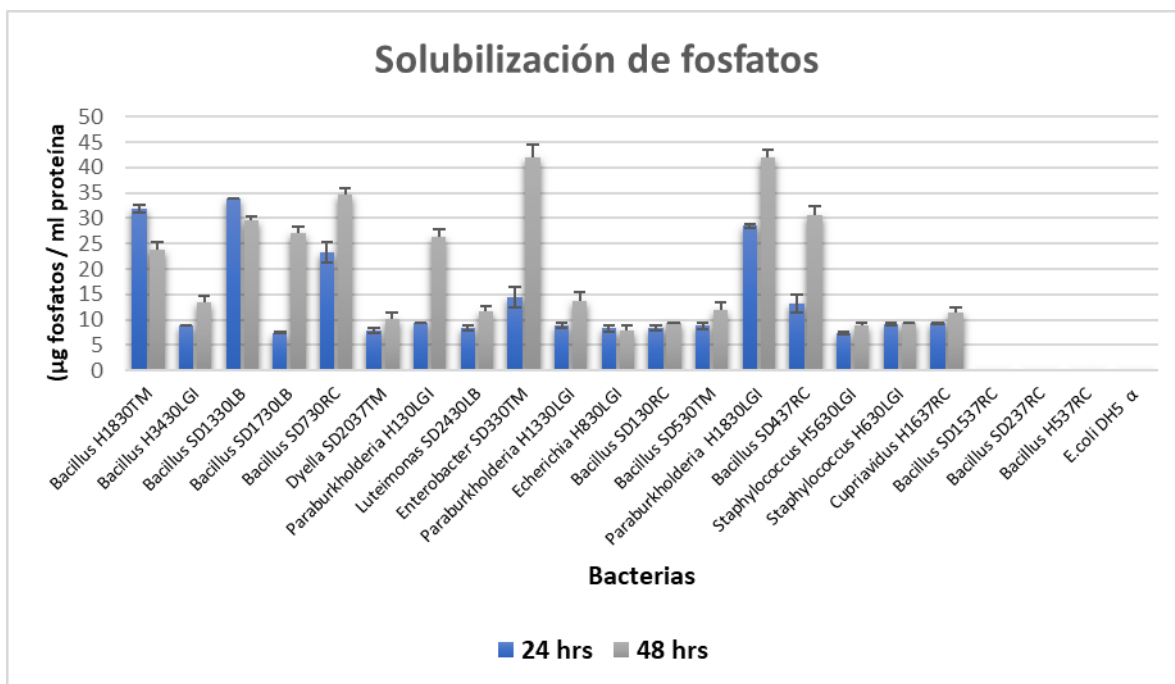


Grafica 5: Producción de giberelinas: Giberelinas detectadas a las 72 horas en las cepas bacterias promotoras de la germinación de semillas de *P. chiapensis* aisladas de los rodales ubicados en las localidades San Diego y Hueyapan.

7.8 Solubilización de fosfatos

Otro mecanismo de las bacterias PGPRs es la capacidad de solubilizar fosfato, es por lo que nosotros evaluamos a los 18 aislados bacterianos la capacidad de solubilizar fosfatos. Los cultivos fueron estandarizados y la capacidad de solubilizar fosfatos fue medida a las 24 y 48 horas tanto en medio sólido como en medio líquido de NBRIP.

Los resultados mostraron que todas las cepas bacterianas son capaces de solubilizar fosfatos (Grafica 6). En cuanto a la medición a las 24 horas las cepas que presentaron mayor producción son SD1330LB con 33.82 µg/ml de proteína, H1830TM (*Bacillus*) con 31.80 µg/ml de proteína, H1830LGI (*Paraburkholderia*) con 28.47 µg/ml de proteína, SD730RC (*Bacillus*) con 23.31 µg/ml de proteína y SD330TM (*Enterobacter*) 14.47 µg/ml de proteína (Tabla 8).



Grafica 6: Solubilización de fosfatos: Fosfatos detectados a las 24 y 48 horas en las cepas bacterias promotoras de la germinación de semillas de *Pinus chiapensis* aisladas de los rodales ubicados en las localidades San Diego y Hueyapan.

Algunos valores de las demás cepas bacterianas a las 24 horas fueron de 13.14 µg/ml de proteína para la cepa SD437RC (*Bacillus*), 9.43 µg/ml de proteína para la cepa H130LGI (*Paraburkholderia*), 9.33 µg/mg de proteína para la cepa H1637RC (*Cupriavidus*), 8.34 µg/ml de proteína para la cepa SD2430LB (*Luteimonas*), 8.34 µg/ml de proteína para la cepa SD1330RC (*Bacillus*), 7.83 µg/ml de proteína para la cepa SD2037TM (*Dyella*) y 7.4 µg/ml de proteína para la cepa SD1730LB (*Bacillus*) (Tabla 8).

A las 48 horas los valores obtenidos de solubilización de fosfatos para las cepas bacterianas aisladas cambiaron teniendo que las cepas con valores más altos fueron de 41.88 µg/mg de proteína para la cepa H1830LGI (*Paraburkholderia*) y 41.88 µg/ml de proteína para la cepa SD330TM (*Enterobacter*) seguidas por 34.67 µg/m de proteína para la cepa SD730RC (*Bacillus*), 30.53 µg/ml de proteína para la cepa SD437RC (*Bacillus*), 27.05 µg/ml de proteína para la cepa SD1730LB

(*Bacillus*), 26.34 µg/ml de proteína para la cepa H130LGI (*Paraburkholderia*), 23.79 µg/mg de proteína para la cepa H1830TM (*Bacillus*), 11.56 µg/ml de proteína para la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) y 10.02 µg/ml de proteína para la cepa SD2037TM (*Dyella*) (Tabla 8).

Tabla 8: Evaluación de mecanismos PGPRs de las cepas bacterianas con efecto benéfico en la germinación de *P. chiapensis*.

Cepa bacteriana	IAA (µg IAA / ml proteína)		Giberelinas (µg ácido giberílico/ ml proteína)	Solubilización de fosfatos (µg fosfato/ml proteína)	
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h
<i>Bacillus</i> H1830TM	0.54 ± 0.01 ^{bc}	0.64 ± 0.01 ^{def}	0.060 ± 0.005 ^{bc}	31.80 ± 0.730 ^f	23.79 ± 1.60 ^f
<i>Bacillus</i> H3430LGI	0.57 ± 0.14 ^{bc}	0.78 ± 0.05 ^{fg}	0.056 ± 0.004 ^{bc}	8.92 ± 0.510 ^b	13.42 ± 1.18 ^{de}
<i>Bacillus</i> SD1330LB	0.72 ± 0.02 ^{bc}	0.70 ± 0.03 ^{efg}	0.070 ± 0.005 ^c	33.82 ± 0.360 ^f	29.50 ± 0.78 ^{gh}
<i>Bacillus</i> SD1730LB	0.72 ± 0.02 ^{bc}	0.55 ± 0.13 ^{cde}	0.468 ± 0.035 ⁱ	7.40 ± 0.140 ^b	27.05 ± 1.23 ^{fgh}
<i>Bacillus</i> SD730RC	0.90 ± 0.14 ^c	0.70 ± 0.03 ^{efg}	0.249 ± 0.004 ^h	23.31 ± 1.930 ^d	34.67 ± 1.14 ⁱ
<i>Dyella</i> SD2037TM	0.50 ± 0.11 ^{bc}	1.45 ± 0.11 ^h	0.121 ± .009 ^d	7.83 ± 0.570 ^b	10.02 ± 1.31 ^{bcd}
<i>Paraburkholderia</i> H130LGI	0.82 ± 0.25 ^{bc}	0.55 ± 0.16 ^{ede}	0.045 ± 0.002 ^{bc}	9.43 ± 0.010 ^b	26.34 ± 1.37 ^{fg}
<i>Luteimonas</i> SD2430LB	0.82 ± 0.12 ^{bc}	0.51 ± 0.19 ^{cd}	0.177 ± 0.006 ^{ef}	8.34 ± 0.570 ^b	11.56 ± 1.13 ^{cde}
<i>Enterobacter</i> SD330TM	1.38 ± 0.14 ^d	1.52 ± 0.007 ^h	0.600 ± 0.078 ^j	14.47 ± 1.940 ^c	41.88 ± 2.76 ^j
<i>Paraburkholderia</i> H1330LGI	0.71 ± 0.15 ^{bc}	0.64 ± 0.17 ^{def}	0.190 ± 0.012 ^g	8.82 ± 0.480 ^b	13.65 ± 1.77 ^e
<i>Echerichia</i> H830LGI	21.00 ± 1.28 ^e	29.2 ± 0.30 ^j	0.160 ± 0.015 ^{fg}	8.26 ± 0.600 ^b	7.94 ± 1.02 ^b
<i>Bacillus</i> SD130RC	0.74 ± 0.001 ^{bc}	0.73 ± 0.00 ^{fg}	0.130 ± 0.006 ^{de}	8.34 ± 0.580 ^b	9.43 ± 0.01 ^{bc}
<i>Bacillus</i> SD530TM	0.87 ± 0.10 ^{bc}	0.85 ± 0.05 ^g	0.039 ± 0.006 ^b	8.79 ± 0.640 ^b	11.89 ± 1.58 ^{cde}
<i>Paraburkholderia</i> H1830LGI	0.76 ± 0.21 ^{bc}	0.44 ± 0.02 ^{bc}	0.042 ± 0.002 ^{bc}	28.47 ± 0.500 ^e	41.88 ± 1.64 ^j
<i>Bacillus</i> SD437RC	0.94 ± 0.09 ^{cd}	2.03 ± 0.005 ⁱ	0.120 ± 0.011 ^d	13.14 ± 1.850 ^c	30.53 ± 1.77 ^h
<i>Staphylococcus</i> H5630LGI	0.78 ± 0.04 ^{bc}	0.78 ± 0.09 ^{fg}	0.062 ± 0.007 ^{bc}	7.35 ± 0.160 ^b	8.99 ± 0.44 ^{bc}
<i>Staphylococcus</i> H630LGI	0.55 ± 0.13 ^{bc}	0.67 ± 0.10 ^{def}	0.160 ± 0.020 ^{ef}	9.09 ± 0.340 ^b	9.44 ± 0.01 ^{bc}
<i>Cupriavidus</i> H1637RC	0.4 ± 0.12 ^{ab}	0.27 ± 0.04 ^b	0.034 ± 0.002 ^b	9.33 ± 0.10 ^b	11.35 ± 1.11 ^{bcde}
<i>Bacillus</i> SD1537RC	0.021 ± 0.006 ^a	0.019 ± 0.001 ^a	0.0004 ± 0.000 ^a	0.010 ± 0.002 ^a	0.009 ± 0.001 ^a
<i>Bacillus</i> SD237RC	0.018 ± 0.007 ^a	0.016 ± 0.002 ^a	0.0003 ± 0.000 ^a	0.012 ± 0.003 ^a	0.010 ± 0.002 ^a
<i>Bacillus</i> H537RC	0.017 ± 0.009 ^a	0.016 ± 0.002 ^a	0.0004 ± 0.000 ^a	0.009 ± 0.002 ^a	0.007 ± 0.002 ^a
<i>E.coli</i> DH5 α	0.005 ± 0.004 ^a	0.004 ± 0.002 ^a	0.00045 ± 0.000 ^a	0.000 ± 0.000 ^a	0.000 ± 0.000 ^a

*abcde^{gh} Diferente letra dentro de una misma columna indica una diferencia significativa (p < 0.05).

Estos datos muestran que las 18 cepas bacterianas promotoras de la germinación aisladas de los rodales ubicados en las localidades de San Diego y Hueyapan era capaces de solubilizar fosfatos. Los mecanismos por los cuales son capaces de lograr esta solubilización son diversos, pero uno de ellos es la acidificación del ambiente donde se encuentran.

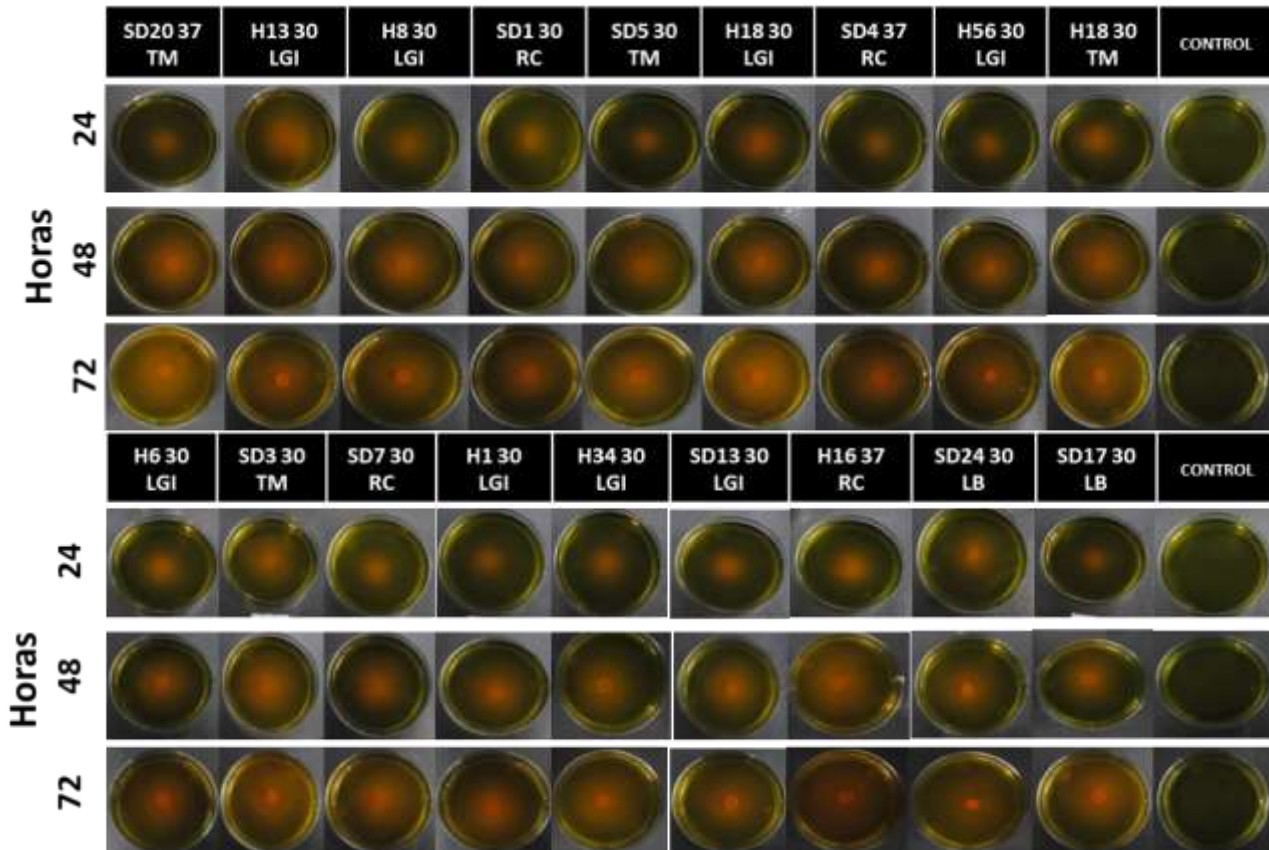


Figura 17: Crecimiento de bacterias en medio sólido NBRIP. Acidificación del medio por las 18 bacterias aisladas de los rodales ubicados en las localidades de San Diego y Hueyapan con capacidad de solubilizar fosfato. Se utilizó Azul de bromotimol como indicador de pH.

Para poder evaluar si estas cepas bacterianas eran capaces de acidificar el medio donde crecen se procedió a crecer a estas bacterias en medio sólido NBRIP, teniendo como indicador el azul de bromotimol. Se detectó el viraje del medio hasta las 72 horas observando que en este medio de cultivo todas las bacterias formaron un halo de color amarillo a partir de las 24 horas y aumentado el tamaño del halo conforme el paso del tiempo, observando a las 72 horas un viraje de tonalidad en la

mayoría de la placa. Estos resultados nos indica que el pH del medio está virando de un pH neutro a un pH ácido, indicando que las bacterias aisladas son capaces de acidificar el medio donde crecen (Fig. 17).

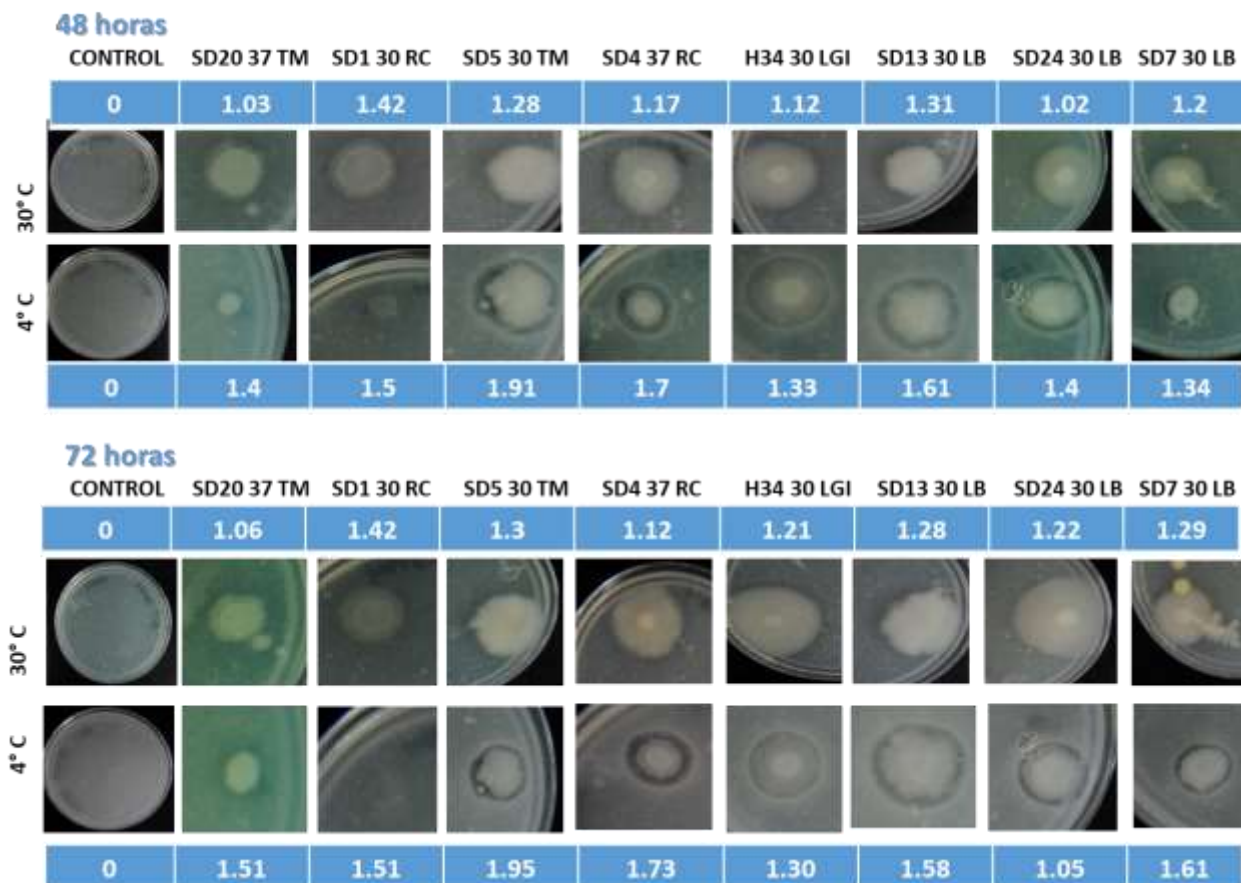


Figura 18: Hidrólisis de almidón de cepas bacterianas aisladas de rizosfera de *P. chiapensis*. En la figura se muestran los halos de hidrólisis a dos temperaturas y con sus respectivos índices de hidrólisis.

7.9 Capacidad de hidrólisis de almidón por bacterias promotoras de la germinación de *P. chiapensis*

Las bacterias aisladas mostraron tener la capacidad de acelerar el proceso de germinación de las semillas de *P. chiapensis*, se propone que estas bacterias poseen diferentes propiedades PGPR y que gracias a estos mecanismos se ve favorecido el proceso de germinación, a su vez, se exploró la posibilidad de que estos aislados bacterianos sean capaces de sintetizar enzimas que favorezcan la hidrólisis de los componentes de reserva que se encuentran en el mega gametófito.

Se probó si todos los aislados promotores de la germinación eran capaces de hidrolizar el almidón. Este ensayo se realizó en agar mínimo base K adicionado con el almidón de papa. Las placas se incubaron a 30 y 4 grados centígrados. Se determinó la razón entre el halo de bacteria y el halo de hidrolisis de almidón. Las cepas SD2037TM (*Dyella*), SD437RC (*Bacillus*), SD1330LB (*Bacillus*), SD730LB (*Bacillus*), SD130RC (*Bacillus*), H3430LGI (*Bacillus*), SD2430 LB (*Luteimonas*) y SD530TM (*Bacillus*) hidrolizaron almidón a 30° C y 4° C, observándose mayor hidrólisis a 4 grados (Fig. 18).

7.10 Aislamiento e identificación de cepas fúngicas y bacterianas de semillas de *P. chiapensis*.

Al trabajar con las semillas de *P. chiapensis*, se observó que existían microorganismos persistentes en las semillas a pesar de diferentes procesos de lavado y desinfección superficial y que la presencia de estos microorganismos afectaba la viabilidad tanto de la semilla como del germinado (Fig. 19). Esos microorganismos fueron aislados e identificados en colaboración con la QFB Mónica Muños (Muños F. M., 2017). Para las bacterias se utilizó en el medio de cultivo LB, mientras que con los hongos se utilizó el medio Sabouraud.




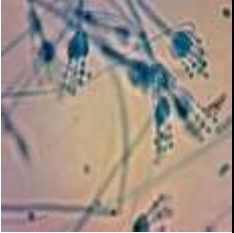




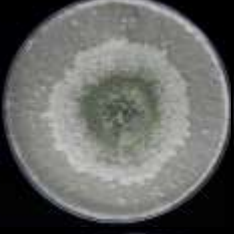



Figura 19: Daño de semillas y germinados de *P. chiapensis* y microorganismos de semilla: Fotos de semillas sometidas a lavado superficial y germinadas en agar agua con presencia de microorganismos endófitos.

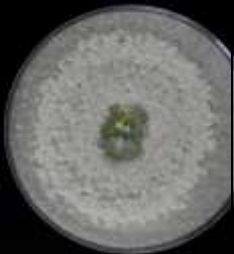


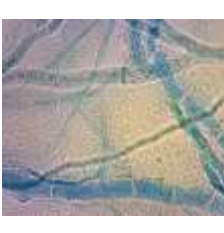


Se aislaron ocho cepas fúngicas y cinco cepas bacterianas. Estos aislados fueron identificados utilizando enfoques de morfología macroscópica, microscópica y molecular. A nivel macroscópico en el caso de las bacterias se describió la morfología de la colonia, mientras que a nivel microscópico para los hongos se describió las características de sus micelios, hifas y cuerpos fructíferos (Tabla 9).

A los aislados fúngicos se les denominó numéricamente (Cepa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8). A los aislados bacterianos se les denominó alfabéticamente (cepa A, B, C, D y E).

La Cepa 1 mostró una colonia filamentosa, vellosa y con surcos radiales, márgenes definidos con textura algodonosa de color blanco - grisácea, al observarla al microscopio se pudieron observar cuerpos fructíferos sostenidos por hifas septadas hialinas, presencia de conidióforos, metulas y fiálides alargadas con producción de conidios. La cepa 2 presentó una colonia algodonosa con surcos radiales de color blanco con un anillo verde y centro gris, al microscopio se observó la presencia de hifas cenocíticas, ramificadas, hialinas, conidióforos, fiálides en forma de botella y conidios globosos.

Tabla 9: Descripción de las cepas fúngicas aisladas de semillas de *P. chiapensis*.

Cepa	Género	Morfología Macroscópica	Morfología macroscópica	Morfología Microscópica	Morfología microscópica
1	<i>Penicillium</i>		Colonia filamentososa, vellosa y con surcos radiales, márgenes definidos con textura algodonosa, de color blanco-grisácea.		Hifas septadas hialinas, con conidióforos simples, metulas, fiálides y conidias hialinos.
2	<i>Trichoderma</i>		Colonia algodonosa, surcos radiales, de color blanco con un anillo verde y centro gris		Hifas cenocíticas, ramificadas, hialinas, conidióforos, fiálides en forma de botella y conidias globosas
3	<i>Trichoderma</i>		Colonia algodonosa, surcos radiales, blanca, con un anillo verde		Hifas cenocíticas, conidióforo hialino, fiálides alargadas con conidios globosos
4	<i>Trichoderma</i>		Colonia aterciopelada y algodonosa con centro verde y coloración blanca		Hifas cenocíticas, conidióforos hialinos, fiálides alargadas en forma de botella con conidias globosas.
5	<i>Trichoderma</i>		Colonia algodonosa, con vellosidades de color blanco con un centro pequeño verde		Hifas cenocíticas, conidióforos hialinos, fiálides alargadas en forma de botella con conidias globosas.

6	<i>Trichoderma</i>		Colonia algodonosa y aterciopelada de color blanco con el centro verde		Hifas cenocíticas, conidióforos hialinos, fiálides alargadas en forma de botella con conidias globosas.
7	<i>Diaporthe</i>		Colonia vellosa aterciopelada de color blanco grisáceo, con un centro beige		Micelio macrosifonado hialino y tabicado sin presencia de cuerpos fructíferos
8	<i>Cladosporium</i>		Colonia aterciopelada, vellosa, con pliegues radiales de color verde oscuro en el centro de la colonia aclarándose en la periferia con márgenes blancos.		Hifas septadas, ramificadas con conidióforos, fiálides alargadas, conidios elipsoides.

Características macroscópicas y microscópicas de las ocho cepas fúngicas aisladas de las semillas de *P. chiapensis*.

La cepa 3 presentó una colonia algodonosa blanca con surcos radiales y presencia de un anillo verde, al microscopio presentó hifas cenocíticas con conidióforos hialinos, fiálides alargadas con conidios globosos. En la cepa 4 la colonia fue aterciopelada y algodonosa con centro verde y coloración blanca, al microscopio se observaron hifas cenocíticas, conidióforos hialinos, fiálides alargadas en forma de botella con conidios globosos. La cepa 5 presentó una colonia algodonosa, con vellosidades de color blanco con un centro pequeño verde, al microscopio presentó hifas cenocíticas, conidióforos hialinos, fiálides alargadas en forma de botella con conidios globosos. La cepa 6 presentó una colonia algodonosa y aterciopelada de color blanco con el centro verde, al microscopio se observaron hifas cenocíticas, conidióforos hialinos, fiálides alargadas en forma de botella con conidios globosos.

La cepa 7 presentó una colonia vellosa aterciopelada de color blanco grisáceo, con un centro beige, al microscopio se observó un micelio macrosifonado hialino y tabicado sin presencia de cuerpos fructíferos a pesar de crecerlo en diferentes medios de cultivos. La cepa 8 presentó una colonia aterciopelada, vellosa, con pliegues radiales de color verde oscuro en el centro de la colonia, aclarándose en la periferia con márgenes blancos, al nivel de microscópica se observaron hifas septadas, ramificadas con conidióforos, fiálides alargadas, conidios elipsoides (Tabla 9).

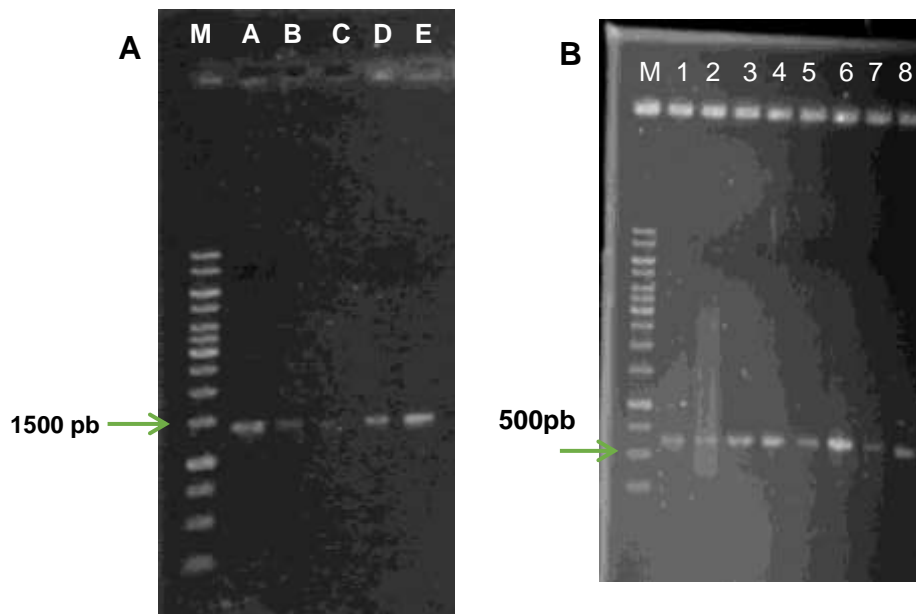
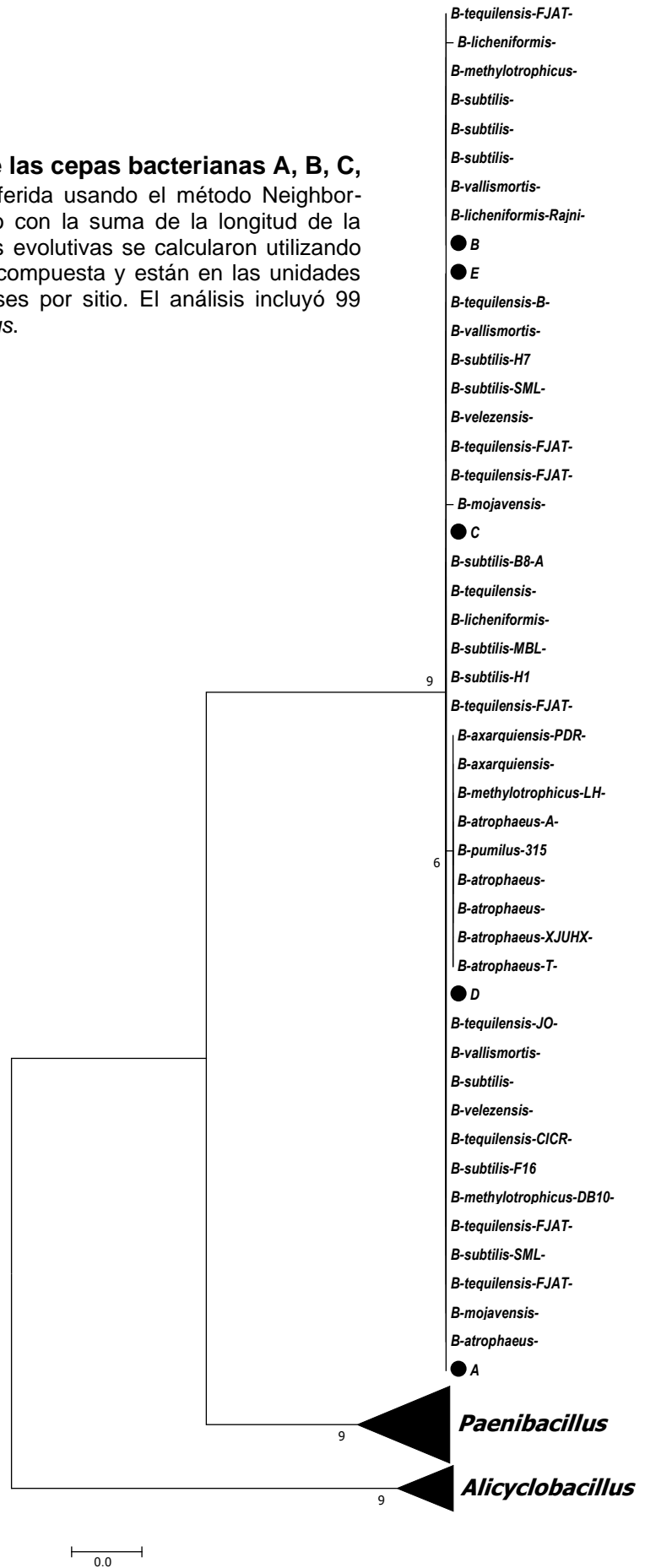


Figura 20. Amplicones de cepas bacterianas y fúngicas. A: Amplificado del gen 16S rRNA de las 5 cepas bacterianas aisladas de semillas de *Pinus chiapensis* **B:** Amplificado de la región intergenica y un fragmento del gen 5.8S rRNA de las 8 cepas fúngicas aisladas de semillas de *P. chiapensis*.

Para la identificación genotípica, las cepas bacterianas fueron cultivadas por 18 horas y los aislados fúngicos por 7 días. A partir de DNA total de las cepas bacterianas se amplificó el gen 16S rDNA utilizando los oligonucleótidos UN27F 5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y UN1392R 5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3', para el caso de los hongos se amplificó la región intergenica y un fragmento del gen 5.8S rDNA, utilizando los oligonucleótidos ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y ITS4 5'-TCCTCCGCCTTATTGATATGC-3'.

Figura 21. Árbol filogenético de las cepas bacterianas A, B, C, D y E: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.503639870. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 99 secuencias de nucleótidos. B: *Bacillus*.



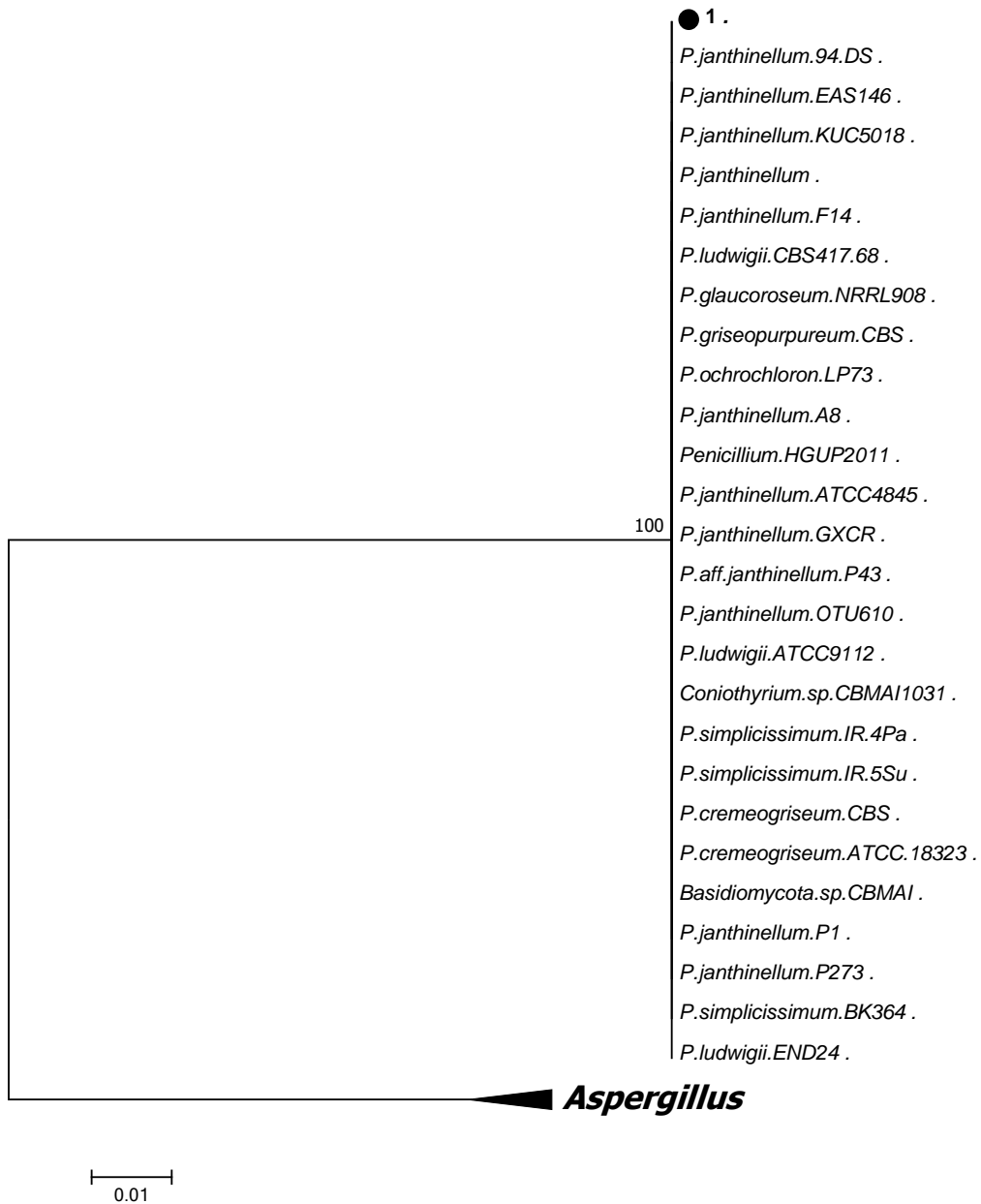


Figura 22. Árbol filogenético de la cepa fúngica 1: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.16916807. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 33 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes. P: *Penicillium*

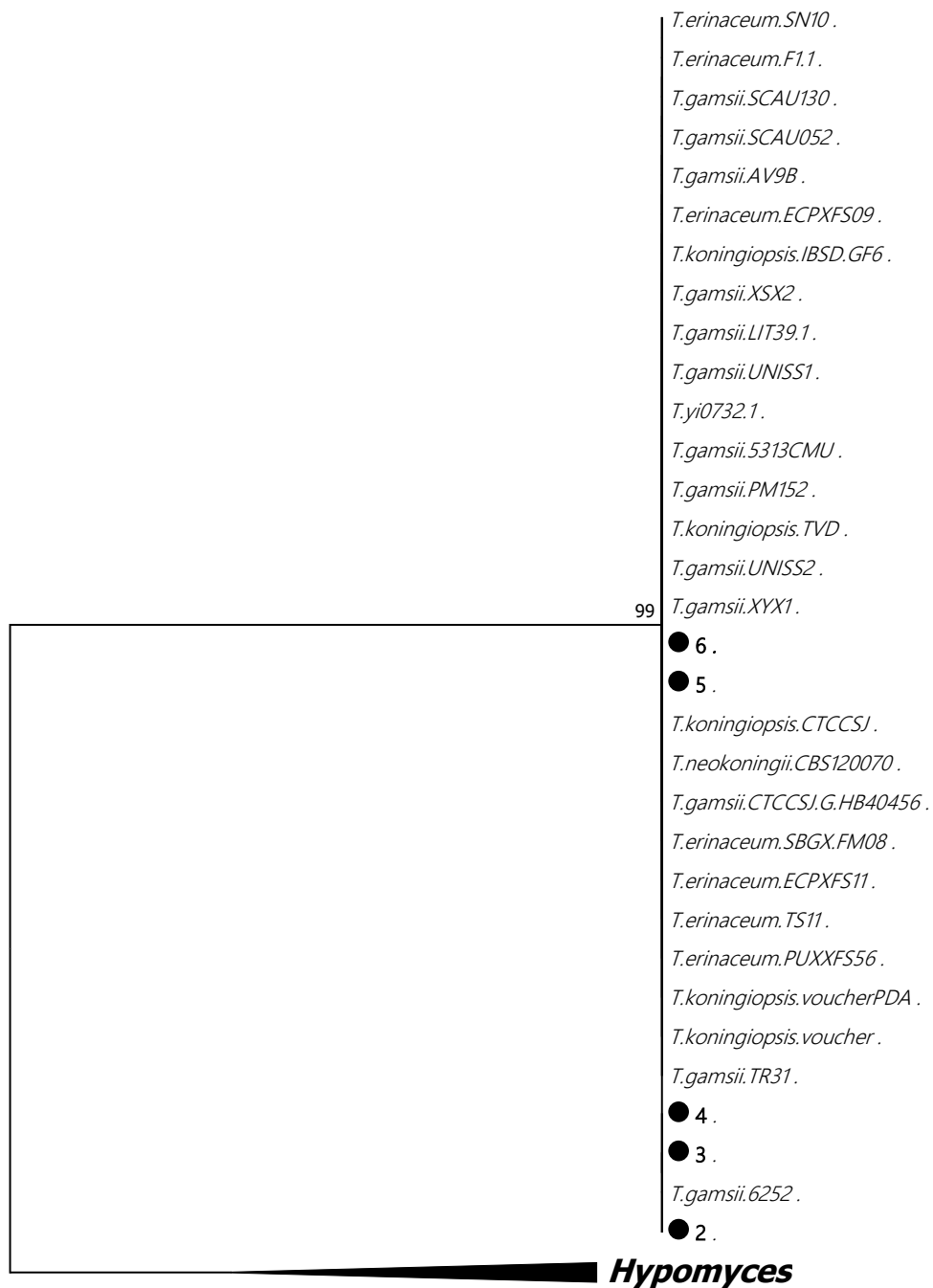


Figura 23. Árbol filogenético de las cepas fúngicas 2, 3, 4, 5 y 6: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.25724839. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 38 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes. T: *Trichoderma*.



Figura 24: Árbol filogenético de la cepa fúngica 7: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama =1.03338722. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 27 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes. D: *Diaphorte*.

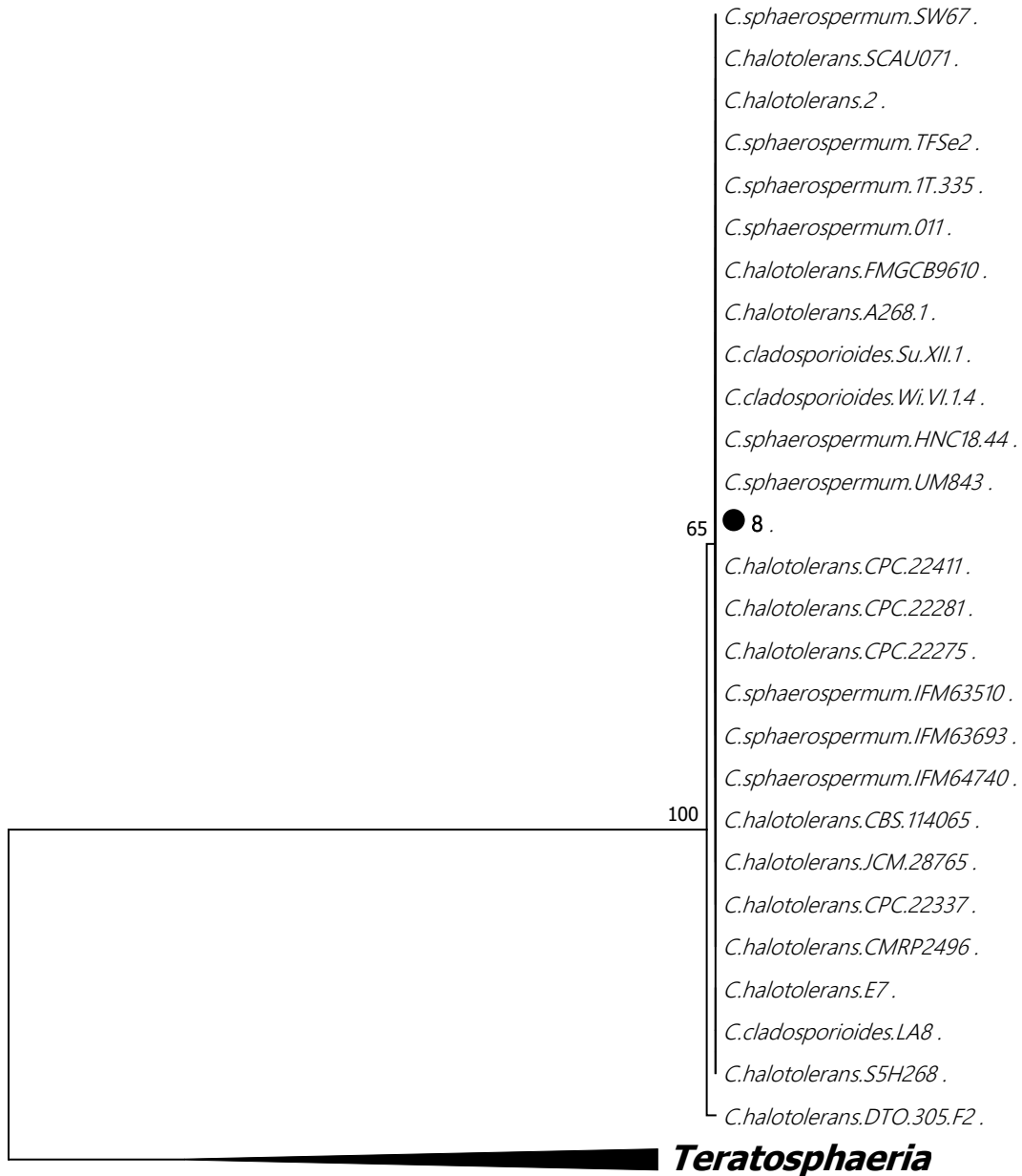


Figura 25: Árbol filogenético de la cepa fúngica H8: La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama =0.39575319. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 33 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes. C: *Ciclosporum*.

De las cepas bacterianas se obtuvo un amplificado de 1.3 Kb y de las cepas fúngicas de 500 pb. Los productos de PCR fueron concentrados y enviados al Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación (Figura 20). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias obtenidas del programa BLAST, con dichas secuencias recopiladas se procedió a la construcción de árboles filogenéticos. La distancia evolutiva se infirió mediante el uso de un análisis de Neighbor joining.

Las cepas fúngicas se pudieron diferenciar en cuatro clados; la cepa fúngica uno se encuentra cerca del género *Penicillium* (Figura 22), las cepas fúngicas 2,3,4,5 y 6 se encuentran cerca del género *Trichoderma* (Figura 23), la cepa fúngica 7 se encuentra cercana al género *Diaphorte* (Figura 24) y la cepa 8 se encuentra cercana al género *Cladosporium* (Figura 25).

Respecto a las cepas bacterianas aisladas de las semillas, todas se ubicaron próximas al género *Bacillus* (Figura 21).

7.11 Ensayos de antagonismo de bacterias aisladas de rizosfera y de semillas de *P. chiapensis* contra cepas fúngicas aisladas de semillas de *P. chiapensis*.

Se procedió a realizar un ensayo de antagonismo retando a las 18 cepas bacterianas ya identificadas como promotoras de la germinación de este pino y que además poseen diferentes cualidades PGPR más las 5 cepas aisladas de semillas de *P. chiapensis* contra las cepas aisladas de semillas que posiblemente provocaban un daño en el proceso de germinación como en la plántula, este ensayo se realizó en el medio Sabouroud.

La cepa fúngica 1 que corresponde al género *Penicillium*, cepa 2 que corresponde al género *Trichoderma* y la cepa 8 que corresponde al género *Cladosporium* no fueron inhibidas por ninguna bacteria probada, mientras que los hongos faltantes presentaron inhibición por lo menos por una bacteria (Figura 26).

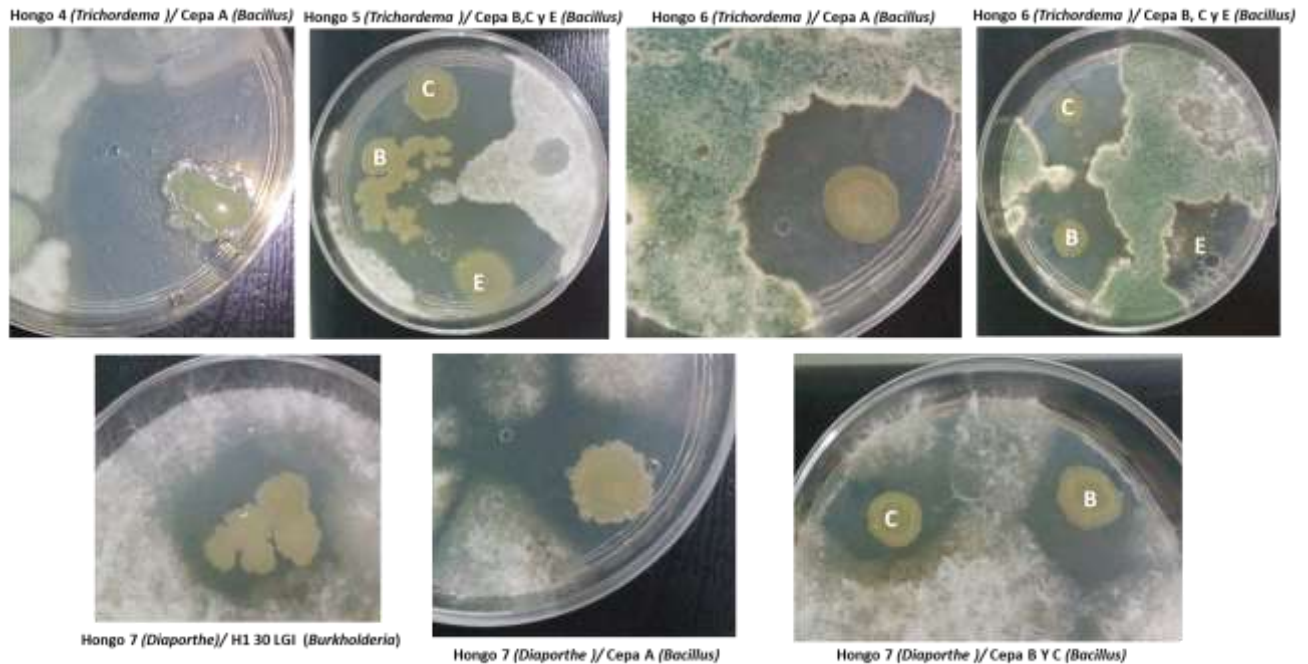


Figura 26: Efecto inhibitorio de hongos de semillas de *P. chiapensis* por cepas bacterianas. Las cepas bacterianas utilizadas fueron las 18 cepas aisladas de rizosfera y las 5 cepas aisladas de semillas de *P. chiapensis*.

Los hongos 3, 4 y 5 que pertenecen al género *Trichoderma*, mostraron una ligera inhibición por la bacteria SD2037TM (*Dyella*) (Figura 26).

El hongo 4 perteneciente al género *Trichoderma* presente un retardo de crecimiento por las cepas H1330LGI (*Burkholderia*), SD437RC (*Bacillus*), mientras que fue fuertemente inhibido por la cepa A (*Bacillus*). El hongo 5 perteneciente al género *Trichoderma* mostró una fuerte inhibición por las cepas B, C y E (*Bacillus*). En el hongo 6 perteneciente al género *Trichoderma* se observó que existe una fuerte inhibición por las cepas A, B, C y E. Por último, el hongo 7 perteneciente al género *Diaporthe* mostro una ligera inhibición por las cepas H5630LGI (*Staphylococcus*), SD730LB (*Bacillus*), A (*Bacillus*), mientras que por las cepas H130LGI (*Burkholderia*), A, B y C (todas pertenecientes al género *Bacillus*) se ve una fuerte inhibición (Figura 26).

8. Discusión

P. chiapensis es un pino que se encuentra en peligro de extinción, esto es debido a que su población ha disminuido drásticamente en los últimos años (Málan F. S., 2001; Del Castillo R.F. and Acosta F., 2002).

En México la población de *P. chiapensis* va a la baja, se ha observado que la presencia de asentamientos en rodales de este pino ha sido un factor decisivo para la disminución de su población, por el cambio de suelos a agrícolas, además de que la presencia de animales que ingieren las semillas producidas (Ledig F.T., 1998). A su vez la diversidad genética de este pino se encuentra dentro de los rangos aceptables (Del Castillo R.F. et al, 2010), siendo este un factor menos de la disminución de su población en diferentes rodales.

En el estado de Puebla existen lugares donde el pino se ha desarrollado sin perturbación. En estos sitios los árboles crecen muy bien, encontrándose individuos de todas las etapas de crecimiento junto con otras plantas, pero también existen otros lugares que denominamos “alterados”, donde la población de *P. chiapensis* es muy baja. En éstas se observan sólo árboles adultos que, aunque son productores de semillas, estas semillas no son capaces de germinar ni de establecerse *in situ*.

P. chiapensis es una especie típica en suelos de tipo Andisol y Acrisol (Martínez A. et al, 2018), donde *P. chiapensis* ha demostrado crecer en poblaciones bien establecidas en México. En este estudio se hizo un análisis comparativo entre las características fisicoquímicas de los suelos muestreados de los rodales Hueyapan y San Diego, catalogados como rodales no alterados y el rodal alterado Cuatempan muestreado por Vera C.B. Los suelos en las tres localidades analizadas son tipo Andisoles. En las tres localidades, Hueyapan, San Diego y Cuatempan su clima tiene una transición de templado húmedo a semicálido húmedo. En cuanto al tipo de suelo presentan franco con apariencia de sedimento para ambas localidades de San Diego y Hueyapan, mientras que Cuatempan tienen un suelo de tipo arcilla. El

pH del suelo de las localidades se puede considerar como ligeramente ácido a neutro con un ligero aumento de 11.14% (pH de 7.82) en Hueyapan. Los demás parámetros analizados varían según la localidad.

Aunque existen variantes en los valores fisicoquímicos del suelo de los tres rodales analizados, todos se encuentran dentro de los parámetros reportados para la germinación y establecimiento de *P. chiapensis* (CONAFOR).

El análisis de correspondencia mostró que las variables fisicoquímicas del suelo contribuyen de manera principal (71.8%) al racimo perturbado por humanos que se separa mucho del racimo no perturbado, lo que indica que estos parámetros tienen un papel importante en la distribución del pino. Es bien sabido que las características fisicoquímicas de los suelos están asociadas con el desarrollo del crecimiento de cualquier planta. En este análisis se pudo encontrar algunas asociaciones entre ciertas características del suelo, siendo la más relevante la arcilla en el rodal ubicado en la localidad de Cuatempan catalogada como perturbada o alterada. La arcilla está asociada con la presencia de varios minerales. Se ha reportado que las propiedades de intercambio catiónico de las arcillas son importantes para retener los iones y nutrientes de las plantas, además tienen selectividad catiónica en los suelos, lo que permite que las plantas crezcan adecuadamente (Dixon J.B, 1991). Esto quiere decir que los nutrientes en el rodal alterado no están afectados para justificar la ausencia de germinación de las semillas de *P. chiapensis*.

Otra asociación en este estudio fue la presencia de bacterias PGPR y sodio en el suelo de sitios no perturbados ubicados en San Diego y Hueyapan, lo que sugiere que las bacterias PGPR aisladas de suelos con Na⁺ podrían ser beneficiosas para la distribución de este pino, es decir que dichas bacterias favorezcan el crecimiento de este pino en dichos suelos salinos. Se sabe que, en los suelos hipersalinos, las bacterias PGPR con capacidad halo tolerante ayudan a las plantas a resistir esta condición y proporciona compuestos inorgánicos como el ácido indol acético (IAA), etileno, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, compuestos

orgánicos volátiles (COV), antioxidantes para su correcto crecimiento, entre otros (Abbas R. *et al*, 2019; Aristizabal, M. A. R. *et al*, 2019). Las comunidades microbianas también pueden activar los genes sensibles al estrés para el crecimiento, rendimiento y desarrollo de las plantas en condiciones de estrés (Abbas R. *et al.*, 2019). Nuestros resultados demuestran que las bacterias PGPR promueven la germinación de la semilla, aunque el mecanismo exacto no está claro.

Referente a la localidad de Hueyapan se han reportado ensayos de plantaciones donde evalúan la capacidad de establecerse de *P. chiapensis* con semillas producidas en rodales naturales de esta comunidad, pudiendo observar que el 96% de los pinos son capaces de sobrevivir y reproducirse. El vigor de estos pinos es normal, el daño ocasionado por ardillas es bajo, solo de un 13%, concluyendo que las semillas producidas son viables en suelos que posean las características necesarias para *P. chiapensis* (Muñoz-Flores H.J. *et al*, 2015).

Con todo lo anterior se observa que en el aspecto fisicoquímico de los suelos de los tres rodales analizados no poseen algún factor decisivo que afecte la germinación y establecimiento de *P. chiapensis*. Estos datos sugieren que pueden estar involucrados otros factores, uno de ellos es la microbiota presente en los suelos. Se sabe que existen microorganismos que poseen capacidades para promover el crecimiento y establecimiento de las plantas denominados PGPRs, y que estos favorecen el éxito de diversas plantas.

En este estudio se aislaron un total de 418 cepas bacterianas de los rodales no alterados ubicados en las localidades de San Diego y Hueyapan. Al probar si estas cepas bacterianas tenían la capacidad de afectar positivamente el proceso de germinación de las semillas de *P. chiapensis* se pudo observar que 18 de estas cepas bacterianas tenían la capacidad de promover la germinación y aumentar el tamaño del germinado. Cabe mencionar que en el estudio previo de Vera C.B. (2014), donde se aislaron 80 cepas bacterianas del rodal alterado ubicado en la localidad de Cuatempan fue imposible aislar bacterias que fueran capaces de

promover la germinación de las semillas de *P. chiapensis*, a su vez se puede notar una clara diferencia en la población aislada de cepas bacteriana siendo esta menor comparada con las 177 cepas bacterianas aisladas del rodal no alterado ubicado en la localidad de San Diego y las 241 cepas bacterianas aisladas del rodal no alterado ubicado en la localidad de Hueyapan. Estos datos muestran que las poblaciones de la carga bacteriana entre estos rodales son diferente, al menos hablando de las bacterias cultivables.

Dentro de las bacterias aisladas que fueron capaces de promover la germinación de *P. chiapensis* pudimos identificar diferentes géneros, ubicando a nuestros aislados bacterianos promotores de la germinación dentro de ocho géneros. Éstos fueron *Bacillus*, *Paraburkholderia*, *Dyella*, *Luteimonas*, *Enterobacter*, *Cupriavidus*, *Staphylococcus* y *Echerichia*. Todas estas cepas fueron aisladas de los rodales no alterados, es decir de los rodales donde la población de *P. chiapensis* se encuentra bien establecida sin intervención antrópica. Se tiene ya documentado que este tipo de pino es muy sensible a la contaminación y se establecen en lugares no alterados antrópicamente, esto podría explicar porque sólo las bacterias de rodales no alterados tienen un efecto positivo en la germinación (Martínez M., 1998).

Muchos de los microorganismos rizosféricos poseen actividades de promoción del crecimiento de las plantas que benefician el establecimiento de las plantas. Hablando específicamente de pinos se sabe que existen diferentes géneros bacterianos que son capaces de asociarse con diferentes especies de estos, se tiene reportado que bacterias pertenecientes a las especies *Burkholderia vietnamiensis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Enterobacter cloacae*, *B. fungorum*, *Gluconacetobacter*, *Bacillus subtilis* y *Rhizobium sp.* son capaces de realizar este tipo de asociación. (Madmony A. *et al*, 2005; Xin G. *et al*, 2009; Anand R. *et al*, 2013; Andreolli M. *et al*, 2013).

Dentro de los géneros aislados, existen géneros ya descritos como bacterias PGPR por su capacidad de promover el crecimiento de las plantas por algún mecanismo ya conocido. Un ejemplo es el caso de *Bacillus*, el cual es un género con capacidad

de producir antibióticos, antifúngicos, además de ser capaz de colonizar las raíces de plantas (Zhang N. *et al*, 2016). Otro género es *Paraburkholderia* el cual se ha descrito que tiene la capacidad de producir auxinas y etileno promoviendo la germinación de diferentes plantas (Ribeiro C.M. *et al*, 2012; Naveed M. *et al*, 2014; Poupin MJ. *et al*, 2016).

Las bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) se han utilizado para promover el establecimiento de pinos. Los mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas por bacterias rizosféricas incluyen la producción de fitohormonas (ácido indol-3-acético, IAA), la producción de sideróforos, actividades enzimáticas que ayudan indirectamente al crecimiento de las plantas, el antagonismo contra los patógenos de las plantas, provocar la tolerancia de las arboreas a hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's), entre otros (Probanza A. *et al*, 2001; Barriuso J. *et al*, 2008; Hou J. *et al*, 2015; Paterson J. *et al*, 2016; Rajkumar M. *et al*, 2009; Andreolli M. *et al*, 2013; Anand R. *et al*, 2013). Se ha descrito que las bacterias de muchos géneros tienen actividad promotora del crecimiento de las plantas. Por ejemplo, se ha demostrado que las bacterias que pertenecen al género *Paraburkholderia* son capaces de producir IAA, sideróforos, ACC desaminasas y compuestos antibióticos. Estas bacterias tienen potencial biotecnológico para controlar los patógenos y disminuir el estrés biótico y abiótico (Naveed M. *et al*, 2014; Eberl L & Vandamme P., 2016; Esmaeel Q. *et al*, 2018). Las bacterias pertenecientes al género *Dyella*, aisladas de suelos forestales (Zhou X. Y. *et al*, 2019; Ou F. H. *et al*, 2019), mostraron su capacidad para producir fitohormonas, solubilizar fosfatos y sintetizar ACC desaminasas (Palaniappan P. *et al*, 2010; Contreras M. *et al*, 2016). Algunas especies de este género también tienen potencial de aplicación biotecnológica para la degradación de compuestos fenólicos y el biocontrol (Zhou H. *et al*, 2012; Isur-Kruh L., 2018). La capacidad del género *Bacillus* para producir compuestos asociados con un aumento en el tamaño y el peso de las plantas también está bien documentada, por ejemplo, la producción de AIA (Kumar P. *et al*, 2012). Este género también es capaz de eliminar metales tóxicos como el cromo, neutralizando su efecto negativo mediante bombas de eflujo, reduciendo Cr (VI) a Cr (III), y activando las enzimas involucradas en el

proceso de desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sethuraman P. y Balasubramanian N. 2010). Algunas especies del género *Enterobacter* se han reportado como PGPR, debido a la capacidad de producir AIA y también fueron capaces de solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno, producir sideróforos (Sarkar A. *et al*, 2018; Pramanik K. *et al*, 2018; Shahid M. *et al*, 2019; Chakraborty P. *et al*, 2019), proteger a las plantas contra la toxicidad de los metales mediante la producción de compuestos antioxidantes (Das A. & Osborne J. W 2018) y tienen una actividad ACC desaminasa que desempeña un papel importante en el mantenimiento del crecimiento y desarrollo de las plantas al reducir la senescencia (Upadhyay S.K. *et al*, 2011; Habib S.H. *et al*, 2016). El género *Luteimonas* fue descrito por primera vez por Finkmann W. y colaboradores (2000) y ha sido aislado de diferentes ambientes contaminados y suelos rizosféricos (Zhang D.C. *et al*, 2010; Sun Z.B. *et al*, 2012; Xin Y. *et al*, 2014; Mu Y. *et al*, 2016; Ngo H.T. *et al*, 2016; Cheng J. *et al*, 2016). Estas bacterias pueden eliminar los contaminantes del combustible del suelo, participando activamente en la restauración del suelo (Mu Y. *et al*, 2016). De todos los géneros bacterianos descritos, aunque se les han atribuido el mejoramiento del crecimiento de las plantas, ninguno había sido reportado como un promotor del crecimiento de *P. chiapensis* hasta este estudio.

Las bacterias promotoras de la germinación solo se lograron identificar de los rodales no alterados. Hay que tener presente que el suelo es un sistema complejo que comprende una variedad de microhábitats con diferentes gradientes fisicoquímicos y condiciones ambientales discontinuas que van a favorecer la presencia o ausencia de diferentes microorganismos. Bajo este concepto, la microbiota de los diferentes rodales podría estar alterando tanto la germinación como posiblemente su establecimiento. Es decir, que la microbiota presente en el momento que la semilla entra en contacto con el suelo, es capaz de establecer una relación benéfica, al menos en la etapa de la germinación, y que debido a la pérdida de esta microbiota en algunos de los rodales donde antes era exitoso el establecimiento de este pino, ahora su población se encuentra disminuyendo drásticamente.

La capacidad que tienen algunas bacterias de promover la germinación en este estudio se pudo clasificar como efectos calendario e intensidad, es decir que las bacterias promotoras de la germinación son capaces de aumentar el número de semillas germinadas y que éstas germinen en un menor tiempo. En cuanto al efecto calendario se pudo observar que en el primer periodo que comprende del 0 hasta el quinto día, ninguna de las bacterias probadas tuvo un efecto significativo con respecto a los controles no inoculados, lo que nos podría mostrar que las bacterias necesitan un periodo de adaptación. Es decir que la bacteria puede estar modificando receptores o concentrando metabolitos como AIA, giberelinas, entre otros, que le permitirán realizar una relación de tipo simbiótica con dicha semilla.

En los periodos dos y tres se observa efectos positivos dependientes de la bacteria inoculada, pudiendo observar que las cepas SD2037TM (*Dyella*), poseen un efecto calendario en el tercer periodo, y las cepas SD330TM (*Enterobacter*) y SD2430LB (*Luteimonas*) poseen un efecto tanto en el segundo como tercer periodo.

Con respecto a la cepa bacteriana SD2037TM (*Dyella*), se observó que tarda más en lograr que las semillas de *P. chiapensis* germinen, pero cuando la germinación empieza lo hace de manera exponencial, es decir que una gran cantidad de semillas empiezan a germinar al mismo tiempo, esto se puede relacionar con la capacidad de producir fitohormonas. El análisis de la producción de indoles y giberelinas nos mostró que esta bacteria es capaz de sintetizar dichas fitohormonas, pero la producción de estas es progresiva observando que a las 24 horas tenemos una producción de 0.5 µg de indoles/ml de proteínas y de 1.45 µg de indoles/ml de proteínas a las 48 horas, en comparación de las cepas SD330TM (*Enterobacter*) y SD2430LB (*Luteimonas*) que poseen un efecto tanto en el segundo como tercer periodo donde estas tienen una producción de indoles de 1.38 µg de indoles/ml de proteínas y 0.82 µg de indoles/ml de proteínas a las 24 horas respectivamente. Esto podría justificar porque la cepa SD2037TM (*Dyella*) sólo tiene un efecto en la germinación en el tercer periodo.

Respecto a estas tres cepas (SD2037TM, SD330TM y SD2430LB), estas se establecen y mantienen en los 14 días analizados, es decir que las poblaciones de las bacterias aumentan conforme el paso de los días, hasta llegar a una población adecuada que les permitiría lograr una concentración de fitohormonas y otros posibles metabolitos que favorecen la pronta germinación de semillas de *P. chiapensis*, además de aumentar el tamaño del germinado.

Todas las cepas analizadas tienen la capacidad de aumentar el tamaño del germinado y fomentar la germinación de las semillas de *P. chiapensis*, aunado a esto, nueve cepas tienen la cualidad de poseer un efecto intensidad. Es decir que las cepas H1830TM (*Bacillus*), H3430LGI (*Bacillus*), SD1330LB (*Bacillus*), SD1730LB (*Bacillus*), SD2037TM (*Dyella*), H130LGI (*Paraburkholderia*), SD2430LB (*Luteimonas*), SD330TM (*Enterobacter*) son capaces de lograr la germinación de una cantidad mayor de semillas que el control.

El ensayo de compatibilidad de las cepas bacterianas con un efecto calendario arrojó resultados interesantes, pudimos observar que no todas las cepas bacterianas que poseen este efecto son capaces de subsistir juntas y que la coexistencia de estas puede depender de la presencia o ausencia de nutrientes en el medio donde se encuentren. En la inoculación de las tres cepas SD2037TM (*Dyella*), SD330TM (*Enterobacter*) y SD2430LB (*Luteimonas*) en medio LB se ve inhibido el crecimiento de la cepa SD2037TM (*Dyella*). En la cepa SD330TM (*Enterobacter*) se observó crecimiento hasta las 72 horas con una población baja de 10^2 UFC, mientras que la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) creció desde las 24 horas, manteniendo su población de 10^5 UFC hasta las 72 horas. Este comportamiento se ve modificado cuando crecen en medio mínimo base K, a excepción de la cepa SD2037TM (*Dyella*) donde también fue inhibido su crecimiento, no pudiendo visualizar crecimiento en los tiempos analizados. En cuanto a las cepas SD330TM (*Enterobacter*) y SD2430LB (*Luteimonas*) se pudo observar que a las 24 horas las dos cepas tienen una población similar. Sin embargo, con el paso del tiempo la población de la cepa SD330TM (*Enterobacter*) disminuye hasta que a las 72 horas ya no se detecta. En cuanto a la cepa

SD2430LB (*Luteimonas*) se ve un aumento de su población de 10^8 UFC a las 48 horas teniendo una baja a las 72 horas de 10^4 UFC, es de notar, que cuando se encontraban las dos cepas a las 24 horas se mantuvieron estables, con el paso del tiempo la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) se favoreció con la disminución de la población de la cepa SD330TM (*Enterobacter*), pero en vez de aumentar su población cuando esta cepa desapareció, se visualizó que la ausencia de esta cepa afectó su crecimiento, teniendo una disminución de su población. Al analizar el comportamiento de estas tres bacterias en el medio papa dextrosa observamos que la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) inhibe tanto a SD2037TM (*Dyella*) como a SD330TM (*Enterobacter*), manteniendo poblaciones estables de 10^8 a 10^9 UFC hasta las 72 horas analizadas, deduciendo que en este medio no necesita a ninguna bacteria y que este medio favorece a la producción de posibles metabolitos de la cepa SD2430LB (*Luteimonas*), que provocan la inhibición de las otras dos cepas bacterianas.

En cuanto a los ensayos de crecimiento de cepas en pares (coinoculadas) es curioso observar que en el medio mínimo no le fue posible crecer a ninguna combinación de cepas. Sin embargo, en medio LB, se pudo notar que las cepas SD2037TM (*Dyella*) y SD2430LB (*Luteimonas*) no pueden crecer juntas en los tres tiempos analizados. En la combinación de SD2037TM (*Dyella*) y SD330TM (*Enterobacter*), se observó que sólo la cepa SD330TM (*Enterobacter*) puede crecer, pero al paso del tiempo ésta disminuye drásticamente observando que, a las 72 horas apenas si se observan 2 colonias en la primera dilución. Esto nos da la idea de que la cepa SD2037TM (*Dyella*) es capaz de estar presente con una baja población y que esta puede estar produciendo un metabolito que necesita SD330TM (*Enterobacter*) y que con el paso del tiempo la concentración de este disminuye con la desaparición de esta cepa bacteriana y por ello el crecimiento de la cepa SD330TM (*Enterobacter*) se vea afectado. Por otro lado, en la combinación de las cepas SD330TM (*Enterobacter*) y SD2430LB (*Luteimonas*), sólo la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) fue capaz de crecer, llegando a una población de 10^9 UFC a las 72 horas, observando que la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) vuelve a inhibir el

crecimiento de SD330TM (*Enterobacter*) y esta vez no es necesaria para su crecimiento.

En cuanto al ensayo de co-inoculación en el medio papa dextrosa en la combinación SD2037TM (*Dyella*) y SD330TM (*Enterobacter*) se observó que ambas pueden crecer hasta las 72 horas detectando poblaciones bajas de 10^1 y 10^2 UFC respectivamente, pudiendo observar que son capaces de coexistir, pero necesitan tiempo para adaptarse en este medio. La combinación de las cepas bacterianas SD2037TM (*Dyella*) y SD2430LB (*Luteimonas*) presentó el mismo comportamiento que en el medio LB y medio mínimo, no pudiendo detectarse ninguna de las dos cepas en los tres tiempos analizados. En el co-cultivo de las cepas SD330TM (*Enterobacter*) y SD2430LB (*Luteimonas*) se observó que la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) crece establemente alcanzando poblaciones de hasta 10^9 UFC, mientras que la cepa SD330TM (*Enterobacter*) se ve inhibida completamente. Esto deja claro que la cepa SD2430LB (*Luteimonas*) bloquea el crecimiento de SD330LB (*Enterobacter*) y que esta no es capaz de producir ningún daño a la cepa SD2430LB (*Luteimonas*).

Estas interacciones observadas *in vitro* dan una idea del complejo equilibrio que debe existir en el suelo para poder favorecer las interacciones planta-bacteria. Se cree que las interacciones competitivas son un factor clave que controla la estructura y la diversidad de la comunidad microbiana presente en el suelo y que esto puede definir una determinada carga microbiana. Las interacciones pueden favorecer diferentes cepas microbianas, incluso una cepa bacteriana puede adquirir mutaciones espontaneas en sistemas de transducción de señales que regulan varios procesos que se han visto ser importantes para la interacción bacteria planta, estas mutantes predominan bajo ciertas condiciones ambientales a las de la cepa silvestre, pero sin eliminarla, actuando ambas variantes de manera mutualista (Chancey S.T. *et al*, 2002, William W. *et al*, 2011).

Se ha documentado como se puede establecer un equilibrio dinámico de la diversidad de cepas bacterianas impactando la estructura del suelo y el aislamiento

espacial en la diversidad microbiana y la estructura de la comunidad. Existen evidencias que indican que el efecto de bacteriocinas puede promover más que eliminar la diversidad microbiana en el ambiente (Benjamín K. *et al*, 2002).

Benjamín Kerr (2002), estableció que es posible que la generación y el mantenimiento de la biodiversidad coexistan cuando la dispersión y la interacción son locales, mientras que una cepa excluye a las otras cuando la comunidad está bien mezclada. Menciona tres diferentes tipos de ambientes uno al que denomina en frasco (líquido), a este lo define como un entorno bien mezclado en el que la dispersión y la interacción no son exclusivamente locales; el siguiente es denominado en placa estática el cual es un entorno en el que la dispersión y la interacción son principalmente locales; y por último está el termino de placa mixta, un entorno intermedio entre estos dos extremos.

Esto nos deja ver que las interacciones que se van a estar efectuando en la rizosfera son complejos y diversos, el equilibrio entre poblaciones va a dar lugar al correcto grupo de bacterias que controlándose entre sí son capaces de otorgar su máximo beneficio a la planta, en nuestro caso a un pino. En este mismo sentido el ambiente o composición de suelo de rodal perturbado o alterado ubicado en Cuatempan, pudo verse modificado, lo que provocó que la población microbiana se afectara y que las bacterias que favorecían al establecimiento de *P. chiapensis*, fueran disminuyendo, siendo desplazadas por otro grupo de microorganismos que ahora les favorecía ese nuevo ambiente, provocando que la germinación de *P. chiapensis* ya no se viera beneficiada por algún microorganismos y esto justifique porque no fue posible aislar bacterias promotoras de la germinación de *P. chiapensis*.

Dentro de las propiedades de las cepas aisladas están la capacidad de producir auxinas en concentraciones necesarias para tener un efecto directo en las plantas, con rangos de 0.5 a 4 µg de índoles/ml de proteína con excepción de la cepa H830LGI (*Echerichia*) que fue capaz de producir hasta 29 µg de índoles/ml de proteína. Existen diversos reportes de diferentes especies de *Bacillus*, *Burkholderia*,

Leclercia en donde se han caracterizado estos aislados y han observado que son capaces de producir giberelinas e indoles y que además estas propiedades están relacionadas con la promoción de germinación (Kampert M. *et al*, 1974; Gutiérrez-Manero F.J. *et al*, 2001; Joo G. J. *et al*, 2004; Joo G. J. *et al*, 2009; Shahzad R. *et al*, 2016; Raheem S. *et al*, 2017).

La capacidad de poder producir estos metabolitos por las cepas bacterianas aisladas indica que pueden estar implicadas en su capacidad para fomentar la germinación del pino. Se ha documentado que el AIA juega un papel importante en la germinación. Se sabe que las semillas acumulaban altas cantidades de IAA durante la imbibición de semillas, el crecimiento y germinación de las raíces de las plántulas (Bialek K. *et al*, 1992; Birgit K. *et al*, 2005). En estudios sobre la latencia y germinación de semillas de pino se ha encontrado que el IAA se acumula antes de la germinación en *P. sylvestris*, esta auxina va a estar implicada en el proceso de germinación y en la etapa temprana de elongación. Se estima que dentro de los primeros 12 días el pino necesita sintetizar esta hormona para tener un correcto desarrollo de este (Ljung K. *et al*, 2001). El efecto calendario observado por estas cepas se podría deber a la producción de AIA, es decir, las bacterias proporcionarían AIA extra a lo que produce el pino. Así se lograría que las concentraciones necesarias de esta fitohormona se pudieran alcanzar en menor tiempo, logrando la germinación dentro de los primeros seis días, además de aumentar la elongación de la plántula.

En cuanto el papel en la germinación de la giberelina se ha reportado que es capaz de romper el periodo de latencia del epicótilo en semillas, mostrando que las giberelinas podrían regular parcialmente la inactividad de las semillas (Hao H. *et al*, 2014). Por otro lado, tenemos la presencia de enzimas hidrolíticas en el cotiledón, las cuales son las encargadas de proporcionar los nutrientes y energía para el desarrollo del embrión. Se ha reportado que las que poseen un papel importante en este proceso son las amilasas y que la actividad de esta aumenta en los primeros 10 días de la germinación de las semillas de pinos (Jones R.L. *et al*, 1991; Perata P. *et al*, 1992; Yomo H. *et al*, 1973). Cabe mencionar que nuestras cepas que

poseen el efecto combinado tienen la propiedad de producir giberelinas en concentraciones que van de 0.6 a 0.121 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína y producir AIA de 0.27 a 1.53 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, siendo un posible mecanismo para lograr el efecto de disminución de tiempos de germinación y el aumento de las semillas germinadas.

Las concentraciones de AIA y giberelinas pueden tener diferentes efectos dependiendo de la planta. En el caso particular de los pinos se han hecho algunos estudios donde han analizado que la presencia de ambos es benéfica, como es el caso de *P. sylvestris* en el que observaron que tanto las giberelinas como el AIA están involucrados en la regulación del crecimiento longitudinal, viéndose reflejado en la producción de xilema y floema, en los brotes de dicho pino (Pharis R. P. *et al*, 1991). Zhao G. & Jiang X. (2014) mostraron que la giberelina exógena promovió la germinación y el vigor de las plántulas en *P. massoniana* al mejorar la respiración en las semillas o disminuir los niveles de ácido abscísico endógeno. En *P. sylvestris*, tanto las giberelinas como el IAA aumentaron el alargamiento del brote, la producción de xilema y floema y la concentración de IAA (Wang Q. *et al*, 1997).

El fósforo es un elemento nutritivo esencial para las plantas. Constituye aproximadamente el 0.2 por ciento del peso seco de una planta (Tak H.I. *et al*, 2012), y es uno de los nutrientes minerales más importantes para *P. taeda L* (Gatiboni L.C. *et al*, 2017), pero la concentración de fósforo soluble en el suelo suele ser muy bajo. El fósforo está disponible principalmente en suelos con un pH de alrededor de 6.5. Un rango de pH aproximado de 6 a 7 promueve la disponibilidad de nutrientes para las plantas (USDA-NRCS). Los suelos del rodal ubicado en la localidad de San Diego mostraron un valor de pH dentro del rango ideal, igual que rodal ubicado en la localidad de Cuatempan y solo el sitio de Hueyapan mostró un pH de 7.82, que podría limitar la disponibilidad de P a las plantas debido a la fijación por calcio. Por lo tanto, el pH del suelo también podría ser un factor para la distribución de la planta, al afectar la disponibilidad de fosfato, que fue contribuido por las rizobacterias. Además, las bacterias solubilizadoras de fósforo pueden ayudar al crecimiento de las plantas al mejorar la actividad rizobial; esto se logra estimulando la fijación de nitrógeno, sintetizando fitohormonas y mejorando la

biodisponibilidad de algunos elementos, como el zinc y el hierro (Wani P.A. *et al*, 2007), que están poco biodisponibles en los suelos.

Nuestras 18 cepas bacterianas aisladas en este trabajo que mostraron efecto en cuanto a la germinación poseen la capacidad de solubilizar fosfatos, además de observar acidificación del medio donde crecen, en contrastes de las cepas tomadas como controles negativos donde no se encontró que posean la capacidad de solubilizar fosfatos además de no modificar el pH del medio donde crecen. La solubilización de fosfatos ha sido reportada en diferentes géneros PGPR, los mecanismos por lo cual realizan esta solubilización son diversos, uno de los descritos es por el cambio en el pH, acidificando el medio y provocando una solubilización de los fosfatos insolubles presentes. Este fenómeno se debe a la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por las bacterias en cuestión (Fernández L. *et al*, 2005). La importancia de este mecanismo radica en que existen suelos con baja cantidad de fosfato disponible y este es uno de los compuestos indispensables para las plantas, de ahí la importancia de que existan bacterias en suelo que sean capaces de lograr hacer disponible para las plantas el fosfato presente (Bar-Yosef B. *et al*, 1999; Ghosh R. *et al*, 2016; Castellano H. A. *et al*, 2016). Otro mecanismo para la solubilización de fosfatos conocido es la liberación de enzimas extracelulares que son capaces de hacer disponible el fosfato, como es la fosfatasa alcalina (McGill W.B & Cole C.V. 1981).

De los 18 aislados bacterianos aislados pudimos obtener un total de 8 géneros (*Dyella*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lysobacter*, *Leclercia*, *Echerichia* y *Cupriavidus*) siendo el más representativo el género *Bacillus* con un porcentaje del 44%. Todos los géneros aquí identificados poseen diferentes características de bacterias PGPRs como solubilización de fosfatos, producción de indoles, fijación de nitrógeno, producción de la ACC (aminociclopropano-1-carboxilato) desaminasa, etc. (Joo G. J. *et al*, 2005; Skorokhod I. O. *et al*, 2011; Liu W. *et al*, 2014; Verma P. *et al*, 2016; Chauhan A. K. *et al*, 2016; Patil C. *et al*, 2016). Los cuales son mecanismos que son capaces de fomentar el crecimiento de las plantas.

Los aislados obtenidos en este estudio son capaces de promover la germinación de *P. chiapensis*, además de producir AIA, giberelinas y solubilizar fosfatos. Todos estos mecanismos pueden estar involucrados en la promoción de la germinación, pero en especial las concentraciones de AIA y giberelinas. Se observó que la cepa SD2037TM (*Dyella*) fue una de las que obtuvo mejores resultados dando un tiempo de germinación de menos de 6 días y tamaño de germinado de más de 97 milímetros, al analizar sus niveles de AIA se observó que es una de las cepas que tiene una mayor producción siendo de 1.48 µg de indol/ml de proteína a las 48 horas y que sus niveles de giberelinas a las 72 horas eran de 0.121 µg ácido giberílico/ml de proteína, mientras que la cepa H1637RC (*Cupriavidus*) fue la que obtuvo el menor tamaño de germinado siendo de un poco más de 77 milímetros, dando un tiempo de germinación de casi 7 días y sus niveles de AIA a las 48 horas fueron de 0.27 µg/ml de proteína, siendo la cepa que produjo menor cantidad de AIA, de igual manera la producción de giberelinas teniendo valores de 0.034 µg/ml de proteína a las 72 horas.

Además de las cualidades antes descritas, se probó si las bacterias aisladas eran capaces de hidrolizar almidón, obteniendo que las cepas SD2037TM (*Dyella*), SD437RC (*Bacillus*), SD1330LB (*Bacillus*), SD730LB (*Bacillus*), SD130RC (*Bacillus*), H3430LGI (*Bacillus*), SD2430LB (*Luteimonas*), SD530TM (*Bacillus*) son capaces de hidrolizar almidón a dos diferentes temperaturas (4 °C y 30 °C), observando una hidrólisis mayor a 4 °C. Esta cualidad nos da indicios de que estas cepas bacterianas son productoras de algún tipo de amilasas.

Durante la embriogénesis se da una serie de sucesos que provocan la aparición de tejidos organizados con funciones específicas. Las semillas de angiospermas acumulan las sustancias de reserva, en cuerpos proteicos (vacuolas especiales o vesículas originadas del RE), cuerpos lipídicos (oleosomas o esferosomas) y amiloplastos. La composición de las sustancias de reserva es diversa, está compuesta principalmente proteínas, lípidos e hidratos de carbono (Matilla A. J., 2008). Diversos géneros bacterianos son capaces de producir amilasas que favorecen la hidrólisis de almidón, promoviendo la germinación, en este estudio se

observó que las cepas productoras de esta hidrolisis pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Dyella* y *Luteimonas*.

Éste puede ser otro mecanismo por el cual las bacterias aisladas puedan favorecer la germinación de las semillas de *P. chiapensis*, logrando disminuir el tiempo de dormancia de dichas semillas.

SD2037TM (*Dyella*), la bacteria más efectiva para acelerar la germinación y aumentar la tasa de germinación, es una especie productiva de IAA y giberelinas y posible productora de amilasas. La cepa SD330TM (*Enterobacter*) que mostró la mayor producción de giberelina, no solo estimuló la tasa de germinación, sino que también aceleró el tiempo de germinación. Estos resultados implican que estas hormonas derivadas de bacterias podrían ayudar a la germinación de la semilla de pino en las primeras etapas.

Estos aislados del suelo de los rodales de *P. chiapensis* ubicados en las localidades de San Diego y Hueyapan se pudieron determinar como bacterias PGPRs para dicho pino, observando que son capaces de promover la germinación de las semillas. La capacidad de promover esta germinación se puede deber a la producción de fitohormonas sintetizadas por estas bacterias u otros mecanismos que favorecen el proceso de la germinación.

En cuanto a los aislados de las semillas de *P. chiapensis* se pudo observar que se encontraron cuatro diferentes géneros de cepas fúngicas (*Penicillium*, *Trichoderma*, *Diaporthe* y *Ciclosporium*), mientras que para las cepas bacterianas solo encontramos al género *Bacillus*. A su vez, se observó que las cepas bacterianas son capaces de inhibir a los aislados fúngicos de éstas y nos da una idea de la importancia del equilibrio de las poblaciones de microorganismo endógenos de las semillas. Un posible escenario de estas poblaciones es que el hongo sea favorable en los primeros días de la germinación y que en un estadio posterior este hongo pueda tornarse perjudicial para la plántula, en este momento la cepa bacteria propia de la semilla, juega el papel de controlar la población de la cepa fúngica para poder

permitir el éxito del germinado. Postulando que la concentración de la población de los diferentes microorganismos es lo que puede dictar que tipo de efecto es el que pueden ejercer en el proceso de germinación de *P. chiapensis*, sin embargo, para poder esclarecer este proceso es necesario realizar más estudios y poder entender este proceso.

Todos los datos nos muestran que las 18 cepas que aislamos poseen diferentes mecanismos que pueden estar implicados en el efecto de promoción de germinación que se observó y que las poblaciones de diferentes microorganismos pueden estar involucradas en el proceso de germinación y posiblemente en el establecimiento de *P. chiapensis*.

Todos nuestros resultados nos muestran que la interacción de diferentes géneros bacterianos puede ser necesaria para lograr una germinación adecuada y favorecer el éxito del germinado. Este es el primer estudio que reporta bacterias que actúan como promotoras de la germinación de semillas de *P. chiapensis*, además de asociar la posible ausencia de éstas o alguna inhibición de éstas por otras especies en rodales que han sido alterados o perturbados de alguna manera. Tomando esto en cuenta, las interacciones de diferentes microorganismos pueden ser decisivas para el éxito de al menos este pino. Con estos resultados se abre la posibilidad de implementar un tratamiento de tipo microbiológico para la restauración de los rodales alterados o perturbados para lograr que *P. chiapensis* sea capaz de volver a establecerse adecuadamente en dichos rodales. Algo importante que se debe considerar es que existen otras especies vegetales en dichos rodales y la modificación de estas poblaciones bacterianas podrían afectar a otras especies vegetales por el desequilibrio que se generaría en las poblaciones ya establecidas. Aunque aún falta mucho por esclarecer para llevar esta alternativa *in situ*, nuestros resultados abren el camino para poder ayudar a favorecer las poblaciones de *P. chiapensis* y lograr cambiar su estado de especie amenazada a una especie bien establecida.

9. Conclusiones

La población microbiana presente en los diferentes rodales de *P. chiapensis* varía de acuerdo al grado de alteración de éstos.

La inoculación de bacterias aisladas de los rodales no alterados ubicados en las localidades de San Diego y Hueyapan, en semillas de *P. chiapensis* favorece la germinación.

Los aislados bacterianos de *P. chiapensis* poseen propiedades PGPRs que pueden estar participando en la promoción de la germinación de las semillas de *P. chiapensis*.

Los aislados bacterianos de *Dyella* sp. SD2037TM y *Enterobacter* sp. SD330TM fueron los candidatos más prometedores, estimulando la germinación, al aumentar las tasas de germinación y el tamaño de los brotes.

Existen microorganismos endógenos de las semillas (bacterias y hongos) de *P. chiapensis* que pueden alterar su viabilidad.

Las poblaciones de diferentes microorganismos propios de *P. chiapensis* tienen una función importante en el proceso de germinación y en su posible establecimiento.

10. Perspectivas

1.- Analizar el papel de las bacterias y hongos endófitos de las semillas de *P. chiapensis*.

1.- Analizar el efecto de la coinoculación de bacterias y hongos en el proceso de germinación y establecimiento de *P. chiapensis*.

2.- Analizar el efecto de la inoculación de cepas bacterianas aisladas de la rizosfera en el proceso de establecimiento de *P. chiapensis*.

3.- Realizar ensayos de inoculación de bacterias y hongos autóctonos de la rizosfera de *P. chiapensis* en rodales alterados y analizar la germinación de semillas *in situ*.

11. Bibliografía

1. Abbas R., Rasul S., Aslam K., Baber M., Shahid M., Mubeen F., Naqqash T. (2019). Halotolerant PGPR: A hope for cultivation of saline soils. *J of King Saud Univ – Sci* 31(4):1195–1201. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.019>.
2. Anand R., Grayston, S., and Chanway, C. (2013). N₂-fixation and seedling growth promotion of lodgepole pine by endophytic *Paenibacillus polymyxa*. *Microb. Ecol.*, 66(2), 369-374. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0196-1>.
3. Andreolli M., Lampis S., Poli M., Gullner G., Biró B., and Vallini G. (2013). Endophytic Burkholderia fungorum DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosph*, 92(6), 688-694. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.033>.
4. Andresen J.W. (1964). The taxonomic status of *Pinus chiapensis*. *Phytol* 10(6): 417-421.
5. Aristizabal, M. A. R., Mora, N. C. H., & Corredor, D. W. S. (2019). Bacterias halófilas con potencial para la recuperación de suelos salinizados en Sáchica-Boyacá, Colombia. *Rev. Biol. Trop.* 67(3).
6. Bais H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.
7. Bal A.S. (2003). Isolation of endophytic bacteria from Lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* (Dougl.) Engelm) and western red cedar (*Thuja plicata* donn) and determination of their nitrogen fixing ability. Thesis Master of Science. University of British Columbia.

8. Balci, Y. and Halmschlager, E. (2003). Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. For Pathol 33(3), 157-174. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2003.00318.x>
9. Barea, J. M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., and Azcon-Aguilar, C. (1998). Impact on Arbuscular Mycorrhiza Formation of *Pseudomonas* Strains Used as Inoculants for Biocontrol of Soil-Borne Fungal Plant Pathogens. Appl environ microbiol 64(6), 2304-2307.
10. Barea, J. M., Azcón, R., and Azcón-Aguilar, C. (2002). Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. Antonie van Leeuwenhoek, 81(1-4), 343-351. <https://doi.org/10.1023/A:1020588701325>.
11. Barriuso J., Ramos S.B., Santamaría C., Daza A, Gutiérrez M.F.J. (2008). Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. J Appl Microbiol 105:1298-1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03862.x>
12. Bar-Yosef, B., Rogers, R. D., Wolfram, J. H., and Richman, E. (1999). *Pseudomonas cepacia* – mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. Soil Sci. Soc .Am. J. 63, 1703–1708. doi: 10.2136/sssaj1999.6361703x.
13. 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.
14. Benizri E., Piutti S., Verger S., Pagès L., Vercambre G., Poessel J. L., and Michelot P. (2005). Replant diseases: bacterial community structure and diversity in peach rhizosphere as determined by metabolic and genetic fingerprinting. Soil Biol Biochem 37(9), 1738-1746. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.009>.

15. Benjamin K., Margaret A. Riley, Marcus W. Feldman & Brendan J. M. Bohannan. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. *NATURE* 418: 171-174.
16. Bennett A.E., Daniell T.J., O'pik M., Davison J., Moora M., *et al.* (2013) Arbuscular Mycorrhizal Fungal Networks Vary throughout the Growing Season and between Successional Stages. *PLoS ONE* 8(12): e83241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083241>.
17. Bialek K., Michalczyk L., Cohen J.D. (1992). Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* 100: 509–517.
18. Bias H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S. and Vivanco J.M. (2006). The role of root exudates rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann Rev Plant Biol.* 57:233-266.
19. Birgit K., Marc A.C., Gerhard L.M. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281–307.
20. Blackwell M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *Amer J Bot*, 98(3), 426-438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>.
21. Brant J. B., Sulzman E. W. and Myrold D. D. (2006). Microbial community utilization of added carbon substrates in response to long-term carbon input manipulation. *Soil Biol Biochem* 38(8), 2219-2232. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.022>.
22. Brimecombe M. J., Frans A. De Leij, and James M. Lynch. (2000). The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations." *Biochemistry and Organic substances at the soil-plant interface. The Rhizosphere, Biochemistry and Organic substances at the soil-plant interface*, Marcel Dekker, Inc: 95-140.
23. Broeker W.S. (2006). *Breathing easy, Et tu, O2*. Columbia University.

24. Budi S.W., VanTuinen D., Martinotti, G., Gianinazzi, S., and Van Tuinen, D. (1999). Isolation from the *Sorghumbicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soil borne fungal pathogens. *App Environ Microbiol* 65(11), 5148–5150.
25. Burgess T. I., Gordon T. R., Wingfield M. J. and Wingfield B. D. (2004). Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*. *Mycol. Res.*, 108(12), 1399-1406. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001443>.
26. Buscot F., Munch J. C., Charcosset J. Y., Gardes M., Nehls U. and Hampp, R. (2000). Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiol Review*, 24(5), 601-614. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00561.x>
27. Calvaruso C., Turpault M. P. and Frey-Klett P. (2006). Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Appl Environ Microbiol* 72(2), 1258-1266. doi: 10.1128/AEM.72.2.1258-1266.2006.
28. Calvaruso C., Turpault M. P., Leclerc E., & Frey-Klett P. (2007). Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microbial Ecol.*, 54(3), 567-577. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9260-z>.
29. Carrell A. A., and Frank A. C. (2014). *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. *Front microbiol* 5, 333. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00333>.
30. Castellano-Hinojosa A., Correa-Galeote D., Palau J., and Bedmar E. J. (2016). Isolation of N₂-fixing rhizobacteria from *Lolium perenne* and evaluating their plant growth promoting traits. *J Basic microbial* 56(1), 85-91.

31. Chakraborty P., Sarker R.K., Roy R., Ghosh A., Maiti D., Tribedi P. (2019) Bioaugmentation of soil with *Enterobacter cloacae* AKS7 enhances soil nitrogen content and boosts soil microbial functional-diversity. *Biotech.* 9(7):253. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1791-8>.
32. Chancey S.T., Wood D.W., Pierson E.A., Pierson L.S. (2002). Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Appl Environ Microbiol.* Jul;68(7):3308-14.
33. Chaparro J. M., Sheflin A. M., Manter D. K., and Vivanco J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase oil seed plant fertility. *Biol Fert Soils*, 48(5), 489-499.
34. Chauhan A. K., Maheshwari D. K., Kim K., and Bajpai, V. K. (2016). Termitarium-inhabiting *Bacillus endophyticus* TSH42 and *Bacillus cereus* TSH77 colonizing *Curcuma longa* L.: isolation, characterization, and evaluation of their biocontrol and plant-growth-promoting activities. *Canad J Microbiol* 62(10), 880-892.
35. Cheng J., Zhang M.Y., Wang W.X., Manikprabhu D., Salam N., Zhang T.Y., Wu Y.Y., Li W.J., Zhang Y.X. (2016). *Luteimonas notoginsengisoli* sp. nov., isolated from rhizosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(2):946-950. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000816>.
36. Clemmensen K. E., Bahr A., Ovaskainen O., Dahlberg A., Ekblad A., Wallander H. and Lindahl B. D. (2013). Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science*, 339(6127), 1615-1618. DOI: 10.1126/science.1231923
37. CONABIO (2010). Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Bosque mesófilo de montaña. Gobierno Federal. https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/pdf/BMM_parte%201.pdf

38. CONAFOR. SIRE. CONABIO. Paquete tecnológico *Pinus chiapensis* (Martínez Andresen).
<http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/956Pinus%20chiapensis.pdf>.
39. Contreras M., Loeza P.D., Villegas J., Farias R., Santoyo G. (2016). A glimpse of the endophytic bacterial diversity in roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*). *Genet. Mol. Res*, 15(3), 1-10. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038542>.
40. Cook R. J., Thomashow L. S., Weller D. M., Fujimoto D., Mazzola M., Bangera G., Kim, D. S. (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *PNAS* 92(10), 4197-4201. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4197>.
41. Das A., Osborne J.W. (2018) Monitoring the stress resistance of *Pennisetum purpureum* in Pb (II) contaminated soil bioaugmented with *Enterobacter cloacae* as defence strategy. *Chemosphere* 210:495–502. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.050>.
42. Del Castillo R.F. and Acosta S. (2002). Ethnobotanical notes on *Pinus strobus* var. *chiapensis*. *Anales del instituto Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica* 73(2): 319-327. <http://www.ejournal.unam.mx/bot/073-02/BOT73208.pdf>.
43. Del Castillo R.F. Trujillo Argueta S. and Sáenz Romero C. (2009). *Pinus chiapensis*, a keystone: Genetics, ecology and conservation. *For Ecol Manag* 257: 2201-2208.
44. Del Castillo R. F., Trujillo-Argueta S., Sánchez-Vargas N. and Newton A. C. (2010). Genetic factors associated with population size may increase extinction risks and decrease colonization potential in a keystone tropical pine. *Evolut Applicat* 574–588.
45. Dixon J.B. (1991). Roles of clays in soils. *Appl Clay Sci* 5(5–6):489–503

46. Donahue, J. K. W. S., Dvorak and Gutiérrez E. A. (1991). The distribution, ecology and gene conservation of *Pinus ayacahuite* and *Pinus chiapensis* in Mexico and Central America. CAMCORE. Bulletin on Tropical Forestry, 8:1-28.
47. Doty S. L., Oakley B., Xin G., Kang J. W., Singleton G., Khan Z., and Staley J. T. (2009). Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis*, 47(1), 23-33. <https://doi.org/10.1007/BF03179967>.
48. Duponnois R. and Garbaye J. (1991). Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-Laccaria laccata symbiosis: effects in aseptic and in glasshouse conditions. *Ann. For. Sci.* Vol. 48, No. 3, pp. 239-251. EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/forest:19910301>.
49. Duponnois R. and Plenchette C. (2003). A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza* 13(2), 85–91. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0204-7>.
50. Dvorak W.S. and Brouard J. (1987). An evaluation of *Pinus chiapensis* as a commercial plantation species for the tropics and subtropics. *Commonwealth Forestry Review*, 66 (2): 165-176.
51. Dvorak W.S., Donahue J.K. and Vázquez J.A. 1996. Provenance and progeny results for the tropical White pine, *Pinus chiapensis*, at five and eight years of age. *New For.* 12:2, 125-140.
52. Eberl L. and Vandamme P. (2016) Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Res* 5:1007. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8221.1>
53. Eguiluz T. 1982. Clima y distribución del género *Pinus* en México. *Ciencia Forestal* 38 (7): 30-44.
54. Esmaeel Q., Vilanova M.L., Rondeau M., Leclère V., Clément C., Jacquard C., Sanchez L., Ait B.E (2018) Paraburkholderia phytofirmans PsJN-Plants interaction: from perception to the induced mechanisms. *Front Microbiol* 9:2093. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02093>.

55. FAO. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010, Informe principal (2010). Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia. <http://www.fao.org/3/i1757s/i1757s.pdf>.
56. FAO. El estado de los bosques del mundo. (2012). Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia. <http://www.fao.org/3/a-i3010s.pdf>.
57. FAO, Noticias (30/10/18). América Latina y el Caribe lideran agenda mundial para integrar la biodiversidad en los sistemas alimentarios. <http://www.fao.org/mexico/noticias/detail-events/es/c/1161321/>.
58. Fernández L., Zalba P., Gómez M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cl. Suelo (Argentina)* 23 (1):31-37.
59. Finkmann W., Altendorf K., Stackebrandt E., Lipski A. (2000) Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbio* 150(1):273-282. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-273>.
60. Fitter A. H., Garbaye, J. (1994). Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant soil*, 159(1), 123-132.
61. FRA (2015). Documento de Trabajo de la Evaluación de los Recursos Forestales, No. 180.
62. Frey-Klett P., Garbaye J. A., and Tarkka M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New phytologist*, 176(1), 22-36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>.
63. Frey-Klett P., M. Chavatte, M. L. Clause, S. Courier, C. Le Roux, J. Raaijmakers, M. Martinotti, J. C. Pierrat, and J. Garbaye. (2005) Ectomycorrhizal

symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165:317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01212.x>.

64. Gatiboni L.C., Vargas C.O., Albuquerque J.A., Almeida J.A., Stahl J., Chaves D.M., ... Rauber L.P. (2017) Phosphorus fractions in soil after successive crops of *Pinus taeda* L. without fertilization. *Cienc. Rural* 47(7). <https://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160595>.
65. Gehring C. A., Mueller R. C., Haskins K. E., Rubow T. K., Whitham T. G. (2014). Convergence in mycorrhizal fungal communities due to drought, plant competition, parasitism and susceptibility to herbivory: consequences for fungi and host plants. *Front microbiol* 5, 306. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00306>.
66. Ghosh R., Barman S., Mukherjee R., & Mandal N. C. (2016). Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L.(Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbiol research*, 183, 80-91.
67. Glickmann E and Y. Deessaux. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkosky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria". *Soil Biol Biochem* 45:631-640.
68. Global Forest Watch. "Tree cover loss in Mexico". Accessed on 08/11/2020 from www.globalforestwatch.org.
69. Gutiérrez-Mañero F. J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J. R., Tadeo F., Talon, M. (2001), The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plantarum*, 111: 206–211. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x.
70. Gur A., Cohen Y. (1989). The peach replant problem—some causal agents. *Soil Biol. Biochem.* 6, 829–834.

71. Guzmán G. (1995). La diversidad de hongos en México. *Rev. Mex. Mic.* 25: 52-57.
72. Habib S.H., Kaussar H., Saud H.M. (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. *Bio Med Res Int* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6284547>.
73. Hao H., He Z., Li H., Shi L., Tang Y.D. (2014). Effect of root length on epicotyl dormancy release in seeds of *Paeonia ludlowii*, Tibetan peony. *Annals of Botany*, 113(3), 443–452. <http://doi.org/10.1093/aob/mct273>.
74. Hatala J. A., Dietze M. C., Crabtree R. L., Kendall K., Six D., and Moorcroft P. R. (2011). An ecosystem-scale model for the spread of a host-specific forest pathogen in the Greater Yellowstone Ecosystem. *Ecol. Appl.* 21(4), 1138-1153. <https://doi.org/10.1890/09-2118.1>.
75. Hawksworth D.L. and Rossman A.Y. (1997). Where are all the undescribed fungi?. *Phytopathol* 87(9):888-91. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.9.888>.
76. Hohmann P., Jones E., Hill R.A. and Stewart A. (2011). Understanding Trichoderma in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonization and growth promotion for commercially grown seedlings. *Fungal Biol.* 115: 759-767. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.05.010>.
77. Holmes A.J., Roslev P., McDonald I.R., Iversen N., Henriksen K., Murrel J.C. (1999). Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl Environ Microbiol* 65(8) 3312-3318.
78. Honorato-Pinto R. (2000). *Manual de Edafología*. 4a ed. Alfaomega. México. ISBN 9789701505311.
79. Hoseini M., Rahimzadeh-Khoei F., Mirshekari B. (2013). Seed priming techniques improve germination and yield in two landraces of lemon balm in laboratory experiment and field study. *Internat J Indigenous Med Plants* 29(1):1144-1150.

80. Hou J., Liu W., Wang B., Wang Q., Luo Y., Franks, A. E. (2015). PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response. *Chemosphere*, 138, 592-598.
81. Iasur-Kruh L., Zahavi T., Barkai R., Freilich S., Zchori-Fein E., Naor V. (2018). *Dyella*-like bacterium isolated from an insect as a potential biocontrol agent against grapevine yellows. *Phytopathology* 108(3): 336–341. <https://doi.org/10.1094/phyto-06-17-0199-r>.
82. Irshad U., Brauman A., Villenave C., Plassard, C. (2012). Phosphorus acquisition from phytate depends on efficient bacterial grazing, irrespective of the mycorrhizal status of *Pinus pinaster*. *Plant Soil*, 358(1-2), 155-168. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1161-3>.
83. Johansson J. F., Paul L. R., Finlay R. D. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS microbiol Ecol* 48(1), 1-13.
84. Johnson N. C. and Gehring C. A. (2007). Mycorrhizas: symbiotic mediators of rhizosphere and ecosystem processes. In *The Rhizosphere* (pp. 73-100). <https://doi.org/10.1016/B978-012088775-0/50006-9>.
85. Jones R.L. and Jacobsen J.V. (1991). Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. *Int. Rev. Cytol.* 126, 49–88
86. Joo G. J., Kang S. M., Hamayun M., Kim S. K., Na C. I., Shin D. H., Lee I. J. (2009). *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *J Microbiol* 47(2), 167-171.
87. Joo G. J., Kim Y. M., Kim J. T., Rhee I. K., Kim J. H., Lee I. J. (2005). Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *J Microbiol* 43(6), 510-515.

88. Joo G. J., Kim Y. M., Lee I. J., Song K. S., Rhee I. K. (2004). Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotech letters*, 26(6), 487-491.
89. Jorquera M., Martinez O., Maruyama F., Marschner P., and Mora M. D. L. L. (2008). Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microb Environ* 23(3), 182-191. Doi: 10.1264/jsme2.23.182.
90. Kampert M., Strzelczyk E., Pokojaska A. (1974). Production of gibberellin-like substances by bacteria and fungi isolated from the roots of pine seedlings (*Pinus silvestris* L.). *Acta Microbiol Polonica. Series B: Microbiologia applicata*, 7(3), 157-166.
91. King E.O., Ward W.K., Raney D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44:301-307.
92. Kumar P., Dubey R.C., Maheshwari D.K. (2012) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol Res* 167(8):493-499. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>.
93. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870-4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
94. Lakshmanan V., Selvaraj G., and Bais H. (2014). Functional soil microbiome: below ground solutions to an above ground problem. *Plant Physiol* 166, 689–700. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245811>.
95. Lau E., Ahmad A., Steudler P.A., Cavanaugh C.M. (2007) Molecular characterization of methanotrophic communities in forest soils that consume atmospheric methane. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 490-500. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00308.x>.

96. Ledig F.T. (1998). Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson DM (ed) Ecology and Biogeography of *Pinus*, Cambridge University Press: Cambridge. pp 251–280.
97. Liu W., Hou J., Wang Q., Ding L., and Luo Y. (2014). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of petroleum-contaminated saline-alkali soil. *Chemosphere*, 117, 303-308.
98. Ljung K., Ostin A., Lioussanne L., Sandberg G. (2001). Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. *Plant Physiol* 125: 464–475.
99. López-Escudero F. J. and Mercado-Blanco J. (2011). Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil*, 344(1-2), 1-50.
100. Madmony A., Chernin L., Pleban S., Peleg E., Riov J. (2005). *Enterobacter cloacae*, an obligatory endophyte of pollen grains of Mediterranean pines. *Folia microbial* 50(3):209-216. <https://doi.org/10.1007/bf02931568>.
101. Málan F. S., (2001). The Wood quality of *Pinus chiapensis* (Mart.) Andresen grown in the Mpumalanga forest region. *South. Afr. For. J* 192, 51-58.
102. Mankel A., Krause K., and Kothe E. (2002). Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Appl Environ Microbiol* 68(3), 1408-1413. doi: 10.1128/AEM.68.3.1408-1413.2002.
103. Maougal R. T., Brauman A., Plassard C., Abadie J., Djekoun A., Drevon J. J. (2014). Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *European J Soil Biol* 62, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.02.006>.

104. Martin F. and Nehls, U. (2009). Harnessing ectomycorrhizal genomics for ecological insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(4), 508-515. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.007>.
105. Martínez A.L., De los Santos Posada H.M., Fierros González A.M., Fierros Mateo R., Pérez Miranda R., Hernández Ramos A., Hernández Ramos J. (2018). Expansion factors and system partition of aerial biomass for *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen. *Rev. mex. cienc. forestales* 10(51):107-132. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i51.311>.
106. Martínez Maximino (1940). Pinaceas Mexicanas. *An. Inst. Biol. Mex.* 11: 57-84.
107. Martínez M. (1998). Atributos poblacionales de *Pinus chiapensis* en Chiapas, México. *Anales del Instituto de Biología UNAM, Serie Botánica* 69(2):119-134.
108. Matilla A. J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. *Fundamentos de fisiología vegetal*, 2, 549.
109. Mayer A. M. (1958). Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. *Nature* 162 : 1670-1671.
110. McGill W.B., Cole C.V. (1981). Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26:267–268 *Microbial Ecol* 41(2):140-14.
111. Meinhardt K. A. and Gehring C. A. (2012). Disrupting mycorrhizal mutualisms: a potential mechanism by which exotic tamarisk out competes native cotton woods. *Ecol. Appl.*, 22(2), 532-549. <https://doi.org/10.1890/11-1247.1>.
112. Monicca S. and Ragazzi A. (2008). Fungal Endophytes in Mediterranean Oak Forests: A Lesson from *Discula quercina*. *Phytopathol* 98-4-0380 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0380>.

113. Moreno G., Manjón J. L., Álvarez-Jiménez J. (2013). Los hongos y el cambio climático. Desert truffle (Kagan-Zur V., Sitrit Y, Roth-Bejerano, NA Morte, eds). Springer Verlag, Berlín, 129-135.
114. Mu Y., Pan Y., Shi W., Liu L., Jiang Z., Luo X., Zeng X.C., Li W.J. (2016). *Luteimonas arsenica* sp. nov., an arsenic-tolerant bacterium isolated from arsenic-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(6):2291-2296. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001024>.
115. Müller H., Berg C., Landa B. B., Auerbach A., Moissl-Eichinger C., Berg, G. (2015). Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus* antagonists colonize Mediterranean olive trees. *Frontiers Microbiol* 6, 138. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00138>.
116. Muñoz Flores H. J., Hernández Zaragoza O., Hernández Zaragoza P., García Magaña J. J., Barrera Ramírez R. (2015). Comparación del crecimiento de *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen, *Pinus greggii* Engelm. Y *Pinus patula* Schl. et Cham. EN PLANTACIONES COMERCIALES ESTABLECIDAS EN HUEYAPAN, PUEBLA. *Foresta Veracruzana*, 17(1).
117. Muñoz-Rojas J., Fuentes-Ramírez L.E., Caballero-Mellado J. (2005) Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiol Ecol* 54:57–66.
118. Muñoz-Rojas J., Bernal P., Duque E., Godoy P., Segura A., Ramos J.L. (2005). Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol*. 72: 472–477. pmid:16391080
119. Murphy J. Riley J.P., (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27, 31-36.
120. Naveed M., Mitter B., Reichenauer T. G., Wieczorek K., Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by

Burkholderia phytofirmans PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. Environ Exp Bot 97, 30-39.

121. Nehls U. (2008). Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. J Exp Bot 59(5), 1097-1108. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm334>.
122. Newcomb Maria and Six Diana. (2001). White Pine Blister Rust in the Greater Yellowstone Area. The UW National Parks Service Research Station Annual Reports. 25. 144-148. 10.13001/uwnpsrc.2001.3483.
123. Newton A. C., Allnutt T. R., Dvorak W. S., del Castillo R. F., Ennos R. A. (2002). Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP marker. Heredity, 89: 191-198.
124. Ngo H.T., Yin C.S. (2016). *Luteimonas terrae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Radix ophiopogonis*. Int J Syst Evol Microbiol 66(5):1920-1925. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000901>.
125. Nicholas K.B., Nicholas H.B. Jr. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the authors. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
126. NOM-021-RECNAT-2000. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. NORMA OFICIAL MEXICANA. Diario Oficial de la Federación.
127. NOM-059-SEMARNAT-2010 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. NORMA OFICIAL MEXICANA. Diario Oficial de la Federación. http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091.
128. Nuñez M. A., Hayward J., Horton T. R., Amico G. C., Dimarco R. D., Barrios-García M. N., and Simberloff D. (2013). Exotic mammals disperse exotic fungi that

- promote invasion by exotic trees. PLoS one, 8(6), e66832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066832>.
129. Nurmiäho Lassila E.L., Timonen S., Haahtela K., and Sen R. (1997). Bacterial colonization pattern of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study. *Can J Microbiol* 43(11), 1017-1035. <https://doi.org/10.1139/m97-147>.
130. Ou F.H., Gao Z.H., Chen M.H., Bi J.Y., Qiu L.H. (2019). *Dyella dinghuensis* sp. nov. and *Dyella choica* sp. nov., isolated from forest soil. *Int. J. Syst. Evol Microbiol* 69(5):1496-1503. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003356>.
131. Palaniappan P., Chauhan P.S., Saravanan V.S., Anandham R., Sa T. (2010). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol Fertil Soils* 46:807–816. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0485-5>.
132. Paterson J., Jahanshah G., Li Y., Wang Q., Mehnaz S., Gross, H. (2016). The Contribution of Genome Mining Strategies to the Understanding of Active Principles of PGPR Strains. *FEMS Microbiol Ecol* 93(3). pii: fiw249. doi: 10.1093/femsec/fiw249.
133. Patil C., Suryawanshi R., Koli S., Patil S. (2016). Improved method for effective screening of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase producing microorganisms. *J Microbiol Methods*, 131, 102-104.
134. Pellegrin C., Morin E., Martin F.M. and Veneault-Fourrey C. (2015). Comparative Analysis of Secretomes from Ectomycorrhizal Fungi with an Emphasis on Small-Secreted Proteins. *Front. Microbiol.*, 6:1278. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01278>.
135. Pendleton A. L., Smith K. E., Feau N., Martin F. M., Grigoriev I. V., Hamelin R., and Davis J. M. (2014). Duplications and losses in gene families of rust

- pathogens highlight putative effectors. *Front. Plant Sci.*, 5, 299. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00299>.
136. Perata P., Pozueta-Romero J., Yamaguchi J. and Akazawa J. (1992) Artifactual detection of ADP-dependent sucrose synthase in crude plant extracts. *FEBS Lett.*, 309, 283–287.
137. Pereira R. M., da Silveira E.L., Scaquitto D.C., Pedrinho E.A.N., Val Moraes S.P., Wickert E., Carareto Alves L.M. and de Macedo Lemos E.G. (2006) Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Brazilian J Microbiol* 37(4), 439-447. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400007>
138. Perry, J.P. (1991). *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland. 231 p.
139. Pharis R. P., Yeh F.C., and Dancik B. P., (1991). Superior growth potential: What is its basis, and can it tested for at an early age? . *Can. J. For. Re.* 21: 368-374.
140. Pinon J. and Frey P. (2005). Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. *Rust Diseases of Willow and Poplar*, eds M. H. Pei and A. R. McCracken (Wallingford: CAB International), 139–154.
141. Pirttila A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllyla R., Hohtola A. (2000). Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch pine (*Pinus silvestris* L.) by *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 66(7): 3073-3077. doi: 10.1128/AEM.66.7.3073-3077.2000.
142. Pivato B., Offre P., Marchelli S., Barbonaglia B., Mougel C., Lemanceau P., & Berta G. (2009). Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19(2), 81. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0205-2>.

143. Plett J. M., Daguerre Y., Wittulsky S., Vayssières A., Deveau A., Melton S. J., Martin, F. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *PNAS* 111(22), 8299-8304.
144. Poole E.J., Bending G.D., Whipps J.M. and Read D.J. (2001). Bacterial associated with *Pinus sylvestris* *Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytologist* 151: 743-751. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00219.x>.
145. Poupin M.J., Greve M., Carmona V. Pinedo I. (2016). A Complex Molecular Interplay of Auxin and Ethylene Signaling Pathways Is Involved in Arabidopsis Growth Promotion by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Front. Plant Sci.* 7:492. doi: 10.3389/fpls.2016.00492.
146. Pramanik K., Mitra S., Sarkar A., Maiti T.K. (2018). Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092. *J. Hazard Mater* 351:317–329. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.005>
147. Pregitzer K. S. and Euskirchen E. S. (2004). Carbon cycling and storage in world forests: biome patterns related to forest age. *Glob. Change Biol.*, 10: 2052-2077. doi:10.1111/j.1365-2486.2004.00866.x.
148. Probanza A., Mateos J.L., Garcia J.A.L., Ramos B., De Felipe M.R., Gutiérrez M.F.J. (2001). Effects of Inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. Growth, Bacterial Rhizosphere Colonization, and Mycorrhizal Infection. *Microb Ecol* 41:140-148. <https://doi.org/10.1007/s002480000081>.
149. Ragazzi A., Vagniluca S., Moricca S. (1995). European expansion of oak decline: involved microorganisms and methodological approaches. *Phytopathol. Mediterr.* 207-226.

150. Raheem Shahzad, Muhammad Waqas, Abdul Latif Khan, Khadija Al-Hosni, Sang-Mo Kang, Chang-Woo Seo and In-Jung Lee. (2017). Indoleacetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Acta Biol. Hung.*, 68(2), pp. 175–186 (2017). DOI: 10.1556/018.68.2017.2.5.
151. Rajkumar M., Ae N., Freitas H. (2009). Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 77(2), 153-160.
152. Reyes C, Ávalos J. and Cerdá-Olmedo E. (1991). Gibberellins and Carotenoids in the Wild Type and Mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Appl Environ Microbiol.* 57(11): 3378–3382. PMID: 16348593.
153. Ribeiro C.M., Cardoso E.J.B.N. (2012). Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiol Res* 167(2):69–78.
154. Rodríguez Acosta M. and Martínez Arteaga B. 2005. Índice de sitios para *Pinus chiapensis* (Martinez) andresen, en los estados de Veracruz y Puebla, México. *RCHSCFA* 11(1): 39-44.
155. Romeu E. (1995). Los pinos mexicanos, récord mundial de biodiversidad. *CONABIO. Biodiversitas*, 2:11-15.
156. Ryan R. P., Germaine K., Franks A., Ryan D. J. and Dowling D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol letters*, 278(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>.
157. Rzedowski J., Vela L. (1966). *Pinus strobus* var. *chiapensis* en la Sierra Madre del Sur de México. *Revista Hispano-Americana de Ciencias Pu. y Apl. México.* 24(5-6):211-216.
158. Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y bosques*, 14(1), 107-120.

159. Sánchez L., Bárcena Ibarra A., Samaniego J., Galindo L. M., Ferrer J., Alatorre J. E., Mostacedo J. (2018). La economía del cambio climático en América Latina y el Caribe: una visión gráfica. https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/42228/4/S1701215A_es.pdf
160. Sarkar A., Ghosh P.K., Pramanik K., Mitra S., Soren T., Pandey S., Mondal M.H., Maiti T.K. (2018). A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Res Microbiol* 169(1):20-32. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.005>.
161. SEDESOL. (1994). Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL794. (Secretaría de Desarrollo Social) Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
162. Sethuraman P., Balasubramanian N. (2010). Removal of Cr (VI) from aqueous solution using *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *Int J Eng Sci Technol* 2(6):1811-1825.
163. Shahid M., Hameed S., Zafar M., Tahir M., Ijaz M., Tariq M., Hussain K., Ali A. (2019). *Enterobacter* sp. strain Fs-11 adapted to diverse ecological conditions and promoted sunflower achene yield, nutrient uptake, and oil contents. *Braz J Microbiol* 50(2):459-469. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00061-x>.
164. Shahzad R., Waqas M., Khan A. L., Asaf S., Khan M. A., Kang S. M., Lee, I. J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiol Biochem*, 106, 236-243.
165. Shengjing Shi., Richardson A.E., O'Callaghan M., De Angelis K.M., Jones E.E., Stewart A, Firestone M.K. and Condrón L.M. (2011) Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 77: 600-610. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01150.x>.

166. Skorokhod I.O., Tserkovniak L.S. and Kudrysh I.K. (2011). The antioxidant effect of *Bacillus subtilis* and *Azotobacter vinelandii* on the seeds of crops. *Mikrobiol. Z.* 73: 44-50.
167. Smith S. E. and Read D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edn. New York: Academic Press.
168. Smithers B. (2017). Soil Preferences in Germination and Survival of Limber Pine in the Great Basin White Mountains. *Forests* 8(11):423. <https://doi.org/10.3390/f8110423>.
169. Srivastava Lalit M. (2002). «Gibberellina». *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. San Diego, California: Associated Press. pp. 171-190. ISBN 978-0-12-660570-9.
170. Sun Z.B., Zhang H., Yuan X.F., Wang Y.X., Feng D.M., Wang Y.H., Feng Y.J. (2012). *Luteimonas cucumeris* sp., nov., isolated from a cucumber leaf. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:2916–2920. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.037549-0>.
171. Tagliavini M., Marangoni B. (1992). Growth of peach as affected by decomposition of own root residues in soil. *Plant Soil* 145, 253–260.
172. Tak H.I., Ahmad F., Babalola O.O., Inam A. (2012). Growth, photosynthesis and yield of chickpea as influenced by urban wastewater and different levels of phosphorus. *Int J Plant Res* 2: 6–13. <https://doi.org/10.5923/j.plant.20120202.02>.
173. Technical Paper 9. 2002. Procedures for soil analysis. Compiled and edited by L.P. Van Reeuwijk. Sixth edition 2002. http://www.soil-science.com/fileadmin/downloads/wrb/ISRIC_TechPap09_2002.pdf.
174. Thomas P. and Farjon A. (2013). *Pinus strobus* var. *chiapensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T32499A2820834. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T32499A2820834.en>.

175. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25(24): 4876-4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>.
176. Timonen S. and Sen R. (1998). Heterogeneity of fungal and plant enzyme expression in intact Scot pine *Suillus bovinus* and *Paxillus involutus* mycorrhizospheres developed in natural forest humus. *New Phytol.*, 138.
177. Upadhyay S.K., Singh J.S., Singh D.P. (2011). Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere* 21(2): 214-222. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(11\)60120-3](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(11)60120-3).
178. Velásquez A., J.F. Mas, J.R. Díaz-Gallegos, R. Mayorga-Saucedo, P.C. Alcántara, R. Castro, T. Fernández, G. Bocco, E. Ezcurra y J.L. Palacio (2002). Patrones y tasas de cambio de uso del suelo en México. *Gaceta* 62. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT, México pp. 21-37.
179. Verma P., Yadav A. N., Khannam K. S., Kumar S., Saxena A. K., Suman, A. (2016). Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. *J. Basic. Microbiol.*, 56(1), 44-58.
180. Vivas M., Zas R., Sampedro L., Solla A. (2013). Environmental maternal effects mediate the resistance of Maritime pine to biotic stress. *PloS one*, 8(7), e70148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070148>.
181. Vogelsang K.M. and Bever J. D. (2009). Mycorrhizal densities decline in association with non native plants and contribute to plant invasion. *Ecology* 90, 399–407. <https://doi.org/10.1890/07-2144.1>.
182. Wagg C., Bender S. F., Widmer F. and Vander Heijden M. G. A. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem

- multifunctionality. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., 111,5266–5270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320054111>.
183. Wang Q., Little C.H., Odén P.C. (1997) Control of longitudinal and cambial growth by gibberellins and indole-3-acetic acid in current-year shoots of *Pinus sylvestris*. *Tree Physiol* 17(11):715–721
184. Wang Y., Lim L., Madilao L., Lah L., Bohlmann J. and Breuil C. (2014). Gene discovery for enzymes involved in limonene modification or utilization by the mountain pine beetle-associated pathogen *Grosmannia clavigera*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(15), 4566-4576. doi: 10.1128/AEM.00670-14
185. Wani P.A., Khan M.S., Zaidi A. (2007). Co-inoculation of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agron Hung* 55(3):315–323. <https://doi.org/10.1556/aagr.55.2007.3.7>.
186. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173(2), 697-703.
187. William W., Driscoll, John W., Pepper, Leland S., Pierson III and Elizabeth A. Pierson. (2011). Spontaneous Gac Mutants of *Pseudomonas* Biological Control Strains: Cheaters or Mutualists?. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 77, No. 20, p. 7227–7235.
188. Wright J.A., Marin A.M., Dvorak W.S. (1996). Conservation and use of the *Pinus chiapensis* genetic resource in Colombia. *For Ecol Manag* 88: 283–288.
189. Xin Y., Cao X., Wu P., Xue S. (2014) *Luteimonas dalianensis* sp. nov., an obligate marine bacterium isolated from seawater. *J Microbiol* 52:729–733. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3610-6>.
190. Xin G., Glawe, D. and Doty, S. L. (2009). Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees. *Mycol. Res.*, 113(9), 973-980. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.001>.

191. Yomo H., Varner J.E. (1973). Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. *Plant Physiol* 51: 708-713.
192. Yu Tian, Bo Guan, Daowei Zhou, Junbao Yu, Guangdi Li, and Yujie Lou (2014), "Responses of Seed Germination, Seedling Growth, and Seed Yield Traits to Seed Pretreatment in Maize (*Zea mays* L.),". *Scient World J*, vol. 2014, Article ID 834630, 8 pages, 2014.
193. Zamora S. C. y Velasco F. (1977). *Pinus strobus* var. *chiapensis*, una especie en peligro de extinción en el estado de Chiapas. *Rev. mex. cienc. forestales* 2: 3-23.
194. Zhang D.C., Liu H.C., Xin Y.H., Zhou Y.G., Schinner F., Margesin R. (2010). *Luteimonas terricola* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1581–1584. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.015537-0>.
195. Zhang N., Yang D., Kendall J. R., Borriss R., Druzhinina I. S., Kubicek C. P., Zhang, R. (2016). Comparative genomic analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* reveals evolutionary traits for adaptation to plant-associated habitats. *Front Microbiol* 7: 2039. doi: 10.3389/fmicb.2016.02039.
196. Zhao G., Jiang X. (2014). Roles of Gibberellin and auxin in promoting seed germination and seedling vigor in *Pinus massoniana*. *Fort Sci* 60(2):367–373
197. Zhou H., Qu Y., Kong C., Wu Y., Zhu K., Yang J., Zhou J. (2012). Promiscuous esterase activities of the C–C hydrolases from *Dyella ginsengisoli*. *Biotechnol Lett.* 34:1107–1113. doi: 10.1007/s10529-012-0880-0.
198. Zhou X.Y., Gao Z.H., Chen M.H., Jian M.Q., Qiu L.H. (2019). *Dyella monticola* sp. nov. and *Dyella psychrodurans* sp. nov., isolated from monsoon evergreen broad-leaved forest soil of Dinghu Mountain, China. *Int J Syst Evol Microbiol.* 69(4):1016-1023. doi: 10.1099/ijsem.0.003259.
199. Zwolinski M. D. (2007). DNA sequencing: strategies for soil microbiology. *Soil Sc Soc Amer J* 71(2), 592-600.

200. Williams M. (2002). Deforesting the earth: from prehistory to global crisis. Chicago (Estados Unidos de América), University of Chicago Press.
201. White T. J., Bruns T., Lee S. and J.Taylor, in: A. Innis, Gelfand D. H. and J. J. Sninsky (1990). PCR Protocols, Academic Press, San Diego, USA, 1990, pp. 315-322.

Anexos

Definición de UMA:

Las UMA se refieren a los predios e instalaciones registrados que operan de conformidad con un plan de manejo aprobado y dentro de los cuales se da seguimiento permanente al estado del hábitat y de poblaciones o ejemplares que ahí se distribuyen (SEMARNAT).

Medios de cultivos

- **TESMES:** Extracto de levadura, dextrosa anhidra, manitol, buffer TES/MES pH 6.7, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y azul de bromotimol.
- **PY:** Bactotripton, extracto de levadura y $CaCl_2$.
- **Mínimo M9:** $MgSO_4$, $FeSO_4$, solución goodies y glucosa.
- **LB:** Bactotripton, extracto de levadura y $NaCl$.
- **Rojo Congo:** Acido málico, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $NaCl$, extracto de levadura, $FeCl_3$, KOH y rojo Congo.
- **LGI:** K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$, $NaMo_4$, glucosa, extracto de levadura y azul de bromotimol.
- **NBRIP:** $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MgSO_4 \cdot H_2O$, KCl , $(NH_4)_2SO_4$, $Ca_2(PO_4)_2$, glucosa e hidroxapatita.
- **King B:** Peptona, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, Triptófano y glicerol
- **Medio para giberelinas:** Glucosa, NH_2PO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$, $(Na_2)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$.
- **Sabouroud:** Glucosa y pluripeptona
- **Medio mínimo base K:** K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $NaCl$, $CaCl_2$, acido málico, $FeCl_3$, $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$

- **Medio papa dextrosa:** Dextrosa y papa
- **Medio mínimo base K adicionado con papa:** K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $NaCl$, $CaCl_2$, ácido málico, $FeCl_3$, $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$.

Condiciones de PCR bacterias:

Las condiciones para la PCR utilizando los oligonucleótidos UN27RC Y UN1392 fueron las siguientes:

95°- 5 minutos de desnaturalización.

95°- 40 segundos de desnaturalización (30 ciclos).

57°- 40 segundos de alineamiento (30 ciclos).

72°- 50 segundos de amplificación (30 ciclos).

72° -10 minutos amplificación final.

Condiciones de PCR hongos:

Las condiciones para PCR utilizando los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 fueron las siguientes

95°- 5 min. desnaturalización.

95°- 40 segundos de desnaturalización (30 ciclos).

60°- 40 segundos de alineamiento (30 ciclos).

72°- 50 segundos de amplificación (30 ciclos).

72° -10 minutos de amplificación final.

Cuantificación de indoles por método colorimétrico modificado de Salkowski:

- Para la cuantificación de indoles se realizó un cultivo de 24 y 48 horas de cada cepa bacteriana analizada en este estudio en medio King B.
- Se toma un mililitro del medio de cultivo y se coloca en un eppendorf de 1.5 ml estéril.
- Se centrifuga a 13 000 rpm por 5 minutos.
- Se toma 500 microlitros de sobrenadante y se coloca en un eppendorf estéril.

- Agregar 500 microlitros de reactivo PC e incubar 30 minutos en oscuridad.
- Leer absorbancia a 540 nm.

Reactivo PC: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_3SO_4

Cuantificación de fosfatos por método colorimétrico Mo-blue

- Para la cuantificación de fosfatos se realizó un cultivo de 24 y 48 horas de cada cepa bacteriana analizada en este estudio en medio NBRIP.
- Se toma un mililitro del medio de cultivo y se coloca en un eppendorf de 1.5 ml estéril.
- Se centrifuga a 13 000 rpm por 5 minutos.
- Se toma 500 microlitros de sobrenadante y se coloca en un tubo falcón estéril.
- Agregar 1 ml de agua y 1 ml de reactivo 1.
- Incubar 2 horas a 37° C
- Leer absorbancia a 880 nm.

Reactivo 1: H_2SO_4 , $\text{H}_24\text{Mo}_7\text{N}_6\text{O}_{24}$ y ácido ascórbico

Cuantificación de giberelinas por método de fluorescencia

- Para la cuantificación de giberelinas se realizó un cultivo de 72 horas de cada cepa bacteriana analizada en este estudio en medio mínimo para giberelinas.
- Se toma un mililitro del medio de cultivo y se coloca en un eppendorf de 1.5 ml estéril.
- Se centrifuga a 13 000 rpm por 5 minutos.
- Se toma 200 microlitros de sobrenadante y se coloca en un tubo falcón estéril.

- Agregar 200 microlitros de etanol 96% y homogenizar.
- Después agregar 2 mililitros de una mezcla ácido sulfúrico: etanol (50:50)
- Incubar a 48 ° C en baño María durante 30 minutos
- Leer fluorescencia a 464 nm de emisión y 406 nm de excitación en un espectrofotómetro de fluorescencia.

Medición de halo de hidrolisis de almidón:

Para determinar el halo de hidrolisis de almidón se procedió a realizar un índice entre el halo de crecimiento bacteriano y el halo de hidrolisis de almidón.

Para esto se hicieron cuatro mediciones del diámetro del halo de crecimiento bacteriano y cuatro del halo de hidrolisis de almidón, se realiza un promedio del tamaño del halo y se determina el índice entre el tamaño del halo de hidrolisis de almidón y el halo del crecimiento bacteriano.

Entre más lejano hacia el lado positivo de 1 se encuentre el valor del índice, nos indica una mayor hidrolisis de almidón.



Potential seed germination-enhancing plant growth-promoting rhizobacteria for restoration of *Pinus chiapensis* ecosystems

Cristina Domínguez-Castillo¹ · Julia María A. Latorre-Cruz² · Dolores Castañeda-Antonio¹ · José Antonio Munive¹ · Xianwu Guo³ · Jesús Francisco López-Olguín¹ · Luis Ernesto Fuentes-Ramírez¹ · Ricardo Carreño-López¹

Received: 3 February 2020 / Accepted: 16 June 2020
© Northeast Forestry University 2020

Abstract Rhizosphere soil samples of three *Pinus chiapensis* sites were analyzed for their physicochemical properties, soil bacteria isolated and screened in vitro for growth-promoting abilities. Nine isolates that showed promise were identified to five genera *Dyella*, *Luteimonas*, *Enterobacter*, *Paraburkholderia* and *Bacillus* based on the sequences of 16S rRNA gene. All the strains were isolated from non-disturbed stands. These bacteria significantly decreased germination time and increased sprout sizes. Indole acetic acid and gibberellin production and phosphate solubilisation were detected. Results indicate that these biochemicals could be essential for *P. chiapensis* distribution and suggest the possibility that PGPR inoculation on *P. chiapensis* seeds prior to planting could improve germination and possibly seedling development.

Keywords *Pinus chiapensis* · Plant growth-promoting rhizobacteria · *Dyella* · *Luteimonas* · *Enterobacter*

Introduction

Efforts to modify the effects of climate change and preserve biodiversity, it is apparent that trees play an important role. The loss or degradation of forest ecosystems due to climate change is of considerable concern. Mexico is rich in temperate and tropical forests, with one-quarter of the total land area classified as forests, and is one of the countries with the world's largest number of pine species.

Pinus chiapensis (Martínez) Andresen is a Neotropical pine endemic to southern Mexico and southwestern Guatemala. In Mexico, it is most abundant in Oaxaca and Chiapas states as well as small populations in Puebla, Guerrero, and Veracruz (Del Castillo et al. 2009). Compared to other Neotropical pine species, *P. chiapensis* requires humid, warm localities (Donahue et al. 1991; Alba et al. 2003; Del Castillo et al. 2009) and grows on acidic soils at 600–2200 m a.s.l. on steep slopes (Dvorak et al. 1996). *P. chiapensis* is a species of economic importance, however, some populations have been severely reduced or disappeared in recent years due to land use changes and over-exploitation for its wood quality (Zamora and Velasco 1977; Donahue et al. 1991; Del Castillo and Acosta 2002). This species is classified as 'vulnerable' according to the International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) Red List criteria (Thomas and Farjon 2013), and needs 'special protection' by the environmental agency of the Mexican Government (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales 2001).

There are a number of methods employed to restore and expand native forests and to conserve wildlife habitats. The

Project funding: This work was supported by SEP, Grant DSA / 103.5 / 15/10976 and VIEP-BUAP, Grant 20 Sub-Program.

The online version is available at <http://www.springerlink.com>.

Corresponding editor: Yanbo Hu.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11676-020-01250-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ricardo Carreño-López
iesistomy@yahoo.com.mx

¹ Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

² Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

³ Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México

application of these methods may be limited by climate conditions, soil quality, and/or characteristics of the species (Smithers 2017). Although chemical methods have proved to be efficient in increasing germination rates, they often have harmful environmental side effects, hence the need to develop effective biotechnological methods to improve forest restoration. A common approach that has been adopted by many countries is pre-farming treatment (Hoseini et al. 2013).

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) have been used to promote the establishment of *Pinus* species. The mechanisms of growth promotion by rhizospheric bacteria include the production of phytohormones (indole-3-acetic acid, IAA) and siderophores, enzymatic activities that indirectly help plant growth and antagonism against pathogens (Probanza et al. 2001; Barriuso et al. 2008). The bacteria of many genera have been described as having plant growth promoting activities. For example, bacteria belonging to the genus *Paraburkholderia* are capable of producing IAA (indole acetic acid), siderophores, ACC (amino-cyclopropane carboxylic acid) deaminase and antibiotic compounds. These bacteria have shown biotechnological potential to control pathogens and to reduce biotic and abiotic stresses (Naveed et al. 2014; Eberl and Vandamme 2016; Esmaeel et al. 2018). Bacteria belonging to the genus *Dyella*, isolated from forest soils (Ou et al. 2019; Zhou et al. 2019), produced phytohormones, solubilized phosphates and synthesized ACC deaminase (Palaniappan et al. 2010; Contreras et al. 2016). Some species of this genus have the potential for biotechnological application for the degradation of phenolic compounds and biocontrol (Zhou et al. 2012; Isur-Kruh et al. 2018). The ability of species of the genus *Bacillus* to produce compounds associated with an increase in plant size and weight, for example, IAA, is also well documented (Kumar et al. 2012). This genus has also been capable of removing toxic metals such as chrome by efflux pumps by neutralizing their negative effect, reducing Cr (VI) to Cr (III), and by activating enzymes involved in the detoxifying process of reactive oxygen species (ROS) (Sethuraman and Balasubramanian 2010). Some species of the *Enterobacter* genus were reported as PGPR because they were confirmed to be IAA producers and also able to solubilize phosphates, fix nitrogen, produce siderophores (Pramanik et al. 2018; Sarkar et al. 2018; Chakraborty et al. 2019; Shahid et al. 2019), protect plants against metal toxicity by producing antioxidants (Das and Osborne 2018) and have an ACC deaminase activity that plays a significant role in sustaining plant growth and development by reducing senescence (Upadhyay et al. 2011; Habib et al. 2016). The genus *Lateimonas* was described for the first time by Finkmann et al. (2000) and has been isolated from different contaminated environments and rhizospheric soils (Zhang et al. 2010; Sun et al. 2012; Xin et al. 2014; Cheng et al. 2016; Mu

et al. 2016; Ngo and Yin 2016). These bacteria are able to eliminate fuel contaminants from soil, participating actively in soil restoration (Mu et al. 2016). All of the bacteria described, although they have been attributed to enhance plant growth, have not been reported as being a growth promoter of *P. chiapensis*.

The disappearance of many species is increasing and *P. chiapensis* is endangered due to human impact. Thus, information on plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) could be used to improve or restore the population of this pine by seed inoculation techniques. Bacteria are likely to adapt or change their diversity and population structure as a response to changing habitats, for example, those disturbed by human activities. The analysis of PGPR in different regions with distinct of *P. chiapensis* populations could possibly provide valuable information on native PGPR populations contributing to plant restoration. This study investigates the ability of bacteria isolated from the rhizosphere of *P. chiapensis* to improve the germination of seeds and the development of the species. This would help pre-farming treatment of the seeds and produce healthy seedlings in *P. chiapensis* conservation programs, permitting the acceleration of the restoration of disturbed forests.

Material and methods

Sampled sites

Samples were collected from three pine locations, one of which was strongly affected by human activities. The three sites were located at 19° 52'02" N and 97° 19'42" W, Hueyapan; 19° 51'00" N and 97° 43'42" W, Cusutempan (highly disturbed); and 19° 47'46" N and 97° 05'40" W, Teziutlán, México (Fig. 1).

Soil sampling

In each of the three regions, eight soil samples were taken for analysis, with each sample a mixture of 10 subsamples. Thus, a total 80 subsampling sites were distributed across each region. The sampling system was done in a zigzag pattern, with a random starting point and at a depth of approximately 30 cm. A 1.5 kg sample was taken from each location and taken to the laboratory for analysis.

Physicochemical of soils

The physicochemical characteristics of the soil samples were measured, and included total nitrogen (N), phosphorus (P), iron (Fe), zinc (Zn), sodium (Na), potassium (K) and calcium (Ca), pH, conductivity, water content and texture, according to standard protocols (Roeuwijk 2002).

Fig. 1 Location of the *Pinus chiapensis* stands in Cuautempan, Hueyapan and Teziutlán regions, México



These characteristics were analyzed through a variance test (ANOVA) with a post-hoc Tukey-HSD with a confidence level of 95% using the Statgraphics Centurion XVI program and canonical correspondence analysis. The classification, composition, and nutrient contents from the three regions were separated based on the presence or absence of PGPR bacteria along axis 1 and axis 2, respectively.

Strains and culture conditions

To isolate the bacterial strains, one gram of soil was suspended in 99 mL sterile water, serially diluted up to 10⁻¹⁰ and cultured at 30 °C and 37 °C on six different media: TESMES, PY, LB, LGI, Congo Red and M9 (Muñoz-Rojas et al. 2005). They were further isolated by repeated streaking and by microscopic examination. The purified strains were kept in 20% (v/v) glycerol at -80 °C. Five µL of the glycerol stock were taken to inoculate on a LB medium for experimentation.

Germination

Seeds were washed, disinfected with 0.1% Tween 20 for 10 min, 0.8% sodium hypochlorite for 10 min and 50% ethanol for 10 min, and germination carried out on water agar (0.8% w/v) in Petri dishes. The samples were incubated at 27 °C and a 12/12 h light/dark cycle at 70% relative humidity. Before the seeds germinated, they were inoculated with 10 µL of bacterial culture containing 10⁸ colony-forming unit (CFU) in the exponential growth phase, because, in this growth phase, adequate interaction between bacteria and seeds has been observed (Angulo et al. 2014).

Non-inoculated seeds were used as controls. Germination was calculated as the number of sprouted seeds divided by the number of total seeds, multiplied by 100. Variance tests (ANOVA) were carried out with a post-hoc Tukey test with a confidence level of 95% using the Statgraphics Centurion XVI program. The dynamics of the germination process were analyzed through a multiple regression analysis with the STATA version 12 statistical estimation application software for multilevel models.

In this regression analysis, two effects can be determined. The "intensity" effect refers to a proportion of germinated seeds during a period as compared to the control, while time is not considered a variable. The "calendar" effect refers to the germination rate at certain times. For this effect, cases of decreased germination times caused by bacteria could be analyzed, reaching the same proportion of germinated seeds but in a shorter time than the control without inoculation. Both effects are observed by plotting the ratio of seed germination against time (days), where:

$$\text{Seed germination proportion} = \frac{\text{Number of germinated seeds}}{\text{Total germinated seeds}}$$

Amplification of the 16S rRNA gene

Total DNA was extracted from overnight cultures at 28 °C in 15 mL of LB broth harvested during the mid-log phase (OD₆₂₀ of 0.5–1), using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA), and

stored at 4 °C. PCR was performed in a 2400 GeneAmp PCR Systems® Perkin Elmer thermocycler. The 16S rRNA amplicon was obtained from each sample using *UN27F* and *UN1392R* primers (Biodiversa Inc., Colima, Mexico). The PCR cycling program comprised an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, 35 subsequent cycles including denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at various specific temperatures for 30 s, an extension step at 72 °C for 90 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. The reaction was carried out in a volume of 25 µL using Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. PCR products were purified with a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), and visualized under ultraviolet light after staining with ethidium bromide. In all cases, the amplification product had a length of approximately 1500 bp using the GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA, NYSE:TMO) as a molecular weight marker.

Sequence alignment and phylogenetic analyses

The PCR products of 16S rDNA were sent to the Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Mexico, for sequencing. The 16S rDNA sequences obtained were compared with those retrieved from the GenBank/EMBL/DBJ databases. Nucleotide sequence alignments were made using CLUSTAL_X (Thompson et al. 1997), and corrected manually using GeneDoc (Nicholas and Nicholas 1997). The evolutionary history was inferred using a Maximum Likelihood (ML) analyses performed with MEGA version 7 (Kumar et al. 2016) based on Jukes and Cantor (1969) with 1000 bootstrap replications. Phylogenetic trees were visualized using MEGA version 7.

Measurement of auxins and gibberellins

For auxin determination, King's medium B (Himedia) supplemented with tryptophan ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was used. Indole-3-acetic acid (IAA) was quantified using a modified *Salkowski* colorimetric method (Glickmann and Deessaux 1995), with sodium salt indole-3-acetic acid (Sigma-Aldrich 15,148) as a control. For the quantification of auxins, a milliliter of the cultures was taken at 24, 48, and 72 h of incubation and centrifuged for 5 min at 12,000 rpm. Five hundred microliters of the supernatant were removed and 500 µl of PC reagent added. The samples were incubated for 30 min and the absorbance read at 540 nm.

Gibberellins were identified using a qualitative fluorescence method (Reyes et al. 1991). Their concentration was calculated by preparing standard curve using gibberellin A3 (GA₃) (Sigma-Aldrich G7645) as reference. Bacterial cultures were incubated in 5 ml of ICI medium (a medium with a low concentration of nitrogen to allow the production of gibberellins) for 24, 48, and 72 h at 30 °C. After

incubation, a 0.2-mL aliquot of the culture was mixed with 0.2 mL of ethanol (96%, v/v) and 2 mL of a cooled mixture of equal volumes of sulfuric acid and 96% ethanol. After the mixture was incubated at 48 °C for 30 min by shaking, the fluorescence emission at 464 nm was measured with a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (excitation at 406 nm) (Candau et al. 1992).

Phosphate solubilization

The capability for solubilizing phosphate was assessed using the *Mo-blue* colorimetric method (Murphy and Riley 1962) in the National Botanical Institute's phosphate (NBRIP) medium with bromothymol blue to follow pH changes.

To determine phosphates, 1-mL of culture was incubated for 24, 48, and 72 h and centrifuged for 5 min at 12,000 rpm. Five hundred microliters of the supernatant were removed and 500 µL of reagent C (1 volume of 6 N sulfuric acid with 2 volumes of distilled water, and 1 volume of 2.5% ammonium molybdate with 1 volume of 10% ascorbic acid) and 1 mL of water were mixed, incubated for 2 h at 37 °C and the absorbance at 880 nm read. The quantification of dissolved phosphorus was performed with a KH₂PO₄ standard curve.

Results

Evaluation of *P. chiapensis* stands

A transition from humid temperate to a humid semi-warm climate is dominant in the three regions. The soils from these regions are classified as Andisols (strongly weathered soils with a high capacity to hold both nutrients and water, making these soils very productive and fertile). Soil pH values ranged between 6.4 and 7.8; total N ranged between 0.1% and 1.0% and organic matter between 2.5% and 7.5%, with a wide range of clay 18% to 50% that confer characteristic andic properties (Table 1). Silt and sand fractions range between 22 to 66% and 18% to 50%, respectively (Table 1). In the Hueyapan and Teziutlán stands, *P. chiapensis* populations are well-established with trees at different growth stages. The Cuautempan site is an anthropogenically disturbed habitat with only mature trees. No seedlings or saplings were observed. This site is commonly used as a waste dump.

Physicochemical characteristics of soils were analyzed with a correspondence analysis model and showed that data from the disturbed site formed a cluster separate from the undisturbed sites (Fig. 2). The first axis had a Cronbach's alpha greater than 0.97, explaining 71.8% of the variance. The variables principally contributed to the clustering are Zn, K, silt, P, Fe, Na, sand, organic material and Ca, while the second axis had a Cronbach's alpha 0.78, explaining

Table 1 Physicochemical characteristics of soils via ANOVA analysis for different localities

Localities	Climate	pH	Organic matter (%)	Conductivity (dS)	Texture (%)			Soil type	P (mg/kg)	Total N (%)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)
					Silt	Clay	Sand								
Cuautempas	Humid temperate	7.0 ± 0.5 ^a	7.5 ± 0.47 ^b	3.4 ± 0.5 ^a	22.0 ± 0.81 ^a	49.9 ± 0.92 ^a	28.1 ± 0.9 ^b	Andisol	12.2 ± 0.5 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	11.0 ± 1.2 ^a	170.0 ± 4.3 ^a	< 0.05 ± 0.02 ^a	102.0 ± 3.09 ^a	405.0 ± 5.96 ^a
	Humid semi-warm														
	Warm														
Hueyapan	Humid temperate	7.8 ± 1.59 ^b	7.2 ± 2.64 ^b	4.9 ± 0.5 ^b	36.2 ± 8.8 ^b	18.3 ± 0.5 ^a	43.5 ± 4.0 ^b	Andisol	4.3 ± 0.3 ^b	1.0 ± 0.2 ^b	20.0 ± 0.6 ^b	36.0 ± 2.4 ^b	13.3 ± 0.7 ^b	102.62 ± 2.7 ^b	263.0 ± 5.92 ^b
	Humid semi-warm														
	Warm														
Teziutlán	Humid temperate	6.4 ± 0.6 ^a	2.5 ± 1.2 ^a	3.6 ± 0.2 ^a	66.6 ± 2.4 ^a	22.0 ± 0.7 ^b	11.4 ± 0.5 ^a	Andisol	0.3 ± 0.06 ^a	0.1 ± 0.01 ^a	7.7 ± 0.66 ^a	0.02 ± 0.002 ^a	116.64 ± 1.1 ^a	40.1 ± 1.4 ^a	30.94 ± 2.7 ^a
	Humid semi-warm														
	Warm														

Results of the one-way ANOVA analysis for the post hoc Tukey-HSD test among groups; Different letters in the same row (by main effect) indicate significant difference (p < 0.05)

25.5% of the variance, only clay and sampled site were representative in this axis.

The more closely related variables, forming a cluster at the disturbed site, were clay, Zn, Ca, Fe, and P. Sodium was grouped at the non-disturbed cluster and at the other secluded cluster, while the other variables were related to sample sites or grouped in another cluster unrelated to the sample sites (Fig. 2).

Seed germination in response to bacterial inoculation

Four hundred and ninety-eight bacterial isolates were obtained from the rhizosphere of *P. chiapensis* stands in three localities. One hundred and seventy-seven isolates were obtained from the Teziutlán site, 241 from the Hueyapan site and 80 from Cuautempas. All isolates were analyzed for their potential to stimulate seed germination and were monitored daily for 25 days. The most effective nine isolates belonged to the *Enterobacter*, *Dyella*, *Luteimonas*, *Paraburkholderia* and *Bacillus* genera and identified by 16S rRNA gene sequence analysis (Figs. S1, S2, S3, S4, and S5). The *Bacillus* species were the most representative (GenBank accession numbers are shown in Table 2). These nine isolates increased germination rates, improved sprout sizes, and reduced germination times (Table 2).

All nine isolates were obtained from the non-disturbed sites (three from Hueyapan and six from Teziutlán) where *P. chiapensis* populations are developing under good conditions, in contrast with the disturbed Cuautempas site where no bacterial isolates were obtained.

In addition, a multilevel logistic regression analysis of time related to the event was carried out, and provided information on the dynamics of the germination process and helped determine if the bacteria improved or delayed germination compared to the controls. In this analysis, the dependent variable was the presence or absence of germination (radicle appearance), and the independent variables were germination time in days and strain inoculated to the seeds, versus the non-inoculated control (Fig. 3).

There are three distinct dynamic phases of the germination process. In the first phase (days 1 to 5), the beginning of germination (calendar effect) with the nine inoculated cultures was observed relative to the non-inoculated controls. According to the statistical test, none of the bacteria had a significant intensity effect compared to the control. In the second phase (days 6 to 10), the inoculated cultures resulted in an exponential increase in seed germination compared to the controls, of which *Dyella* sp. SD2037TM was the most effective for inducing germination. The "calendar type" positive-effect was also observed with the *Dyella* SD2037TM, *Enterobacter* SD3307TM, *Luteimonas* SD2430LB, *Paraburkholderia* H130LGI and *Bacillus*

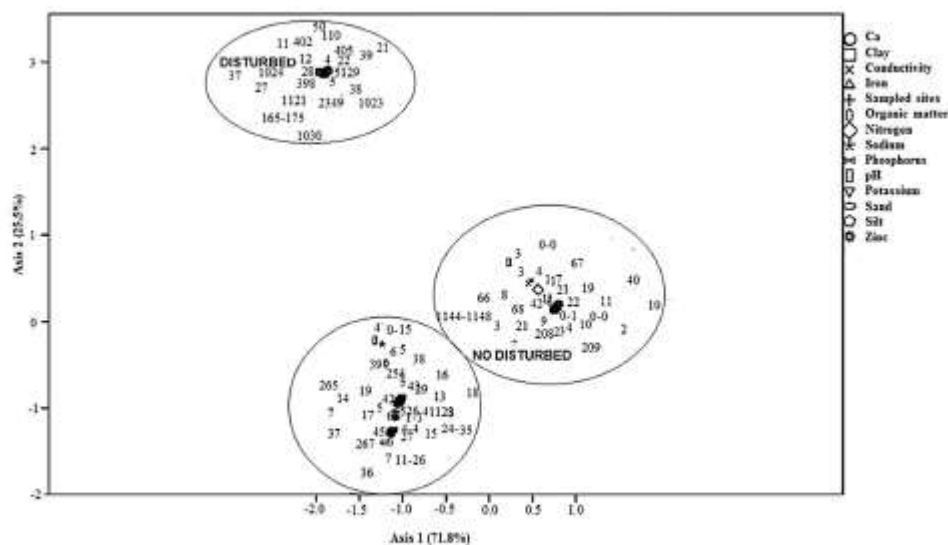


Fig. 2 Bio-spatial dispersion diagram of physicochemical characteristics on disturbed and none-disturbed sites

H3430LGI inoculates. In the third phase (days 11 to 14), the germination proportion did not change significantly. All nine cultures showed the “intensity” effect and five the “calendar” effect (Fig. 3).

Mechanisms of germination stimulation by bacterial inoculation

In this study, two phytohormones (IAA, gibberellin) production and phosphate solubilizing capacity were tested. All nine bacteria produced IAA at concentrations from 0.5 to 1.38 µg IAA·mL⁻¹, which could induce a direct effect on seeds. The *Enterobacter* sp. SD330TM inoculate attained maximum production after 24 h. The nine bacterial cultures also produced gibberellins, with *Enterobacter* sp. SD330TM and *Bacillus* sp. SD1730LB showing higher gibberellin production than the other inoculates: 0.6 ± 0.08 µg·mg⁻¹ and 0.47 ± 0.03 µg·mg⁻¹ respectively (Table 3). All nine cultures also had the capacity to solubilize phosphate. *Bacillus* sp. SD1330LB and *Bacillus* sp. H1830TM were the most effective, solubilizing 33.8 ± 0.4 µg phosphate·mg⁻¹ and 31.8 ± 0.7 µg phosphate·mg⁻¹ respectively.

Three isolates from the two undisturbed stands (*Bacillus* sp. SD1537RC, *Bacillus* sp. SD237RC, and *Bacillus* sp. H537RC) had no beneficial effect on germination, as they produced low amounts of IAA and gibberellins, much less

than the nine cultures, and slightly higher than the *E. coli* DH5α control. Phosphate solubilization from these isolates was also tested, and the result was similar to the IAA and gibberellin results, implying that inoculates that have a positive effect on the germination of *P. chiapensis* are related to the production of IAA and gibberellin, and also to phosphate solubilization.

Discussion

P. chiapensis is a typical species found on Andisol and Acrisol soils (Martínez et al. 2018) where it forms well-established populations in Mexico. The soils in the three sites are Andisols, however, pine populations are decreasing and the causes are not clear. A plantation established near Hueyapan (a non-disturbed site) showed a survival rate higher than 96%, and only minor damage by animals was observed in 13% of the trees, unlikely to affect population development (Muñoz-Flores et al. 2015). These data suggested that other factors must be involved in the decline of *P. chiapensis* populations in Mexico.

Rhizospheric microorganisms possess growth promoting substances that benefit plant establishment. Bacteria of the species *Burkholderia vietnamiensis*, *Paenibacillus*

Table 2 Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on *Pinus chiapensis* seeds

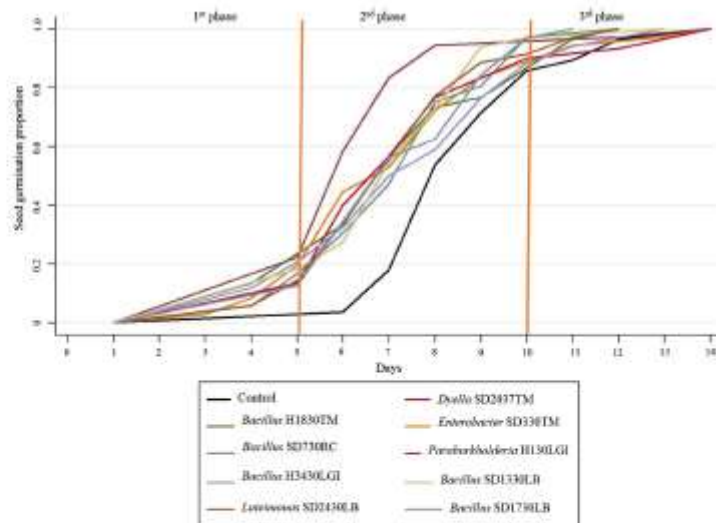
Strain (GenBank Accession number)	Germination rate (%)	Germination time (days) **	Sprout size (mm) **	Wet weight (g) **	Dry weight (g) **
<i>Luteimonas</i> sp. SD2430LB (MH724924)	70	6.6 ± 1.90 ^a	98 ± 23.30 ^b	0.09 ± 0.030 ^{bc}	0.02 ± 0.000 ^{abc}
<i>Dyella</i> sp. SD2037TM (MH725241)	72	5.6 ± 1.84 ^a	98 ± 24.28 ^b	0.10 ± 0.018 ^d	0.02 ± 0.003 ^{bc}
<i>Enterobacter</i> sp. SD330TM (MH725240)	72	6.4 ± 2.45 ^a	95 ± 25.14 ^b	0.09 ± 0.014 ^{cd}	0.02 ± 0.004 ^c
<i>Paraburkholderia</i> sp. H130LGI (MH725263)	60	6.6 ± 2.31 ^a	83 ± 31.63 ^{def}	0.07 ± 0.004 ^{abcd}	0.02 ± 0.001 ^{abc}
<i>Bacillus</i> sp. SD1330LB (MH725242)	66	6.4 ± 1.77 ^a	90 ± 25.78 ^{ef}	0.11 ± 0.025 ^d	0.02 ± 0.000 ^{abc}
<i>Bacillus</i> sp. SD730RC (MH725267)	72	6.5 ± 1.90 ^a	87 ± 23.05 ^{defg}	0.07 ± 0.004 ^{abcd}	0.02 ± 0.000 ^{abc}
<i>Bacillus</i> sp. SD1730LB (MH725243)	64	6.5 ± 1.76 ^a	85 ± 18.04 ^{defg}	0.10 ± 0.020 ^d	0.02 ± 0.003 ^{abc}
<i>Bacillus</i> sp. H3430LGI (MH725262)	68	6.7 ± 2.40 ^a	78 ± 28.04 ^{cb}	0.08 ± 0.003 ^{abcd}	0.02 ± 0.000 ^{abc}
<i>Bacillus</i> sp. H1830TM (MH725268)	60	6.5 ± 2.22 ^a	77 ± 20.56 ^{cd}	0.07 ± 0.003 ^{abcd}	0.02 ± 0.000 ^{abc}
<i>Bacillus</i> sp. SD1537RC (MN558947)	44	8.2 ± 1.76 ^{bc}	50 ± 24.20 ^f	0.04 ± 0.013 ^a	0.01 ± 0.004 ^{abc}
<i>Bacillus</i> sp. SD237RC (MN558949)	42	9.1 ± 1.89 ^{cd}	61 ± 21.00 ^{gh}	0.05 ± 0.009 ^{ab}	0.01 ± 0.003 ^a
<i>Bacillus</i> sp. H537RC (MN558948)	42	9.6 ± 1.56 ^d	59 ± 32.00 ^{gh}	0.05 ± 0.021 ^{ab}	0.01 ± 0.001 ^a
<i>E. coli</i> DH5 α	40	8.1 ± 1.44 ^b	65 ± 17.54 ^{bc}	0.07 ± 0.210 ^{abcd}	0.02 ± 0.000 ^{abc}
Non-inoculated Control	56	7.9 ± 1.78 ^b	71 ± 22.80 ^{bc}	0.07 ± 0.022 ^{abcd}	0.01 ± 0.005 ^{abc}

Results of the one-way ANOVA analysis for different sites $p < 0.01$ significance for the post hoc Tukey-HSD test among groups

Different letters in the same column (by main effect) indicate significant differences ($P < 0.05$)

**A significant interaction exists between simple effects

Fig. 3 Dynamics of seed germination proportion multilevel logistic regression analysis of time to the event plots ($P < 0.05$)



polymyxa, *Enterobacter cloacae*, *B. fungorum*, *Gluconacetobacter* and *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* spp. have been associated with pine species (Madmony et al. 2005; Xin et al. 2009; Anand et al. 2013; Andreolli et al. 2013). In this study, we have identified the rhizospheric bacteria associated with *P. chiapensis*. A total of 498 isolates were tested

for germination enhancement and nine isolates, belonging to the five genera, *Bacillus*, *Paraburkholderia*, *Dyella*, *Luteimonas* and *Enterobacter*, stimulated germination. All of the nine isolates were obtained from non-disturbed stands.

The mechanisms utilized by bacteria to promote plant growth could be the production of phytohormones such as

auxins and gibberellins and phosphate solubilization. Seeds accumulate high amounts of IAA during dormancy and subsequent germination (Birgit et al. 2005). In studies of breaking dormancy and germination in *Pinus sylvestris* L. seeds, IAA accumulated before germination and during the early stage of elongation. It was suggested that pines need to synthesize this hormone for successful development within the first 12 days (Ljung et al. 2001). Zhao and Jiang (2014) showed that exogenous gibberellin promoted germination and seedling vigor in *P. massoniana* Lamb. By improving respiration or decreasing levels of endogenous abscisic acid. In *P. sylvestris*, both gibberellins and IAA are required for both shoot elongation and cambial growth, and gibberellins act directly in the control of shoot growth, rather than indirectly through affecting the IAA concentration (Wang et al. 1997). All nine inoculates in this study were analyzed for IAA and gibberellin production, as well as for phosphate solubilization. *Dyella* sp. SD2037TM, the most effective bacteria for accelerating germination and increasing germination rate, is an IAA producing species. *Enterobacter* sp. SD330TM, which showed the highest gibberellin production, not only stimulated the rate of germination but also in a shorter time than the control without inoculation. These results imply that these bacterial derived hormones could help pine seed germination in the early stages.

Phosphorus is an essential nutrient element for plants, and makes up about 0.2% of a plant's dry weight (Tak et al. 2012). However, the concentration of soluble phosphorus in soil is usually very low, and is generally most available in soils with a pH around 6.5. A pH range of approximate

6.0 to 7.0 promotes availability of plant nutrients (USDA-NRCS 2020). Soils from the Teziutlán and Cuautempan sites showed pH values within the ideal range; the Hueyapan site had a pH of 7.8 that would limit phosphorous availability due to fixation by calcium. The growth of some phosphorus-solubilizing bacteria from the Teziutlán and Hueyapan sites were identified in agar media with bromothymol blue indicating acidification. Therefore, soil pH is also a factor in plant distribution by affecting phosphate availability contributed by rhizobacteria. In addition, phosphorus-solubilizing bacteria may aid the growth of plants by enhancing rhizobial activity; this is achieved by stimulating nitrogen fixation, synthesizing phytohormones and enhancing the bioavailability of elements such as zinc and iron (Wani et al. 2007), which are weakly available in soils. Considering the human-disturbed region Cuautempan where soil pH value is generally adequate for phosphorous availability, but also the Hueyapan region where pH was much higher, it suggests that pH is not an important factor for pine distribution, at least for seed germination in *P. chiapensis* in the range of pH 6.0–7.8.

The correspondence analysis showed that soil physicochemical variables contribute principally (71.8%) to the human-disturbed cluster, separating it distinctly from the undisturbed clusters. This indicates that these parameters have an important role in pine distribution. It is well-known that physicochemical soil characteristics are associated with growth development in plants. In the present study, some associations were found among certain soil characteristics (Table 1; Fig. 3). For example, clay is associated with the presence of various minerals, and cation exchange properties

Table 3 Phytohormones production and phosphate solubilizing capacity of plant-growth promoting rhizobacteria

Strain	IAA ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein)**	Gibberellins ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein)**	Phosphate solubilization (μg phosphate- mg^{-1} protein)**
	24 h	72 h	24 h
<i>Bacillus</i> H1830TM	0.54±0.01 ^{bc}	0.06±0.005 ^{ab}	31.8±0.73 ^e
<i>Bacillus</i> H3430LGI	0.57±0.14 ^{bc}	0.06±0.004 ^{ab}	8.9±0.51 ^b
<i>Bacillus</i> SD1330LB	0.72±0.02 ^{bc}	0.07±0.005 ^b	33.8±0.36 ^f
<i>Bacillus</i> SD1730LB	0.72±0.02 ^{bc}	0.47±0.035 ^c	7.4±0.14 ^b
<i>Bacillus</i> SD730RC	0.90±0.14 ^c	0.25±0.004 ^d	23.3±1.93 ^d
<i>Dyella</i> SD2037TM	0.50±0.11 ^b	0.12±0.009 ^{bc}	7.8±0.57 ^b
<i>Paraburkholderia</i> H130LGI	0.82±0.25 ^{bc}	0.05±0.002 ^a	9.4±0.01 ^b
<i>Luteimonas</i> SD2430LB	0.82±0.12 ^{bc}	0.18±0.006 ^c	8.3±0.57 ^b
<i>Enterobacter</i> SD330TM	1.38±0.14 ^d	0.60±0.078 ^f	14.5±1.94 ^c
<i>Bacillus</i> SD1537RC	0.02±0.06 ^a	0.00 ^a	0.0±0.002 ^a
<i>Bacillus</i> SD237RC	0.02±0.07 ^a	0.00 ^a	0.0±0.003 ^a
<i>Bacillus</i> H537RC	0.02±0.09 ^a	0.00 ^a	0.0±0.002 ^a
<i>E. coli</i> DH5 α	0.01±0.004 ^a	0.00±0.000 ^a	0.0±0.000 ^a

Results of the one-way ANOVA analysis for different localities $p < 0.01$ significance for the post-hoc Tukey-HSD test among the groups

Different letters in the same column (by main effect) indicate significant differences ($P < 0.05$)

**As significant interaction exists between simple effects

of them are important for the retention of nutrient ions in soils (Dixon 1991), allowing plants to develop properly.

Another association in this study was the presence of PGPR bacteria and sodium in the soil of non-disturbed sites, suggesting that the association could be beneficial to the distribution of this species. In hypersaline soils, halotolerant PGPR bacteria have enabled plant resistance as well as provided inorganic compounds such as indole acetic acid (IAA), ethylene, 1-amino cyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, volatile organic compounds (VOC), and antioxidants for their proper growth (Abbas et al. 2019). Microbial communities also helped triggering response genes involved in plant growth, yield, and development under stress conditions (Abbas et al. 2019).

Conclusions

Microorganisms play an important role in plant development and bacteria that showed plant growth-promoting activities, isolated from the rhizosphere of *Pinus chiapensis*, belong to the genera *Dyella*, *Luteimonas*, *Enterobacter*, *Paraburkholderia* and *Bacillus*. They have stimulated seed germination and interestingly, all these bacteria were isolated from non-disturbed stands. These bacteria can be used for restoration of degraded soils for the establishment of *P. chiapensis*. Bacterial isolates *Dyella* sp. SD2037TM and *Enterobacter* sp. SD330TM were the most promising candidates, increasing germination rates and sprout sizes. The mechanisms used by these microorganisms can be related to bacterial derived auxin and gibberellin production as well as to phosphorus solubilization. Additional research is required to utilize these isolates for forest soil recovery.

Acknowledgements We thank Conrado-Parraguire Lezama and Alfredo Gil-Garcés for their assistance in pine species identification and Eduardo Torres-Ramírez for use of their fluorescence spectrophotometer.

References

Abbas R, Rasul S, Aslam K, Baber M, Shahid M, Mubeen F, Naqash T (2019) Halotolerant PGPR: a hope for cultivation of saline soils. *J King Saud Univ Sci* 31(4):1195–1201

Alba LMP, González EM, Ramírez MN, Castillo SMA (2003) Determinantes de la distribución de *Pinus* spp. en la altiplanicie central de Chiapas. *México Bol Soc Bot Mex* 73:7–15

Anand R, Grayston S, Chamway C (2013) N₂-fixation and seedling growth promotion of lodgepole pine by endophytic *Paenibacillus polymyxa*. *Microb Ecol* 66(2):369–374

Andreoli M, Lampis S, Poli M, Gullner G, Biró B, Vallini G (2013) Endophytic *Burkholderia fungorum* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere* 92(6):688–694

Angulo VC, Sanfuentes EA, Rodríguez F, Sosa KE (2014) Characterization of growth-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus nitens* seedlings. *Rev Argent Microbiol* 46(4):338–347

Barriuso J, Ramos SB, Santamaría C, Daza A, Gutiérrez MFJ (2008) Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *J Appl Microbiol* 105:1298–1309

Birgit K, Marc AC, Gerhard LM (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* 15:281–307

Candau R, Avalos J, Cerda-Olmedo E (1992) Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol* 100(3):1184–1188

Chakraborty P, Sarker RK, Roy R, Ghosh A, Maiti D, Tribedi P (2019) Bioaugmentation of soil with *Enterobacter cloacae* AK S7 enhances soil nitrogen content and boosts soil microbial functional diversity. *3 Biotech* 9:253

Cheng J, Zhang MY, Wang WX, Manikprabhu D, Salam N, Zhang TY, Wu YY, Li WJ, Zhang YX (2016) *Luteimonas notoginsengii* sp. nov., isolated from rhizosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(2):946–950

Contreras M, Loeza PD, Villegas J, Farias R, Santoyo G (2016) A glimpse of the endophytic bacterial diversity in roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*). *Genet Mol Res* 15(3):1–10

Das A, Osborne JW (2018) Monitoring the stress resistance of *Penicillium purpurescens* in Pb (II) contaminated soil bioaugmented with *Enterobacter cloacae* as defence strategy. *Chemosphere* 210:495–502

Del Castillo RF, Acosta S (2002) Ethnobotanical notes on *Pinus serotina* var. *chiapensis*. *Anales del Instituto Biología. Serie Botánica* 73(2):319–327

Del Castillo RF, Trujillo AS, Sáenz RC (2009) *Pinus chiapensis*, a keystone: genetics, ecology and conservation. *For Ecol Manag* 257:2201–2208

Dixon JB (1991) Roles of clays in soils. *Appl Clay Sci* 5(5–6):489–503

Donahue JK, Dvorak WS, Gutierrez EA (1991) The Distribution, ecology, and gene conservation of *Pinus ayacahuite* and *Pinus chiapensis* in Mexico and Central America. North Carolina State University, College of Forest Resources No. p 8

Dvorak WS, Donahue JK, Vasquez JA (1996) Provenance and progeny results for the tropical white pine, *Pinus chiapensis*, at five and eight years of age. *New For* 12:125–140

Eberl L, Vandamme P (2016) Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Res* 5:1007

Esmael Q, Vilanova ML, Rondeau M, Leclère V, Clément C, Jacquard C, Sanchez L, Ait BE (2018) *Paraburkholderia physofirmans* PdN-Plants interaction: from perception to the induced mechanisms. *Front Microbiol* 9:2093

Finkmann W, Altendorf K, Stuckebrandt E, Lipski A (2000) Characterization of N₂O-producing Xanthomonas-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitrireducens* sp. nov., *Luteimonas nephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegherensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 5(1):273–282

Glickmann E, Deessaux Y (1995) A critical examination of the specificity of the Salkosky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61(2):793–796

Habib SH, Kausar H, Saud HM (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. *Biomed Res Int* 2016:1–10

Hoseini M, Rahimzadeh-Khoei F, Mirshakari B (2013) Seed priming techniques improve germination and yield in two landraces of lemon balm in laboratory experiment and field study. *Int J Indigen Med Plants* 29(1):1144–1150

Isaur-Krub L, Zahavi T, Barkai R, Freilich S, Zchori-Fein E, Naor V (2018) *Dyella*-like bacterium isolated from an insect as a potential

- biocontrol agent against grapevine yellows. *Phytopathology* 108(3):336–341
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, p 21. https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9_50009-7
- Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK (2012) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol Res* 167(8):493–499
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/mw054>
- Ljung K, Östin A, Lioussanne L, Sandberg G (2001) Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. *Plant Physiol* 125:464–475
- Madmony A, Chernin L, Pleban S, Peleg E, Riv J (2005) *Enterobacter cloacae*, an obligatory endophyte of pollen grains of Mediterranean pines. *Folia Microbiol* 50(3):209–216
- Martínez AL, De los Santos PHM, Ferrero GAM, Ferrero MR, Pérez MR, Hernández RA, Hernández R (2018) Expansion factors and system partition of aerial biomass for *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen. *Rev Mex de Cienc Forestales* 10(51):107–132. <https://doi.org/10.2929/rmc.v10i51.311>
- Mu Y, Pan Y, Shi W, Liu L, Jiang Z, Luo X, Zeng XC, Li WJ (2016) *Luteimonas arsenica* sp. nov., an arsenic-tolerant bacterium isolated from arsenic-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(6):2291–2296
- Muñoz-Flores H, Hernández-Zaragoza J, Hernández-Zaragoza O, García-Magaña PJ, Barrera Ramírez JR (2015) Growth comparison of *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen, *Pinus greggii* Engelm and *Pinus patula* Schl. et Cham in commercial plantation established in Hueyapan, Puebla. *Foresta Veracruzana* 17(1):1–8
- Muñoz-Rojas J, Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J (2005) Antagonism among *Glucosacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiol Ecol* 54:57–66
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:31–36
- Naveed M, Hussain MB, Zahir ZA, Mitter B, Sessitsch A (2014) Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PaJN. *Plant Growth Regul* 73:121–131
- Ngo HT, Yin CS (2016) *Luteimonas terrae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Radix ophiopogonis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(5):1920–1925
- Nicholas KB, Nicholas HB (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *Embnew News* 4:14
- Ou PH, Gao ZH, Chen MH, Bi JY, Qiu LH (2019) *Dyella diagenensis* sp. nov. and *Dyella choica* sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 69(5):1496–1503
- Palaniappan P, Chauhan PS, Saravanan VS, Anandham R, Sa T (2010) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lepedeza* sp. *Biol Fertil Soils* 46:807–816
- Pramanik K, Mitra S, Sarkar A, Maiti TK (2018) Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092. *J Hazard Mater* 351:317–329
- Probanza A, Mateos JL, García JAL, Ramos B, De Felipe MR, Gutiérrez MPJ (2001) Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. *Microb Ecol* 41:140–148
- Reeuwijk LPV (2002) Procedures for soil analysis. Technical paper 9. International Soil Reference and Information Centre, ISRIC and Food and Agriculture Organization of the United Nations. https://www.isric.nl/sites/default/files/ISRIC_TechPap09.pdf
- Reyes C, Ávalos J, Cerdá-Olmedo E (1991) Gibberellins and Carotenoids in the Wild Type and Mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Appl Environ Microbiol* 57:3378–3382
- Sarkar A, Ghosh PK, Pramanik K, Mitra S, Soren T, Pandey S, Mondal MH, Maiti TK (2018) A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Res Microbiol* 169(1):20–32. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.005>
- Secretaría del medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL (2001) Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. <https://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/NOM-059-ECOL-2001.pdf>
- Sethuraman P, Balasubramanian N (2010) Removal of Cr (VI) from aqueous solution using *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *Int J Eng Sci Technol* 2(6):1811–1825
- Shahid M, Hamoed S, Zafar M, Tahir M, Ijaz M, Tariq M, Hussain K, Ali A (2019) *Enterobacter* sp. strain Ps-11 adapted to diverse ecological conditions and promoted sunflower achene yield, nutrient uptake, and oil contents. *Braz J Microbiol* 50(2):459–469
- Smithers B (2017) Soil preferences in germination and survival of Limber Pine in the Great Basin White Mountains. *Forests* 8(11):423. <https://doi.org/10.3390/f8110423>
- Sun ZB, Zhang H, Yuan XF, Wang YX, Feng DM, Wang YH, Feng YJ (2012) *Luteimonas cucumeris* sp. nov., isolated from a cucumber leaf. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:2916–2920
- Tak HI, Ahmad F, Bahulola OO, Inam A (2012) Growth, photosynthesis and yield of chickpea as influenced by urban wastewater and different levels of phosphorus. *Int J Plant Res* 2:6–13
- Thomas P, Farjon A (2013) *Pinus strobus* var. *chiapensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T32499A2820834. <https://dx.doi.org/https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T32499A2820834.en>. Downloaded on 02 October 2020
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25(24):4876–4882
- Upadhyay SK, Singh JS, Singh DP (2011) Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere* 21(2):214–222
- USDA-NRCS United States Department of Agriculture (2020) Natural Resources Conservation Service https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_055254.pdf
- Wang Q, Little CH, Odén PC (1997) Control of longitudinal and cambial growth by gibberellins and indole-3-acetic acid in current-year shoots of *Pinus sylvestris*. *Tree Physiol* 17(11):715–721
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2007) Co-inoculation of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agron Hung* 55(3):315–323
- Xin G, Glaswe D, Doty SL (2009) Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees. *Mycol Res* 113(9):973–980
- Xin Y, Cao X, Wu P, Xue S (2014) *Luteimonas dalmanensis* sp. nov., an obligate marine bacterium isolated from seawater. *J Microbiol* 52:729–733
- Zamora SC, Velasco VF (1977) *Pinus strobus* var. *chiapensis*, una especie en peligro de extinción en el estado de Chiapas. *Ciencia forestal* 2:3–23