









Bacterial community structure associated with roots of *Pinus montezumae* Lamb. inoculated with edible ectomycorrhizal fungi and mycorrhizal helper bacteria

Estructura de la comunidad bacteriana asociada con raíces de *Pinus montezumae* Lamb. inoculado con hongos ectomicorrízicos comestibles y bacteria auxiliar de la micorriza

José David Álvarez-Solís^{1*}, María del Rosario Cardoso-Villanueva², Beatriz Xoconostle-Cázares³, Martín Eduardo Sánchez-García³, José Luis Barragán-Soriano², Jesús Pérez-Moreno^{2*}

¹Departamento de Agricultura, Sociedad y Ambiente, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.

²Laboratorio de Microbiología, Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

³Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-Zacatenco, San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, México.

*Corresponding authors

E-mail address: dalvarez@ecosur.mx (J. D. Álvarez-Solís), jepemo@yahoo.com.mx (J. Pérez-Moreno)

Article history:

Received: 26 January 2024 / Received in revised form: 29 April 2024 / Accepted: 6 May 2024 / Published online: 1 July 2024.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.3.1>

ABSTRACT

Tree roots are associated with a high diversity of microorganisms that play key roles in soil fertility and plant nutrition and health. Here we examine the composition and diversity of bacterial community in ectomycorrhizal root (ECR) and their ectomycorrhizosphere (EMR) of the Neotropical tree *Pinus montezumae* inoculated with *Laccaria laccata* and *Hebeloma mesophaeum*, applied alone or co-inoculated with *Azospirillum brasilense*. For this, we used a 16S rRNA gene metabarcoding-sequencing approach in samples of ECR and EMR that were collected nine-months after inoculation in greenhouse. A total of 943 Operational

Taxonomic Units (OTU) were differentiated and grouped in 32 bacterial phyla. The most abundant phyla were Proteobacteria (67%) and Actinobacteria (20.7%). Bacterial communities were structured in ECR and EMR (Anosim, $R=0.77$, $P\leq 0.005$), and were more diverse in EMR than ECR (Shannon-Weaver of 4.2 and 3.6, and Simpson inverse of 33.7 and 16.7, respectively). The abundance of *Pseudomonas*, *Actinoplanes* and *Salinibacterium* were promoted with *L. laccata*, while with *H. mesophaeum* an OTU from Burkholderiaceae was prominent. Our results showed that the ectomycorrhizal fungi strongly shaped the composition of the bacterial communities associated with roots of *P. montezumae*.

Keywords: metabarcoding, ectomycorrhizal symbiosis, native mushrooms, neotropics, microbiome

RESUMEN

Las raíces de los árboles están asociadas con una gran diversidad de microorganismos que desempeñan funciones clave en la fertilidad del suelo y la nutrición y salud de las plantas. Se examinó la composición y diversidad de la comunidad bacteriana en la raíz ectomicorrízica (ECR) y su ectomicorrizosfera (EMR) del árbol neotropical *Pinus montezumae* inoculado con *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum*, aplicados solos o coinoculados con *Azospirillum brasilense*. Se utilizó un método de secuenciación de metabarcodes del gen 16S ARNr en muestras de ECR y EMR recolectadas nueve meses después de la inoculación en invernadero. Se encontró un total de 943 Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) que se agruparon en 32 phyla bacterianos. Proteobacteria (67%) y Actinobacteria (21%) fueron los phyla más abundantes. Las comunidades bacterianas se estructuraron en ECR y EMR (Anosim, $R=0.77$, $P\leq 0.005$), y fueron más diversas en EMR que ECR (Shannon-Weaver de 4.2 y 3.6, e inverso de Simpson de 33.7 y 16.7, respectivamente). Con *L. laccata* se promovió la abundancia de *Pseudomonas*, *Actinoplanes* y *Salinibacterium*, mientras que con *H. mesophaeum* una OTU de Burkholderiaceae fue prominente. Los resultados mostraron que los hongos ectomicorrízicos modelaron fuertemente la composición de las comunidades bacterianas asociadas con las raíces de *P. montezumae*.

Palabras clave: metabarcodes, simbiosis ectomicorrízica, hongos nativos, neotrópico, microbioma

1. INTRODUCCIÓN

Las raíces de los árboles están asociadas con una gran diversidad de microorganismos que desempeñan funciones clave en la fertilidad del suelo, la nutrición y la salud de las plantas. La actividad microbiana apoyada directamente por los exudados de las raíces crea la llamada rizosfera (Vandana *et al.*, 2021). Los hongos ectomicorrízicos (HEM) son habitantes naturales de la rizosfera y establecen una simbiosis mutualista con la mayoría de las plantas leñosas de los bosques templados (Pérez-Moreno & Read, 2004). Estos hongos desempeñan funciones ecofisiológicas que son de suma relevancia a nivel ecosistémico, ya que facilitan la absorción de nutrientes y agua requeridos por la planta,

a cambio de azúcares proveídos a través de la fotosíntesis (Shirakawa *et al.*, 2019). Las raíces ectomicorrízicas (ECR) desarrollan en el córtex una estructura conocida como red de Hartig desde donde se realiza el intercambio de nutrimentos entre el hongo y la planta (Galindo-Flores *et al.*, 2015). Además, en la superficie de la ECR se desarrolla una red de micelio que se extiende en el suelo circundante, amplía el área de exploración de las raíces y crea un área de influencia llamada ectomicorrizosfera (EMR) (Uroz *et al.*, 2012). Los dos compartimentos presentan una amplia variedad de bacterias, algunas de las cuales pueden otorgar beneficios adicionales a las plantas (Izumi & Roger, 2011; Marupakula *et al.*, 2016). Por consiguiente, es de gran interés comprender la composición y diversidad de bacterias en estos compartimentos ectomicorrízicos (Deveau, 2016; Obase, 2019).

Las bacterias que se encuentran en la ECR y EMR pueden movilizar nutrientes para las plantas hospedadoras. Calvaruso *et al.* (2007) aislaron bacterias que movilizan fósforo y hierro en la EMR formada por *Quercus petraea* y *Scleroderma citrinum*. Asimismo, algunas bacterias mejoran el establecimiento de las micorrizas, las denominadas bacterias auxiliares de la micorriza (MHB, por sus siglas en inglés) (Garbaye, 1994; Gupta & Chakraborty, 2020). Las MHB son miembros de muchos taxones y géneros bacterianos, tales como Proteobacteria (*Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Rhizobium*); Firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*) y Actinomycetes (*Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*) (Frey-Klett & Garbaye, 2005; Frey-Klett *et al.*, 2007). Algunas MHB, como *Pseudomonas fluorescens*, promueven la colonización de *Laccaria bicolor* incluso con dosis bajas (2×10^3 UFC g DM⁻¹) de inóculo bacteriano (Frey-Klett *et al.*, 1997). Labbé *et al.* (2014) aislaron 21 cepas de *Pseudomonas* de la ECR de *Populus deltoides*, de las cuales 19 tuvieron un efecto positivo en el crecimiento, la arquitectura del micelio y la colonización de *L. bicolor*. Además, algunas bacterias asociadas a las ectomicorrizas están involucradas en la supresión de fitopatógenos del suelo mediante la liberación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, lo que a su vez modifica la estructura y la composición de la comunidad microbiana (Caravaca *et al.*, 2015; Shirakawa *et al.*, 2019).

México es reconocido como el segundo centro de diversificación de pinos en el mundo, con 52 especies de pinos (Manzanilla-Quiñones *et al.*, 2019). Sin embargo, en nuestro país los bosques templados han disminuido drásticamente su extensión debido a la deforestación y el cambio de uso del suelo (Rosete-Vergés *et al.*, 2014). La reforestación adquiere un carácter de urgente debido a que estos ecosistemas son vitales para la existencia humana. Entre las especies de pinos que se utilizan con este propósito destaca *Pinus montezumae*, que es de rápido crecimiento y buena madera, por lo que ocupa un lugar preponderante en la producción de plantas en vivero con fines de reforestación, principalmente en las zonas centro y sureste del país (Manzanilla-Quiñones *et al.*, 2019). El carácter obligado de la ectomicorriza para los árboles con los que se asocia hace necesario su uso en la reforestación. Por consiguiente, es esencial realizar la micorrización de las plantas en la fase de vivero para lograr el éxito de su establecimiento en el campo (Carrasco-Hernández *et al.*, 2018).

La inoculación de HEM comestibles es una alternativa importante para mejorar el crecimiento de árboles forestales nativos. La comestibilidad se incluye como uno de los principales criterios de selección de HEM para inocular las plantas hospedantes compatibles porque brindan servicios ulteriores más allá de la producción de madera

(Pérez-Moreno *et al.*, 2020, 2021). Entre los HEM comestibles se encuentran *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum*, los cuales tienen amplia abundancia e importancia biocultural en el centro de México (Carrasco-Hernández *et al.*, 2018), en donde se venden en mercados y se utilizan como alimento (Pérez-Moreno *et al.*, 2008; Carrasco-Hernández *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha informado que el consumo de *H. mesophaeum* puede ser tóxico (CBG, 2020) y causar irritación gastrointestinal e incluso necrosis hepática (Fernández-Armendáriz *et al.*, 2022). Varios estudios mostraron que algunas especies de pinos neotropicales responden a la inoculación con HEM comestibles nativos y generalmente tienen un mayor crecimiento en comparación con las plantas no inoculadas (Méndez-Neri *et al.*, 2011; Carrasco-Hernández *et al.*, 2011; Martínez-Reyes *et al.*, 2012). Además, Barragán-Soriano *et al.* (2022), encontraron un efecto sinérgico de la coinoculación de *L. laccata* y *A. brasilense* en el crecimiento de *P. montezumae*. Sin embargo, no se conoce cómo los compartimentos ectomicorrízicos, ECR y EMR, dan forma a los microbiomas de especies de árboles neotropicales inoculados con HEM. Por lo anterior, es necesario desarrollar estudios para conocer la composición y diversidad de las comunidades de bacterias asociadas con las ectomicorrizas de árboles forestales neotropicales, con particular atención en las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, por su importancia en la reforestación y la restauración productiva de los bosques templados de nuestro país. Se conoce que la mayoría de los microorganismos del suelo no se pueden cultivar con técnicas convencionales de laboratorio (Riesenfeld *et al.*, 2004). El desarrollo de métodos independientes del cultivo, como la metagenómica, ha abierto la posibilidad de estudiar la estructura poblacional de la mayoría de los microorganismos del suelo. La metagenómica comprende el análisis genómico total de una muestra ambiental y ofrece la oportunidad de evaluar las comunidades bacterianas (Bonfante & Anca, 2009; Luo *et al.*, 2014). En el presente trabajo se utilizó un método de secuenciación de metabarcodes del gen 16S ARNr, con el objetivo de analizar la composición y diversidad de la comunidad bacteriana asociada con la raíz ectomicorrízica (ECR) y su ectomicorrizosfera (EMR) del árbol neotropical *P. montezumae* inoculado con *L. laccata* y *H. mesophaeum*, aplicados solos o coinoculados con la bacteria auxiliar de la micorriza *A. brasilense*, en condiciones de invernadero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Condiciones experimentales

Las semillas de *P. montezumae* se recolectaron en la comunidad de Piedra Canteada, Nanacamilpa, Tlaxcala, en el centro de México. Las semillas se trataron con H₂O₂ al 30% durante 20 min antes de ser sembradas. Los inóculos de *H. mesophaeum* y *L. laccata* se prepararon con esporas obtenidas del píleo, el cual fue deshidratado a 35 °C y triturado en un molino eléctrico con malla de 1 mm de apertura. La cepa bacteriana de *A. brasilense* se cultivó en caldo nutritivo Merck®, luego se centrifugó y el sedimento se recuperó en agua destilada estéril y se ajustó a una concentración de 10⁸ UFC mL⁻¹ (Barragán-Soriano *et al.*, 2018). El sustrato para el cultivo de las plantas consistió en una mezcla de arena,

corteza y tierra de bosque en proporción 2:2:1. Las semillas se sembraron en tubos de plástico negro de 125 cm³ que contenían el sustrato.

Se evaluaron seis tratamientos de inoculación a las plantas: 1) sin inoculación (NI); 2) con *A. brasilense* (AB); 3) con *L. laccata* (LL); 4) con *H. mesophaeum* (HM); 5) con *L. laccata* y *A. brasilense* (LL+AB); y 6) con *H. mesophaeum* y *A. brasilense* (HM+AB). Cada planta se inoculó con una concentración de 10⁷ a 10⁸ esporas de *L. laccata* o *H. mesophaeum*, y/o con 3 mL de la suspensión bacteriana de *A. brasilense*. Las plantas se cultivaron en invernadero sin fertilización adicional. A los nueve meses se recolectaron muestras de la raíz ectomicorrízica (ECR) y de la ectomicorrizosfera (EMR) de cuatro plantas dentro de los diferentes tratamientos en condiciones axénicas y se elaboró una muestra compuesta de cada tratamiento. La ECR se separó de la raíz principal utilizando tijeras y pinzas estériles, y la EMR se obtuvo del suelo adherido a ésta por medio de una agitación mecánica; ambas se conservaron en muestras separadas a -20 °C para la posterior extracción de ADN para una secuenciación de alto rendimiento.

2.2 Generación de bibliotecas genómicas del gen 16 ARNr

El ADN metagenómico se extrajo de las muestras ECR y EMR (0.5 g) con el kit de aislamiento de ADN del suelo (MoBio Laboratories Inc) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La calidad del ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. La concentración de ADN (ng/μl) y las proporciones 260/280 y 260/230 se registraron con un espectrofotómetro a 285 nm (Thermo Fisher Nanodrop 2000). La amplificación del gen 16S ARNr se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en termociclador (Professional Thermocycler BIOMETRA), con 30 ciclos de reacción. La mezcla de reacción de la PCR contenía 1 μL de 10X Ex Taq Buffer (Takara), 0.8 μL de dNTPs 2.5 mM (Takara), 0.2 μL de cada primer (CGO465R, 5' CAGGATTAGATACCCTGGTAG 3', y CGO465F, 5' CTCCTACGGGAGGCAGCAG 3'), 0.05 μL de Polimerasa (Ex Taq HS 250U 50U μL-1) y 20 ng de ADN en 10 μL de volumen final. La amplificación se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 94 °C durante 30 s; 55.3 °C durante 30 s; 72 °C durante 30 s; 72 °C durante 5 min; y 5 min a 4 °C para enfriar. Se combinaron y purificaron tres productos de PCR por muestra con el kit de purificación de PCR QIAquick (EXOSAP-IT) según el protocolo del fabricante. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, utilizando 1 kbplus como marcador de peso molecular, azul de bromocresol como indicador y 5 μl de muestra, a 100 V durante 45 min. La concentración de ADN resultante se cuantificó con espectrofotómetro a 285 nm (Thermo Fisher Nanodrop 2000). La secuenciación de los productos de PCR se realizó con secuenciador Illumina por el Laboratorio de Genética del CINVESTAV-Zacatenco.

2.3 Bioinformática y análisis de datos

La calidad de las secuencias de Illumina se verificó con el software Trimmomatic V0.32 (Bolger *et al.*, 2014) y FastQC v0.11.5 (Andrews, 2016). Se utilizó el software Galaxy en línea para convertir el formato de secuencias *.fastq a *.fasta, y la generación de datos tabulares (Afgan *et al.*, 2016). Se utilizó el software Mothur (Schloss *et al.*, 2009) para eliminar polímeros ambiguos, secuencias duplicadas y quiméricas. Las secuencias se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU, por sus siglas en inglés) en el

umbral de similitud del 95 % y se alinearon con la Base Taxonómica de Referencia. Para la identificación taxonómica se descargó la base de datos SILVA Release 123.1 (Quast *et al.*, 2013).

La estimación de la riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas se realizó con el tamaño de lecturas estandarizado al tamaño de la biblioteca más pequeña utilizando el comando `submuestra = T` del software Mothur; se calcularon el estimador de riqueza Chao1 y los índices de diversidad alfa de Shannon-Weaver (H') e inverso de Simpson ($1/D$). El grado de similitud entre cualquier par de comunidades bacterianas se midió con el índice de similitud de Sorensen (CC), mediante la ecuación: $CC = 2C/(S1 + S2)$, donde S1 es el número total de especies registradas en la primera comunidad, S2 es el número total de especies registradas en la segunda comunidad, y C es el número de especies comunes a ambas comunidades (Sorensen, 1948). Además, para representar la variación de la comunidad bacteriana en un espacio bidimensional ($k=2$) se utilizó el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en la matriz de disimilitud de Bray-Curtis; se midió la bondad de ajuste de la regresión y se obtuvo el estrés. Se probaron diferencias significativas de la matriz de distancia entre compartimentos ectomicorrízicos mediante una prueba estadística no paramétrica (Anosim); las muestras se agruparon con la función `ordiellipse`, y la contribución de las especies a la variación entre grupos se obtuvo con la función `simper`. Finalmente, se generó un mapa de calor de la abundancia relativa de los 81 OTU principales. Los análisis fueron realizados con los paquetes `Vegan` y `ggplots` en R (Dixon, 2003).

3. RESULTADOS

3.1 Composición de las comunidades bacterianas

De las muestras analizadas se obtuvieron un total de 915 unidades taxonómicas operativas (OTU) que se clasificaron en 32 phyla bacterianos (Fig. 1), con 64 clases, 211 familias y 615 géneros clasificados. El phylum más abundante fue Proteobacteria ($67\% \pm 10.6$) que estuvo dominado por la clase Alphaproteobacteria ($58.7 \pm 6.9\%$) y en menor medida por Betaproteobacteria ($5.4 \pm 9.0\%$), así como Gamma-, Delta- y Epsilon-proteobacteria ($2.9 \pm 2.6\%$). Las bacterias fijadoras de N de los géneros *Azospirillum*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*, así como *Pseudolabrys*, *Devosia*, *Hyphomicrobium* y *Sphingomonas*, fueron abundantes en Alphaproteobacteria, y los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* en Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria, respectivamente. El segundo phylum en abundancia relativa fue Actinobacteria ($20.7 \pm 11.1\%$), con predominio de los géneros *Nocardioides*, *Actinoplanes* y *Salinibacterium*. Los dos phyla principales mostraron la tendencia a un cambio en abundancia relativa en los tratamientos de inoculación con HEM. Con HM y LL, la abundancia de proteobacterias fue 78.0 ± 10.9 y $52.4 \pm 1.2\%$, mientras que de actinobacterias fue 10.3 ± 2.4 y $36.8 \pm 5.5\%$, respectivamente.

También se encontraron los phyla Chloroflexi, Acidobacteria, Gemmatimonadetes y Saccharibacteria (4.3 ± 2.8 , 1.2 ± 1.5 , 0.8 ± 0.7 y $0.8 \pm 0.5\%$, respectivamente) principalmente en EMR; así como Bacteroidetes y Firmicutes (2.5 ± 0.9 y $1.8 \pm 1.3\%$, respectivamente) principalmente en ECR de plantas no inoculadas. Otros phyla (WCHB1-60, Armatimonadetes, Gracilibacteria, Hydrogenelents, Latescibacteria, Lentisphaerae,

Nitrospirae, SHA-109, SM2F11, Synergistetes, Thermotogae, TM6, Cyanobacteria, Fibrobacteres, Elusimicrobia, Verrucomicrobia, Spirochaetae, Plactomycetes, Chlamydiae, Deino coco -Thermus, Fusobacteria, Tenericutes Chlorobi y Unclassified), tuvieron una abundancia relativa muy baja ($0.8 \pm 0.5 \%$).

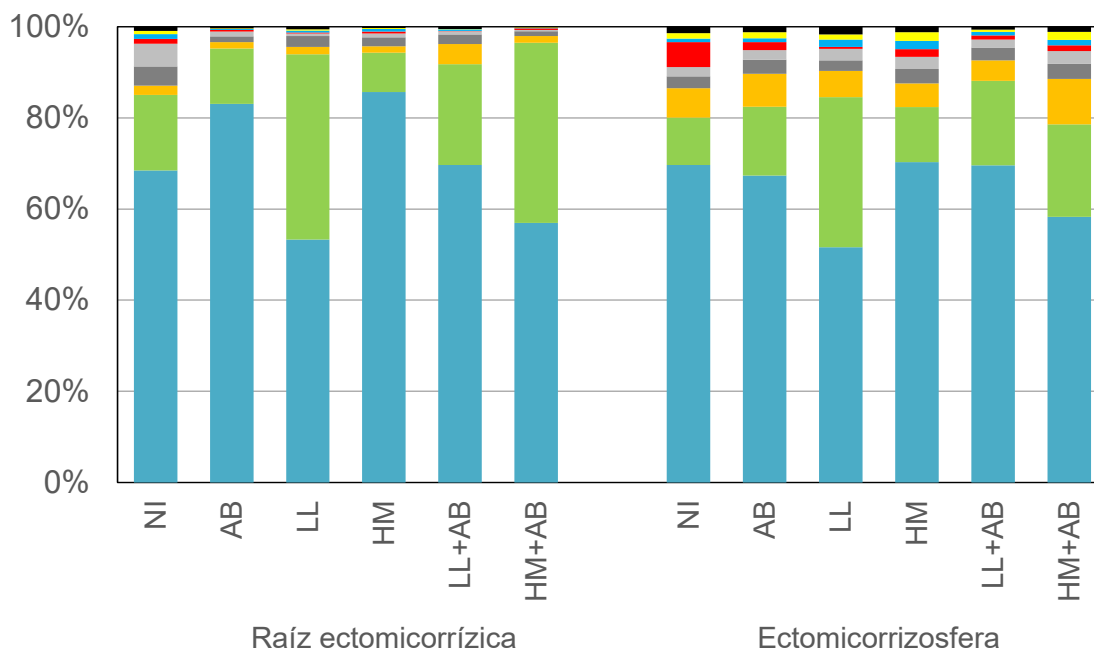


Fig. 1. Abundancia relativa de los phyla bacterianos dentro de las diferentes comunidades (Proteobacteria ■, Actinobacteria ■, Chloroflexi ■, Bacteroidetes ■, Firmicutes ■, Acidobacteria ■, Saccharibacteria ■, Gemmatimonadetes ■, otros phyla ■). Abreviaciones: NI= Sin inoculación; AB= *A. brasilense*; LL= *L. laccata*; HM= *H. mesophaeum*.

Fig. 1. Relative abundance of bacterial phyla within the different bacterial communities. Abbreviations: NI= Without inoculation; AB= *A. brasilense*; LL= *L. laccata*; HM= *H. mesophaeum*.

3.2 Riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas

El estimador de cobertura estuvo por encima del 97% en todas las muestras, lo que indicó que se detectó la mayoría de OTU en el suelo. El número de OTU osciló entre 405 y 470, y el estimador Chao1 (S) mostró que la riqueza osciló entre 479 y 615 taxones. El índice de Shannon-Weaver (H') tuvo valores de 4.21 ± 0.2 y 3.63 ± 0.4 en EMR y ECR, respectivamente; mientras que el Inverso de Simpson ($1/D$) tuvo valores de 33.7 ± 5.7 y 16.7 ± 8.9 en EMR y ECR, respectivamente (Tabla 1). Ambos índices indicaron que la diversidad de bacterias fue más alta en EMR que ECR. En ECR la diversidad de bacterias disminuyó en los tratamientos de inoculación.

Tabla 1. Número de secuencias, OTU e índices de diversidad alfa (los valores entre paréntesis son intervalos de confianza del 95%).

Table 1. Number of sequences, OTU and alpha diversity indices (values in parentheses are 95% confidence intervals).

Trat.	No. de secuencias	No. de OTU	Chao 1 (S)	Shannon-Weaver (H')	Inverso de Simpson (1/D)
Raíz ectomicorrízica (ECR)					
NI	88,246	450	539.6 (501 - 607)	4.2 (4.1 - 4.3)	33.6 (33.2 - 34.1)
AB	74,932	417	540.2 (490 - 623)	3.3 (3.2 - 3.4)	9.7 (9.5 - 9.8)
LL	97,512	443	520.0 (488 - 574)	3.6 (3.6 - 3.7)	16.8 (16.6 - 17.0)
HM	59,097	410	524.0 (478 - 598)	3.6 (3.5 - 3.6)	16.0 (15.7 - 16.2)
LL+AB	72,109	450	543.8 (506 - 604)	3.8 (3.8 - 3.9)	15.3 (15.0 - 15.6)
HM+AB	96,769	415	524.4 (481 - 596)	3.1 (3.1 - 3.2)	9.0 (8.9 - 9.1)
Ectomicorrizosfera (EMR)					
NI	43,458	405	479.0 (447 - 533)	4.2 (4.2 - 4.3)	33.6 (33.0 - 34.2)
AB	62,470	423	523.1 (481 - 595)	4.0 (4.0 - 4.1)	27.4 (26.9 - 27.8)
LL	56,891	447	615.0 (548 - 725)	4.3 (4.3 - 4.4)	42.7 (42.2 - 43.3)
HM	41,967	432	501.6 (472 - 551)	4.2 (4.1 - 4.2)	29.5 (28.9 - 30.1)
LL+AB	71,722	459	578.8 (530 - 658)	4.1 (4.0 - 4.1)	31.2 (30.8 - 31.6)
HM+AB	55,809	470	523.6 (500 - 564)	4.3 (4.2 - 4.3)	37.7 (37.2 - 38.3)
ECR	488,665	773	532.0 (491 - 600)	3.6 (3.6 - 3.7)	16.7 (16.4 - 16.9)
EMR	332,317	755	536.9 (496 - 604)	4.2 (4.2 - 4.3)	33.7 (33.1 - 34.2)

Para el significado de las abreviaciones ver la Fig. 1.

El índice de similitud de Sorensen (CC) presentó valores entre 0.66 y 0.79 para las diferentes comparaciones por pares entre las muestras (Tabla 2). La similitud más baja se encontró en las comparaciones entre muestras de ECR y EMR (por ejemplo, LL+AB en ECR vs. NI en EMR = 0.66), mientras que las similitudes más altas fueron para los pares de muestras inoculadas con HEM vs. las coinoculadas con HEM más *A. brasilense*, tanto en ECR (LL vs. LL+AB = 0.74; HM vs. HM +AB = 0.74) como en EMR (LL vs. LL+AB = 0.79; HM vs. HM+AB = 0.76); así como en pares de muestras no inoculadas vs. las inoculadas solo con *A. brasilense* (NI vs. AB = 0.74 en ECR, y NI vs. AB = 0.75 en EMR). Esto sugiere que la inoculación de *A. brasilense* tuvo poca influencia en la comunidad bacteriana de raíces con y sin inoculación de HEM.

Tabla 2. Índices de similitud de Sorensen (abajo a la izquierda) y número de OTU comunes (arriba a la derecha) para las comparaciones por pares de tratamientos usando todas las OTUs de las muestras analizadas.

Table 2. Sorensen similarity indices (lower-left) and number of common OTU (upper-right) for pairwise comparisons of treatments using all OTUs of the analyzed samples.

Tratamiento	Raíz ectomicorrízica (ECR)						Ectomicorrizosfera (EMR)					
	NI	AB	LL	HM	LL+AB	HM+AB	NI	AB	LL	HM	LL+AB	HM+AB
NI	1.0	323	311	303	317	301	306	323	319	311	325	321
AB	0.74	1.0	299	291	296	290	291	314	309	305	307	315
E LL	0.70	0.70	1.0	298	332	314	299	306	340	302	333	329
C HM	0.70	0.70	0.70	1.0	291	397	285	286	305	302	309	316
R LL+AB	0.70	0.68	0.74	0.68	1.0	303	283	295	315	299	332	306
HM+AB	0.70	0.70	0.73	0.74	0.70	1.0	280	282	319	304	313	313
NI	0.71	0.71	0.71	0.70	0.66	0.68	1.0	312	313	311	315	320
AB	0.74	0.75	0.71	0.69	0.68	0.67	0.75	1.0	313	308	322	327
E LL	0.71	0.72	0.76	0.71	0.70	0.74	0.73	0.72	1.0	329	360	344
M HM	0.70	0.72	0.69	0.72	0.68	0.72	0.74	0.72	0.75	1.0	331	342
R LL+AB	0.71	0.70	0.74	0.71	0.73	0.72	0.73	0.73	0.79	0.74	1.0	350
HM+AB	0.70	0.71	0.72	0.72	0.67	0.71	0.73	0.73	0.75	0.76	0.75	1.0

Para el significado de las abreviaciones ver la Fig. 1.

El NMDS indicó que las comunidades bacterianas exhibieron una separación distinta entre los compartimentos ECR y EMR (estrés = 0.069; Anosim, $R = 0.776$, $P \leq 0.005$, Fig. 2a-b). Asimismo, la agrupación jerárquica de las 81 OTU más abundantes (18.6 % del total de OTU) con más de 1000 secuencias cada una, generó un dendrograma que muestra la similitud en la composición de especies, en el que ECR y EMR se diferenciaron como los dos grupos principales (Fig. 2c). Las 81 OTU incluyeron 86.3 % del total de secuencias obtenidas, de las cuales, cuatro OTU con 22.0 % del total de secuencias no fueron clasificadas a nivel de género. Como se puede observar en el mapa de calor (Fig. 2c), las OTU001 y OTU002, pertenecientes a Rhizobiales y Actinobacteria, fueron más abundantes en ECR de plantas inoculadas con LL+AB y HM+AB, respectivamente; la OTU033 de la familia Rhizobiaceae fue común en ECR; pero la OTU036 de la familia Burkholderiaceae fue prominente en ECR inoculada con HM. Los doce géneros más abundantes se muestran en la Fig. 3; *Hyphomicrobium*, *Devosia* y *Variibacter* fueron comunes en EMR, mientras que *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* en ECR; *Burkholderia* y *Azospirillum* fueron abundantes en NI y AB, respectivamente; pero *Pseudomonas*, *Actinoplanes* y *Salinibacterium* fueron prominentes en plantas inoculadas con LL.

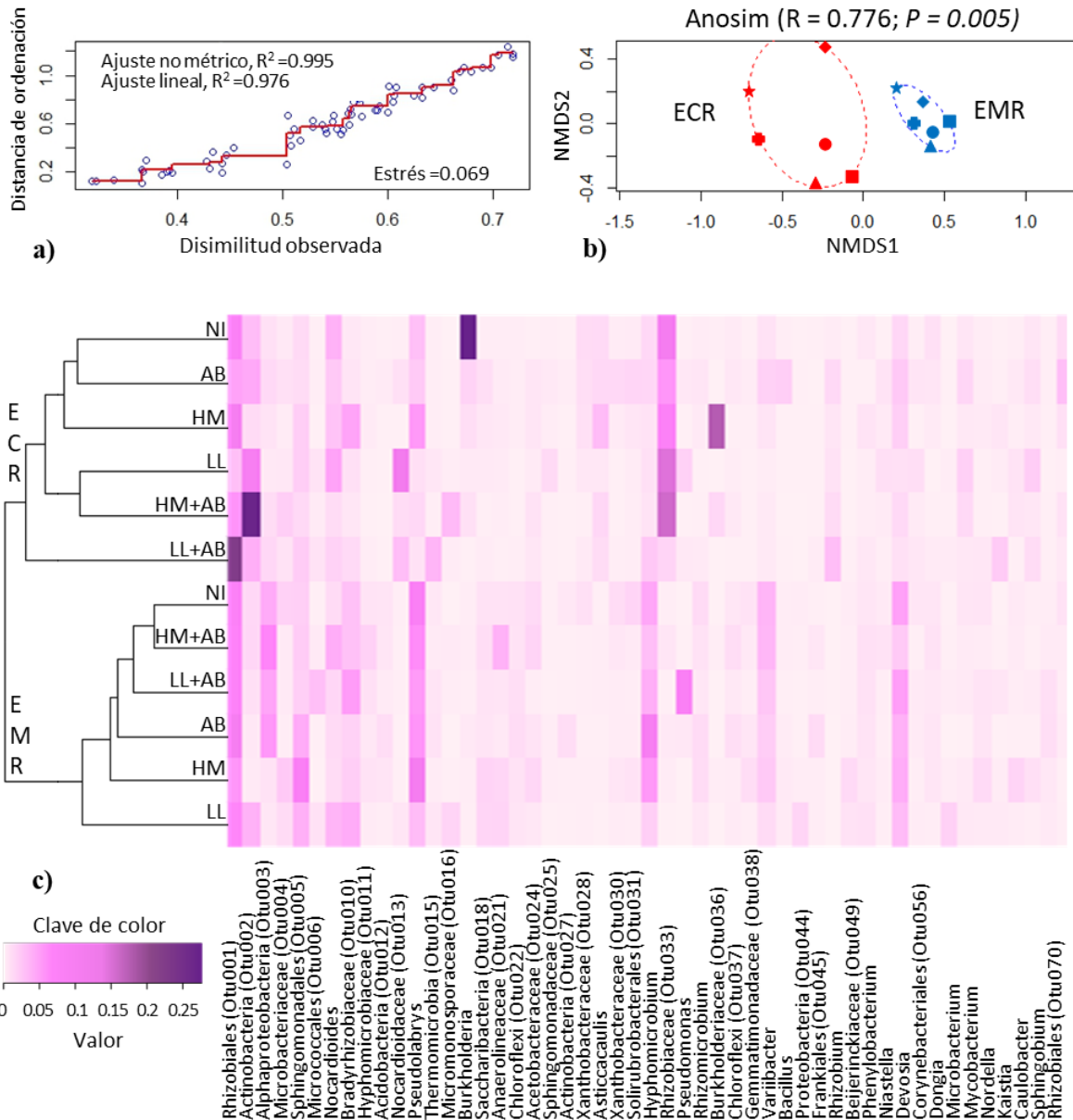


Fig. 2. Gráfico de estrés (a), escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) (b), y dendrograma con mapa de calor (c), que muestran el agrupamiento jerárquico de tratamientos alrededor de ECR (raíz ectomicorrízica) y EMR (ectomicorrizosfera); NI= Sin inoculación (●); AB= *A. brasilense* (▲); LL= *L. laccata* (★); HM= *H. mesophaeum* (■); LL+AB= *L. laccata* y *A. brasilense* (◆); HM+AB= *H. mesophaeum* y *A. brasilense* (■).

Fig. 2. Stress plot (a), Non-metric multidimensional scaling (NMDS) (b), and dendrogram with heatmap (c), showing hierarchical clustering of treatments around ECR (ectomycorrhizal root) and EMR (ectomycorrhizosphere).

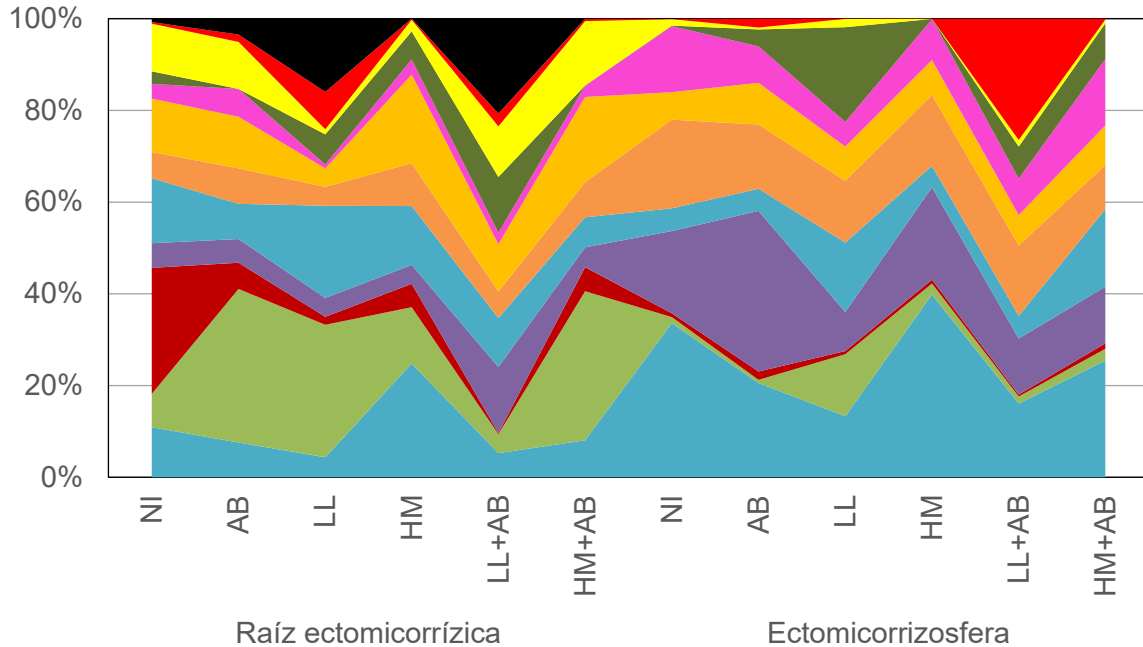


Fig. 3. Abundancia relativa de los doce géneros bacterianos más abundantes dentro de las diferentes comunidades bacterianas (de abajo hacia arriba y de mayor a menor abundancia: *Pseudolabrys*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Hyphomicrobium*, *Nocardioides*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Variibacter*, *Salinibacterium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Actinoplanes*). Abreviaciones: NI = Sin inoculación; AB = *A. brasilense*; LL = *L. laccata*; HM = *H. mesophaeum*.

Fig. 3. Relative abundance of the twelve most abundant bacterial genera within the different bacterial communities. Abbreviations: NI = Without inoculation; AB = *A. brasilense*; LL = *L. laccata*; HM = *H. mesophaeum*.

4. DISCUSIÓN

Encontramos un microbioma bacteriano asociado con las raíces de *P. montezumae* compuesto por un total de 943 unidades taxonómicas operativas (OTU) que fueron clasificadas en 32 phyla bacterianos. Las comunidades estuvieron dominadas por Proteobacteria y Actinobacteria, y en menor medida por Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes y Acidobacteria. Otros estudios también encontraron que estos phyla bacterianos dominaron las comunidades de bacterias en raíces ectomicorrízicas (Uroz *et al.*, 2012; Marupakula *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017, 2018). Las proteobacterias incluyen una alta diversidad de bacterias relacionadas con los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre (Kerstens *et al.*, 2006). Se ha observado que en suelos con un alto contenido de nutrientes fácilmente disponibles se muestra una selección positiva para Proteobacteria (Torsvic & Ovreas, 2002). Por el contrario, las actinobacterias están especializadas en la degradación de fuentes de C relativamente complejas y recalcitrantes (Montecchia *et al.*, 2015). Dentro de Proteobacteria, los géneros más comunes que se encontraron en este trabajo fueron *Hyphomicrobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* del orden

Rhizobiales, así como *Azospirillum*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* de los órdenes Rhodospirillales, Burkholderiales y Pseudomonadales, respectivamente. Dentro de Actinobacteria, los principales géneros fueron *Salinibacterium* y *Actinoplanes* pertenecientes a Micrococcales, y *Nocardioides* a Propionibacteriales. La mayoría de estos géneros bacterianos incluyen especies con cepas que son MHB (Garbaye, 1994; Frey-Klett & Garbaye, 2005; Frey-Klett *et al.*, 2007; Caravaca *et al.*, 2015); también con algunas especies que llevan a cabo la fijación biológica de N, solubilización de P, producción de sideróforos/quelación de Fe, producción de antibióticos y supresión natural de fitopatógenos del suelo (Caravaca *et al.*, 2015; Marupakula *et al.*, 2016; Bhatti *et al.*, 2017; Vandana *et al.*, 2021).

La abundancia relativa de los phyla bacterianos principales mostró una tendencia asociada con la inoculación de los HEM. Con *H. mesophaeum* (HM) se promovió la abundancia de Proteobacteria, mientras que con *L. laccata* (LL) de Actinobacteria, tanto en ECR como en EMR. Dentro de proteobacterias un género no identificado de la familia Burkholderiaceae fue prominente en ECR inoculada con HM; mientras que para actinobacterias, los géneros *Actinoplanes*, *Salinibacterium* y *Nocardioides*, además de *Pseudomonas*, fueron abundantes en raíces inoculadas con LL. El efecto diferencial de los HEM sobre las comunidades bacterianas ha sido observado en otros trabajos (Izumi & Roger, 2011; Marupakula *et al.*, 2016). Sin embargo, la alta abundancia de la OTU036 de Burkholderiaceae en la ECR de HM requiere de una consideración adicional debido a que esta familia es extremadamente diversa y contiene once géneros, entre los que se encuentra *Burkholderia* (Coenye, 2014). El género *Burkholderia*, con cerca de 100 especies, es ubicuo y bifuncional; algunas de sus especies pueden establecer simbiosis mutualista con plantas, fijar el nitrógeno atmosférico, sintetizar sustancias promotoras del crecimiento vegetal, solubilizar el fósforo del suelo y controlar patógenos de plantas; mientras que otras de sus especies pueden ser patogénicas en plantas, animales y humanos (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020). Entre las especies patogénicas en humanos se ha identificado a *Burkholderia pseudomallei* como agente causal de melioidosis (Coenye, 2014; Espinosa-Victoria *et al.*, 2020). De manera interesante, nuestros resultados también mostraron que *Burkholderia* fue prominente en el control sin inoculación y disminuyó en los tratamientos de inoculación con HEM. Por lo anterior, es importante profundizar el conocimiento del microbioma de HM y su ECR, que aborden el posible efecto tóxico, tanto del hongo como de la bacteria que favorece.

El cambio en la composición bacteriana entre especies de HEM se ha explicado debido a diferencias en los flujos de carbono y nutrientes, así como por la producción de sustancias antibióticas, metabolitos secundarios o moléculas de señalización producidas por los HEM (Izumi & Roger, 2011; Marupakula *et al.*, 2016; Deveau, 2016). Sin embargo, el cambio observado en este trabajo también puede ser debido al microbioma de los cuerpos fructíferos de los HEM (Quandt *et al.*, 2015; Bahram *et al.*, 2018). Pent *et al.* (2017) caracterizaron las comunidades bacterianas en cuerpos fructíferos de ocho géneros de la clase Agaricomycetes (Basidiomycota). Estos autores descubrieron que la identidad fúngica fue uno de los principales determinantes de la estructura de las comunidades bacterianas. En estos hongos se detectaron 446 OTU bacterianas que se asignaron a Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia y Planctomycetes (Pent *et al.*, 2017). Además, Proteobacteria y las clases Actinobacteria y Sphingobacteria dominaron la comunidad bacteriana en el peridio de *Elaphomyces granulatus* (Quandt *et al.*, 2015). Otros estudios mostraron la complejidad del microbioma

y la compartimentalización de la comunidad microbiana en los cuerpos fructíferos de *Tuber pseudohimalayense* (Liu *et al.*, 2021a), *Tricholoma matsutake* (Liu *et al.*, 2021b), *Thelephora ganbajun* (Liu *et al.*, 2021c), y *Tuber indicum* (Liu *et al.*, 2021d). Por lo tanto, es de esperar que las comunidades bacterianas difieran debido a la especie de hongo involucrada en la simbiosis ectomicorrízica.

Los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H') y el Inverso de Simpson ($1/D$) mostraron que las comunidades bacterianas fueron más diversas en EMR que en ECR. La diversidad de bacterias asociadas con ECR disminuyó en las plantas que fueron inoculadas con HEM, con o sin *A. brasilense*, en relación con el control sin inoculación (NI). Este resultado está de acuerdo con los hallazgos de Li *et al.* (2017), quienes observaron que la diversidad bacteriana de la raíz ectomicorrízica de *P. armandii* fue menor en comparación con el suelo circundante. El efecto diferencial de ECR y EMR sobre la diversidad de bacterias puede ser explicado debido a los exudados y biomoléculas que son producidos por las raíces de la planta y las hifas de los HEM, los cuales ejercen una influencia selectiva sobre las poblaciones de bacterias (Vandana *et al.*, 2021). Asimismo, el índice de similitud de Sorensen (CC) mostró que la inoculación de *A. brasilense* tuvo una influencia menor en la composición de las comunidades bacterianas en las raíces con HEM; no obstante, hubo un incremento en la abundancia relativa de *Azospirillum* en ECR de plantas que fueron inoculadas con esta bacteria.

Por otra parte, el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) mostró una diferencia significativa entre los compartimentos ECR y EMR (Anosim, $R = 0.776$, $P \leq 0.005$). Como lo muestran los tamaños de elipse de las coordenadas, las comunidades de EMR tuvieron una menor dispersión que las de ECR, lo que indica que la estructura de la comunidad bacteriana aumentó en ECR en relación con EMR. La función *simper* del paquete *Vegan* en R, mostró que hubo una similitud de 61 % entre ambos compartimentos ectomicorrízicos; asimismo, la contribución de los géneros bacterianos más comunes a la disimilitud general promedio de Bray-Curtis (NMDS) mostró que hubo una mayor frecuencia relativa de *Azospirillum*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Actinoplanes* y *Rhizobium* en ECR que en EMR ($P \leq 0.01$), mientras que *Pseudolabrys*, *Hyphomicrobium*, *Devosia* y *Variibacter* fueron más abundantes en EMR que en ECR ($P \leq 0.01$). Por el contrario, *Pseudomonas*, *Salinibacterium*, *Nocardioides* y *Sphingomonas* no difirieron entre ECR y EMR. Es de destacar que Rhizobiales fue el orden más común en los tratamientos de muestreo con el 41 % del total de secuencias y representó el 70 % de la clase Alfabroteobacteria. Este orden se encontró altamente representado en raíces ectomicorrízicas de árboles forestales (Wagner *et al.*, 2019); asimismo, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* fueron los miembros más comunes en la comunidad bacteriana de raíces ectomicorrízicas de *L. laccata* en una plantación de castaño (*Castanea crenata*) (Obase, 2019). Por lo anterior, es notable que los principales géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno hayan tenido un lugar con significancia estadística dentro de la comunidad bacteriana asociada con la raíz ectomicorrízica de *P. montezumae*. Estudios adicionales son necesarios para profundizar en el conocimiento de las interacciones entre los HEM y las bacterias fijadoras del nitrógeno, por la importancia de estos grupos funcionales de microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal.

Se encontró que la estructura de la comunidad bacteriana fue diferente en los compartimentos ECR y EMR, con una mayor diversidad en EMR que en ECR, en donde los HEM modelaron fuertemente la composición de la comunidad bacteriana. La inoculación de *L. laccata* promovió la abundancia de *Pseudomonas*, *Salinibacterium* y

Actinoplanes, mientras que *H. mesophaeum* indujo la presencia de un género bacteriano no identificado de la familia Burkholderiaceae. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio de los cambios en el microbioma originados por la inoculación de HEM comestibles en un árbol hospedero neotropical. Sin embargo, se necesitan más estudios para tener conocimientos más profundos de la relevancia ecosistémica funcional de los microbiomas asociados con las raíces ectomicorrízicas y su ectomicorrizosfera, principalmente en ecosistemas tropicales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT bajo el Proyecto Donación 316198-PRONACES Soberanía Alimentaria FOP07-2021-03. Dos revisores anónimos aportaron sugerencias valiosas que contribuyeron a mejorar el manuscrito.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Afgan E., Baker D., van den Beek M., Blankenberg D., Bouvier D., *et al.* 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 44: W3–W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343>

Andrews S. 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Bahram M., Vanderpool D., Pent M., Hiltunen M. & Ryberg M. 2018. The genome and microbiome of a dikaryotic fungus (*Inocybe terrigena*, Inocybaceae) revealed by Metagenomics. *Environmental Microbiology Reports* 10(2): 155–166. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12612>

Barragán-Soriano J. L., Pérez-Moreno J., Almaraz-Suárez J.J., Carcaño-Montiel M.G., & Medrano-Ortiz K. I. 2018. Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 24(1): 3-16. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.01.010>

Barragán-Soriano J. L., Pérez-Moreno J., Almaraz-Suárez J. J., Carcaño-Montiel M. J., Delgadillo-Martínez J., Cetina-Alcalá V. M. & Mata G. 2022. Coinoculación de *Pinus montezumae* (Pinaceae) con un hongo comestible ectomicorrízico y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Acta Botanica Mexicana* 129: e2024. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2024>

Bhatti A. A., Haq S. & Bhat R. A. 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis* 111: 458-467. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.036>

- Bolger A. M., Lohse M. & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bonfante P. & Anca I. A. 2009. Plants, mycorrhizal fungi and bacteria: A network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63: 363–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504>
- 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 Ecology* 54: 567–577. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9260-z>
- Caravaca F., Maboreke H., Kurth F., Herrmann S., Tarkka M.T. & Ruess L. 2015. Synergists and antagonists in the rhizosphere modulate microbial communities and growth of *Quercus robur* L. *Soil Biology and Biochemistry* 82: 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.12.004>
- Carrasco-Hernández V., Pérez-Moreno J., Espinosa-Hernández V., Almaraz-Suárez J. J., Quintero-Lizaola R. & Torres-Aquino M. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 83-96. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2011000100006>
- Carrasco-Hernández V., Pérez-Moreno J., Quintero-Lizaola R., Espinosa-Solares T., Lorenzana-Fernández A. & Espinosa-Hernández V. 2015. Edible species of the fungal genus *Hebeloma* and two Neotropical pines. *Pakistan Journal of Botany* 47(1): 319-326. [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/47\(1\)/45.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/47(1)/45.pdf)
- Carrasco-Hernández V., Rodríguez-Trejo D. A., Pérez-Moreno J., Duarte-Zaragoza V.M., Navarro-Sandoval J. L. & Quintero-Lizaola R. 2018. Evaluación del costo de producción de inoculantes ectomicorrízicos neotropicales a base de esporas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(2): 417-429. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1082>
- Coenye T. 2014. The Family Burkholderiaceae. In: *The Prokaryotes - Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, (Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F., eds). Springer. Berlín. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_239
- CVG, Cofradía Vasca de Gastronomía. 2020. *Hebeloma mesophaeum*. Fichas micológicas. Cofradía Vasca de Gastronomía/Asociación Cultural “Baxauri”. <https://www.fichasmicologicas.com/?micos=1&alf=H&art=600> (consultado abril 6, 2024).
- Deveau A. 2016. How does the tree root microbiome assemble? Influence of ectomycorrhizal species on *Pinus sylvestris* root bacterial communities. *Environmental Microbiology* 18(5): 1303–1305. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13214>
- Dixon P. 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 14: 927–930. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x>

Frey-Klett P., Pierrat J. C. & Garbaye J. 1997. Location and survival of mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* during establishment of ectomycorrhizal symbiosis between *Laccaria bicolor* and Douglas Fir. *Applied and Environmental Microbiology* 63(1): 139–144. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.139-144.1997>

Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel M. G. & Serret-López M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 337-359. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2004-5>

Fernández-Armendáriz C., Garibay-Orijel R., & Ramírez-Terrazo A. 2022. *Hebeloma mesophaeum* s.l. In: Hongos silvestres comestibles y tóxicos de México, (Garibay-Orijel R., coord.). Universidad Nacional Autónoma de México. <https://hongoscomestiblesytoxicos.ib.unam.mx/imagenes/infografias/hebeloma%20mesophaeum.png> (consultado abril 6, 2024).

Frey-Klett P. & Garbaye J. 2005. Mycorrhiza Helper Bacteria: A promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions. *New Phytologist* 168: 4-8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01553.x>

Frey-Klett P., Garbaye J. & Tarkka M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22–36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>

Galindo-Flores G., Castillo-Guevara C., Campos-López A. & Lara C. 2015. Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences* 93 (4): 855-863. <https://doi.org/10.17129/botsci.200>

Garbaye P. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197-210. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x>

Gupta S. K. & Chakraborty A. P. 2020. Mycorrhiza Helper Bacteria: Future prospects. *International Journal of Research and Review* 7(3): 387-391. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:216363440>

Izumi H. & Roger D. 2011. Ectomycorrhizal roots select distinctive bacterial and ascomycete communities in Swedish subarctic forests. *Environmental Microbiology* 13(3): 819–830. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02393.x>

Kerstens K., De Vos P., Gillis M., Swings J., Vandamme P. & Stackebrandt E. 2006. Introduction to the Proteobacteria. In: *The Prokaryotes*, (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH. & Stackebrandt E. eds). Springer, New York, NY. Pp.3-37. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_1

Labbé J. L., Weston D. J., Dunkirk N., Pelletier D.A. & Tuskan G. A. 2014. Newly identified helper bacteria stimulate ectomycorrhizal formation in *Populus*. *Frontiers in Plant Science* 5(579): 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00579>

Li Q., Zhao J., Xiong C., Li X., Chen Z., Li P. & Huang W. 2017. *Tuber indicum* shapes the microbial communities of ectomycorrhizosphere soil and ectomycorrhizae of an indigenous tree (*Pinus armandii*). PLoS ONE 12(4): e0175720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175720>

Li Q., Yan L., Ye L., Zhou J., Zhang B., Peng W., Zhang X. & Li X. 2018. Chinese black truffle (*Tuber indicum*) alters the ectomycorrhizosphere and endoectomycosphere microbiome and metabolic profiles of the host tree *Quercus aliena*. Frontiers in Microbiology 9:2202. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02202>

Liu D., Chater C.C., Yu F. & Pérez-Moreno J. 2021a. *Tuber pseudohimalayense* ascomata-compartments strongly select their associated bacterial microbiome from nearby pine forest soils independently of their maturation stage. Pedobiologia - Journal of Soil Ecology 87–88: 150743. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2021.150743>

Liu D., Pérez-Moreno J., Zhang P., Wang R., Chater C.C. & Yu F. 2021b. Distinct compartmentalization of microbial community and potential metabolic function in the fruiting body of *Tricholoma matsutake*. J. Fungi 7: 586. <https://doi.org/10.3390/jof7080586>

Liu D., He X., Chater C.C., Pérez-Moreno J. & Yu F. 2021c. Microbiome community structure and functional gene partitioning in different micro-niches within a sporocarp-forming fungus. Front. Microbiol. 12: 629352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629352>

Liu D., Pérez-Moreno J., He X., Garibay-Orijel R. & Yu F. 2021d. Truffle microbiome is driven by fruit body compartmentalization rather than soils conditioned by different host trees. mSphere 6:e00039-21. <https://doi.org/10.1128/msphere.00039-21>

Luo C., Rodriguez L. M., Johnston E. R., Wu L., Cheng L., Xue K., Tu Q. & Deng Y. 2014. Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics. Applied and Environmental Microbiology 80(5): 1777-1786. <https://doi.org/10.1128/AEM.03712-13>

Manzanilla-Quiñones U., Delgado-Valerio P., Hernández-Ramos J., Molina-Sánchez A., García-Magaña J. J., Rocha-Granados M.C. 2019. Similaridad del nicho ecológico de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrabus* (Pinaceae) en México: implicaciones para la selección de áreas productoras de semillas y de conservación. Acta Botanica Mexicana 126: e1398. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1398>

Martínez-Reyes M., Pérez-Moreno J., Villarreal-Ruiz L., Ferrera-Cerrato R., Xoconostle-Cázares B., Vargas-Hernández J. J. & Honrubia-García M. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 18(2): 183-192. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2010.11.112>

Marupakula S., Mahmood S. & Finlay R. D. 2016. Analysis of single root tip microbiomes suggests that distinctive bacterial communities are selected by *Pinus sylvestris* roots

colonized by different ectomycorrhizal fungi. *Environmental Microbiology* 18(5): 1470-1483. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13102>

Méndez-Neri M., Pérez-Moreno J., Quintero-Lizaola R., Hernández-Acosta E. & Lara-Herrera A. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana* 29(1): 73-81. <https://terralatinoamericana.org.mx/index.php/terra/article/view/1205/1432>

Montecchia M. S., Tosi M., Soria M.A., Vogrig J.A., Sydorenko O. & Correa O. S. 2015. Pyrosequencing reveals changes in soil bacterial communities after conversion of Yungas forests to agriculture. *PLoS ONE* 10(3): e0119426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119426>

Obase K. 2019. Bacterial community on ectomycorrhizal roots of *Laccaria laccata* in a chestnut plantation. *Mycoscience* 60: 40-44. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.08.002>

Pent M., Pöldmaa K. & Bahram M. 2017. Bacterial communities in boreal forest mushrooms are shaped both by soil parameters and host identity. *Front. Microbiol.* 8: 836. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00836>

Pérez-Moreno J. & Read D.J. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29(5): 239-247. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33909203.pdf>

Pérez-Moreno J., Martínez-Reyes M., Yesca-Pérez A., Delgado-Alvarado A. & Xoconostle-Cázares B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62: 425-436. <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9043-6>

Pérez-Moreno J., Martínez-Reyes M., Hernández-Santiago F. & Ortiz-Lopez I. 2020. Climate change, biotechnology, and Mexican neotropical edible ectomycorrhizal mushrooms. In: Pérez-Moreno *et al.* (eds.), *Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World*. Springer Nature Switzerland AG. Chapter 3: 61-99. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37378-8_3

Pérez-Moreno J., Guerin-Laguette A., Rinaldi A. C., Yu F., Verbeken A., Hernández-Santiago F. & Martínez-Reyes M. 2021. Edible mycorrhizal fungi of the world: What is their role in forest sustainability, food security, biocultural conservation and climate change? *Plants People Planet* 3: 471-490. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10199>

Quandt C. A., Kohler A., Hesse C.N., Sharpton T.J., Martin F. & Spatafora J. W. 2015. Metagenome sequence of *Elaphomyces granulatus* from sporocarp tissue reveals Ascomycota ectomycorrhizal fingerprints of genome expansion and a Proteobacteria-rich microbiome. *Environmental Microbiology* 17(8): 2952-2968. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12840>

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J. & Glöckner F. O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing

and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41: 590-596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Riesenfeld C. S., Schloss P. D., & Handelsman J. 2004. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 38: 525–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091216>

Rosete-Vergés F.A., Pérez-Damián J.L, Villalobos-Delgado M., Navarro-Salas E.N., Salinas-Chávez E. & Remond-Noa R. 2014. El avance de la deforestación en México 1976-2007. *Madera y Bosques* 20(1): 21-35. <https://doi.org/10.21829/myb.2014.201173>

Schloss P.O., Westcott S. L., Ryabin T., Hall J. R. *et al.* 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>

Shirakawa M., Uehara I. & Tanaka M. 2019. Mycorrhizosphere bacterial communities and their sensitivity to antibacterial activity of ectomycorrhizal fungi. *Microbes Environ.* 34(2): 191-198. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18146>

Sorensen T. A. 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content, and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Biologiske Skrifter* 5: 1-34.

Torsvik V. & Ovreas L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 240-245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)

Uroz S., Oger P., Morin E. & Frey-Klett P. 2012. Distinct ectomycorrhizospheres share similar bacterial communities as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78(8): 3020-3024. <https://doi.org/10.1128/AEM.06742-11>

Vandana U. K., Rajkumari J., Singha L. P., Satish L., Alavilli H. *et al.* 2021. The endophytic microbiome as a hotspot of synergistic interactions, with prospects of plant growth promotion. *Biology* 10: 101. <https://doi.org/10.3390/biology10020101>

Wagner K., Krause K., Gallegos-Monterrosa R., Sammer D., Kovács Á. T. & Kothe E. 2019. The ectomycorrhizospheric habitat of Norway Spruce and *Tricholoma vaccinum*: Promotion of plant growth and fitness by a rich microorganismic community. *Front. Microbiol.* 10: 307. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00307>