



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera  
División de Estudios de Posgrado  
Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera

# **Efecto de la micorrización en el crecimiento de *Dalbergia congestiflora* Pittier en dos sistemas de propagación**

**TESIS**

Como requisito parcial para obtener el grado de:  
Maestra en ciencias en Tecnología de la madera

**Presenta**

**Biol. Yoshira López Antonio**

**Director de tesis**

**D.C. Jorge Enrique Ambriz Parra**

**Co-directora**

**M.C. Alejandra Hernández García**

**Morelia Michoacán, julio del 2018**



***El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del Dr. Jorge Enrique Ambriz Parra y co-asesoría de la M.C. Alejandra Hernández García.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, en especial a la **Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera**, por todo el apoyo otorgado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada, ya que sin el apoyo, no hubiese sido posible la realización de este proyecto.

Al **Dr. Jorge Enrique Ambriz Parra**, por todas sus enseñanzas para mi formación, por su tiempo y dedicación para la culminación de este trabajo. **Muchas gracias**

A la **M.C. Alejandra Hernández García**, que me ha guiado en el desarrollo de este trabajo, por sus aportes y enseñanzas que influyeron en mi formación. **Gracias**

A mis sinodales el **Dr. Crisanto Velázquez Becerra**, **Dr. José Cruz de León**, y a la **Dra. Patricia Ríos Chávez** por sus aportes y recomendaciones en el proyecto de tesis. **Gracias**

Al **Laboratorio de Biotecnología Vegetal del IIQB-UMSNH**, en especial al **Dr. Rafael Salgado Garciglia** y a la **M.C. Alejandra Hernández García**, por todo el apoyo brindado

A la **M.C Lorena Carreto Montoya**, por el apoyo en la identificación y tinción de hongos micorrízicos y sus conocimientos aportados. **Gracias**

A la **Ing. Teresa García Moreno de la Facultad de Tecnología de la Madera** por la donación de semillas y por facilitar el microscopio para este trabajo.

Al **Dr. Crisanto Velázquez Becerra** por las instalaciones prestadas, para realizar parte del trabajo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Biotecnología Vegetal **Ana, Rafael Ayala, Rafael Torres** que siempre estuvieron ahí apoyándome incondicionalmente, y que también brindaron sus aportes de conocimientos. **Muchas gracias.**

A mis amigas **Kari, Anahí y Mari**, por siempre estar ahí conmigo apoyándome incondicionalmente, por todas sus palabras de aliento y no dejarme sola en este recorrido **Gracias por su amistad.**

A la **M.C. Alejandra** por todos estos años compartidos como maestra, como asesora y sobre todo como amiga. **Gracias por toda la confianza, apoyo y creer en mí.**

A mis compañeros de generación **Andrés, Gaby, Vanesa, Emilio y Juan Gabriel** por todo lo compartido en clases, salidas de campo, laboratorios. Gracias fue un gusto haberlos conocido.

Al **M.C. Jesús Morales Hernández** y al **M.C. Wilber Montejo Mayo**, por su apoyo y sus conocimientos aportados durante mi formación. **Gracias**

A la señora Estela, por todo su apoyo, por sus consejos y sus ánimos. **Gracias**

A la señora Teresa por todo su apoyo. **Gracias**

## ***DEDICATORIA***

A ti **PAPÁ** que siempre has estado motivándome para seguir adelante, para poder seguirme preparando profesionalmente y que nunca me has dejado sola a pesar de todo.

A ti **MAMÁ** por siempre apoyarme y estar conmigo incondicionalmente en cada momento. Gracias por todo, te admiro mucho.

A ti **ABEL** por apoyarme incondicionalmente, por tu paciencia, por tus palabras de aliento, por aguantar mis días malos y mis días de preocupación. Mil gracias

A **Ian** e **Ileana** mis dos grandes amores. Los amo mucho

A mis hermanos **NADIA, EMIGDIO y ODIN** por siempre estar conmigo, y apoyarme en cada momento.

A mis niños hermosos **Brandon, Dania y Bruno de Jesús.**

A ti abuelita, que aunque ya no estás conmigo, te llevo siempre presente en mi corazón. Te extraño mucho.

*“Gracias por existir en mi vida”*

## ÍNDICE

### ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN.....                                                                                                                         | 1  |
| ABSTRACT .....                                                                                                                       | 2  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                | 3  |
| 2. ANTECEDENTES.....                                                                                                                 | 5  |
| 2.1 <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier .....                                                                                     | 5  |
| 2.2 Distribución de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier .....                                                                     | 5  |
| 2.3 Usos.....                                                                                                                        | 5  |
| 2.4 Propagación de cultivos .....                                                                                                    | 6  |
| 2.5 Propagación por semilla.....                                                                                                     | 7  |
| 2.6 Invernadero .....                                                                                                                | 7  |
| 2.7 Sustrato .....                                                                                                                   | 8  |
| 2.7.1 Características físicas de los sustratos.....                                                                                  | 8  |
| 2.7.2 Características químicas de los sustratos .....                                                                                | 8  |
| 2.7.3 Características biológicas de los sustratos .....                                                                              | 9  |
| 2.8 Micorrizas.....                                                                                                                  | 10 |
| 2.9 Biomasa.....                                                                                                                     | 14 |
| 3. JUSTIFICACIÓN .....                                                                                                               | 15 |
| 4. HIPÓTESIS .....                                                                                                                   | 16 |
| 5. OBJETIVO GENERAL.....                                                                                                             | 17 |
| 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....                                                                                                      | 17 |
| 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....                                                                                                     | 18 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                        | 20 |
| 7.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....                                                                                                         | 20 |
| 7.1.1 Plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> micropropagadas .....                                                                | 20 |
| 7.1.2 Plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> propagadas por semilla.....                                                          | 21 |
| 7.2 Inoculación en invernadero de plantas obtenidas por semilla y micropropagadas de<br><i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier ..... | 22 |
| 7.2.1 Sustrato .....                                                                                                                 | 22 |
| 7.2.2 Inoculación de las plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier con<br>micorrizas en invernadero.....                     | 22 |
| 7.2.3 Parámetros evaluados en plantas micorrizadas en invernadero: semilla                                                           |    |

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| y micropropagadas .....                                                                                                                            | 24 |
| 7.3 Inoculación de plantas <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia congestiflora</i> .....                                                                 | 25 |
| 7.3.1 Parámetros evaluados en plantas micorrizadas <i>in vitro</i> .....                                                                           | 26 |
| 7.4 Tinción de raíces de las plantas micorrizadas provenientes de invernadero<br>e <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier ..... | 26 |
| 7.5 Evaluación estadística.....                                                                                                                    | 27 |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                                                                                                     | 28 |
| 8.1 Plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> micropropagadas.....                                                                                 | 28 |
| 8.1.1 Supervivencia en plantas micropropagadas.....                                                                                                | 28 |
| 8.2 Plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> propagadas por semilla.....                                                                          | 29 |
| 8.2.1 Supervivencia en plantas por semilla .....                                                                                                   | 30 |
| 8.3 Plantas obtenidas por semilla y micropropagadas de <i>Dalbergia congestiflora</i> .....                                                        | 31 |
| 8.3.1 Plantas obtenidas por semilla crecidas en invernadero.....                                                                                   | 31 |
| 8.3.2 Plantas micropropagadas crecidas en invernadero.....                                                                                         | 37 |
| 8.4 Inoculación de plantas <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia congestiflora</i> .....                                                                 | 41 |
| 8.5 Tinción de raíces de las plantas micorrizadas.....                                                                                             | 45 |
| 9. CONCLUSIONES.....                                                                                                                               | 50 |
| 10. RECOMENDACIONES .....                                                                                                                          | 51 |
| 11. LITERATURA CITADA.....                                                                                                                         | 52 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Proceso de infección de hongos micorrízicos arbusculares .....                                         | 13 |
| Figura 2. Propagación de plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier en un sistema <i>in vitro</i> ...     | 21 |
| Figura 3. Germinación de semillas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier.. .....                              | 21 |
| Figura 4. Sustrato utilizado para el crecimiento de plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier..<br>..... | 22 |
| Figura 5. Inoculación de plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier con micorrizas. ....                  | 23 |
| Figura 6. Plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier.....                                                 | 25 |
| Figura 7. Raíces de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier mantenidas en invernadero. ....                       | 27 |
| Figura 8. Plantas micropropagadas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier.....                                 | 28 |

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 9. Porcentaje de supervivencia de plantas micropropagadas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier.....                                                                                             | 29 |
| Figura 10. Semillas y plántulas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier. ....                                                                                                                             | 30 |
| Figura 11. Porcentaje de supervivencia de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier.....                                                                                                                       | 31 |
| Figura 12. Altura de plantas obtenidas a partir de semillas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier a los 60,120 y 180 días.. ....                                                                        | 32 |
| Figura 13. Diámetro de plantas obtenidas a partir de semillas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier a los 60, 120 y 180 días.....                                                                       | 33 |
| Figura 14. Número de folíolos obtenidas a partir de semillas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier a los 60, 120 y 180 días.....                                                                        | 34 |
| Figura 15. Número de hojas obtenidas a partir de semillas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier a los 60, 120 y 180 días.....                                                                           | 35 |
| Figura 16. Cobertura de plantas obtenida a partir de semillas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier. ....                                                                                               | 36 |
| Figura 17. Altura de plantas micropropagadas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier a los 60, 120 y 180 días. ....                                                                                       | 37 |
| Figura 18. Diámetro de plantas micropropagadas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier a los ...                                                                                                          | 38 |
| Figura 19. Número de folíolos de plantas obtenidas <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier a los 60, 120 y 180 días.. ....                                                                | 39 |
| Figura 20. Número de hojas obtenidas <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier a los 60, 120 y 180 días. ....                                                                               | 40 |
| Figura 21. Longitud de raíz en plantas <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier en diferentes concentraciones de esporas de <i>Rhizophagus intraradices</i> a los 8, 15, 22 y 30 días..... | 41 |
| Figura 22. Plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> . ....                                                                                                   | 42 |
| Figura 23. Número de raíces en plantas <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier en diferentes concentraciones de esporas de <i>Rhizophagus intraradices</i> . ....                         | 43 |
| Figura 24. Porcentaje de supervivencia de plántulas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier en condiciones <i>ex vitro</i> . ....                                                                         | 44 |
| Figura 25. Raíces de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier sometidas a diferentes tiempos de clarificación.....                                                                                            | 46 |
| Figura 26. Presencia de estructuras de hongos micorrízicos arbusculares en raíces de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier. ....                                                                           | 47 |
| Figura 27. Raíces de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier sometidas a diferentes tiempos de clarificación.....                                                                                            | 48 |
| Figura 28. Presencia de estructuras en raíces de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier.....                                                                                                                | 48 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Especies frutícolas, forestales evaluadas con hongos micorrízicos arbusculares                                                          | 12 |
| Cuadro 2. Efecto de las micorrizas en cultivo <i>in vitro</i> .....                                                                               | 13 |
| Cuadro 3. Concentraciones de inóculo comercial aplicadas a las plantas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier.....                             | 23 |
| Cuadro 4. Concentraciones de hongos micorrízicos arbusculares aplicadas en plantas <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier..... | 25 |
| Cuadro 5. Porcentaje de clarificación en raíces micorrizadas de <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier.....                                       | 46 |

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de micorrizas comerciales (*Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum* y *Entrophospora columbiana*) y *Rhizophagus intraradices* en *Dalbergia congestiflora* en invernadero e *in vitro*.

Las plantas de *D. congestiflora* propagadas por semilla e inoculadas con 176 esporas de las micorrizas comerciales y mantenidas en invernadero por 180 días, fueron las que presentaron un incremento en las variables de altura, diámetro, número de hojas, número de folíolos, cobertura y un 80 % de supervivencia. A comparación con las plantas micropropagadas que en todos los tratamientos probados solo se observó en el parámetro de supervivencia un aumento de 20 a 40%. Sin embargo, solo se logró observar micelio con la técnica de tinción de tinta china.

La inoculación *in vitro* de las plantas de *D. congestiflora* con 10 esporas de *R. intraradices* y mantenidas por 30 días en condiciones de cuarto de cultivo, presentaron un incremento en número de raíces, longitud de raíz, ya *ex vitro* la supervivencia aumento a un 80% en comparación con el control que fue de 50%, y con la tinción con azul de tripano se encontró en su interior esporas de *R. intraradices*.

En invernadero o *in vitro* las plantas de *D. congestiflora* propagadas por semilla o micropropagadas e inoculadas con micorrizas comerciales o *R. intraradices* se observó un efecto en la supervivencia, que fue un resultado favorable para *D. congestiflora* ya que se encuentra clasificada como una especie en peligro de extinción.

**Palabras clave:** Hongos micorrízicos arbusculares, micropropagación, semilla, *in vitro*, supervivencia.

## ABSTRACT

In this study evaluated the effect of commercial mycorrhizal (*Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum*, and *Entrophospora columbiana*) and *Rhizophagus intraradices* on *Dalbergia congestiflora* in greenhouse and *in vitro*.

*D. congestiflora* plants propagated by seed and inoculated with 176 spores of arbuscular commercial and maintained in the greenhouse for 180 days, were which showed an increase in the variables of height, diameter, number of sheets, number of leaflets, coverage and 80% survival. Compared with micropropagadas that all plants tested only treatments was observed in survival parameter an increase from 20 to 40%. However, only managed to observe mycelium with the ink stain technique.

*In vitro* inoculation *R. intraradices* of plants with 10 spores of *D. congestiflora* and maintained for 30 days in terms of grow room, showed an increase in number of roots, root length, former *ex vitro* survival increase to 80% in comparison with the control that was 50%, and staining with trypan blue was found inside spores of *R. intraradices*

In the greenhouse or *in vitro* propagated by seed or micropropagadas and inoculated with commercial mycorrhizae or *R. intraradices* the *D. congestiflora* plants observed an effect on survival, which was a favorable outcome for *D. congestiflora* is classified as a species in danger of extinction.

**Key words:** Fungi mycorrhizal arbuscular, micropropagation, seed, *in vitro*, survival.

# 1. INTRODUCCIÓN

El género *Dalbergia* cuenta con alrededor de 250 especies en general, se encuentran distribuidas en Sudamérica, África, Madagascar (Vatanparast *et al.*, 2013). Veinte especies se distribuyen en México y de estas 15 son considerados especies maderables, 6 son endémicas y las 9 restantes son nativas de México y Centroamérica (LGVS, 2000).

*Dalbergia congestiflora* Pittier no es una especie endémica de México debido a que se encuentran pequeñas poblaciones en Guatemala (Hernández García, 2014). Su madera posee alto valor económico y es considerada de importancia comercial internacional por su belleza, durabilidad y excelentes propiedades físicas, mecánicas y acústicas (Pittier, 1922) (Linares y Sousa, 2007). Actualmente se cataloga en peligro de extinción por NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010) y la Ley General de Vida Silvestre (LGVS, 2000), por ello se prohíbe la venta de su madera. Es utilizada para la elaboración de muebles, instrumentos musicales, artesanías y objetos diversos en México y Centroamérica (Díaz Gómez y Huerta-Crespo, 1986).

Esta especie es conocida comúnmente como campincerán, en la zona Tierra caliente del estado de Michoacán, México. En esta zona de Michoacán es muy requerida para la elaboración de artesanías (Gúridi, 1996).

Buscar y proponer alternativas de propagación de campincerán son necesarias por ser una madera muy utilizada y valorada económicamente. Estas alternativas ayudaran a mantener su hábitat natural y evitar la reducción de sus poblaciones.

Algunos sistemas de propagación vegetal han ayudado al incremento de especies leñosas, ya sea por reproducción sexual o asexual. Además, la multiplicación de especies forestales busca alternativas de que garanticen su crecimiento en su medio natural para que proporcionen suficientes plantas y de esta manera mantener las poblaciones explotadas.

Estudios de propagación por semilla se ha comenzado a realizar con la especie *Dalbergia congestiflora* (Casillas-Sánchez, 2014), por estaca y por cultivo *in vitro* (micropropagación) (Hernández-García, 2014) se han realizado en campincerán. Además, su cultivo en vivero se ha intentado, sin embargo, los requerimientos se desconocen para lograr un óptimo crecimiento y desarrollo de estas plantas cultivadas.

El objetivo de la presente investigación fue analizar el crecimiento de plantas micorrizadas y no micorrizadas de *Dalbergia congestiflora* Pittier obtenidas por semilla, micropropagadas e *in vitro* utilizando diferentes concentraciones de inóculo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en invernadero y utilizar un hongo como es *Rhizophagus intraradices* en plantas *in vitro*.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 *Dalbergia congestiflora* Pittier**

*Dalbergia congestiflora* Pittier es comúnmente conocida como campincerán. Estos árboles miden entre 5 y 7 (-10) m de altura. Sus hojas son de 9-20 cm, sus folíolos son oblongos, eventualmente obovados o suborbiculares, glabros en el haz, estrigulosos en el envés y sus inflorescencias son de 1-4 cm, paniculadas, muy congestas, de apariencia capitada o glomerosa, agrupándose hacia el final de ramas defoliadas, ocasionalmente producidas en ramas con hojas. El raquis es estriguloso, glabro con la edad, flores sésiles. Los frutos son oblongos, a veces pandurados, obtusos en el ápice y atenuados hacia la base, glabros. El estípite es de 10 mm de largo, una semilla se presenta por fruto, en ejemplares de herbario, muestran la cámara seminal conspicuamente reticulado nervada (Linares y Sousa, 2007).

### **2.2 Distribución de *Dalbergia congestiflora* Pittier**

Se distribuye en México, Guatemala y El Salvador. En México se encuentran poblaciones en los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla y Michoacán (es característico de la zona de tierra caliente) (Gúridi, 1996). Se localizan en el bosque tropical caducifolio, bosque tropical subcaducifolio (Cue-Bär *et al.*, 2006) y ocasionalmente se han observado en vegetación de transición con bosque de encinos.

### **2.3 Usos**

Las especies maderables del género *Dalbergia* se distingue por presentar un duramen considerado de alto valor económico. Por presentar, belleza, durabilidad y excelentes propiedades físicas, mecánicas y acústicas (Pittier, 1922). Es utilizada para la fabricación de finos instrumentos musicales como violines, muebles y mangos para herramientas rústicos.

## 2.4 Propagación de cultivos

Las plantas presentan dos formas de reproducción: sexual y la asexual. La primera es la más común y consiste en la unión de dos células sexuales o gametos (Vargas, 1982). Por el contrario, la reproducción asexual se define como la obtención de nuevos individuos a partir de órganos o porciones vegetativas, se cultivan asépticamente en un medio artificial y cada fragmento da origen a una planta idéntica de donde se obtuvo el tejido (Mroginsk, 2010). Este genera grandes beneficios para la producción de plántulas homogéneas genéticamente y con calidad sanitaria; sin embargo hay limitantes que perjudica su obtención, uno de ellos es la aclimatación, que resulta ser una etapa crucial para las plantas de *in vitro* a *ex vitro*, presentando una mortalidad de (50-90%), debido a que presenta una cutícula poco desarrollada, estomas no funcionales y un sistema radical débil. En *Dalbergia congestiflora* existen pocos reportes por cultivo *in vitro*.

Hernández-García (2014) reportó la obtención de brotes por cultivo *in vitro*. Obtuvo un 100% de brotación en los explantes cultivados después de 45 días. Los brotes regenerados en el tratamiento constituido con (0.05 mg/L de benciladenina (BA) y 0 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) fueron los de mayor longitud con un promedio de 2.15 cm, y con (1.0 mg/L de benciladenina y 0.1 mg/L ácido naftalenacético) fue de 0.7 y 1.63 cm, respectivamente.

En la aplicación de la técnica de cultivo *in vitro* para especies leñosas se ha tenido una respuesta lenta debido a que presentan un tejido lignificado que proporciona rigidez a la pared celular evitando una propagación rápida. Sin embargo, trabajos de micropropagación de maderables se han publicado en un número superior de 140 especies (Amaya y Eliécer, 2014).

Algunas especies leñosas micropropagadas como eucaliptos (*Eucaliptus dunni*), robles (*Quercus humboldtii*), *Dalbergia lanceolaria*, *Dalbergia sisso* y *Dalbergia retusa* (Dwari *et al.*, 1996) (Pradhan, 1998) (Valverde y Alvarado, 2004) (Billar *et al.*, 2005) (Millan y Ballester, 2007)

## 2.5 Propagación por semilla

Las semillas han tomado vital importancia en la obtención de plantas en la cual se define como el principal órgano reproductivo en su mayoría (Niembro, 1988). Principal resultado de la floración y por último cuando el fruto se encuentra maduro. Estas cumplen funciones muy importantes como la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones, la regeneración de los bosques y la sucesión ecológica. Además son fáciles de obtener y de bajo costo (Escobar *et al.*, 2002) y aunque no presentan las características de las plantas madres, poseen una gran ventaja como el mantener la diversidad genética en su ambiente natural.

Las semillas deben cumplir con ciertas características tales como originarse de plantas madres de buena calidad. Una adecuada selección de material biológico es necesario, la cual lleva a garantizar la producción sea de buena calidad y la mayoría germinen (Rodríguez, 2002). Sin embargo, algunas especies ha sido difícil su obtención ya que en ocasiones necesita ciertos tratamientos para poder realizar el proceso de germinación *Prosopis* sp es un caso especial, ya que germina con un método de escarificación mecánica. Presenta un porcentaje del 60% con dicho pre-tratamiento; *Tabebuia billbergii* un 86.8% dejando remojar por 48 horas (Minchala *et al.*, 2014).

## 2.6 Invernadero

Se define como una estructura, que puede estar construido de madera o metal, o cualquier otro material como cubiertas de plásticos, láminas, en la cual su principal función es permitir una mecánica de protección del frío o para limitar el exceso de calor. El invernadero presenta ciertas ventajas como, rendimiento, obtención de cosechas fuera de época, frutos y plantas de mejor calidad, ahorro de agua, menos exposición y obtención de productos contaminados por el aire.

## **2.7 Sustrato**

Se pueden encontrar medios como el sustrato para la producción de plantas, ya que resulta de vital importancia para la obtención de plantas y se define como cualquier medio que se utilice para cultivar plantas en contenedores, se utiliza para la producción de hortalizas, plántulas y flores. Una amplia variedad de materiales (polvo de coco, tezontle, perlita, pumacita, tepezil, compostas, turba, corteza de pino, cascarilla de arroz, entre otros) se utilizan como sustratos en México (Sáez y Narciso, 1999).

Los sustratos deben cumplir un papel fundamental a medida en que la planta se va desarrollando y la evapotranspiración aumenta. Es por ello, que el sustrato debe proporcionar un suministro continuo de agua y de elementos nutritivos y a la vez proporcionar la aireación necesaria. Estos suelen distinguirse en cuanto a propiedades físicas, químicas y biológicas. El conocer estas propiedades tiene gran importancia ya que el manejo adecuado de la fertilización, y el riego dependerá de ellos. La preparación de estos influye en sus propiedades. Consiste en mezclar los materiales constituyentes de los mismos de una manera uniforme y estar preparados correctamente y ser estables (Ansorena, 1994).

Según Pastor 1999 las características de los sustratos pueden ser físicas, químicas y biológicas:

### **2.7.1 Características físicas de los sustratos**

Las características físicas son determinadas por la estructura interna de las partículas, su granulometría y el tipo de empaquetamiento. Pero también otras son de vital importancia, como densidad real, densidad aparente, distribución granulométrica, porosidad, aireación-retención de agua, permeabilidad, distribución de tamaños de poros y estabilidad estructural.

### **2.7.2 Características químicas de los sustratos**

Las características químicas representan gran importancia para la composición de los materiales. A su vez se caracterizan por la transferencia de materia entre el sustrato y la solución del mismo. Entre estas características destacan, capacidad

de intercambio catiónico, pH, capacidad tampón, contenido de nutrientes y relación carbono-nitrógeno (C/N).

Agua fácilmente disponible (AFD). Se refiere a la cantidad de agua (% en vol.) que se libera al aplicar una tensión al sustrato de entre 10 y 50 cm de columna de agua. Su valor óptimo es de 20 a 30 %.

Agua de reserva (AR). El agua de reserva se refiere a la cantidad de agua (% en vol.) que se libera al aplicar una tensión al sustrato de entre 50 y 100 cm de columna de agua. Su valor óptimo es de 4 a 10 %.

Agua difícilmente disponible (ADD). Es el agua (% en vol.) que queda retenida en el sustrato después de aplicar una tensión de 100 cm de columna de agua.

Capacidad de aireación (CA). Se refiere a la proporción del volumen del sustrato que contiene aire después de que ha sido llevado a saturación y dejado de drenar (normalmente a 10 cm de columna de agua). Su valor óptimo está con valores entre 10 y 30 %.

Espacio poroso total (EPT). Es el volumen total del sustrato de cultivo que no está ocupado por partículas orgánicas o minerales. Este dato se determina a partir de las densidades real y aparente. Su valor óptimo está a niveles superiores de 85 %.

De las características físicas y químicas, las primeras son consideradas de mayor importancia, ya que si no son manejadas adecuadamente, difícil será que la planta se recupere de situaciones adversas (Ansorena, 1994).

### **2.7.3 Características biológicas de los sustratos**

Las características biológicas representan a la estabilidad que puede tener un sustrato orgánico frente a organismos que lo pueden degradar. Esta propiedad ayuda a determinar si este sufre algún cambio durante el cultivo. Entre las que destacan:

- Contenido de materia orgánica
- Estado y velocidad de descomposición

## 2.8 Micorrizas

Las micorrizas son asociaciones entre la mayoría de las plantas existentes y los hongos benéficos. Estos incrementan el volumen de la raíz y, por tanto, una mayor exploración de la rizósfera. Son considerados los componentes más activos de los órganos de absorción de los nutrientes de la planta. La planta provee al hongo simbionte de nutrientes orgánicos y de un nicho protector (Corredor, 2001).

Existen dos tipos de micorrizas, los más conocidos son las ectomicorrizas y las endomicorrizas también llamadas hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Cada tipo se caracteriza por la relación de las hifas del hongo con las células radicales del hospedero (Smith y Read, 2010).

La asociación entre hongo y planta se encuentra muy extendida en los ecosistemas terrestres, los fenómenos de degradación y el uso indiscriminado de sustancias químicas, planteando la necesidad de aplicar técnicas como la micorrización inducida, mediante el uso de inoculantes micorrízicos, en las plantas desde la etapa de vivero o invernadero.

Estas se caracterizan por presentar un sistema de absorción que se extiende por el suelo, proporcionando a las plantas agua y nutrientes, como el nitrógeno y fósforo. A cambio, el hongo recibe azúcares y carbohidratos que provienen de la fotosíntesis. La simbiosis proporciona otros beneficios tales como el aumento de la resistencia de las plántulas a la sequía, a temperaturas del suelo y valores de pH extremos y ataques de hongos patógenos, la estimulación del enraizamiento, el aumento de la supervivencia durante la aclimatación de plantas micropropagadas. (González-Chávez *et al.*, 1998). Además proporciona hormonas estimulantes del crecimiento, como auxinas, citoquininas, giberelinas y vitamina B. Estas últimas se traducen en un aporte adicional, ya que son producidas simultáneamente por la planta. Esto, contribuye a favorecer el aumento y longevidad mayores de las raíces.

Las endomicorrizas se caracterizan por tener estructuras especializadas denominadas arbusculos, estos se forman en las células corticales de la raíz como resultado de la interacción planta-hongo. Constituyen el punto de intercambio de metabolitos entre los dos participantes de la simbiosis (Ayling *et al.*, 1997).

Sylvia y Williams, (1992) señalaron que las endomicorrizas son organismos que predominan en las asociaciones de las raíces y se encuentran en diferentes ambientes, aun cuando las condiciones ambientales sean desfavorables para las plantas. Los hongos micorrízicos arbusculares son altamente adaptables a diferentes ambientes y son intermediarios cruciales entre el suelo y la planta.

La mayoría de las plantas arbóreas y herbáceas poseen este tipo de asociación, al igual que la mayoría que son cultivadas (aproximadamente el 80%). Las endomicorrizas son particularmente importantes en los trópicos, donde los suelos tienden a retener los fosfatos.

Es importante mencionar que en la nutrición de las plantas, uno de los principales beneficios que obtiene, es la absorción de P para su crecimiento por encontrarse en baja disponibilidad en los suelos tropicales, sin embargo si el P no se encuentra disponible en cantidades bajas, la simbiosis puede llegar a reducirse o hasta inhibirse (Blanco *et al.*, 1997). Para que la asociación pueda llevarse a cabo, la planta debe suministrar carbohidratos para su metabolismo y viceversa, el hongo debe facilitar los nutrientes que la planta requiere (Genre *et al.*, 2005) es por ello que son considerados simbiosiontes obligados debido que desarrollan en las células de la corteza de la raíz el arbúsculo y de esta manera forman una interfase entre la planta-hongo para el intercambio de nutrientes (Gadkar *et al.*, 2001).

Se han realizado estudios de inoculación en las raíces de plantas en invernadero, en la cual ha demostrado que estas presentan cambios y /o modificaciones en su estructura fisiológica, por lo cual ha llevado un incremento en la biomasa de plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas (Alarcón y Ferrera- Cerrato, 1999). Estas ventajas se han reportado en algunas leguminosas arbóreas, como *Prosopis* spp. (Cardona y Ocampo, 1985) y *Acacia* spp. (Plazola *et al.*, 1990).

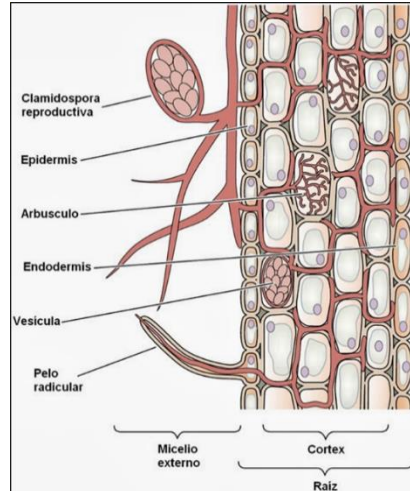
Las micorrizas arbusculares, se caracterizan por presentar una asociación benéfica en la mayoría de las plantas superiores descritas (>85%) con hongos del orden Glomales (Smith y Read, 2010). La más utilizadas, pertenece a las especies de *Glomus* que se caracterizan por adaptarse a casi cualquier tipo de suelo y condiciones edafoclimáticas.

La colonización entre un hongo y la raíz de la planta comienza cuando la hifa fungal emerge de la espora, debe existir la presencia de una raíz para iniciar el reconocimiento, una vez que se da este proceso, llega a la raíz para colonizarla, poniéndose en contacto con la superficie del pelo radical. La hifa comienza a diferenciarse y formar un apresorio, que ayuda a penetrar la pared de las células. Una vez que la hifa penetra a la raíz, este comienza a crecer inter e intracelularmente a lo largo de la corteza y da origen a la colonización en el tejido parenquimático de la raíz, en la capa interna de este tejido se forman los arbusculo (es donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes hongo-planta), que se produce por una ramificación masiva de la hifa después de penetrar la pared celular (Friberg, 2004) (Figura 1).

A nivel mundial existen diversos reportes de los grandes beneficios que aportan los hongos micorrízicos arbusculares tales como plantas hortícolas, frutícolas, forestales en donde comparan el crecimiento con plantas inoculadas y no inoculadas (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Especies frutícolas, forestales evaluadas con HMA**

| ESPECIE                                                            | HMA                                        | SISTEMA                               | VARIABLES EVALUADAS                         | CITA                              |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Prosopis glandulosa</i> Torr.<br>(Mezquite)                     | <i>Glomus</i> spp. Zac-19                  | Por semilla                           | Altura<br>Diámetro                          | Hernández<br><i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.<br>(Acacia)                   | <i>Glomus</i> spp. Zac-19                  | Por semilla                           | Altura<br>diámetro                          | Hernández<br><i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Hevea brasiliensis</i> Willd.<br>(Caucho)                       | Endomicorriza<br>comercial<br>MICORRIZAFER | Semilla<br>Cultivo<br><i>in vitro</i> | Área foliar<br>Diámetro del tallo           | Rodríguez<br><i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Tectona grandis</i><br>(Teca)                                   | <i>Glomus fasciculatum</i>                 | Semilla                               | % de mortalidad<br>Altura<br>Diámetro basal | Hernández<br><i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Gmelina arborea</i><br>(Melina)                                 | <i>Glomus fasciculatum</i>                 | Semilla                               | % de mortalidad<br>Altura<br>Diámetro basal | Hernández<br><i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Astronium graveolens</i>                                        | <i>Glomus fasciculatum</i>                 | Semilla                               | % de mortalidad<br>Altura<br>Diámetro basal | Hernández<br><i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Juglans regia</i> Serr.<br>(Nogal)                              | <i>Glomus mosseae</i>                      | <i>In vitro</i>                       | % de sobrevivencia                          | Dolcet<br><i>et al.</i> , 1996    |
| <i>Poncirus trifoliata</i><br><i>Citrus sinensis</i><br>(Citricos) | <i>Glomus</i> sp. Zac-19.                  | <i>In vitro</i>                       | Altura<br>Diámetro del tallo<br>Área foliar | González<br><i>et al.</i> , 1991  |



**Figura 1. Proceso de infección de hongos micorrízicos arbusculares**

### **Micorrización en plantas *in vitro***

El uso de hongos micorrízicos durante la propagación *in vitro* otorga grandes beneficios como presentar mayor crecimiento de tallo y raíces, además de incrementar el número de hojas y área foliar, a su vez presenta ciertas desventajas como la producción de un bajo intercambio de gases, lo que conlleva a provocar alteraciones en el desarrollo de los explantes, además de contaminación con otros organismos al tener contacto con el medio (Hooker *et al.*, 1994) (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Efecto de las micorrizas en cultivo *in vitro***

| <b>Especies</b>                                | <b>HMA</b>           | <b>Resultados obtenidos</b>                     | <b>Citas</b>       |
|------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------|--------------------|
| <i>Rubus glaucus</i>                           | <i>Glomus</i> sp     | Óptimo crecimiento<br>Sobrevivencia 80%         | Pérez M., 2012     |
| <i>Solanum tuberosum</i>                       | <i>Glomus clarum</i> | Incremento en altura entre<br>un 47 y 54%       | Fernández K., 2010 |
| <i>Coffea canephora</i><br><i>var. Robusta</i> | <i>Glomus clarum</i> | Óptimo crecimiento y<br>desarrollo en plántulas | Fernández K., 2002 |

## 2.9 Biomasa

La biomasa es un indicador de la eficiencia fisiológica durante el desarrollo de las plantas, está compuesta por el peso de materia orgánica aérea y subterránea (Eamus *et al.*, 2000). Este parámetro se emplea para analizar la calidad de la planta, y se determina basándose en variables morfológicas como la altura de la planta, el diámetro del tallo, tamaño, forma y volumen del sistema radical, la relación altura/diámetro, la relación tallo/raíz (Prieto, *et al.*, 2003). Es de suma importancia ya que cuantifica indirectamente la cantidad de nutrientes en diferentes partes de las plantas y estratos de la vegetación, permitiendo comparar distintos tipos de especies o vegetación y tipo de vegetación similares en diferentes sitios.

Este se puede determinar mediante métodos destructivos y métodos no destructivos (Ruehle *et al.*, 1984). Para ello, las plantas deben cumplir con requerimientos nutricionales, tipo de sustrato, contenedor, para evaluar las condiciones en que se encuentran (Leyva *et al.*, 2008).

Estudios en *Pinus pseudostrobus* Lindl se estimó mediante variables morfológicas, considerando el efecto del sistema de producción en la relación alométrica (Sigala, 2013).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los problemas más importantes de *Dalbergia congestiflora* Pittier son la tala excesiva y la extracción ilegal. Estos propician la desaparición de poblaciones de esta especie. Producir plantas de buena calidad en invernadero es una alternativa para evitar la disminución de su población. Para ello, la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se requiere para favorecer un mayor crecimiento, pero la simbiosis de HMA y *Dalbergia congestiflora* Pittier no ha sido estudiada ni evaluada. Esto genera la necesidad de estudiar y evaluar la asociación para determinar el incremento en un tiempo determinado, realizando evaluaciones en dos sistemas de propagación por semilla y micropropagación, y así determinar el sistema adecuado para mantener y establecer plantaciones futuras de esta especie.

## 4. HIPÓTESIS

1.- La biomasa aérea y supervivencia en plantas de *Dalbergia congestiflora* aumentará con la aplicación de endomicorrizas comerciales en invernadero.

2.- La supervivencia y crecimiento de plantas *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* aumentará con la aplicación de un hongo micorrízico arbuscular (*Rhizophagus intraradices*).

## 5. OBJETIVO GENERAL

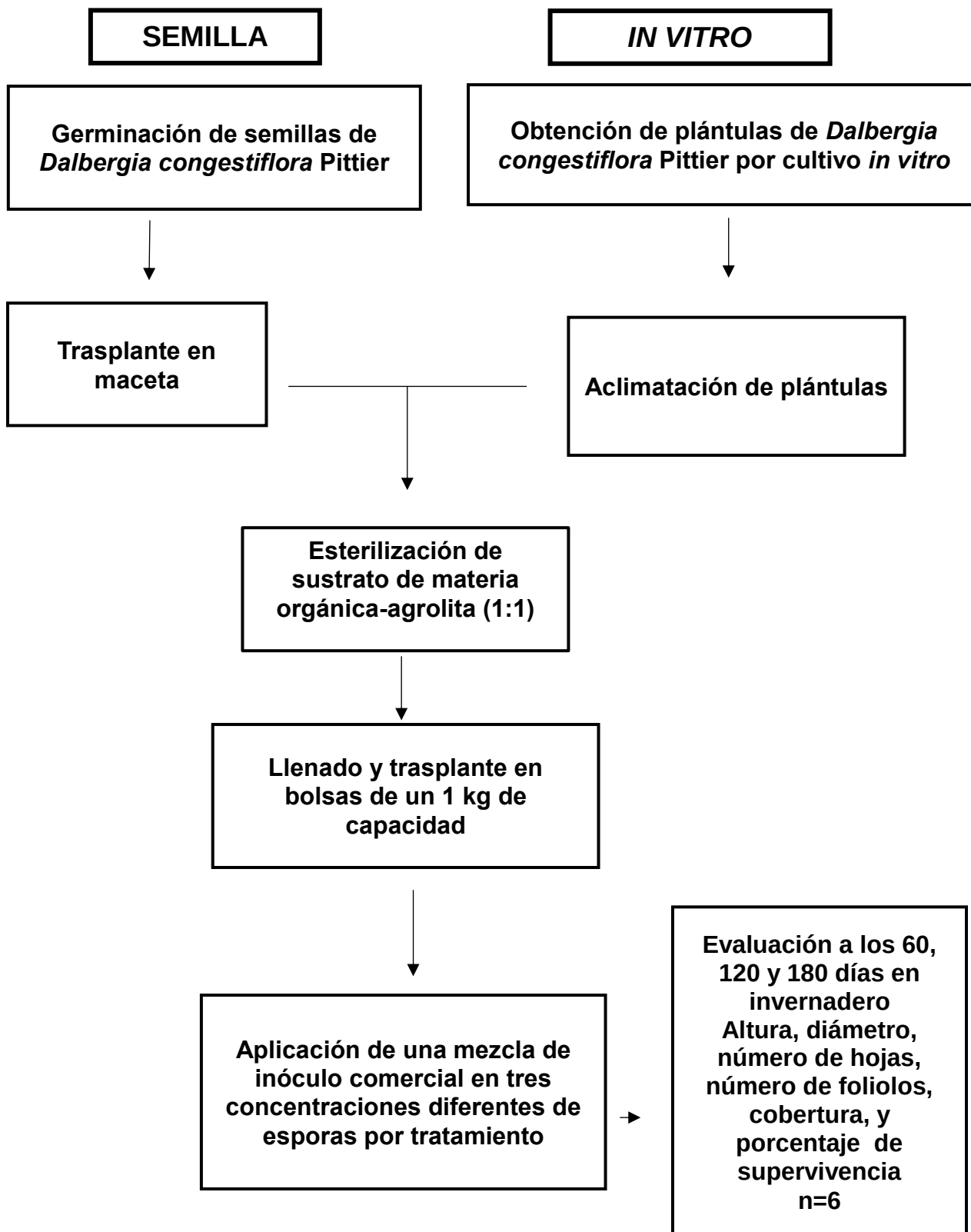
Analizar el crecimiento de plantas micorrizadas y no micorrizadas de *Dalbergia congestiflora* Pittier obtenidas en invernadero e *in vitro*.

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

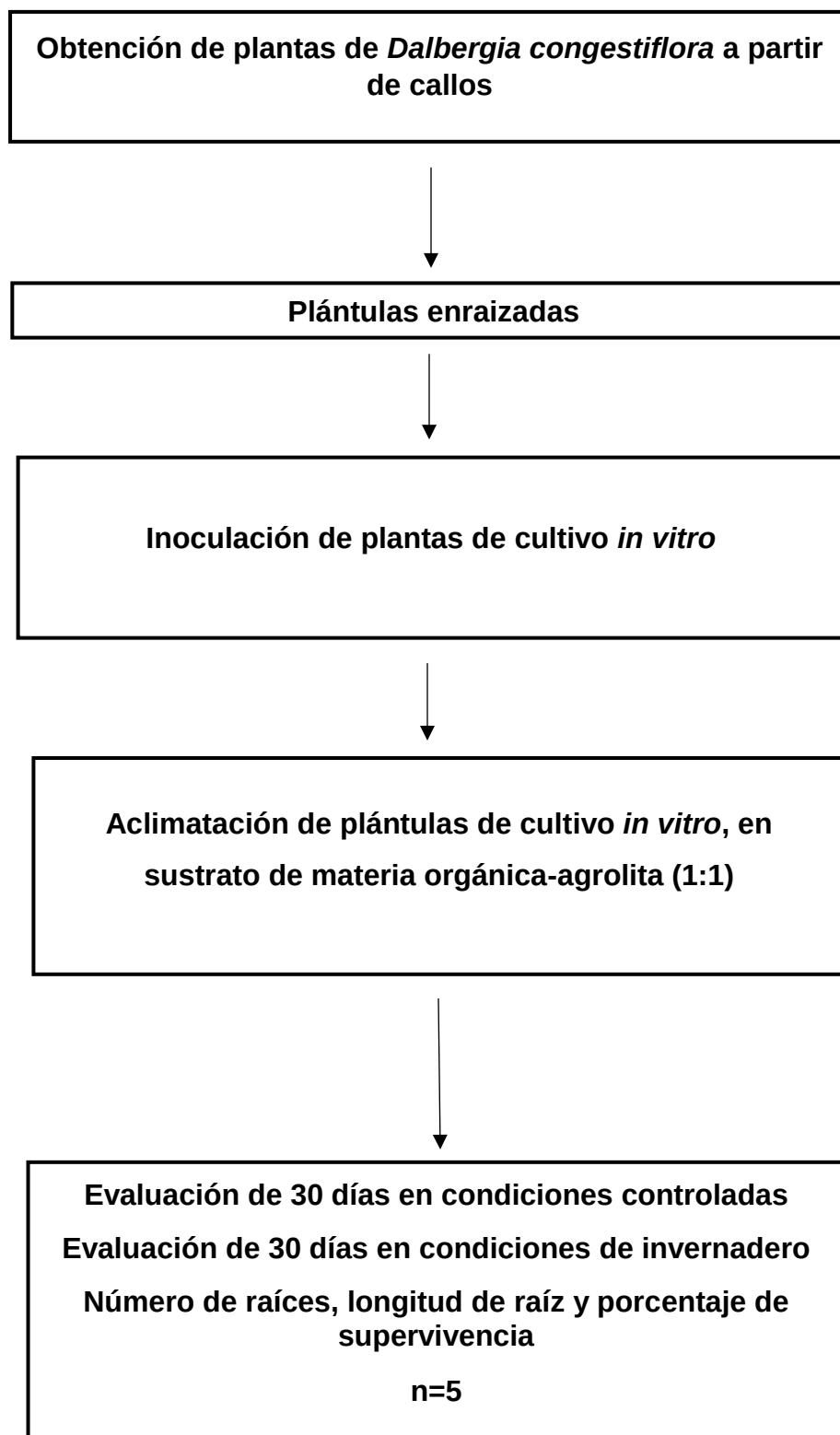
- 1.-Evaluar el crecimiento y supervivencia de plantas a partir de semillas de *D. congestiflora* después de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares comerciales en invernadero.
- 2.-Evaluar el crecimiento y supervivencia de plantas micropropagadas de *D.congestiflora* después de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares comerciales en invernadero.
- 3.- Determinar el número de esporas adecuado para la asociación entre hongos micorrízicos y *D. congestiflora*.
- 4.- Evaluar la supervivencia de plantas micorrizadas *in vitro* después de la inoculación con un hongo micorrízico arbuscular (*Rhizophagus intraradices*).
- 5.- Evaluar la presencia de hongos micorrízicos arbusculares.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Experimento de invernadero



## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA PLÁNTULAS *IN VITRO*



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 7.1.1 Plantas de *Dalbergia congestiflora* micropropagadas

Las plantas micropropagadas de *Dalbergia congestiflora* se obtuvieron a partir de callos que han sido cultivados y mantenidos en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Los callos se colocaron en un medio para inducción de brotes reportado por Hernández-García (2014), el cual contiene como base MS (Murashige y Skoog, 1962) y adicionado con 1.0 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA, con 8 g/L de agar y 30 g/L de sacarosa con un pH 5.7. Posteriormente se almacenaron en un cuarto de cultivo con 25° C de temperatura y un fotoperiodo de 16 horas/Luz con una intensidad de 2000 luxes.

Los brotes obtenidos se colocaron en otro medio para enraizado también reportado por Hernández-García (2014) y que contiene MS ½ con 2.5 mg/L de AIB y 20 g/L de sacarosa y mantenidos en las condiciones antes mencionadas. Para ambos medios los reactivos utilizados fueron de marca Bioxon®. Los brotes se mantuvieron en estas condiciones hasta la aparición de sus raíces y esto se consideró como indicador de la formación de plántulas completas (Figura 2).

Estas plántulas se pusieron 22 días en condiciones de aclimatación que consistió en eliminar el agar de las raíces con agua corriente y trasplantar en macetas con sustrato orgánico estéril húmedo en porciones de 1:1 con agrolita. Posteriormente se mantuvieron por 8 días en cámara húmeda a un porcentaje de un 80% de humedad (Figura 2).



Figura 2. Propagación de plantas de *Dalbergia congestiflora* Pittier en un sistema *in vitro*.  
A) Formación de callos; B) Brotes; C) Formación de raíces; D) Aclimatación

### 7.1.2 Plantas de *Dalbergia congestiflora* propagadas por semilla

Las semillas de *D. congestiflora* fueron donadas por la Ing. Teresa García Moreno del Laboratorio de Anatomía de la Madera UMSNH y fueron colectadas en la localidad de Carácuaro Michoacán México.

La germinación de las semillas se realizó en cajas Petri con papel filtro húmedo y se mantuvieron en oscuridad a 25 °C, hasta la aparición de la radícula (Figura 3). Posteriormente las plantas con 4 cm de altura se colocaron bolsas con sustrato esterilizado.



Figura 3. Germinación de semillas de *Dalbergia congestiflora* Pittier. A) Semillas; B) Semillas en caja Petri.

## 7.2. Inoculación en invernadero de plantas obtenidas por semilla y micropropagadas de *Dalbergia congestiflora* Pittier

### 7.2.1. Sustrato

El sustrato utilizado fue la mezcla de materia orgánica marca (Vigoro®) con agrolita en porciones de 1:1 y fue esterilizado doblemente en condiciones de presión a 14 lb/pulg<sup>2</sup> durante 30 minutos por dos ocasiones. El pH de la mezcla después de la esterilización fue de 5.3. La mezcla fue colocada en bolsas de 1 kg de capacidad (Figura 4) que fueron almacenadas en invernadero. El riego del sustrato fue con agua corriente hasta quedar completamente húmedo durante todo el experimento.



Figura 4. Sustrato utilizado para el crecimiento de plantas de *Dalbergia congestiflora* Pittier. A) Mezcla de agrolita-materia orgánica (Vigoro®); B) Bolsas con sustrato estéril.

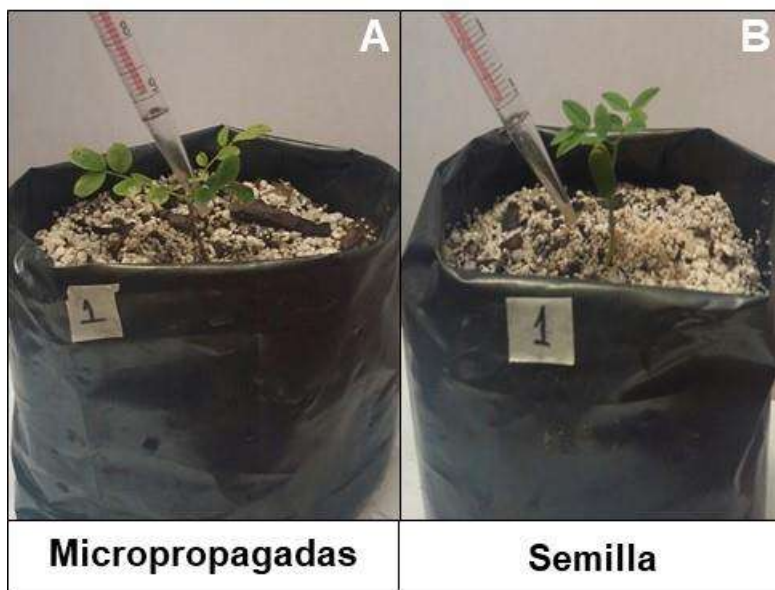
### 7.2.2 Inoculación de las plantas de *Dalbergia congestiflora* Pittier con micorrizas en invernadero

Las plantas provenientes de semilla y micropropagadas se micorrizaron con endomicorrizas comerciales (conteniendo esporas de *Glomus clarum*, *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum* y *Entrophospora columbiana*) (Mycor Tree ® Plant Healt Care, Canadá) a tres concentraciones diferentes de esporas y un control (Cuadro 3). El inóculo (endomicorrizas) se pesó y se disolvió con agua estéril y se agregó 1 mL de la solución cada planta. El número de repeticiones fue de 6 plantas

por tratamiento en las diferentes concentraciones (n=6). Las condiciones en el invernadero se mantuvieron con una temperatura promedio de 24.5°C y una humedad relativa de 80%. Los riegos se realizaron cada tercer día con agua corriente (Figura 5).

**Cuadro 3. Concentraciones de inóculo comercial aplicadas a las plantas de *Dalbergia congestiflora* Pittier.**

| Tratamientos | Número de esporas |
|--------------|-------------------|
| T0           | 0                 |
| T1           | 80                |
| T2           | 128               |
| T3           | 176               |



**Figura 5. Inoculación de plantas de *Dalbergia congestiflora* Pittier con micorrizas. A) Plantas por semilla; B) Plantas micropropagadas.**

### **7.2.3 Parámetros evaluados en plantas micorrizadas en invernadero: semilla y micropropagadas**

Los parámetros de crecimiento fueron altura de la planta, el diámetro de tallo, número de folíolos y horas y cobertura y medidos en las plantas obtenidas tanto de semilla como micropropagadas.

**La altura** se midió desde la base de la planta hacia el ápice, la medición se realizó con una regla.

**El diámetro** de tallo se tomó después de 2 cm. de altura de cada planta, la medición se realizó con un vernier (Ultra tech®, México), para las plantas micorrizadas en invernadero.

**El número de folíolos y hojas** se realizó un conteo de cada estructura en cada planta.

**La cobertura** se determinó midiendo largo y ancho de los folíolos por planta para ambos sistemas.

Estos parámetros se evaluaron a los 60,120 y 180 días después de la inoculación, en ambos sistemas de propagación por semilla y por micropropagación y la cobertura se determinó a los 180 días.

### 7.3 Inoculación de plantas *in vitro* de *Dalbergia congestiflora*

La inoculación de las plantas *in vitro* se realizó con un inóculo de *Rhizophagus intraradices* (*Glomus intraradices*) proveniente de la empresa llamada ECOSUSTENTA S.A. de C.V. Este inóculo se preparó en 4 diferentes números de esporas más un control (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Concentraciones de HMA aplicadas en plantas *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* Pittier.**

| Tratamiento | Número de esporas |
|-------------|-------------------|
| T0          | 0                 |
| T1          | 4                 |
| T2          | 8                 |
| T3          | 10                |
| T4          | 12                |

El inóculo en las diferentes concentraciones se agregó a las plantas en campana de flujo laminar bajo condiciones estériles (Figura 6). Las plantas presentaban una raíz de 1 cm y fueron sacadas del medio, colocándolas en la caja Petri para agregar el inóculo en la base (Figura 6C). Posteriormente la siembra se hizo en otro medio con MS  $\frac{1}{4}$ , 20 gr/L de sacarosa, 4 gr/L de agar, a un pH de 5.7 y las plantas se mantuvieron por 30 días en condiciones controladas de temperatura a 25 °C y fotoperiodo de 16 h/Luz (Figura 6 D). Por cada tratamiento se realizó una réplica de 5.



**Figura 6. Plantas de *Dalbergia congestiflora* Pittier.**  
A) Formación de callos; B) Brotes; C) Inoculación de raíces D) Formación de raíces.

### 7.3.1 Parámetros evaluados en plantas micorrizadas *in vitro*

**El número de raíces** se determinó contabilizando a través de observación.

**Longitud de raíces** se determinó midiendo a partir del nacimiento de la raíz hasta finalizar la raíz con una regla.

**La supervivencia** se determinó después de los 30 días de inoculación en un sustrato descrito previamente. Posteriormente las plantas se sometieron a un periodo de aclimatación en una cámara húmeda, con una humedad del 80% durante 15 días y transcurrido este tiempo la supervivencia se determinó.

### 7.4 Tinción de raíces de las plantas micorrizadas provenientes de invernadero e *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* Pittier

La tinción de raíces de las plantas de campincerán (Figura 7) se realizó con dos técnicas: tinción con tinta china propuesta por Vierheiling (1998), y la técnica de azul de tripano propuesta por Phillips y Hayman (1970).

La tinción de tinta china consiste en poner en ebullición las raíces en una solución de KOH al 10% por 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, las raíces se lavaron con agua corriente por 10 minutos. Las raíces lavadas se colocan en tinta china negra (marca Sheaffer ®) al 5%. Esta mezcla se lleva a ebullición durante 3 minutos y las raíces teñidas se lavan con agua corriente hasta que el agua de los enjuagues se observe clara.

La técnica de azul de tripano consiste en colocar raíces libres de suelo, colocarlos en un vaso de precipitado, agregar suficiente KOH al 10% para cubrirlas, calentar por 10 minutos bajo 10 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Retirar el KOH y enjuagar con agua destilada. Posteriormente agregar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% (alcalinizada), suficiente cantidad para cubrir las raíces durante 3 minutos, enjuagar con agua destilada, cubrir las raíces con HCL al 10% por 3 minutos, se elimina el ácido y sin enjuagar se procede a la tinción. Las cápsulas que contienen las raíces se cubren con la solución colorante (azul tripano 0.05 %) en lactoglicerol y se calienta por 10 minutos a 10

kg/cm<sup>2</sup> libras de presión. Las observaciones de las raíces se hicieron en un microscopio (marca ZEISS modelo 37081) con los objetivos de 10x y 40x.



**Figura 7. Raíces de *Dalbergia congestiflora* Pittier mantenidas en invernadero.**  
A) Control; B) Micropropagadas; C) Semilla

### 7.5. Evaluación estadística

Los datos de plantas de invernadero e *in vitro* fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) en una vía, utilizando la prueba de diferenciación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) evaluando las variables de altura, diámetro, número de hojas, número de folíolos y cobertura con una  $n=6$  (programa estadístico JP8).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Plantas de *Dalbergia congestiflora* micropropagadas

Los brotes obtenidos de los callos se produjeron a los 30 días y el desarrollo de la raíz a los 15 días, con una longitud 1 a 2 cm. En total 50 plántulas fueron utilizadas para el experimento del invernadero (Figura 8).

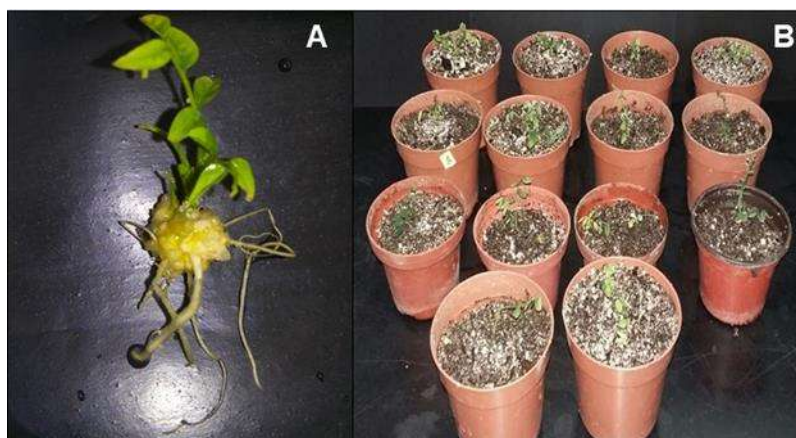


Figura 8. Plantas micropropagadas de *Dalbergia congestiflora* Pittier.  
A) Plantas extraídas del medio MS; B) Plantas aclimatadas

#### 8.1.1 Supervivencia en plantas micropropagadas

El porcentaje de supervivencia fue del 40% al final del experimento. A los 60 días presentó un 40 %, en los tratamientos con 128,176 esporas y el control, el tratamiento con 80 esporas una disminución presentó de un 20 %. A los 120 días los tratamientos con 128 y 176 esporas presentó un 40 % de supervivencia, una disminución presentó en el tratamiento con 80 esporas y el control. A los 180 días, se mantuvo en un 40% con respecto al control y el tratamiento con 80 esporas, mostró una disminución de supervivencia del 20%, no mostrando diferencia significativa entre los tratamientos (Figura 9).

Se ha reportado el porcentaje de supervivencia en plantas de *Dalbergia congestiflora* por Hernández García (2014), obteniendo un 90 % de supervivencia a los 30 días sin la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares, esto difiere de lo obtenido en este trabajo ya que el porcentaje de supervivencia corresponde en un

40 % a los 180 días, que es considerado como bajo, esto podría deberse, que la aplicación de los HMA no manifestó ningún efecto sobre las plantas y debido a que las plantas presentaban una buen sistema radical, lo que propicio una adaptación y supervivencia.

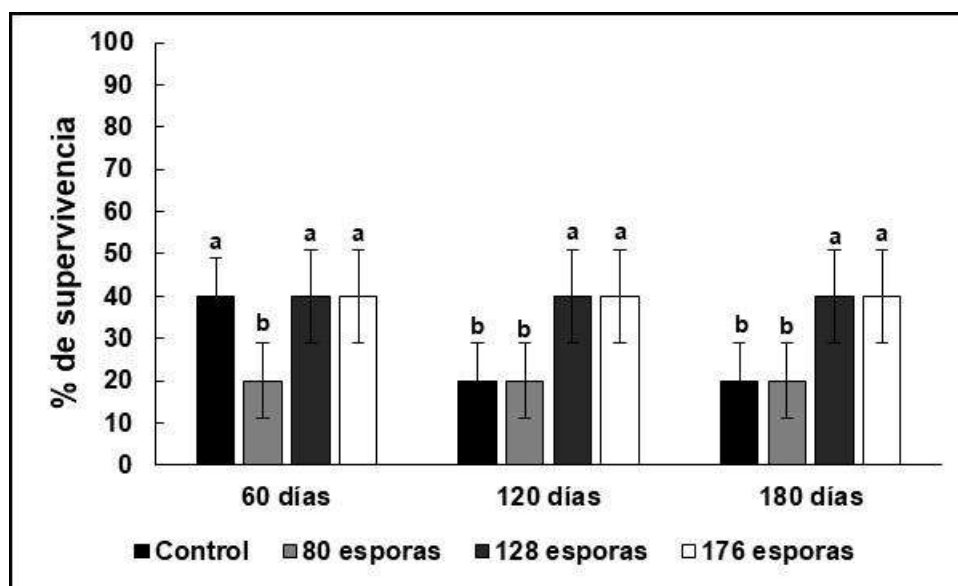


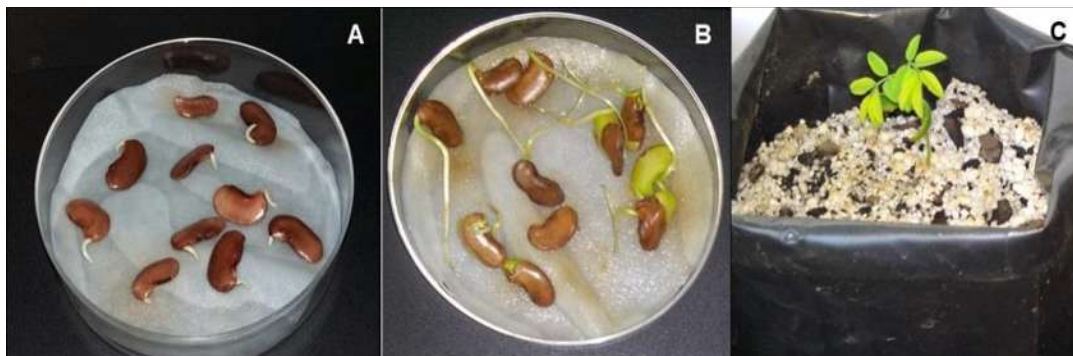
Figura 9. Porcentaje de supervivencia de plantas micropropagadas de *Dalbergia congestiflora* Pittier. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

## 8.2 Plantas de *Dalbergia congestiflora* propagadas por semilla

El porcentaje de germinación en caja Petri de semillas de *Dalbergia congestiflora* fue del 90%. El indicio de formación de radícula se presentó a los dos días. La longitud promedio de radícula fue de 0.45 mm a los dos días, y de 3.2 cm a los 8 días. La altura promedio fue de 4 cm después de 8 días del inicio de la germinación (Figura 10). Las primeras hojas se presentaron a los 3 días después del trasplante.

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con lo reportado en diversas investigaciones, las semillas de *Dalbergia congestiflora* tenían 6 meses de haber sido colectadas al momento del ensayo y su porcentaje de germinación y la supervivencia fueron del 80 %. Este porcentaje es igual al reportado por (Casillas-Sánchez, 2014) para *Dalbergia congestiflora* y similar a los reportados en otros trabajos con un 80 % en semillas de *Dalbergia retusa* (cocobolo) recién colectadas (García y Di Stefano, 2000) y un 92 % en *Dalbergia tucurensis* bajo condiciones de

sol y sombra sin tratamiento pregerminativo (Knoblauch, 2001). En el caso de *Dalbergia congestiflora* es necesario mantener condiciones de alta humedad para poder tener resultados del 90% de germinación.



**Figura 10. Semillas y plántulas de *Dalbergia congestiflora* Pittier.**  
A) Formación de radícula; B) Radícula desarrollada; C) Formación de primeras hojas

### 8.2.1 Supervivencia en plantas por semilla

El porcentaje de supervivencia fue de 100% al inicio del experimento, a los 60 días del trasplante tuvieron un 100% de supervivencia en todos los tratamientos. A los 120 días, una disminución mostró en todos los tratamientos, el tratamiento con 176 esporas presentó una supervivencia del 80 %, el tratamiento con 128 esporas presentó un 75 % de supervivencia, mostrando la supervivencia menor en el tratamiento con 80 esporas y el control (60 y 40%). El porcentaje de supervivencia a los 180 días se mantuvo en un 80 %, en el tratamiento con 176 esporas, mostrando diferencia significativa con respecto al tratamiento control (Figura 11).

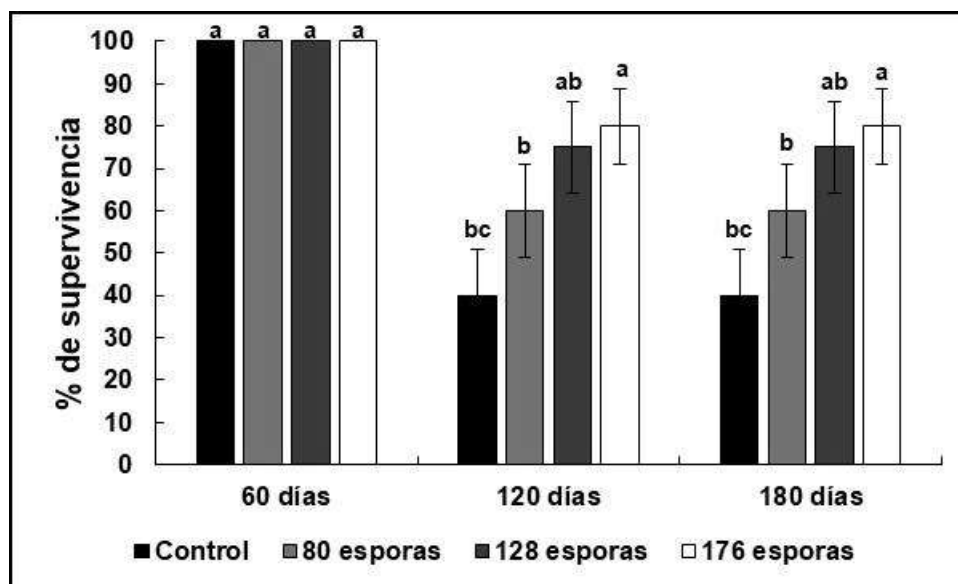


Figura 11. Porcentaje de supervivencia de *Dalbergia congestiflora* Pittier. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Casillas Sánchez reportó el porcentaje de supervivencia en *Dalbergia congestiflora* del 47 % a los 15 días en una mezcla de vermiculita + turba (3:1 v/v), esto difiere con lo obtenido en este trabajo ya que se presentó un porcentaje de supervivencia más alta con la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares.

### 8.3 Plantas obtenidas por semilla y micropropagadas de *Dalbergia congestiflora*

#### 8.3.1 Plantas obtenidas por semilla crecidas en invernadero

##### Altura

A los 60 días, un incremento se observó en altura en algunos tratamientos como el de 80 y 176 esporas con respecto al control (Figura 12). El tratamiento con 176 esporas presentó la mayor altura. A 120 días, una altura similar se observó entre los tratamientos 80, 128 y el control y el tratamiento de 176 esporas permaneció con la altura mayor (10.1 cm).

A los 180 días, la altura mayor fue de 10.6 cm del tratamiento de 176 esporas con respecto al control que presentó una altura de 8.5 cm. Este tratamiento de 176

esporas fue el que obtuvo una diferencia significativa respecto a los otros tratamientos (Figura 12).

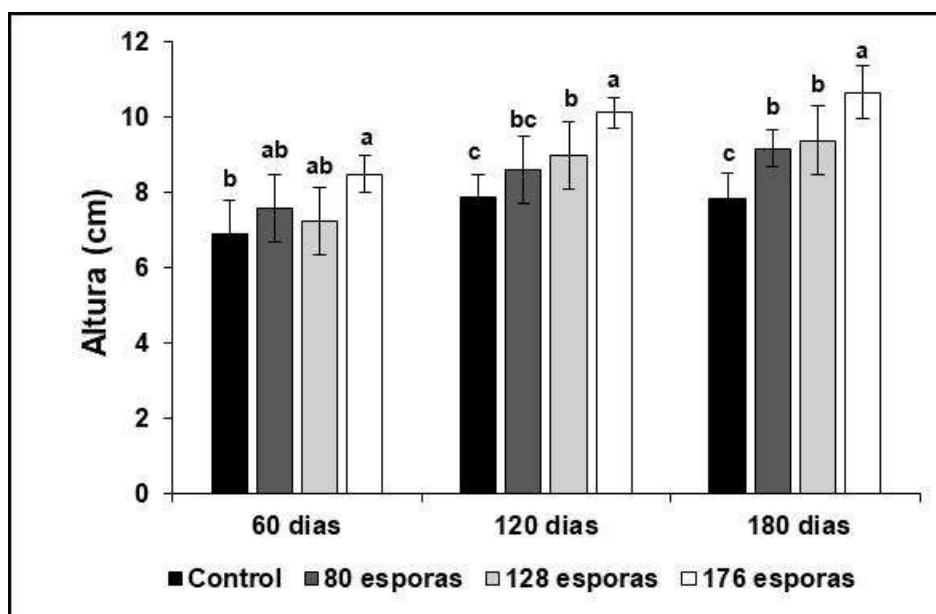


Figura 12. Altura de plantas obtenidas a partir de semillas de *Dalbergia congestiflora* Pittier a los 60, 120 y 180 días. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en las plantas de *Dalbergia congestiflora*, provenientes de semilla e inoculadas con 176 esporas de HMA (*Glomus intraradices*, *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* y *Entrophospora columbiana*), tuvieron una altura mayor a los 60, 120 y 180 días de cultivo en relación a los demás tratamientos. Esta diferencia en altura fue significativa para los tres periodos de evaluación. En la misma especie una altura de 10.1 cm se reportó a los 120 días sin ningún hongo micorrízico (Casillas, 2014), lo cual es similar a los resultados aquí reportados e indica que esta especie no responde a la presencia de hongos micorrízicos. En *Dalbergia sisso* mostró un incremento en altura se reportó a los 90 días de la inoculación con *Glomus intraradices*, *Gigaspora albida* y *Acaulospora scrobiculata* (Bisht *et al.*, 2009). Estos resultados indican que las especies de *Dalbergia* tienen alguna estrategia particular de absorción de nutrientes y agua ante la presencia de microorganismos (HMA).

### Diámetro del tallo

A los 60 días, las plantas de *D. congestiflora* presentaron un tallo similar entre los tratamientos con 80 y 128 esporas (Figura 13). El control y el tratamiento con 176 esporas, presentaron promedios mayores (1.52 y 1.85 mm). A los 120 días, las plantas presentaron un tallo de color café que fue mayor en el tratamiento con 80 esporas. Un diámetro similar se presentó en los tratamientos con 128 y 176 esporas y fue similar al observado en el control. A los 180 días no hay diferencia significativa entre los tratamientos de 80, 128 y 176 esporas. El diámetro de tallo a los 180 días fue similar entre los tratamientos inoculados con el hongo y fue mayor significativamente al diámetro del tratamiento control (Figura 13).

Hernández *et al.*, (2006) reportó este parámetro evaluando diferentes especies de plantas como en *Acacia farnesiana* inoculada con hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus intraradices*, *Glomus* spp. Zac-19 y *Gigaspora rosea*) y es similar al obtenido para *Dalbergia congestiflora* a los 180 días.

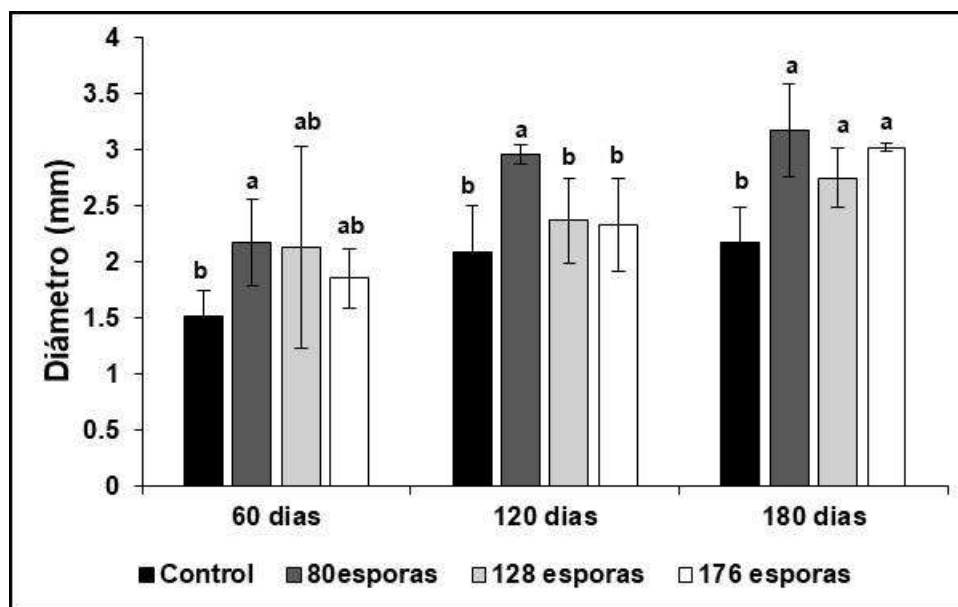


Figura 13. Diámetro de plantas obtenidas a partir de semillas de *Dalbergia congestiflora* Pittier a los 60, 120 y 180 días. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

## Número de foliolos

A los 60 días, el número de foliolos en promedio fue de entre 31.5 y 38.5 en los 4 tratamientos. A los 120 días, el número de foliolos fue mayor en los tratamientos con 176 esporas y 80 esporas con respecto a los tratamientos con 128 esporas y el control que estos mostraron una disminución de foliolos.

A los 180 días, se observa una disminución de foliolos en todos los tratamientos, observando un número mayor de foliolos en el tratamiento con 176 esporas y el número menor se observó en el control (17.5) (Figura 14).

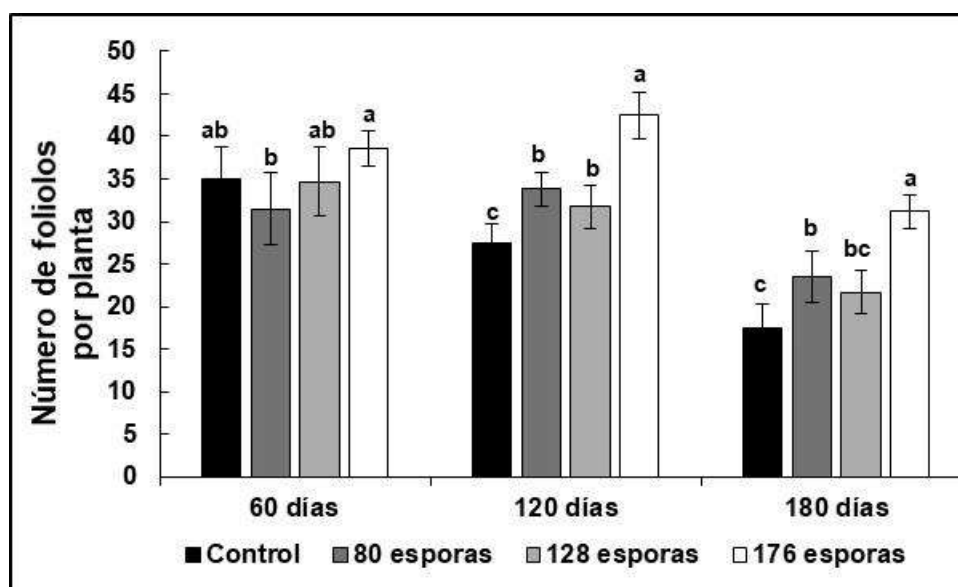


Figura 14. Número de foliolos obtenidas a partir de semillas de *Dalbergia congestiflora* Pittier a los 60, 120 y 180 días. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

## Número de hojas

A los 60 días, el tratamiento con 176 esporas presentó un mayor número de hojas, con 5 hojas en promedio y fue similar al promedio de los tratamientos con 80 y 128 esporas, mientras que el control presentó un promedio de 4.5 hojas.

A los 120 días el tratamiento con 176 esporas presentó un incremento y los tratamientos con 80 esporas y 128 esporas presentaron un promedio similar al anterior tratamiento. El control presentó una disminución de hojas y su promedio fue

de 3.8 hojas. A los 180 días el número de hojas presentó una disminución en todos los tratamientos, aunque un número mayor de hojas se presentó en el tratamiento con 176 esporas (Figura 15).

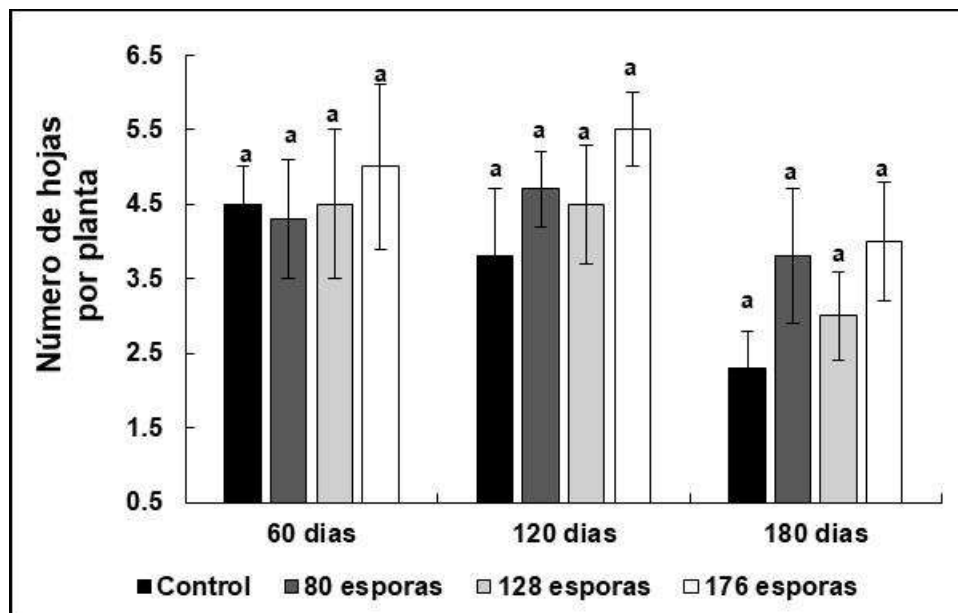


Figura 15. Número de hojas obtenidas a partir de semillas de *Dalbergia congestiflora* Pittier a los 60, 120 y 180 días. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

La diferencia entre tratamientos en la variable de número de hojas no fue significativa en ningún periodo de tiempo evaluado. Pero el tratamiento con 176 esporas mostró mayor número a los 80, 120 y 180 días. Hernández *et al.*, (2006) reportó en especies de *Acacia farnesiana* un número mayor de hojas a los 126 días, sin embargo el número de hojas formadas en *Dalbergia congestiflora* fue menor. A los 180 días presentó caída de hojas, esto se debe a que la especie es un árbol caducifolio. El incremento de número de hojas en una planta podría deberse al aumento en la capacidad de absorción que una planta presenta y al transporte del sistema radical inducido por el organismo a la planta (Aguirre, 2011). Por lo tanto, las plantas inoculadas de *D. congestiflora* presentaron mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes que las del tratamiento control.

## Cobertura

Al final de la experimentación el tratamiento con 80 esporas presentó una cobertura mayor en relación al resto de los tratamientos y el tratamiento con 176 esporas presentó la cobertura menor (Figura 16).

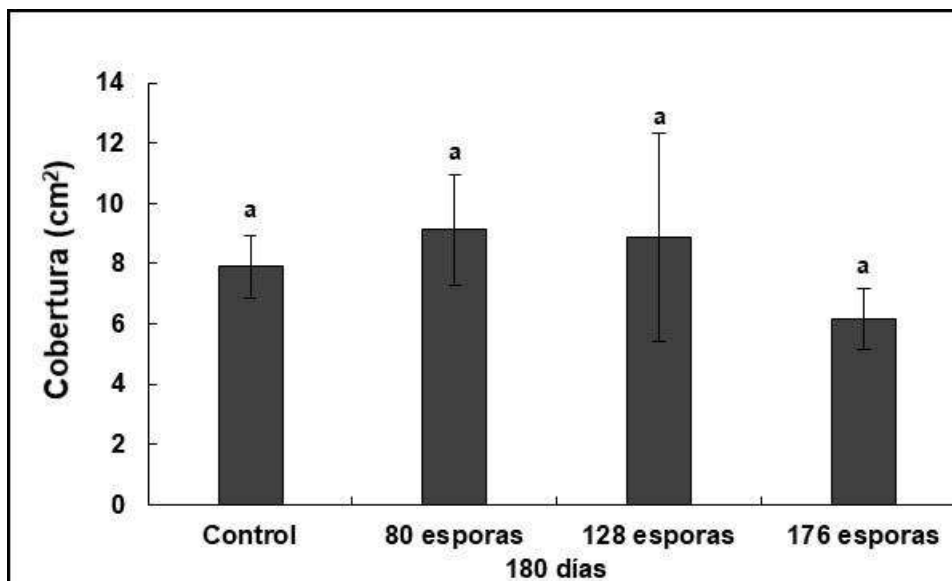


Figura 16. Cobertura de plantas obtenida a partir de semillas de *Dalbergia congestiflora* Pittier.

### 8.3.2 Plantas micropropagadas crecidas en invernadero

Las plantas mantenidas en invernadero presentaron una altura similar entre el control y los tratamientos con 80,128 y 176 esporas. Este parámetro de altura en las plantas micropropagadas no tuvo diferencia entre tratamientos a los diferentes tiempos (Figura 17).

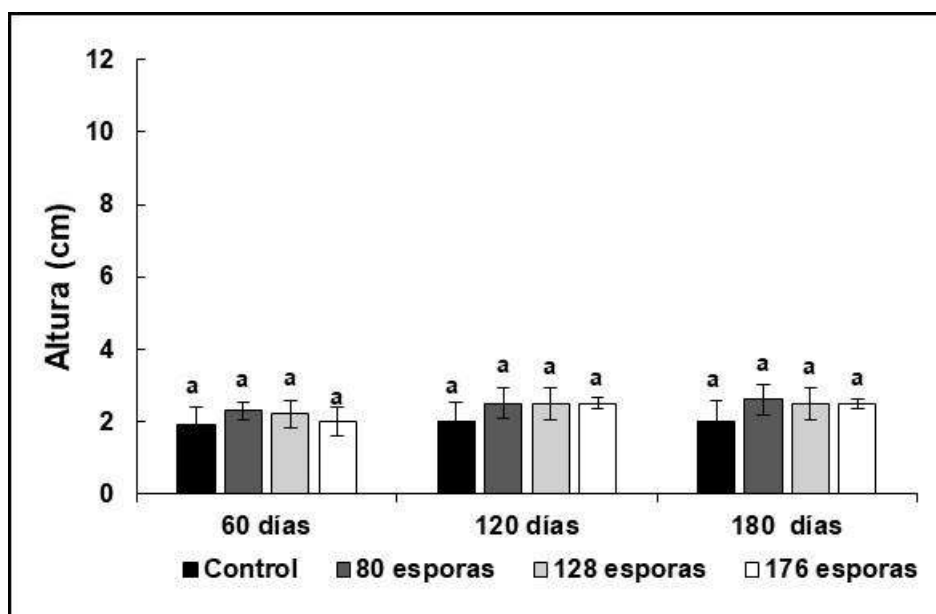


Figura 17. Altura de plantas micropropagadas de *Dalbergia congestiflora* Pittier a los 60, 120 y 180 días.

En especies forestales (*Prosopis glandulosa* y *Acacia farnesiana*), pertenecientes a la misma familia de *Dalbergia congestiflora*, presentaron a los 126 días un incremento en la altura de 32 cm y 27 cm respectivamente en presencia de *Glomus intraradices*. Estas plantas fueron vigorosas en invernadero (Hernández *et al.*, 2006). Por otra parte, las plantas micropropagadas con la misma cantidad de esporas obtuvieron una altura de 2.5 cm que representa solo el 23 % de la altura observada en plantas por semilla.

## Diámetro del tallo

A los 60 días, un diámetro de tallo se observó entre 1.3 y 1.1 mm en los tratamientos y a los 120 días presentó un ligero incremento entre 1.4 y 1.3 mm. A los 180 días un incremento no se observó en ningún tratamiento (Figura 18).

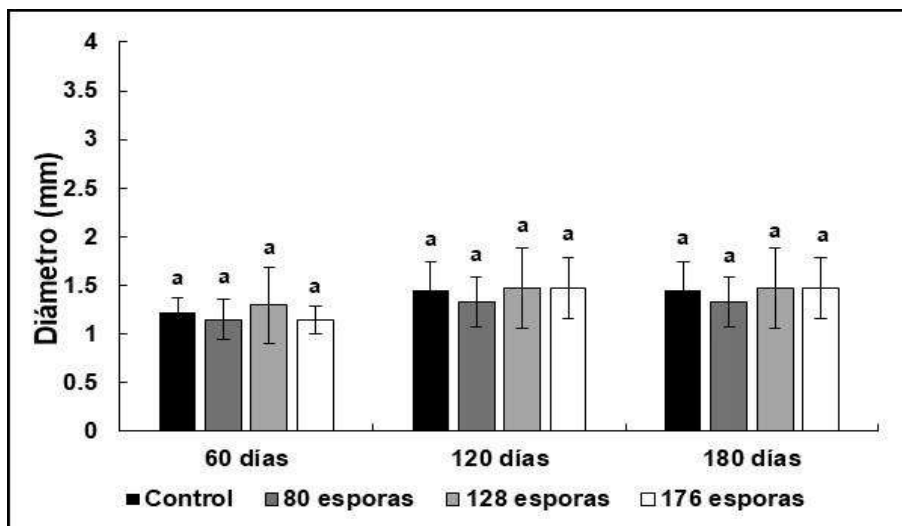


Figura 18. Diámetro de plantas micropropagadas de *Dalbergia congestiflora* Pittier a los 60, 120 y 180 días.

Algunos trabajos reportaron el diámetro en plantas micropropagadas en invernadero e inoculadas con HMA. Uno de ellos considera a *Hevea brasiliensis* (caucho) y demostró un efecto positivo en el diámetro (Rodríguez *et al.*, 2009) y otro mostró el mismo efecto en especies de *Citrus sinensis* micropropagadas e inoculadas con *Glomus* spp. Zac-19 (Chávez *et al.*, 2000). El diámetro obtenido fue alrededor de 3.5 mm en ambos trabajos. Sin embargo, las plantas micropropagadas e inoculadas de *Dalbergia congestiflora* obtuvieron solo 1.4 mm de diámetro de tallo a los 180 días.

## Número de foliolos

El número de foliolos en promedio fue de 12.7 para el tratamiento con 80 esporas y de entre 5.5 y 7.7 foliolos en los demás tratamientos. A los 120 días una disminución se presentó en todos los tratamientos y se ubicó entre 5.5 y 5.8, lo cual fue similar a los 180 días (Figura 19).

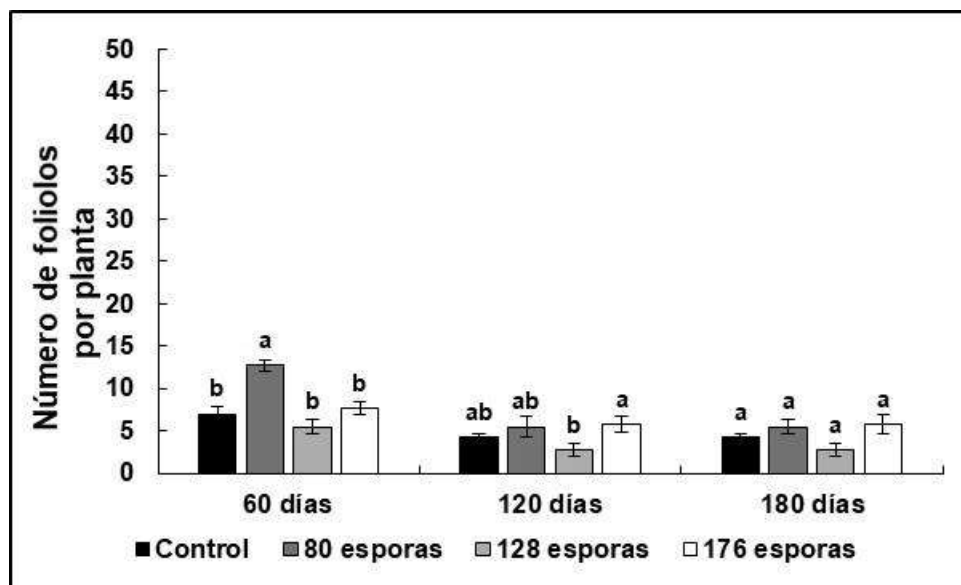


Figura 19. Número de foliolos de plantas obtenidas *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* Pittier a los 60, 120 y 180 días. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

## Número de hojas

El número de hojas en promedio fue entre 1.0 y 1.1 en todos los tratamientos y en los tres periodos de evaluación (Figura 20).

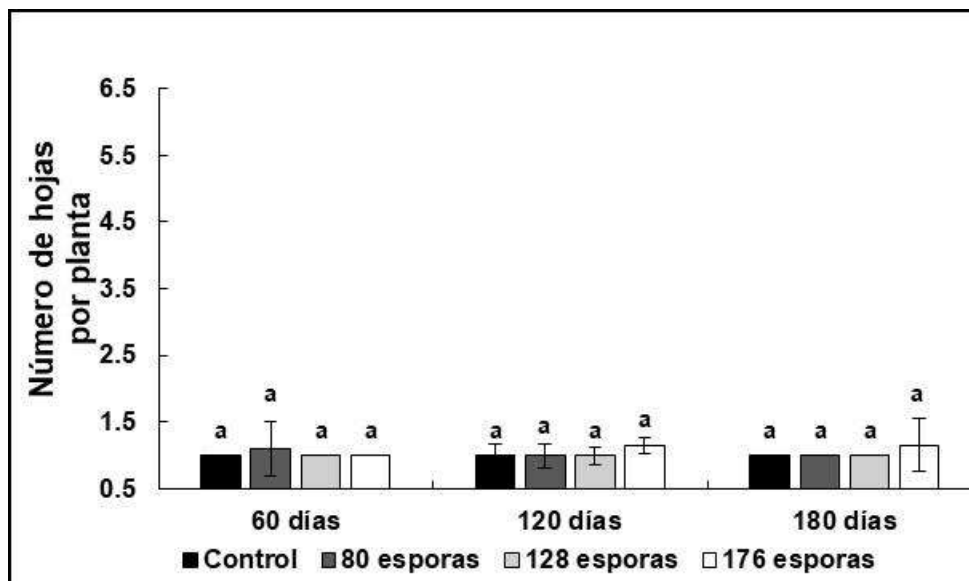


Figura 20. Número de hojas obtenidas *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* Pittier a los 60, 120 y 180 días.

En el sistema de micropropagación el número de hojas en promedio fue de 1.2 a los 60 días, en la cual al transcurrir los días este disminuyó, manteniendo como 1 hoja en promedio al final del experimento. Una diferencia significativa entre tratamientos no se presentó.

#### 8.4 Inoculación de plantas *in vitro* de *Dalbergia congestiflora*

En el presente trabajo se evaluó el efecto HMA (*Rhizophagus intraradices*) en condiciones *in vitro*, evaluando variables de longitud de raíz, número de raíces y porcentaje de supervivencia, en la cual resulto efectivo para la micorrización en plantas *in vitro*.

La longitud de raíz fue de entre 1.0 y 1.3 cm para todos los tratamientos a los 8 días de la inoculación (Figura 22). Los tratamientos con 4 y 8 esporas inhibieron el crecimiento de la raíz en todos los periodos de tiempo evaluados. Un incremento en la longitud se observó a los 15 días de la inoculación y se presentó en los tratamientos de 10 esporas con un crecimiento de 2.5 cm y en 12 esporas de 3.2 cm. A los 30 días la longitud mayor fue de 5.2 cm en el tratamiento de 10 esporas (Figura 21), lo que representa una diferencia significativa respecto a los otros tratamientos.

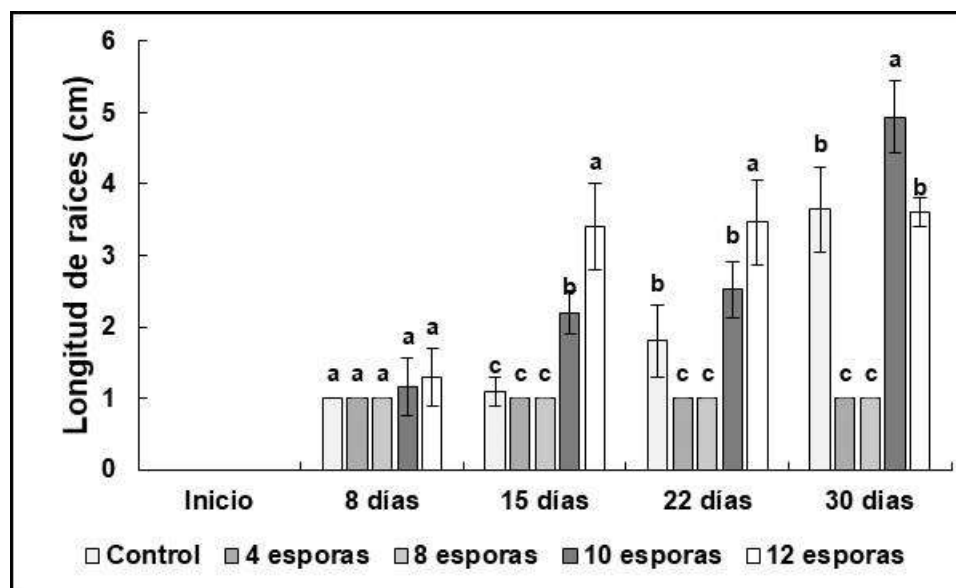
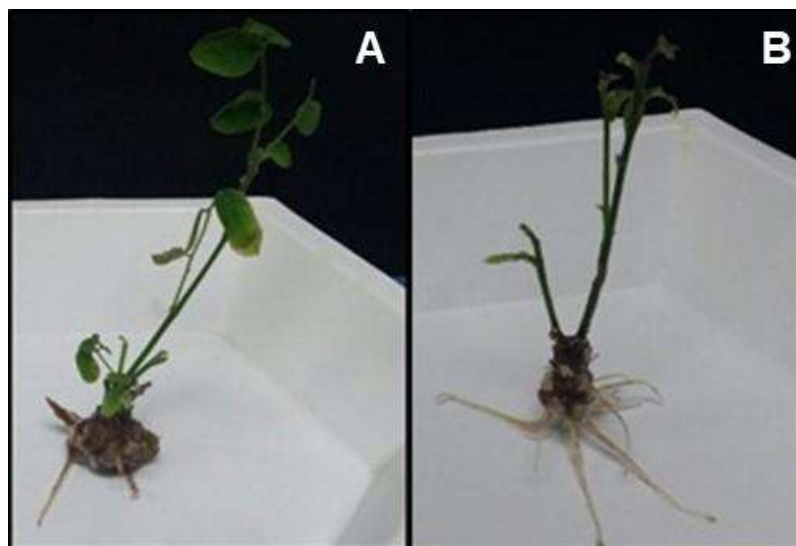


Figura 21. Longitud de raíz en plantas *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* Pittier en diferentes concentraciones de esporas de *Rhizophagus intraradices* a los 8, 15, 22 y 30 días. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 22. Plantas de *Dalbergia congestiflora* Pittier obtenidas por cultivo *in vitro*.  
A) Plantas control B) Plantas inoculadas con 10 esporas de *Rhizophagus intraradices*.**

### **Número de raíces**

En el número de raíces promedio en los tratamientos estuvo entre 1.2 y 1.8. Un incremento del número de raíces se observó a los 15 días solo en los tratamientos con 10 y 12 esporas con un promedio de 5.2 y 4.4 respectivamente. A los 22 y a los 30 días el comportamiento fue similar en los tratamientos con 10 y 12 esporas y el control. El mayor número de raíces se presentó en el tratamiento de 10 esporas con 10.8 raíces (Figura 23). Una diferencia significativa se presentó en los tratamientos con 8 y 10 esporas en relación a los demás tratamientos.

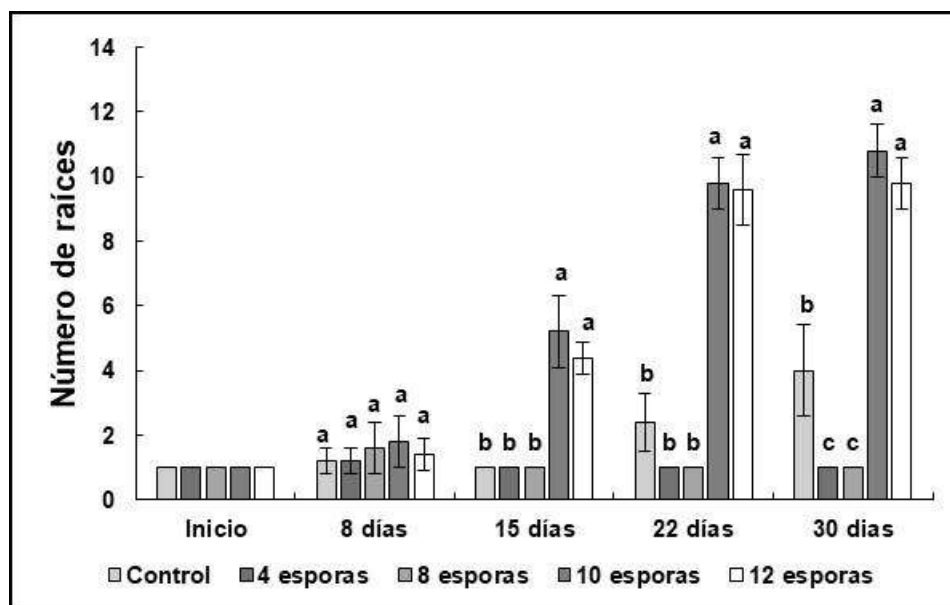


Figura 23. Número de raíces en plantas *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* Pittier en diferentes concentraciones de esporas de *Rhizophagus intraradices*. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

En la variable de número de raíces, se observó que estas presentaron un promedio de 10.8 raíces a los 30 días con una concentración de 10 esporas, en la cual mostró un efecto significativo en comparación con el control.

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Fernández *et al.*, (2002) en especies de *Coffea canephora* (café) que presentaron un número de raíces significativo a los 30 días en una concentración de 10 esporas de *Glomus clarum*, estas presentaron un incremento en el número de hojas y altura, utilizando diferentes tipos de propágulo (micelio y esporas). Han sido poco los trabajos realizados en cultivo *in vitro*, y estos se han reportado en especies herbáceas; sin embargo, Nogales García, (2009) reportó en especies de vid como especie leñosa en la cual se obtuvieron resultados favorables al utilizar *Glomus intraradices* obteniendo un crecimiento positivo tanto aéreo como radical en un lapso de 6 a 7 semanas, y utilizando diferentes tipos de medios, para que se llevase a cabo la colonización de los hongos.

En la cual es importante mencionar, que el medio utilizado se redujo los niveles de nutrientes, principalmente fósforo, y de esta manera llevarse con éxito la inoculación de los hongos micorrízicos arbusculares. Alarcón *et al.*, (2000) menciona que los

bajos niveles de nutrientes y fósforo, el hongo puede aprovechar con mayor eficiencia los escasos nutrimentos, haciéndolos disponibles y aprovechables para la planta.

### Porcentaje de supervivencia en condiciones ex vitro

El porcentaje de supervivencia en los tratamientos con 4 y 8 esporas fue de 0 después de 15 días. A los 15 días los tratamientos con 10 esporas y el control presentaron una supervivencia de 80 % y el tratamiento con 12 esporas fue de 60 %. A los 30 días, el tratamiento con 10 esporas su porcentaje de supervivencia se mantuvo en un 80% y el control y el de 8 esporas fue de alrededor de 60 % (Figura 24).

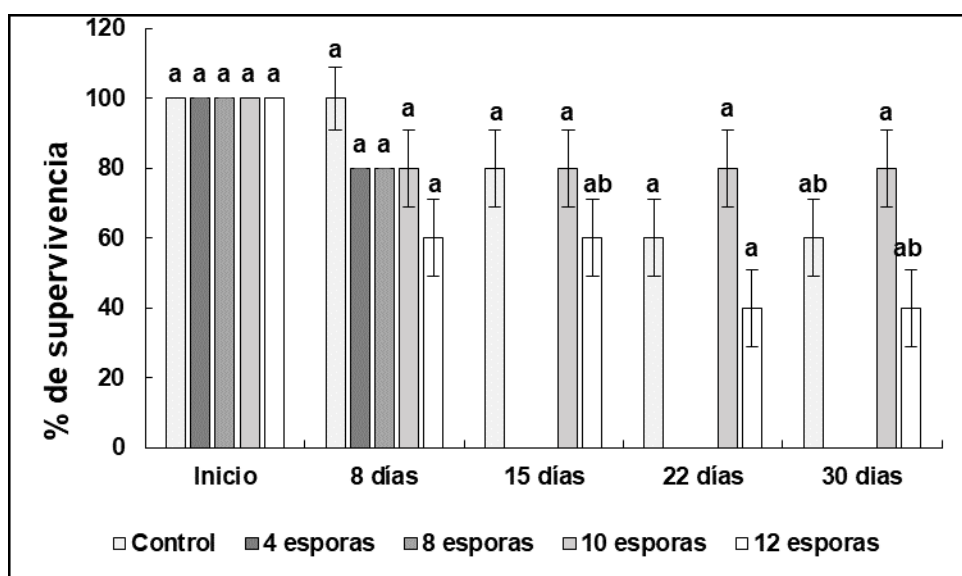


Figura 24. Porcentaje de supervivencia de plántulas de *Dalbergia congestiflora* Pittier en condiciones ex vitro. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

En esta fase se obtuvo un 80% de supervivencia a los 30 días después de la aclimatación, en comparación con el control, en la cual el porcentaje de supervivencia se redujo en un 40%, en especies de *Rubus glaucus* obtuvieron un 100% de supervivencia a los 60 días, con *Glomus intraradices* con un porcentaje alto en la colonización con HMA, (Pérez-Moncada, 2012); en especies de Fresa Cv. Fern obtuvo un 100% de supervivencia, además de mejorar la formación de

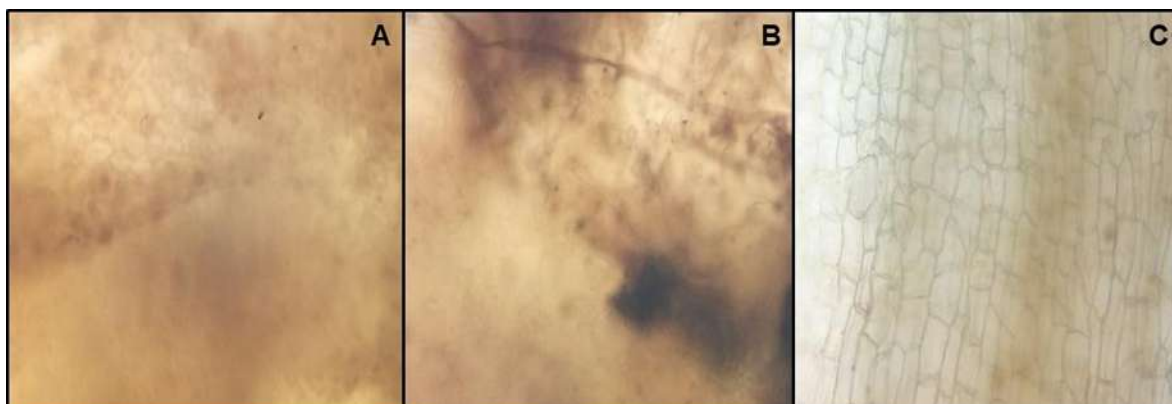
estolones y plantas hija, obteniendo un mayor aprovechamiento de nitrógeno y absorción de fósforo (Alarcón *et al.*, 2000), en especies de *Solanum tuberosum* var. Alfa, reportó un porcentaje de supervivencia alta, utilizando hongos de *Glomus intraradices* y *Glomus fasciculatum*. Sin embargo en comparación con estas especies el porcentaje de supervivencia en *Dalbergia congestiflora* sigue siendo considerada alta a pesar de presentar un 80% de supervivencia, en comparación con las anteriormente mencionadas ya que son especies arbustivas en comparación con *Dalbergia congestiflora* que es una especie leñosa.

Es importante mencionar que aunque se realizó reducción de nutrientes en el medio MS, para poder llevar a cabo la inoculación con HMA (*Glomus intraradices*) estas no mostraron cambios en la morfología de la planta, como sucedió en el caso de *Papa solanum* variedad Alfa, las plantas se atrofiaron y mostró cambio de color en la parte aérea, (Fernández *et al.*, 2010) el porcentaje de supervivencia en *Dalbergia congestiflora* es alta, esto coincide con los resultados obtenidos con otras especies, esto se debe a que es la fase correcta para llevar a cabo la inoculación es la etapa enraizado en *in vitro*. Autores reportan que el realizar la infección con micorrizas *in vitro* durante el enraizamiento es muy favorable, y que existe una mayor posibilidad de que los hongos puedan colonizar las raíces de las plantas y así permitir un porcentaje de supervivencia mayor, una alta tasa de crecimiento y enraizado ya que es muy vital, para el desarrollo de las plantas cuando estas se llevan a condiciones *ex vitro*.

### **8.5 Tinción de raíces de las plantas micorrizadas**

La identificación de estructuras micorrízicas intraradicales no se logró realizar con los dos métodos de tinción planteados, en cuanto a los tiempos de clarificación, debido a que cada estructura de raíz tanto de plantas de invernadero y por *in vitro* presentaba diferentes grados de lignificación. Por tanto, las raíces se sometieron a diferentes tiempos de clarificación (Figura 22). Los resultados fueron los siguientes (Cuadro 5). Las raíces de plantas de invernadero se clarificaron después de 30 minutos en ebullición en KOH y las de *in vitro* después de 15 minutos. Tampoco las

estructuras intraradicales de hongos micorrízicos se lograron identificar mediante el segundo método (Figura 25).

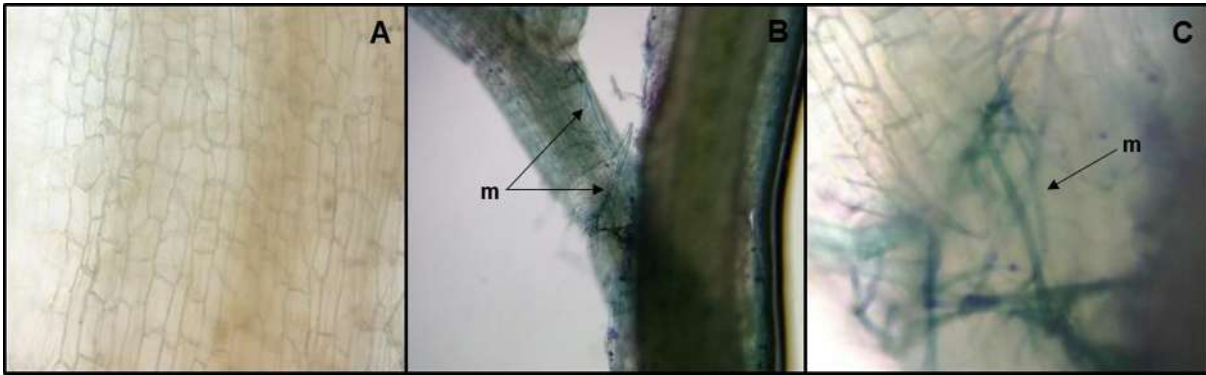


**Figura 25. Raíces de *Dalbergia congestiflora* Pittier sometidas a diferentes tiempos de clarificación. A) 10 minutos; B) 15 minutos; C) 30 minutos**

**Cuadro 5. Porcentaje de clarificación en raíces micorrizadas de *Dalbergia congestiflora* Pittier.**

| Tiempo     | Plantas de invernadero |                 | Plantas <i>in vitro</i> |
|------------|------------------------|-----------------|-------------------------|
|            | Semilla                | Micropropagadas |                         |
| 5 minutos  | 10%                    | 10%             | 20%                     |
| 10 minutos | 25%                    | 25%             | 50%                     |
| 15 minutos | 50%                    | 50%             | 100%                    |
| 20 minutos | 65%                    | 65%             | --                      |
| 25 minutos | 85%                    | 85%             | --                      |
| 30 minutos | 100%                   | 100%            | --                      |

El efecto de micorrización en raíces de *Dalbergia congestiflora* se determinó después de los 180 días, en la cual el tiempo óptimo para observar las estructuras fue a los 30 minutos, se considera que el tiempo de clarificación es un factor muy importante para poder observar las estructuras adecuadamente, esta técnica difiere con lo propuesto por Vierling (1968), debido a que cada especie presenta diferentes grados de lignificación. En las plantas mantenidas en invernadero (por semilla), se observaron estructuras de micelio en el interior de la raíz (Figura 26).



**Figura 26. Presencia de estructuras de hongos micorrízicos arbusculares en raíces de *Dalbergia congestiflora* Pittier. A) Raíces control en plantas por semilla; B) Micelio (m) observado a 10 X a los 180 días en plantas por semilla; C) Micelio (m) observado a 40 X a los 180 días en plantas por semilla.**

En especies leñosas como el caucho se observó una colonización poco desarrollada, debido a que no se encontró arbusculos y las cantidad de vesículas era muy baja, solo se encontró micelio intrarradical y extrarradical (Rodríguez *et al.*, 2009), esto concuerda con lo observado en raíces de *Dalbergia congestiflora*, en otras especies de la familia fabaceae (*Mimosa biuncifera*) se observaron estructuras de vesículas e hifas (Peña-Becerril *et al.*, 2016). En las raíces de plantas micropropagadas, no se observó la presencia de ninguna estructura (micelio, vesículas, arbusculos), en lo cual se considera que no fue la etapa adecuada para poder llevarse a cabo la micorrización, (Vestberg y Staún, 1994) manifiesta que hay tres etapas, en las que podría llevarse la colonización de los HMA.

Para las plantas obtenidas por *in vitro* el tiempo óptimo fue a los 15 minutos, al utilizar solo KOH, realizando la tinción con azul tripano directamente (Figura 27), ya que al someterlo a más tiempo de calentamiento, provoca la ruptura de las raíces, en este caso, se observaron estructuras de esporas de color amarillo, al utilizar azul tripano, las estructuras quedan teñidas de este color (Figura 28).



Figura 27. Raíces de *Dalbergia congestiflora* Pittier sometidas a diferentes tiempos de clarificación. A) 10 minutos; B) 15 minutos

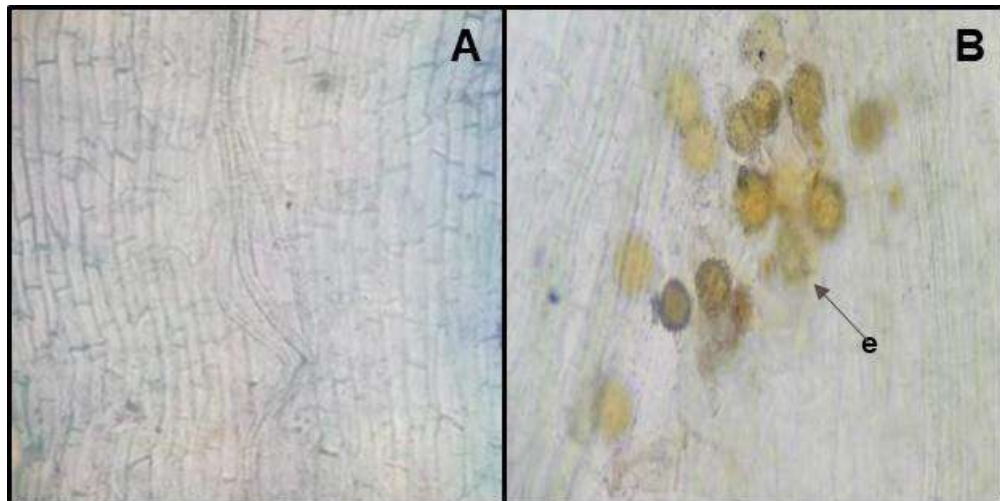


Figura 28. Presencia de estructuras en raíces de *Dalbergia congestiflora* Pittier. A) Raíces control en plantas *in vitro*; B) Esporas (e) observado a 40 X a los 30 días de inoculación

En plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) se observaron esporas de color blanco-amarillento, al presentar esporas estas tardan más en colonizar a la planta, lo que conlleva que al observar solo la presencia de esporas en raíces de *Dalbergia congestiflora*, en un lapso de 30 días, indica el requerimiento de más días para que se realice y pueda observar una colonización exitosa, en el caso de *Rubus glaucus* se determinó a los 60 días de inoculación (Pérez- Moncada, 2012). Fernández *et al.*, (2002) reporto en raíces de café (*Coffea canephora*) a los 30 días observaron micelio a pesar de que no se dio la colonización en el interior de las raíces, en el caso de *Dalbergia congestiflora*, se observó la presencia de esporas.

En *Dalbergia congestiflora* no existen estudios que demuestren el efecto de colonización con hongos micorrízicos arbusculares, que muestren el efecto y crecimiento de las plantas, en los resultados obtenidos, un efecto bajo se observó, esto puede deberse, que el sustrato contenía una cantidad rica en nutrientes (materia orgánica), (Sieverding, 1991) reporta que contenidos altos de materia orgánica inhiben el efecto de los hongos. Otros factores también influyen en el bajo efecto, como la incompatibilidad con la planta, (Manjares *et al.*, 2000) menciona que la efectividad de los hongos se asocia al genotipo y /o especificidad hongo - planta debido a que cada especie puede o no necesitar dependencia de un hongo micorrízico. A pesar de que en este estudio se utilizaron diferentes concentraciones de esporas, el efecto fue bajo, lo que lleva a determinar que el tener un número alto o bajo de esporas, no favorece a que pueda llevarse con éxito una infección en las raíces, si no que depende de las condiciones en la que se encuentre para que se pueda lograr un eficiente funcionamiento y óptimo rendimiento en el crecimiento de las plantas (Alvarado *et al.*, 2004).

Al realizar este trabajo, fue favorable ya que hay pocos reportes, sobre esta especie mostrando mayor importancia, el uso de hongos micorrízicos arbusculares en especies frutícolas.

## 9. CONCLUSIONES

Las micorrizas comerciales (*Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum* y *Entrophospora columbiana*) aplicadas en plantas propagadas por semilla y micropropagadas de *D. congestiflora* cultivadas en invernadero, mostraron un efecto positivo en la supervivencia, del 40 al 80% en plantas propagadas por semilla y en micropropagadas de un 20 a 40%.

El máximo incremento de los parámetros evaluados como altura, número de hojas y número de folíolos se logró con la aplicación de 176 esporas en las plantas provenientes de semilla. Sin embargo, aunque no se confirmó la colonización por micorrizas, solo se observó la presencia de micelio en las raíces.

En plántulas *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* inoculadas con *Rhizophagus intraradices*, se aumentó la longitud de raíz, número de raíces y supervivencia. A los 30 días, se observó la presencia de esporas típicas de *R. intraradices*, demostrando el inicio de la simbiosis.

Las micorrizas tuvieron un efecto en el incremento de la supervivencia tanto en plantas de *D. congestiflora* propagadas por semilla como *in vitro*.

## 10. RECOMENDACIONES

### Plantas de semilla

Incrementar el periodo de evaluación, porque en invernadero o *in vitro* no se pudo observar un número mayor de estructuras de los hongos HMA dentro de la raíz.

Probar más sustratos para plantas mantenidas en invernadero, con la finalidad de mantener mayor humedad y que favorezca la simbiosis hongo-planta.

Las plantas propagadas por semilla o *in vitro*, se les debe agregar una micorriza para aumentar la supervivencia. Si son obtenidas a partir de semillas y se van a mantener en invernadero, aplicar 176 esporas de micorriza comercial. Y obtenidas *in vitro* agregar 10 esporas de *R. intraradices*.

## 11. LITERATURA CITADA

**Ansorena** M. J. 1994. Sustratos: propiedades y caracterización. Mundi-Prensa Madrid España. No. 631.811 A622s.

**Alarcón** A. y Ferrera R. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra*. 17:179-191.

**Alarcón** A. Ferrera R. González C. M. C. y Villegas M. A. 2000. Hongos micorrízicos arbusculares en la dinámica de aparición de estolones y nutrición de plantas de fresa Cv. Fern obtenidas por cultivo *in vitro*. *Terra Latinoamericana*. 18:3.

**Alvarado** A. Chavarría M. Guerrero R. Boniche J. y Navarro J. R. 2004. Características edáficas y presencia de micorrizas en plantaciones de teca (*Tectona grandis* Lf) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 28:1.

**Amaya** R. y Eliécer J. 2014. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas.

**Ayling** S. M. Smith S. E. Smith F. A. y Kolesik P. 1997. Transport processes at the plant-fungus interface in mycorrhizal associations: Physiological studies. *Plant and Soil*, 196:2:305-310.

**Billard** C. E. y Lallana V. H. 2005. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. *Ciencia, Docencia y Tecnología*. 16:30.

**Bisht** R. Chaturvedi S. Srivastava R. Sharma A. K. y Johri, B. N. 2009. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi, *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium leguminosarum* on the growth and nutrient status of *Dalbergia sissoo* Roxb. *Tropical Ecology*. 50:2:231.

**Blanco** F. y Salas E. 1997. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía costarricense*. 21:1:55-67.

**Cardona** L. F. y Ocampo J. A. 1985. Estudio de la posible utilización de micorrizas VA como fertilizantes biológicos en dos suelos. *An. Edafol. Agrobiol.* 44: 457-462.

**Casillas-Sánchez** J.I. 2014. Propagación de *Tilia americana* var. Mexicana y *Dalbergia congestiflora*. Tesis de Maestría Tecnología de la Madera UMSNH. Morelia Mich.

- Chávez G.** Ferrera C. R. Villegas M. A. y Oropeza J. L. 2000. Selección de sustratos de crecimiento en microplántulas de cítricos inoculadas con *Glomus* sp. *Zac-19. Terra Latinoamericana*.18:4.
- Corredor H.** y Gloria A. 2001. Micorrizas arbusculares: Aplicación para el manejo sostenible de los agroecosistemas. Bogotá Colombia. 25486.
- Cué Bär E. M.** Villaseñor J. L. Arredondo A L. Cornejo T. G. e Ibarra M. G. 2006. La flora arbórea de Michoacán, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 78.
- Del Amo Rodríguez S.** Tenorio M. D. C. V. María J. Prado R. y Campillo C. S. Germinación y manejo de especies forestales tropicales.
- Díaz-Gómez V.** y Huerta-Crespo J. 1986. Utilización de las maderas tropicales en México. *Ciencia Forestal. México. Vol.II*.60:127-146.
- Dolcet-Sanjuan R.** Claveria E. Camprubi A. Estaun V. y Calvet C. 1996. Micropropagation of walnut trees (*Juglans regia* L) and response to arbuscular mycorrhizal inoculation. *Agronomie*.16:10:639-645.
- Dwari M.** y Chand P. K. 1996. Evaluation of explants, growth regulators and culture passage for enhanced callus induction proliferation and plant regeneration in the tree legume *Dalbergia lanceolaria* L. *Phyto-morphology*. 46:123-131.
- Eamus D.** Burrows W. y McGuinness K. 2000. Review of allometric relationships for estimating woody biomass for Queensland, the Northern Territory and Western Australia. Australian Greenhouse Office.
- Escobar A.C. J.** Zuluaga Peláez J. J. y Osorio M.V. E. 2002. Manual técnicas de propagación de especies vegetales leñosas promisorias para el Pie de monte de Caquetá.
- Fernández K.** 2010. Micorrización *in vitro* e *in vivo* de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* var. Alfa). *Cultivos Tropicales*.31:2: 00-00.
- Friberg S.** 2001. Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in traditional agriculture on the Niger inland delta, Mali, West Africa. *CBM: s Skriftserie*. 3:53-80.
- Gadkar V.** David-Schwartz R. Kunik T. y Kapulnik Y. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant physiology*.127:4: 1493-1499.
- García E. G.** y Di Stéfano J. F. 2000. Temperatura y germinación de las semillas de *Dalbergia retusa* (Papilionaceae), árbol en peligro de extinción. *Revista de Biología Tropical*. 48:1:43-45.

**Genre** A. Chabaud M. Timmers T. Bonfante P. y Barker D. G. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell*.17:12:3489-3499.

**Guridi-Gómez** L. I.1996. Caracterización macroscópica de cuatro especies tropicales mexicanas: Campincerán (*Dalbergia congestiflora* Pittier), Granadillo o Zangalicua (*D. granadillo* Pittier), Palo escrito (*D. palo-escrito* Rzedowski-Guridi) y Granadillo (*Platymiscium lasiocarpum* Sandw.). *Ciencia y Tecnología de la Madera*. Morelia, México.8:3-14.

**Hernández- García** A. 2014. Propagación *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* (campincerán) a partir de estacas cultivadas en invernadero. Tesis de Maestría en ciencias y Tecnología de la Madera UMSNH. Morelia Mich. 72 pp.

**Hernández-Martínez** M. Cetina-Alcalá V. M. González-Chávez M. C. y Cervantes-Martínez C. T. 2006. Inoculación micorrízica y su efecto en el crecimiento de dos leguminosas arbóreas. *Terra Latinoamericana*, 24:1. 65-73.

**Hernández** W. y Salas E. 2009. La inoculación con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. *Agronomía costarricense*. 33:1:17-30.

**Hooker** J. E. Gianinazzi S. Vestberg M. Barea J. M. y Atkinson D. 1994. The application of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagation systems: an opportunity to reduce chemical inputs. *Agricultural and Food Science in Finland*. 3:3: 227-232.

**Knoblauch** B. 2001. Estudio ecológico, silvícola y de utilización de granadillo (*Dalbergia tucurensis* JD Smith) en bosque latifoliados de Honduras. Bachelor's thesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2013.

**Leyva** R. F. Rosell P. R. Ramírez R. A. y Romero R. I. 2008. Manejo de endurecimiento por riego para elevar la calidad de las plantas de *Eucalyptus* sp. cultivadas en vivero de la Unidad Silvícola Campechuela. Universidad de Granma. Central del Batey. Campechuela. Granma. Cuba.

**LGVS** 2000. Ley General de Vida Silvestre. DOF (Diario Oficial de la Federación), Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

**Linares** J. y Sousa M. 2007. Nuevas especies de *Dalbergia* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae) en México y Centroamérica.

**Manjares** M. J. Alarcón A. y Ferrera R. 2000. Biotecnología de la producción de inóculo micorrízico arbuscular y su control de calidad. *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Mundi Prensa. Montecillo, Colegio de Postgraduados.

**Millan-Orozco** L. y Ballester A. 2007. Micropropagación de *Chlorophora Tinctoria* (L.) *Gaudichaud* y *Quercus humboldtii* Bonpl. Revista-Real Academia Galega de Ciencias. 26:17.

**Minchala-Patiño** J. Eras-Guamán. V. H. Muñoz-Chamba. L. Yaguana-Arévalo. M. Poma-Angamarca R. Delgado-Paredes G. y Gallo P. R. 2013. Propagación sexual y asexual de cuatro especies forestales nativas y promisorias de la Región Sur del Ecuador. Revista CEDAMAZ. 3:1:5-17.

**Mroginski** L. Sansberro P. y Flaschland E. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Biotecnología y mejoramiento vegetal. 2.

**Murashige** T., Skoog F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*15:3:473-497

**Niembro** R.A. 1988. Semillas de árboles y arbustos, ontogenia y estructura. Ed. Limusa. México.285

**Nogales** A. M. 2009. Estudio de la Interacción entre el Hongo Formado de Micorrizas Arbusculares *Glomus intraradices* Schenck y Smith y el hongo patógeno *Armillaria mellea* (Vahl.: fr) P. Kuhn en vid (Doctoral dissertation, Doctoral Thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain).

**Pastor** S. B.1999. Introducción a los sustratos: aspectos generales. In Tecnología de sustratos: aplicaciones a la producción viverística, ornamental, hortícola y forestal. Universitat de Lleida.9-36.

**Peña-Becerril** J. C Monroy-Ata A. Orozco-Almanza M. D. S. y García-Amador E. M. 2016. Establishment of *Mimosa biuncifera* (Fabaceae) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi in greenhouse and field drought conditions. *Revista de Biología Tropical* 64:2:791-803.

**Pérez-Moncada** U. A. Ramírez-Gómez M. M. Núñez-Zarante V. M. Franco-Correa M.y Roveda-Hoyos G. 2012. Evaluación de un sistema para la micorrización *in vitro* en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth). *Universitas Scientiarum.* 17:2.

**Phillips** J. M. y Hayman D.S.1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158–161

**Pittier** H. 1922. On the species of Dalbergia of Mexico and Central America. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 12:3:54-64.

**Plazola** G. Anastacio R. y Ferrara C. R. 1990. La endomicorriza vesiculo-arbuscular en las leguminosas. No. 583.32 G89.

**Pradhan** C. Kar S. Pattnaik S. y Chand P. K. 1998. Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes. Plant Cell Reports 18:1-2. 122-126.

**Prieto** J. A. Vera C. G. y Merlín E. 2003. Factores que influyen en la calidad de brinzales y criterios para su evaluación en vivero. Folleto técnico, 12.

**Rodríguez** T. S. 2009. Efecto de la inoculación con Hongos formadores de micorrizas arbusculares sobre plántulas de Caucho. Acta Biológica Colombiana, 14:3:31.

**Ruehle**, J. L., Marx, D. H., y Muse, H. D. 1984. Calculated nondestructive indices of growth response for young pine seedlings. Forest Science. 30:2:469-474.

**Sáez** P. y Narciso J. 1999. Utilización de sustratos en viveros. Terra Latinoamericana.17:3.

**Sieverding** E. Friedrichsen J. y Suden, W. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Sonder publikation der GTZ (Germany).

**Sigala Rodríguez** J. Á. 2013. Efecto del manejo y calidad de planta en vivero, en la supervivencia y crecimiento de *Pinus pseudostrobus* lindl en sitios de baja productividad. Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León.

**Smith** S. E. y Read D. J. 2010. Mycorrhizal symbiosis. Academic press.

**Sylvia** D. M. y Williams S. E. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. Mycorrhizae in sustainable agriculture, (mycorrhiza e insu). 101-124.

**Vatanparast** M. Klitgård B. B. Adema F. A. Pennington R. T. Yahara T. y Kajita T. 2013. First molecular phylogeny of the pantropical genus *Dalbergia*: implications for infrageneric circumscription and biogeography. South African journal of botany. 89:143-149.

**Valverde Cerdas** L. y Alvarado G. L. 2004. Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). Revista de Biología Tropical.52:1:41-46.

**Vargas Hernández** J. J. 1982. Aplicación del cultivo de tejidos en la propagación vegetativa de especies forestales. Ciencia forestal.

**Vierheilig** H. Coughlan, A. P. Wyss, U. R. S. y Piche Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Applied and environmental microbiology.64:12. 5004-5007.

