



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
ÁREA: ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**“ESTUDIO DE GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE ESPECIES
NATIVAS EN PRESENCIA/ AUSENCIA DE HONGOS
MICORRÍDICOS CON FINES DE RESTAURACIÓN
ECOLÓGICA”**

TESIS

QUE PRESENTA:

BIÓL. ARUBI MONSERRAT BECERRIL NAVARRETE

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARIELA GÓMEZ ROMERO

CO-DIRECTOR:

DR. FERNANDO PINEDA GARCÍA



Morelia, Michoacán marzo de 2021

Agradecimientos

A mis padres Marisa y René, y a mi hermano por el cariño, sacrificio ya que siempre han estado conmigo, gracias a todos ellos por apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos y aventuras y han sido parte fundamental en mi formación; y a toda mi familia que de una u otra forma han estado ahí cuando recurro a ellos, los quiero y admiro a todos.

Para Sinaí, quien me apoyó y siempre estuvo conmigo alentándome y motivándome en todo momento y siempre creyó en mí desde el inicio de esta etapa.

A mi directora de tesis la Dra. Mariela Gómez por la confianza, motivación, los consejos y el apoyo de manera personal y académica para la realización de este proyecto, así como el tiempo dedicado durante todo el proceso.

A mi co- director el Dr. Fernando Pineda por su paciencia, conocimiento y su experiencia para la realización de esta tesis.

A mi comité tutorial por sus valiosas aportaciones en el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Arnulfo Blanco García por aconsejarme y siempre brindarme su apoyo. Al Dr. Roberto Lindig por brindar el espacio, parte del material y sus sugerencias para que este trabajo se realizara. Y al Dr. Javier Villegas por sus conocimientos brindados.

Gracias a CONACyT por la beca para realizar este proyecto de Maestría. También quisiera agradecer a la Coordinación Académica de Posgrado por la ayuda durante estos dos años de Maestría.

A la M.C. Marlene Gómez Peralta y al Biól. Zirahuén Ortega dueños del Área Voluntaria para la Conservación “El Tocuz” por las facilidades para la colecta de semillas y todo su apoyo. De manera especial quiero agradecer Dulce, Mariela, Violeta y Zulma, así como a Doña Lola y Don Pancho por la ayuda durante el trabajo de campo, a mis compañeros y amigos del laboratorio de Ecología de la Restauración y a todas las personas que me apoyaron de alguna manera con sus consejos y apoyo para realizar este trabajo.

ÍNDICE

I. RESUMEN GENERAL	1
II. SUMMARY	2
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
IV. HIPÓTESIS	6
V. OBJETIVOS	7
CAPÍTULO 1. EXPLORACIÓN DE LA GERMINACIÓN E INTERACCIONES MICORRÍICAS DE LA ESPECIE <i>Monnina ciliolata</i>	8
1.1 Resumen.....	8
1.2 Abstract.....	9
1.3 Introducción.....	10
1.4 Materiales y métodos.....	13
1.5 Resultados.....	18
1.6 Discusión.....	26
1.7 Conclusiones.....	29
1.8 Bibliografía.....	30
CAPÍTULO 2. INFLUENCIA DE HONGOS MICORRÍICOS Y UNA BACTERIA REGULADORA DE CRECIMIENTO SOBRE EL DESARROLLO DE <i>Tecoma stans</i>	36
2.1 Resumen.....	36
2.2 Abstract.....	37
2.3 Introducción.....	38
2.4 Materiales y métodos.....	40
2.5 Resultados.....	46
2.6 Discusión.....	54
2.7 Conclusiones.....	56
2.8 Bibliografía.....	57
VI. DISCUSIÓN GENERAL	62
VII. RECOMENDACIONES	66
VIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Porcentaje de germinación de *Monnina ciliolata* 18
- Figura 2.** Variables de crecimiento de *M. ciliolata* entre los distintos tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos.....20
- Figura 3.** Variables de atributos morfofuncionales de raíz y hojas22

Capítulo 2

- Figura 1.** Germinación acumulada de *Tecoma stans*46
- Figura 2.** Variables de crecimiento final entre los distintos tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos.48
- Figura 3.** Variables de atributos morfofuncionales de raíz y tasa de crecimiento relativo50

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 1

- Tabla 1.** Tratamientos pregerminativos para semillas de *Monnina ciliolata*..... 15
- Tabla 2.** Tratamientos de inoculación con los hongos ectomicorrícicos *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* en plantas de *Monnina ciliolata*..... 16
- Tabla 3.** Atributos morfofuncionales de *M. ciliolata* bajo distintos tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos.....23

Capítulo 2

- Tabla 1.** Tratamientos para la propagación de plantas de *Tecoma stans*44
- Tabla 2.** Atributos morfofuncionales de *T. stans* bajo los distintos tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos.....51

ÍNDICE DE IMÁGENES

Capítulo 1

Imagen 1. Especies del estudio.....	14
Imagen 2. Crecimiento de las plantas de <i>Monnina ciliolata</i> bajo los distintos tratamientos de inoculación	19
Imagen 3. Plantas de <i>Monnina ciliolata</i> por tratamiento de inoculación	21
Imagen 4. Arquitectura de raíz de las plantas de <i>Monnina ciliolata</i> por tratamiento	24
Imagen 5. Microscopia de raíces inoculadas de <i>Monnina ciliolata</i> por tratamiento	25

Capítulo 2

Imagen 1. Especies del estudio.....	42
Imagen 2. Crecimiento de las plantas de <i>Tecoma stans</i> bajo los distintos tratamientos del experimento de inoculación	47
Imagen 3. Plantas de <i>Tecoma stans</i> por tratamiento de inoculación	49
Imagen 4. Arquitectura de raíz de las plantas de <i>Tecoma stans</i> por tratamiento ..	52
Imagen 5. Microscopia de raíces inoculadas de <i>Tecoma stans</i> por tratamiento ..	53

I. RESUMEN GENERAL

En los ecosistemas forestales, en los últimos años han aumentado agentes de disturbio antropogénico o natural, algunos de estos ligados al cambio climático, generando la pérdida de servicios ecosistémicos. Ante ello, la restauración ecológica es clave para el manejo, conservación y restauración de ecosistemas frente al cambio climático. Sin embargo, falta información para la restauración de sitios perturbados; el uso y germinación de especies nativas, junto con las micorrizas. Las especies de arbustos *Monnina ciliolata* DC. (con flores azul-moradas, nativa de bosques templados) y *Tecoma stans* (L.) Juss exKunth (1-10 m de altura) se consideran especies con alto potencial para restauración. Para su establecimiento se propone utilizar hongos micorrícicos, por su efecto positivo en el crecimiento y supervivencia. Los objetivos de este estudio son conocer el efecto de tratamientos pregerminativos y evaluar la interacción de diversos hongos micorrícicos, y la adición de una bacteria en plantas de *M. ciliolata* y *T. stans*. El experimento de germinación fue de cuatro tratamientos y control; (30 semillas en *Monnina*) y, un tratamiento y control (100 réplicas en *Tecoma*), con una semilla por contenedor en una mezcla de turba- agrolita (70%-30%), riego a capacidad de campo y evaluación cada tercer día. Se obtuvo velocidad y porcentaje de germinación. Para la interacción micorrícica, se colocó una semilla por contenedor y se inoculó, se establecieron tres tratamientos y un control (30 réplicas) en *Monnina* y para *Tecoma*, cinco tratamientos y un control (50 réplicas), en fibra de coco-agrolita (70%-30%). Se evaluó por seis meses; por método destructivo se evaluó biomasa aérea y radical, entre otras variables. Como resultados: inició la germinación en *M. ciliolata* el día 21 en el control (63%) y en *T. stans* inició a los nueve días (83%). En las interacciones, la inoculación dual en *Monnina* promovió el crecimiento en altura y mayor biomasa, mientras que *Scleroderma verrucosum* en *Tecoma* presenta efecto en benéfico de las variables aéreas y en la parte radical también influyó positivamente. Se concluye que las especies no requieren tratamientos pregerminativos; la inoculación con hongos micorrícicos tiene efectos positivos sobre el crecimiento de *M. ciliolata* y *T. stans*, por lo que se consideran ambos arbustos para su uso en estrategias de restauración, con las interacciones mencionadas.

Palabras clave: conservación, inoculación, micorrización, arbusto, interacción

II. SUMMARY

In the last few years, in forestry ecosystems, anthropogenic agents or natural disturbances have increased, some of these are linked to climate change, which has resulted in the loss of ecosystem services. Therefore, ecological restoration is a key tool for the management, conservation and restoration of ecosystems in front of climate change. However, in forest ecosystems information is still lacking, mainly for the disturbed sites restoration; the usage and germination of native species with mycorrhizae is an alternative to increase the success in restoring sites. The shrubs species *Monnina ciliolata* DC (with blue-purple flowers, native in temperate forests) and *Tecoma stans* (L.) Juss ex Kunth (1-10 meters tall) are considered restoration potential species. For their establishment, it is proposed to use of mycorrhizal fungi, due to their positive effect on growth and survival. The objectives in the present work are to know the effect of pregerminative treatments and evaluate the mycorrhizal interaction and a plant bacterium in *M. ciliolata* and *T. stans* plants. The germination experiment consisted of four treatments and a control with 30 replicates for *Monnina* and, a treatment and control with 100 replicates (*Tecoma*), with one seed per container in a mixture of peat-moss-agrolite (70% -30%), irrigation to field capacity and evaluation every third day. Germination speed and percentage were obtained. For the mycorrhizal interaction, one seed was placed per container and inoculated with a mixture of coco fiber-agrolite substrate (70% -30%), three treatments and one control (30 replicates in *Monnina*) and for *Tecoma*, five treatments and a control (50 replicates). Were evaluated for a six months period; by destructive method, aerial and radical biomass, among other variables. As results: in *M. ciliolata* germination began on day 21 in control treatment with 63% and germinated *T. stans* in nine days with 83%. In the interactions, the dual inoculation in *Monnina* promoted growth in height and higher biomass, while *Scleroderma verrucosum* in *Tecoma* shows a beneficial effect on aerial variables and radical variables also had a positive influence. It is concluded that the species do not require pregerminative treatments; inoculation with mycorrhizal fungi has positive effects on the growth of *M. ciliolata* and *T. stans*, which is why both shrubs are considered for use in restoration strategies, with the interactions mentioned.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

En los ecosistemas forestales, en los últimos años han aumentado agentes de disturbio (sequías, incendios, plagas, deforestación, etc.) algunos de estos se encuentran ligados al cambio climático, lo que ha traído como consecuencia la pérdida de servicios ecosistémicos (la regulación del ciclo del agua, alimentos, servicios culturales, recreativos, etc.) (Ojea *et al.* 2012). De acuerdo a las predicciones de diversos modelos, en México, en comparación con el promedio del período 1961-1990, habrá un incremento de la temperatura media anual (TMA) de 1.5°C para 2030, 2.3°C para 2060 y 3.7°C para 2090, mientras que la precipitación disminuirá en promedio 6.7% para 2030, 9.0% para 2060 y 18.2% para 2090 (Sáenz- Romero *et al.* 2012). En cuanto al estado de Michoacán, se estima que la TMA aumentaría 1.4 °C para el año 2030, 2.2 °C en 2060, y 3.6 °C para el año 2090 y la precipitación anual decrecerá en 5.6 % para el año 2030, 5.9 % en 2060 y 7.8 % para el 2090 (Sáenz- Romero *et al.* 2012).

El decaimiento de árboles por sequía y brotes de enfermedades forestales causadas por patógenos forestales nativos e introducidos se volverán más frecuentes e intensos, esto a consecuencia del cambio climático (Sáenz- Romero 2014, Sturrock *et al.* 2011, Allen *et al.* 2010). Ante ello, la restauración ecológica es una herramienta clave para el manejo y conservación de ecosistemas frente al cambio climático. Sin embargo, los enfoques tradicionales basados en recuperar el ecosistema a las condiciones del pasado son insostenibles para responder a los factores actuales de disturbio. Actualmente, es necesario hacer un balance entre reconstruir el pasado e intentar construir ecosistemas resilientes y sustentables a futuro (Gómez- Ruíz y Lindig-Cisneros 2017).

Los eventos antes mencionados pueden alterar las interacciones entre especies lo que podría afectar su distribución, tamaño, estructura y abundancia de sus poblaciones. Esto tendría repercusiones sobre la pérdida de especies y el deterioro de los ecosistemas afectando, a su vez, el flujo de bienes y servicios. A su vez, desde otro punto de vista, no se requiere la pérdida de una especie para que desaparezcan las interacciones, ya que en algunos casos la disminución de abundancia es suficiente

para que esto suceda (Uribe 2015, Navarro *et al.* 2017). Es por ello, que uno de los puntos centrales de la restauración ecológica es poner el foco no tanto en las especies sino en las interacciones entre ellas, que son las que verdaderamente proveen de varios procesos ecológicos porque va más allá de la simple recuperación de especies (Navarro *et al.* 2017). Una de las interacciones entre especies son las micorrizas en donde se pueden crear redes comunes de hongos, principalmente formados por hongos arbusculares y ectomicorrícicos (ECM), que pueden cubrir grandes áreas, potencialmente a escala de campo. La capacidad de algunos hongos ECM para formar tales redes interconectadas ofrece claramente oportunidades de explotación para mejorar los servicios ecosistémicos clave relacionados con la silvicultura y la restauración forestal. Las redes de micorrizas también pueden tener efectos importantes en la configuración de la estructura de la comunidad en los bosques que comprenden huéspedes tanto de hongos ECM como hongos arbusculares, debido a que se ha encontrado que estas redes de micorrizas promueven el crecimiento y la supervivencia de las plántulas, mientras que las redes de micorrizas de plantas con hongos arbusculares no lo hacen (Pierre- Louis *et al.* 2020).

Booth y Hoeksema (2010) utilizaron un enfoque de excavación de zanjas para mostrar que la conexión con las redes de micorrizas formadas por ECM tuvo efectos positivos en el establecimiento de las plántulas y se benefició notablemente de un mayor acceso al agua del suelo. Estos mismos autores también proponen que estas redes micorrícicas actúan como agentes facilitadores para el establecimiento entre la vegetación y generaciones posteriores en los bosques. Además, en ambientes estresantes (por ejemplo, en suelos salinos), las plantas adultas pueden promover el crecimiento y la absorción de nutrientes de sus plántulas a través del desarrollo de redes de micorrizas formados por hongos arbusculares, destacando una aplicación potencial en la restauración de ecosistemas degradados en suelos salinos. Gracias a esto se mitigan los efectos de degradación en suelos perturbados aumentando la importancia de reestablecer las interacciones biológicas entre las especies, siendo las interacciones micorrícicas fundamentales, ya que el micelio extraradical puede representar entre el 20% y el 30% de la biomasa microbiana total del suelo (Pierre- Louis *et al.* 2020).

Por otra parte, durante períodos de estrés hídrico que se produce cuando existe limitación de agua, las plantas expresan respuestas fisiológicas (pérdida de turgencia, reducción del potencial de agua de las hojas, reducción de concentración de CO₂ interna, etc.), bioquímicas (disminuye la eficiencia del Rubisco, acumulación de metabolitos de estrés como glutatión, incremento en enzimas antioxidantes, etc.) y moleculares (expresión de ácido abscísico en los genes, tolerancia al estrés por sequía, etc.) (Shao *et al.* 2008). En especies de uso agrícola inoculadas con micorrizas arbusculares, se ha demostrado que el uso de micorrizas en plantas produce un efecto benéfico para mantener su estatus hídrico, lo que se manifestó a través de una mayor conductividad hidráulica de las raíces; esto favoreció considerablemente la conductancia estomática, y, por lo tanto, la tasa fotosintética y la hidratación de los tejidos. En general, esto se reflejó en un mayor crecimiento en biomasa seca de la parte aérea y en el área foliar de las plantas (Dell'Amico *et al.* 2002, Augé 2001). Sin embargo, falta información en ecosistemas forestales principalmente para restauración de sitios perturbados, siendo el uso de especies nativas junto con las micorrizas una alternativa para aumentar el éxito en la restauración de un sitio. A pesar de que en la gran mayoría de las superficies muy alteradas no serán recuperadas al 100%, es posible inducir el desarrollo de una vegetación protectora que permita conservar e incrementar la fertilidad del suelo y parte de la diversidad de plantas y animales, mediante las especies vegetales herbáceas y leñosas nativas que tengan la potencialidad de crecer en zonas profundamente alteradas y que, con el tiempo, permitan la recuperación de la fertilidad del suelo, un microclima y un ciclo hidrológico similares a los originales (Vázquez-Yanes *et al.* 1999). Así mismo, es crucial promover la producción de plantas de este tipo en vivero para reforestación de sitios perturbados y para ello se necesita conocer los tratamientos de germinación y/o propagación de estas plantas por no ser de interés económico-forestal, así como su afinidad con hongos micorrícicos.

IV. HIPÓTESIS

Con la finalidad de identificar las estrategias que mejoren la supervivencia y desempeño de las plantas para su establecimiento futuro en sitios degradados y de esa forma, recuperar una cobertura vegetal, se espera que el tratamiento pregerminativo con estratificación pueda incrementar la velocidad y porcentaje de germinación de *Monnina ciliolata*. Mientras que se espera que en presencia de los hongos ectomicorrícicos *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* la especie *Monnina ciliolata* presente un mayor crecimiento de la planta y que su eficiencia en la captura de recursos se vea modificada en *Monnina ciliolata*. Para las plantas de *Tecoma stans* se espera que, la presencia del hongo micorrícico arbuscular *Rhizophagus intraradices* pueda potenciar su crecimiento y desarrollo.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la germinación de semillas de *Monnina ciliolata* y el crecimiento en presencia o ausencia de inoculación de los hongos ectomicorrícicos *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* con fines de restauración ecológica en bosque templado. Así como evaluar en plantas de *Tecoma stans* los efectos en presencia o ausencia de hongos micorrícicos y una bacteria promotora de crecimiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer el efecto de los tratamientos pregerminativos (Capítulo 1).
- Evaluar el efecto en el crecimiento de *Monnina ciliolata* en presencia o ausencia de los hongos ectomicorrícicos *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus*, así como, la arquitectura de la raíz (Capítulo 1).
- Realizar el conteo de micorrización ectomicorrícica entre *Monnina ciliolata* y los hongos *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* (Capítulo 1).
- Realizar el conteo de micorrización en *Tecoma stans* y diversos hongos micorrícicos y una bacteria promotora de crecimiento (Capítulo 2).
- Evaluar el efecto en el crecimiento y supervivencia en plantas de *Tecoma stans* en presencia o ausencia de diversos hongos micorrícicos y una bacteria promotora de crecimiento, así como, la arquitectura de la raíz (Capítulo 2).

CAPÍTULO I. EXPLORACIÓN DE LA GERMINACIÓN E INTERACCIONES MICORRÍDICAS DE LA ESPECIE *Monnina ciliolata*

1.1. RESUMEN

Debido al deterioro de los ambientes forestales, se requiere reforestar y restaurar para hacer más eficiente la recuperación de sitios degradados mediante el uso de especies nativas. La especie *Monnina ciliolata*, es un arbusto de hasta dos metros de altura, con flores azul-moradas y fruto elipsoide; florece de marzo a junio en bosques de coníferas, pino-encino y bosques de encino, entre 2400- 3200 m snm. En este trabajo se estudia la germinación de *M. ciliolata*, como especie nativa de bosque templado, para identificar estrategias que mejoren la germinación, y el efecto en la interacción con hongos ectomicorrícicos (*Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus*) en la supervivencia y desarrollo de las plantas. Para su establecimiento futuro en proyectos de restauración ecológica. Se evaluó la velocidad y porcentaje de germinación con cinco tratamientos: estratificación 30 y 15 días, escarificación química con ácido sulfúrico, imbibición en agua por 12 horas y un control, con 30 réplicas. Para la inoculación, se evaluaron cuatro tratamientos: control, inoculación con *S. verrucosum*, *P. arhizus* e inoculación dual (ambos hongos micorrícicos) con 30 réplicas cada uno. Los resultados muestran el inicio de la germinación a los 21 días con 63%, mientras que en el experimento de inoculación el tratamiento dual sobresalió del resto de los tratamientos. En cuanto a la inoculación el tratamiento dual presenta efecto en la parte aérea y radical en las plantas (medidas durante seis meses). *M. ciliolata* no requiere de tratamientos pregerminativos y los hongos micorrícicos utilizados en este experimento tienen efecto en el incremento de las variables aéreas y radicales de las plántulas para su posible establecimiento en proyectos de restauración ecológica.

Palabras clave: crecimiento, inoculación, germinación

1.2. ABSTRACT

Due to the forestry deterioration, to recover degraded sites, turns necessary to reforest and restore through the use of native species. The species *Monnina ciliolata*, is a two meters tall shrub, with blue-purple flowers and ellipsoid fruit. This shrub blooms between march to June in temperate forest, between 2400-3200 masl. In the present paper work, studied *M. ciliolata* germination strategies, as a temperate native forest species and the ectomycorrhizal mushrooms interaction effect with *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* in the survival and growth of plants for their future establishment in ecological restoration projects. The speed and percentage of germination were evaluated with five treatments: 30 and 15 stratification days, chemical scarification with sulfuric acid, 12 hours in water imbibition, and a control, with 30 replicates. Four treatments were evaluated for inoculation: control, inoculation with *S. verrucosum*, *P. arhizus* and dual inoculation (both mycorrhizal fungi) each one with 30 replicates. Thus, the results obtained indicate the germination begins past 21 days with 63%. Otherwise, in the inoculation experiment, the dual treatment was more efficient than the rest of the treatments. In regard to the inoculation experimental, the dual treatment shows a positive effect on the aerial and radical part in the plants measured at six months. *Monnina ciliolata* does not require pregerminative treatments. The mycorrhizal fungi used in this experiment have an increasing effect on the aerial and radical variables of the seedlings for their possible future establishment in ecological restoration projects.

Key words: growth, inoculation, germination

1.3. INTRODUCCIÓN

El deterioro de los ecosistemas forestales se ha incrementado en los últimos años en México, de ahí la necesidad de reforestar y restaurar para eficientizar la recuperación de estos sitios degradados, sobre todo en ecosistemas con constante perturbación como lo son los bosques templados (CONAFOR 2009, Calva-Soto y Pavón 2018). En México los bosques templados como el bosque de pino-encino, tienen gran importancia ecológica, económica y social (Valencia 2004, Villaseñor 2010, Uribe-Salas *et al.* 2019). A menudo, son el componente dominante de la vegetación, influyen en los procesos funcionales del ecosistema tales como los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos, los regímenes de fuego, y son hábitat y fuente de alimento para la fauna silvestre (Sánchez- González 2008, Chávez-Vergara y García- Oliva 2013). Además, ofrecen importantes servicios ambientales (agua, oxígeno, recreación, captura de carbono) e influyen en el clima regional, la regulación de los vectores de enfermedades y la regulación de la erosión de los suelos (Ramírez- Herrera *et al.* 2005, Balvanera *et al.* 2009). Dentro de los bosques templados también se encuentra el bosque mesófilo de montaña, también conocido como bosque de niebla, se caracteriza por la presencia de nubosidad o niebla a nivel de la cobertura vegetal. Es considerado el tipo de vegetación más diverso en México y a la vez vulnerable, ya que la superficie que cubren en el país es muy reducida, las condiciones ambientales para su permanencia son muy específicas y contiene una gran riqueza de especies. Los ensamblajes de plantas, animales y hongos que ahí habitan son vitales para su funcionamiento y, además, el bosque mesófilo provee de bienes y servicios ambientales al ser humano (Williams-Linera 2015). Sin embargo, debido a los cambios ambientales actuales y a su reducida superficie, este tipo de vegetación está experimentando desbalances en su entrada de humedad, ya que está registrando una menor precipitación, menos días con neblina y un aumento en la duración e intensidad de los periodos de sequía (Sánchez-Ramos y Dirzo 2014). Por ello, es importante aumentar el éxito de los esfuerzos de restauración, en especial con especies nativas al ecosistema, ya que se espera tengan un mejor desempeño y se adapten a las condiciones bióticas y abióticas locales y apoyen en la biodiversidad nativa y la función del ecosistema en mayor grado que al utilizar especies exóticas (Thomas *et al.* 2014). Así mismo, en los esfuerzos de

restauración con especies nativas se recomienda incluir germoplasma proveniente de distintos progenitores, ya que de esta forma se fomenta la conservación de la variabilidad genética, lo que se traduce en una mayor capacidad de respuesta de las especies ante los cambios ambientales naturales o provocados por las actividades humanas. Además, al utilizar especies nativas del sitio se propicia una disminución de los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos que podrían afectar nuestra capacidad de sobrevivencia como sociedad y como especie (Piñero *et al.* 2008).

Por otra parte, existe una necesidad imperante de incrementar el conocimiento sobre la fisiología de la germinación de especies forestales con poco interés económico o que han sido poco utilizadas en los esfuerzos de reforestación o restauración. El desarrollo de protocolos de germinación permitiría conocer características particulares de cada especie como la permeabilidad de sus cubiertas, composición química de sus reservas, tamaño y contenido de humedad, y determinar las señales ambientales como la humedad del suelo y la temperatura que disparan su germinación (Doria 2010). Se ha propuesto que uno de los métodos para incrementar el porcentaje de la germinación es la estratificación de las semillas que se refiere a romper la latencia fisiológica. Este proceso consiste en colocar las semillas en estratos que conservan la humedad, comúnmente arena o bien turba o vermiculita, y en frío, manteniendo las semillas a temperaturas bajas de 4 a 10 °C, para simular las condiciones de invierno, esto por un período que oscila entre 20 y 60 días, llegando inclusive hasta 120 días (Varela y Aparicio 2011). Definir los umbrales ambientales de la fisiología de las semillas de especies forestales no comerciales, contribuiría a definir su idoneidad como candidatas en esfuerzos de restauración.

Otro aspecto relevante que contribuiría al éxito de las estrategias de restauración es el uso de hongos micorrícicos. Los hongos micorrizógenos que además de degradar la materia orgánica, facilitan el acceso de las plantas, en especial a nivel de plántula, a nutrientes como nitrógeno y fósforo (a cambio de azúcares, producto de la fotosíntesis). Esto potencialmente puede acelerar el crecimiento de las plantas, incrementar su supervivencia y facilitar la regeneración del ecosistema tras algún

disturbio natural o antropogénico (Sánchez-Ramos y Dirzo 2014). Así mismo, los hongos micorrícicos, principalmente los arbusculares, pueden contribuir a mantener el estatus hídrico de la planta durante sequías y mejorar el crecimiento. Tal efecto benéfico de la simbiosis modifica no solamente la asimilación de nutrientes sino también la adquisición y distribución de fotoasimilados y agua en la planta (Harris-Valle *et al.* 2009). En particular, para las especies forestales no comerciales existe poca información sobre las especies de hongos micorrícicos que potencialmente pueden contribuir a su establecimiento y desarrollo.

Por lo tanto, en este trabajo se plantea estudiar la germinación de *Monnina ciliolata*, una especie nativa del sotobosque de los bosques templados (pino-encino y mesófilo), debido a que no se conocen trabajos al respecto, y sólo se reporta en listados florísticos. Las especies de sotobosque tienen un papel ecológico importante en los ecosistemas, ya que pueden mejorar las condiciones microclimáticas para el establecimiento futuro de especies arbóreas, lo que las hace candidatas ideales para la restauración (Gómez- Romero *et al.* 2013) Es por esto que es importante desarrollar estrategias ecofisiológicas de las especies nativas que contribuyan al incremento de la germinación y variabilidad genética. Así mismo, en el presente estudio se evaluará el efecto que tiene la interacción con los hongos ectomicorrícicos *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* sobre la supervivencia y crecimiento de *M. ciliolata* crecidas bajo condiciones óptimas. En particular, con esta exploración se busca determinar si la interacción tendrá efectos positivos sobre el crecimiento y el desarrollo de la parte aérea y subterránea de la especie y, por ende, recomendar el uso de este tipo de interacciones en los esfuerzos de restauración en campo de sitios perturbados favoreciendo así los procesos de sucesión vegetal. El presente trabajo sentará las bases para evaluar la idoneidad *M. ciliolata* y de su interacción con hongos micorrícicos en la restauración, para posteriormente utilizarla de manera experimental como una planta nodriza para otras especies vegetales.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material biológico

Las colectas de semillas de *Monnina ciliolata* se llevaron a cabo entre octubre y diciembre de 2018 y octubre de 2019 en un Bosque de Pino-Encino dentro del Área Voluntaria para la Conservación “El Tocuz” ubicado en el Rincón de Tamanguio, municipio de Acuitzio Michoacán en 19° 29' 06" latitud norte y 101° 21' 39" longitud oeste.

Monnina ciliolata D.C. (Imagen 1 a) también conocida como hierba del burro, de la familia *Polygalaceae*, es un arbusto de sucesión intermedia de hasta 2 m de altura, tallos y peciolos de las hojas a veces de color rojo con inflorescencia en racimos cónicos o cilíndrico-cónicos, densos; flores azul-moradas y fruto elipsoide, obtuso, carnoso, marginado, rugoso-reticulado, de color oscuro (Chimal-Hernández *et al.* 2013), siendo ésta una especie atrayente de polinizadores de abejas silvestres como *Colletes recurvatus*, *Xylocopa azteca*, *Megachile zapoteca*, *Megachile gentilis* (Razo 2015). Florece de marzo a junio. En bosque de encino, oyamel, pino-encino, de 2400 a 3200 m de altitud.

La recolección de cuerpos fructíferos del hongo *Scleroderma verrucosum* (Bull.) Pers. se realizó en agosto de 2019 en el Bosque templado y Bosque mesófilo de montaña en la estación “Vasco de Quiroga” en la localidad de Toreo el Alto, municipio de Uruapan Michoacán entre los 19°29'27.09" latitud norte y los 102° 00'23.24" longitud oeste. El hongo *Pisolithus arhizus* se obtuvo de la empresa Plant Health Care de México S. de R.L. de C.V.

Scleroderma verrucosum (Bull.) Pers. (Imagen 1 b) es un hongo globoso ectomicorrícico que ha sido empleado para micorrizar árboles y arbustos como *Cistus albidus* y *Quercus coccoifera* con inoculaciones exitosas dando como resultado un efecto positivo y significativo en el crecimiento de las plantas desarrolladas en vivero en comparación con el grupo de plantas control (Pera y Parladé 2005).

Pisolithus arhizus (Scop.) Rauschert (Imagen 1 c) es un hongo gasteroide, globoso, ectomicorrícico que ha sido utilizado en la micorrización de distintos árboles y arbustos,

teniendo un efecto positivo en el crecimiento, así como, en el volumen y la longitud de la raíz, aspectos que son muy importantes para el establecimiento de las plantas en condiciones naturales (Gómez- Romero *et al.* 2015).



Imagen 1. Especies del estudio. a) Planta de *Monnina ciliolata* en floración; b) Cuerpo fructífero del hongo ectomicorrícico *Scleroderma verrucosum*; c) Cuerpo fructífero del hongo ectomicorrícico *Pisolithus arhizus*.

Experimento de germinación.

El experimento consistió en cuatro tratamientos y un control, cada uno con 30 semillas (Tabla 1). Previo al inicio de la germinación, se aplicaron los tratamientos de estratificación. Se inició con la estratificación a 30 días en refrigerador con temperatura constante de 4°C para el primer tratamiento, transcurridos quince días del tratamiento anterior se colocó el tratamiento de estratificación de 15 días, finalizado este período de tiempo se retiraron del refrigerador. Doce horas previas al retiro de los tratamientos de estratificación del refrigerador se realizó el tratamiento de imbibición de agua por 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo de imbibición las semillas fueron colocadas en la charola retirada del refrigerador. Posteriormente, para el cuarto tratamiento se realizó la escarificación química con ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado durante 15 minutos y un control, ambos tratamientos colocados en la misma charola. Para la germinación, se utilizó una charola de germinación de 200 cavidades, cada cavidad tenía un volumen de 14 cm³. Se colocó una semilla por cavidad en sustrato mezcla de 70% turba (peat-moss) y 30% agrolita. Se mantuvo riego a capacidad de campo y la germinación se evaluó cada tercer día, contabilizando la germinación acumulada hasta que no se presentaron cambios. Se consideró una semilla germinada al momento de

la observación del hipocotilo. Se obtuvo la velocidad y porcentaje de germinación por tratamiento.

Tabla 1. Tratamientos pregerminativos para semillas de *Monnina ciliolata*.

Tratamientos	Tiempo
Control	
Escarificación química H ₂ SO ₄	15 minutos
Estratificación	30 días 4 °C 15 días 4 °C
Imbibición en H ₂ O	12 horas

Preparación del inoculante micorrícico

Una vez colectados los cuerpos fructíferos se deshidrataron y posteriormente se pulverizaron las partes fértiles. Para la muestra de viabilidad se tomó una muestra de 0.1g del hongo molido al que se le agregó 1ml de Azul de tetrazolio, se dejó reposar sin luz a una temperatura de 22°C por 72 h para realizar el conteo de esporas viables en cámara de Neubauer. La especie *Scleroderma verrucosum* tuvo una viabilidad de 7, 650, 000 esporas viables por gramo de inóculo puro, se hizo la homogenización con turba micronizada para el medio millón de esporas por 0.5gr de inóculo. En el caso de *Pisolithus arhizus* contiene una viabilidad de 250 millones de esporas por gramo en el inóculo puro, para su manejo este fue diluido en turba micronizada hasta obtener medio millón de esporas en 0.5g del hongo micorrícico.

Experimento de inoculación con hongos ectomicorrícicos para la propagación de *Monnina ciliolata*.

De acuerdo con los resultados del experimento de germinación, no se requiere ningún tratamiento pregerminativo para la germinación de *Monnina ciliolata*, por lo que la siembra de la semilla se llevó a cabo directamente en contenedores rígidos de plástico con una capacidad de 275 cm³ y con un sustrato compuesto de 70% polvillo de coco y 30% de agrolita. Posterior a la siembra, una vez que comenzaron a emerger las hojas verdaderas, se llevó a cabo la inoculación de las plántulas de forma independiente;

mediante una solución que contiene medio millón de esporas, mismas que fueron contabilizadas previamente con cámara de Neubauer (explicado previamente en la preparación del inoculante). El riego se mantuvo a capacidad de campo durante los seis meses que duró el experimento.

El diseño experimental constó de 30 réplicas por tratamiento (Tabla 2), teniendo una duración de seis meses. El desarrollo de las plantas bajo los tratamientos se monitoreó mensualmente, midiendo las variables altura, número de hojas, cobertura ($\pi r_1 r_2$) y diámetro a la altura de la base (DAB).

Tabla 2. Tratamientos de inoculación con los hongos ectomicorrícicos *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* en plantas de *Monnina ciliolata*.

Tratamiento de inoculación	<i>Scleroderma verrucosum</i>	<i>Pisolithus arhizus</i>
Control	-	-
Individual	+	-
Individual	-	+
Dual	+	+

Análisis de raíz y hojas

Con el fin de explorar el efecto de la inoculación de los hongos micorrícicos en el desarrollo de la raíz de las plantas de *Monnina ciliolata*, una vez transcurridos los seis meses de crecimiento, se llevó a cabo la cosecha de 10 ejemplares por tratamiento tomados al azar.

Para la limpieza de las raíces a las plantas seleccionadas se les retiró la mezcla de sustrato dos horas antes del análisis con ayuda de agua corriente y coladores de plástico para evitar la pérdida de raíces en el proceso. Se colocó el tallo (con las hojas) y la raíz de forma separada de cada individuo para su posterior análisis. Para el escaneo de hojas y raíz se utilizó un escáner EPSON PERFECTION V800 Photo y el programa WinRHIZO. Después del escaneo la parte aérea y radical por separado se colocaron en bolsas de papel para su secado en un horno a 70°C. Posteriormente, cada uno de sus componentes se pesó en una balanza analítica (0.0001g). Las

variables analizadas fueron densidad de raíz (peso seco de raíz/ volumen de raíz), longitud total del sistema radicular (cm), diámetro promedio de la raíz (mm), volumen de raíz (cm³), número de puntas, biomasa aérea (g), biomasa del sistema radicular (g), el cociente longitud del sistema radicular entre el área foliar total, Área Foliar Específica (AFE: promedio del área de las hojas/ el peso seco de las hojas), Longitud Radicular Específica (LRE: longitud sistema radicular/peso seco del sistema radicular), número de puntas/ área foliar, cociente peso seco raíz/peso seco parte aérea (R:S Ratio). A su vez, se obtuvo la tasa de crecimiento relativo (TCR) con el cociente de la diferencia de la medida de altura final menos la inicial/ la altura final. Posteriormente se siguió la técnica de Hernández *et al.* (2008) (modificado de Phillips y Hayman 1970) para la tinción de las raíces. Para el porcentaje de micorrización se utilizaron 10 muestras por individuo, se hizo el conteo de las muestras con signos de micorrización (hifas) para obtener el promedio por tratamiento, esto mediante la utilización de un microscopio con cámara marca AmScope, se utilizó el objetivo 40X principalmente para mejor detalle de las hifas, también se utilizó 20X y 100X para algunas fotografías.

Análisis de datos

Los datos de germinación se analizaron mediante una prueba de riesgos proporcionales de Cox, Chi- cuadrado y un Modelo Linear Generalizado (GLM). Para conocer si existen diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación, por efecto de los hongos micorrícicos, se analizaron mediante análisis de varianza y una prueba de comparaciones múltiples Tukey. Los análisis se realizaron mediante los programas estadísticos R y JMP Versión 8 con ayuda de Excel para la captura de datos.

1.5. RESULTADOS

Experimento de germinación.

La germinación de *Monnina ciliolata* inició a los 21 días en el tratamiento control, hasta los 51 días de seguimiento se tuvo un máximo de germinación del 63% en dicho tratamiento. En el tratamiento de escarificación con ácido sulfúrico a los 51 días se obtuvo el 47% de germinación y en la estratificación de 15 días un 40% de germinación (Figura 1). Los resultados muestran que no se requiere de ningún tratamiento pregerminativo para la germinación de *Monnina ciliolata* ($X^2 = 36.43$, $P < 0.001$), porque en control muestra un porcentaje de germinación significativamente mayor que los otros tratamientos, por lo que la semilla se puede sembrar directamente en el sustrato.

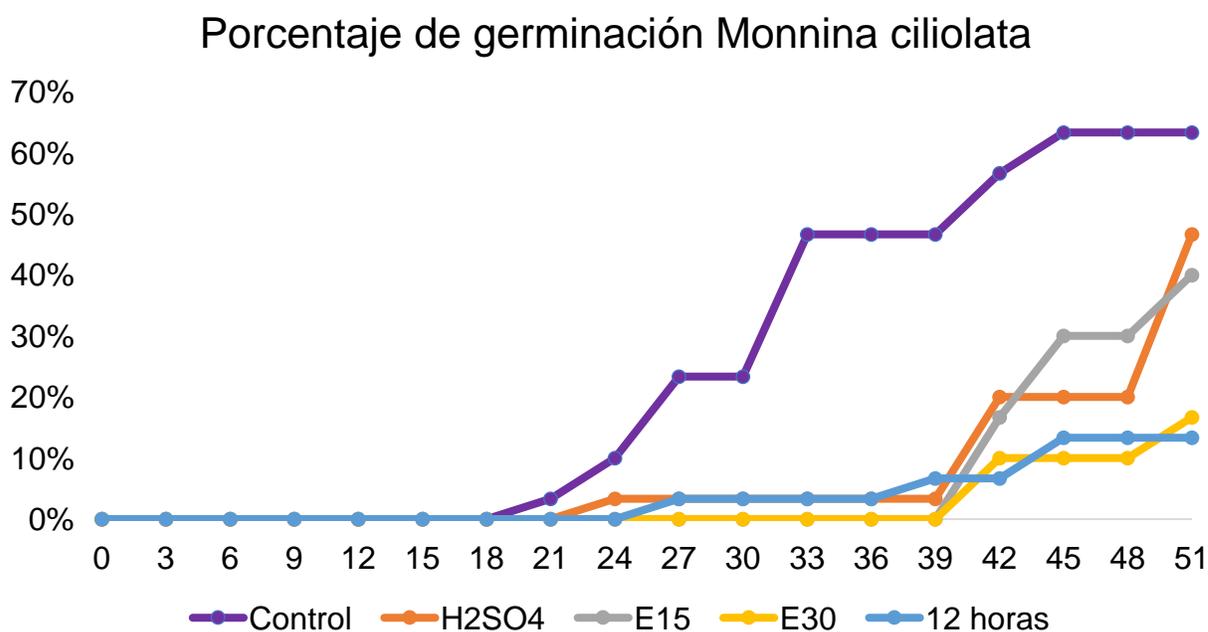


Figura 1. Porcentaje de germinación de *Monnina ciliolata* bajo cuatro tratamientos experimentales pregerminativos. Los tratamientos son: Control (color morado); ácido sulfúrico (H_2SO_4) (color naranja); Estratificación 15 días (E15) (color gris); Estratificación 30 días (E30) (color amarillo); Imbibición por 12 horas (12 horas) (color azul). En la esquina superior derecha se muestra la prueba de chi- cuadrado y GLM.

Efecto de la inoculación de hongos ectomicorrícicos sobre *Monnina ciliolata*

Crecimiento

Después de transcurridos seis meses de evaluación mensual se observaron los siguientes resultados. En la imagen 2 se muestran las plantas de *Monnina ciliolata* al sexto mes de inoculadas con los distintos tratamientos, en donde se observa el tratamiento control con una menor altura en comparación con los otros tratamientos, siendo la inoculación dual (*S. verrucosum* y *P. arhizus*) el tratamiento con mayor altura.



Imagen 2. Crecimiento de las plantas de *Monnina ciliolata* bajo los distintos tratamientos de inoculación. Los tratamientos: C Tratamiento control, D Tratamiento con *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* (dual), P Tratamiento con *Pisolithus arhizus*, S Tratamiento con *Scleroderma verrucosum*.

Para las variables de crecimiento analizadas se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en la altura, cobertura final y en la tasa relativa de crecimiento (Tabla 3; Figura 2 y 3). También en la variable TCR, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo también el tratamiento dual el tratamiento con mayor crecimiento. En general, con el tratamiento de inoculación dual se promovió un mayor crecimiento de *M. ciliolata* de la parte aérea, ya que al final del experimento

las plantas crecieron más, fueron más altas y tuvieron una mayor cobertura y una mayor biomasa tanto de la parte aérea como de la raíz, en comparación con el tratamiento control. (Tabla3, Figura 2 y 3; Imagen 2 y 3).

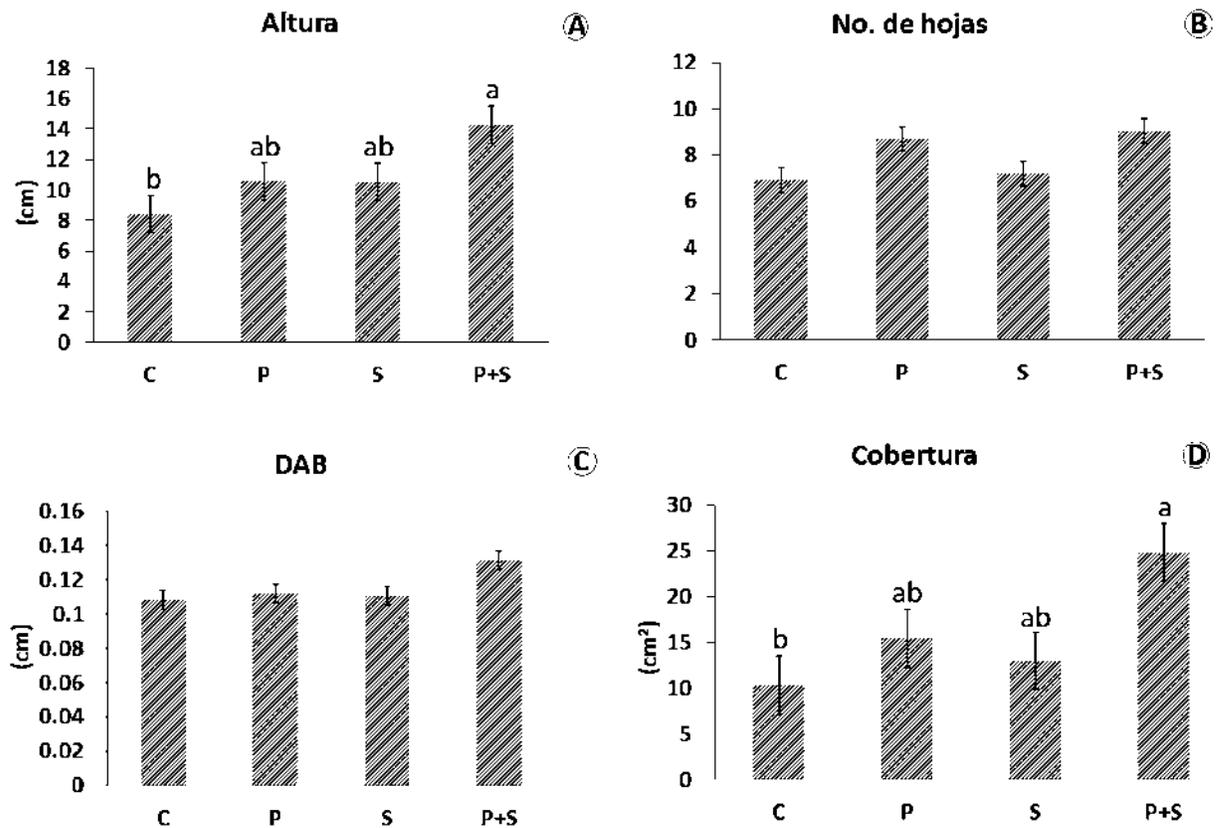


Figura 2. Variables de crecimiento de *M. ciliolata* entre los distintos tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos. Variables de crecimiento: A) Altura; B) No. de hojas; C) DAB; D) Cobertura. Acrónimos de los tratamientos: C=Control, P=*Pisolithus arhizus*, P+S= *P. arhizus* y *S. verrucosum*, S= *Scleroderma verrucosum*. Las barras representan el error estándar. Las letras distintas representan diferencias significativas exploradas con la prueba de *Tukey*.



Imagen 3. Plantas de *Monnina ciliolata* por tratamiento de inoculación, en la imagen se puede apreciar las diferencias en la cobertura y altura final. a) tratamiento control; b) tratamiento dual (*P. arhizus* y *S. verrucosum*); d) tratamiento con *P. arhizus*; e) tratamiento con *S. verrucosum*.

Atributos morfofuncionales de raíz y hojas

Para el caso de los atributos morfofuncionales de hoja, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en el área foliar específica (Tabla 3); los individuos en el tratamiento control presentaron un mayor valor de AFE y el tratamiento con *P. arhizus* presentó el menor valor.

Para el caso de los atributos morfofuncionales de la raíz, la interacción con el hongo también tuvo efectos sobre los mismos. En general, en el tratamiento dual *M. ciliolata* generó un sistema radicular menos denso y, por lo tanto, con raíces con un menor valor de LRE (más baratas) pero con sistema radicular con un mayor volumen (Tabla 3; Figura 3). Por otra parte, para el caso de la biomasa radical se observó diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3), se observó que todos los individuos de los tratamientos con inoculación micorrícica tienen valores altos en comparación al tratamiento control. Para la longitud radicular específica se obtuvo diferencias entre los tratamientos (Tabla 3); los individuos del tratamiento control tuvieron valores mayores en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 3). Se encontró diferencias

significativas en la variable R:S Ratio (Tabla 3); en el tratamiento con *Scleroderma* tienen un valor mayor al resto de los tratamientos. En la imagen 4 se observa la arquitectura de la raíz por cada tratamiento.

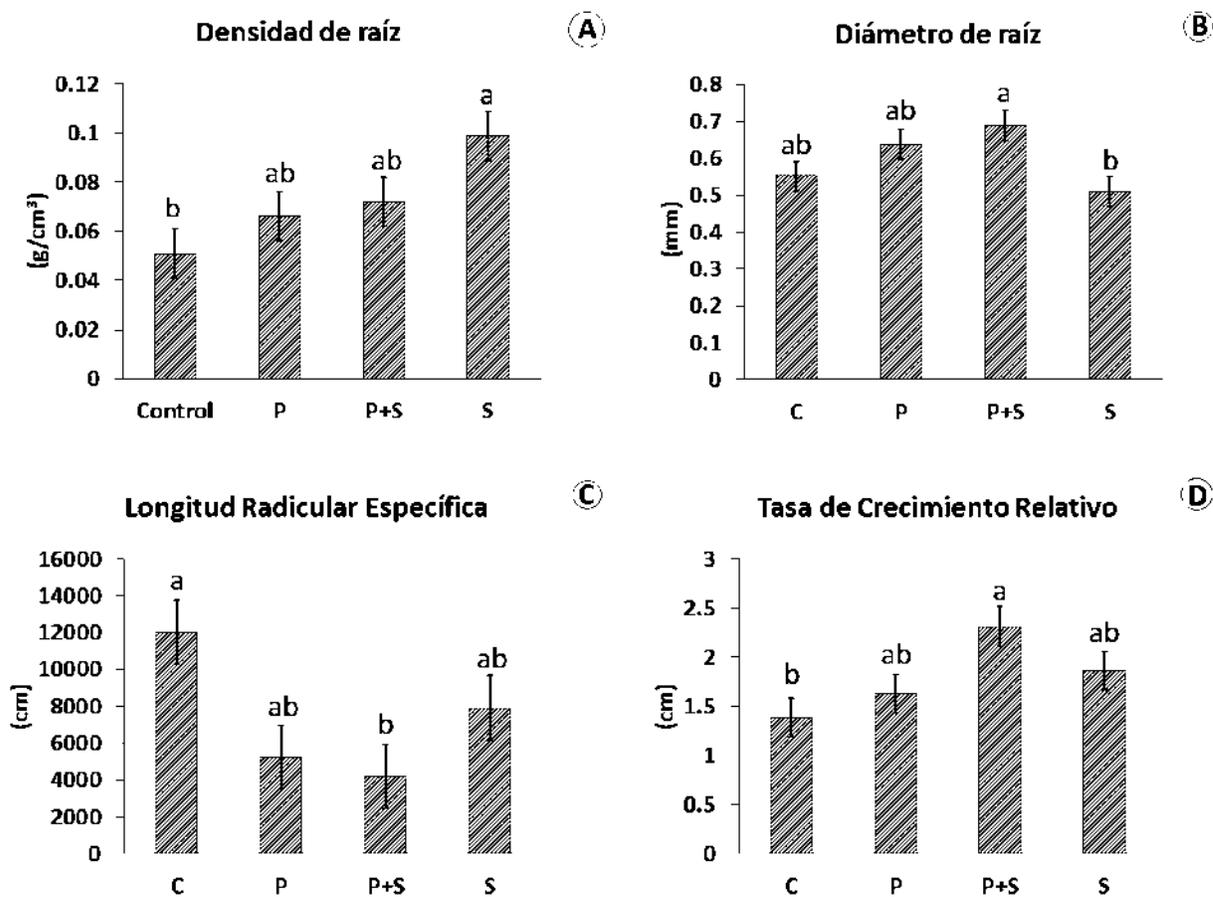


Figura 3. Variables de atributos morfofuncionales de raíz y hojas. Variables: A) Densidad de raíz; B) Diámetro de raíz; C) TCR; D) Longitud de raíz . Acrónimos de los tratamientos: C=Control, P=*Pisolithus arhizus*, S= *Scleroderma verrucosum* y P + S= *P. arhizus* y *Scleroderma verrucosum*. Las barras representan el error estándar. Las letras distintas representan diferencias significativas exploradas con la prueba de Tukey.

Tabla 3. Atributos morfofuncionales de *M. ciliolata* bajo los distintos tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos. En la tabla se muestran los valores promedios de cada atributo obtenidos bajo el tratamiento Control, inoculación con *P. arhizus* (P), inoculación dual con *P. arhizus* y *S. verrucosum* (P+S) e inoculación con *S. verrucosum* (S). A su vez, se muestran el estadístico F y el valor de P obtenido a partir del análisis de varianza. Los valores en negritas y con * indican diferencias significativas. Las diferencias entre tratamientos se exploraron con una prueba de Tukey y se observan con letras distintas. La descripción de los acrónimos se puede ver en la sección de métodos.

Variable	Promedio				F	P
	Control	P	P+S	S		
Altura (cm)	8.41 b	10.56 ab	14.26 a	10.53 ab	5.52	0.002*
DAB (mm)	0.108	0.112	0.131	0.11	1.91	0.1321
Cobertura (cm ²)	10.31 b	15.46 ab	24.84 a	13 ab	3.52	0.0175*
Número de hojas	6.92	8.7	9.03	7.18	1.71	0.1580
Biomasa aérea (g)	0.028 b	0.075 ab	0.092 a	0.064 a	8.14	0.0003*
AFE (cm ² /g)	685.07 a	360.53 b	474.09 ab	528.89 ab	3.74	0.019*
Long/ Área foliar (cm/cm ²)	22.70	16.34	11.85	24.25	1.16	0.334
No. puntas/ Área foliar	631.19	187.12	135.30	348.98	1.44	0.245
TCR (cm)	1.387 b	1.626 ab	2.314 a	1.864 ab	4.03	0.0092*
Biomasa radical (g)	0.0161 b	0.0526 a	0.0712 a	0.053 a	8.64	0.0002*
Densidad de raíz (cm ³ /g)	0.051 b	0.066 ab	0.072 ab	0.099 a	3.68	0.020*
Volumen de raíz (cm ³)	0.400 b	0.814 ab	1.098 a	0.629 ab	4.77	0.006*
Longitud de raíz (cm)	189.70	267.36	298.41	337.70	0.441	0.441
LRE (cm/g)	12039.4 a	5236.6 ab	4207.8 b	7910.8 ab	3.70	0.020*
Diámetro de raíz (mm)	0.552 ab	0.638 ab	0.689 a	0.511 b	3.07	0.038*
R:S Ratio (g/g)	0.582 b	0.694 ab	0.776 ab	0.820 a	3.29	0.031*
No. Puntas	5974.9	3549.5	3007.8	8757	0.533	0.662
Porcentaje de micorrización	5.2 b	60 a	48 a	36 ab	7.1	0.0007*

Grado de infección en raíces

En lo que respecta al porcentaje de inoculación se observó contaminación en el tratamiento control, no descartando que se trate de organismos endófitos. Por otro lado, el tratamiento con inóculo de *Pisolithus* tuvo un mayor porcentaje de micorrización, después *Scleroderma* y por último la inoculación dual (Tabla 3). En la imagen se muestran las estructuras observadas en la microscopia (Imagen 5).

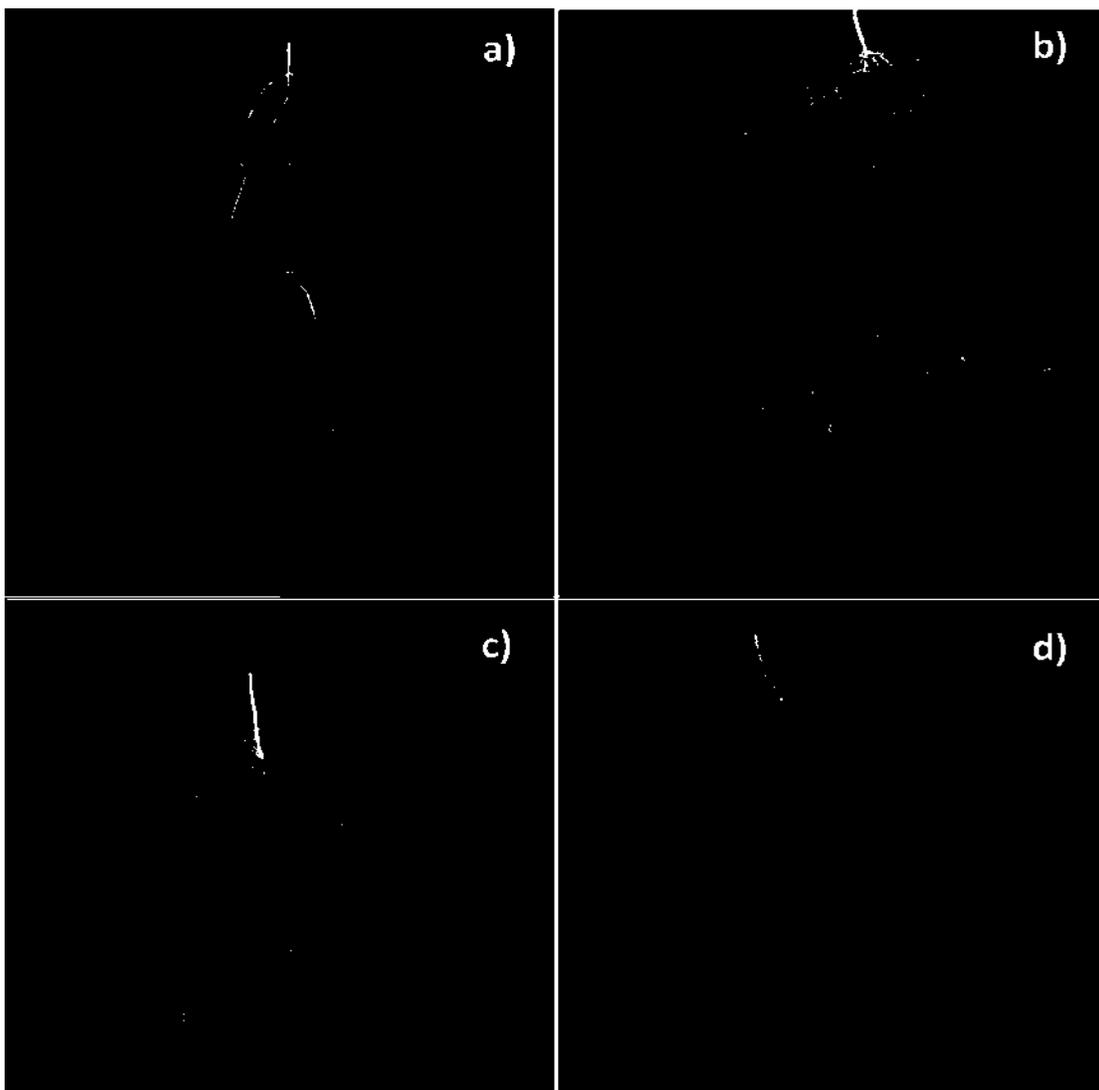


Imagen 4. Arquitectura de raíz de las plantas de *Monnina ciliolata* por tratamiento. a) tratamiento control, b) tratamiento con *S. verrucosum*, c) tratamiento con *P. arhizus*, d) tratamiento dual.

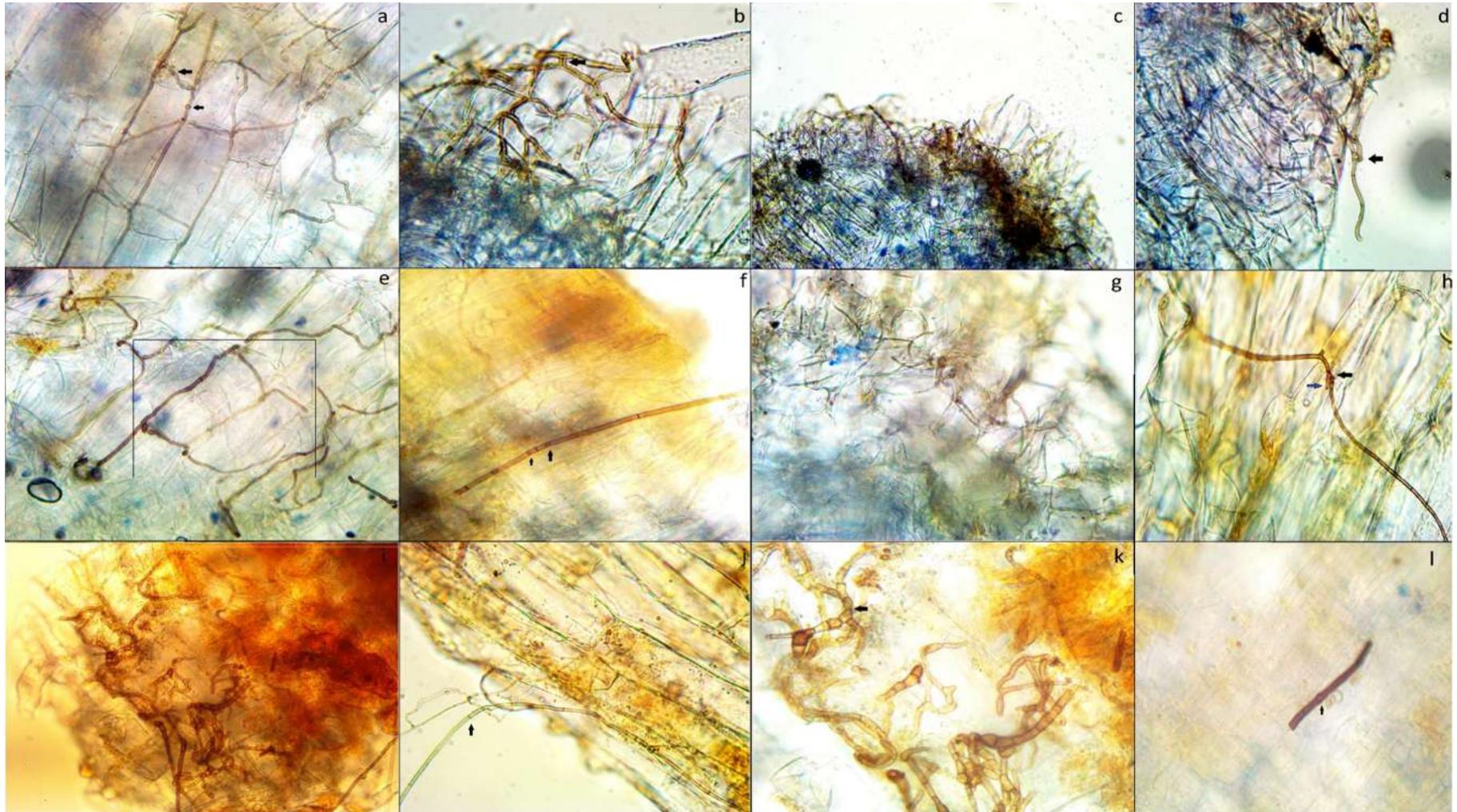


Imagen 5. Microscopia de raíces inoculadas de *Monnina ciliolata* por tratamiento 40X. Las figuras de la a-d pertenecen al tratamiento con *Scloderma verrucosum*, e-h al tratamiento con *Pisolithus arhizus*, i-l al tratamiento dual. a) Anastomosis con clamp y un puente largo, 20X; b) Anastomosis abierto con un puente largo y formación del manto; c) Manto de *S. verrucosum* 20X; d) Hifa externa; e) Hifas alrededor de la célula 20X (cuadro negro); f) Poros en la hifa; g) Manto, h) Hifa terminación simple (flecha azul) y septo bifurcado (flecha negra); i) Micelio 20X; j) Hifa externa; k) Hifa doble terminación; l) Poro.

1.6. DISCUSIÓN

En general, la germinación de las semillas es muy sensible a la variación de los factores abióticos, como el agua, luz y la temperatura. Para el caso de *M. ciliolata* no se conocían detalles suficientes sobre la fisiología de germinación de sus semillas. Debido a que es una especie de bosque templado se esperaba que la germinación de semillas se viera beneficiada por las bajas temperaturas, es por ello, que se realizó el tratamiento pregerminativo por estratificación, que se caracteriza por mantener las semillas a temperaturas bajas (4 a 10 °C), asemejando a las condiciones de invierno, por un periodo de tiempo (entre 20 y 60 días) y así romper la latencia del embrión (Arriaga *et al.* 1994, Quiroz *et al.* 2009). El tratamiento pregerminativo por estratificación no tuvo los resultados esperados, sin embargo, se observó que las semillas de *M. ciliolata* resisten a temperaturas mínimas sin perder completamente la viabilidad lo que pudiera ser un indicador de tolerancia a las bajas temperaturas (Hartmann y Kester 1988). Sin embargo, en el presente estudio, detectamos que la germinación de *M. ciliolata* se vio afectada por la temperatura, ya que los tratamientos de estratificación redujeron significativamente su porcentaje de germinación. Así mismo, la especie presentó un mejor desempeño en su germinación al sembrarse directamente en condiciones de temperatura ambiental. Nuestros resultados contrastan con estudios previos de especies de zonas templadas donde han detectado que la estratificación aumenta y acelera la germinación (Figuroa y Jaksic 2004). Por otra parte, se ha detectado que en los bosques templados del centro de México existen dos picos de producción de frutos en los arbustos, uno se presenta en los meses más fríos, entre noviembre y diciembre, y otro pico de fructificación en el mes de abril (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez 2007). En conjunto, estos resultados indican que las posibilidades de reclutamiento en campo de la especie se vean reducidas debido a la sensibilidad de la germinación de sus semillas a las bajas temperaturas. Por otra parte, los resultados obtenidos sobre el proceso de germinación de la especie son alentadores en términos de las estrategias de restauración, ya que las semillas no requieren de ningún tratamiento pregerminativo. Esto reduce el tiempo y recursos económicos, ya que la especie puede ser sembrada directamente sobre el sustrato garantizando un éxito en su germinación, esto es importante ya que cualquiera sea la

alternativa de producción de plantas, ésta debe ser el resultado que se asegure la cantidad y calidad de las plantas esperadas, producidas al más bajo costo posible para su producción en vivero (Quiroz *et al.* 2009). Sin embargo, se recomienda explorar cómo responde el proceso de germinación bajo otras condiciones de temperatura para encontrar un nivel al cual se alcance un mayor porcentaje de germinación que el encontrado en el presente estudio. A su vez, este estudio con las semillas colectadas de dos años diferentes, pero se desconoce cuáles son las consecuencias del almacenamiento sobre la germinación. Por lo tanto, se recomienda realizar más estudios respecto a la pérdida de viabilidad en sus semillas con el paso de los años para conocer la posibilidad de almacenarla en los bancos de semillas. Por otra parte, a pesar de la poca información de esta especie se ha observado que los frutos atraen aves, y las flores atraen polinizadores como abejas nativas silvestres como *Colletes recurvatus*, *Xylocopa azteca*, *Megachile zapoteca*, entre otros (Razo 2015). Además, su nombre común hace referencia al uso de los frutos color azul como tinta para teñir telas y se hierva la planta para bañar a niños asustados (Rancho Santa Elena 2018), esto es relevante ya que puede impactar socialmente haciendo importante su uso en la restauración. Por consiguiente, esta especie nativa pudiera ser recomendada como un actor más en las estrategias de restauración.

Uno de los objetivos centrales del presente trabajo era evaluar el efecto que tiene la interacción con hongos micorrícicos en el desarrollo de la planta para incorporar este tipo de estrategias en los esfuerzos de restauración. En general, detectamos que la infección por los hongos tuvo efectos sobre el crecimiento y despliegue de los atributos funcionales indicadores del uso de recursos. Nuestros resultados, coinciden con las observaciones de estudios previos donde se inoculó con las especies micorrícicas *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* a árboles (*Quercus coccoifera* L. y *Shorea pinanga*) y algunos arbustos como *Cistus albidus* L. En *Shorea pinanga* ambas especies fúngicas como tratamientos independientes mostraron diferencias positivas en el número de hojas, crecimiento en altura, diámetro, peso fresco y seco en comparación del tratamiento control (Turjaman *et al.* 2005), mientras que el inóculo de *S. verrucosum* fue el tratamiento más exitoso en la estimulación del crecimiento en las plántulas de *C. albidus* y *Q. coccoifera* (Caravaca *et al.* 2005, Pera y Parladé 2005).

En nuestro estudio, se detectó que la inoculación dual con *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* fue la que tuvo mayor efecto sobre el crecimiento de la planta. Al final del tratamiento, se observó que las plantas de *M. ciliolata* crecidas bajo este tratamiento tuvieron un mayor crecimiento de la parte aérea (tasa de crecimiento, tamaño de la planta, cobertura y biomasa parte aérea). Esto sugiere que la presencia de los dos hongos incrementó la capacidad de ganancia de agua y nutrientes del suelo por parte de la raíz, lo que potenció la captura de carbono en las hojas, y, por lo tanto, el crecimiento y desarrollo de la planta (Choi *et al.* 2005, Molina *et al.* 2005). A su vez, la presencia de los dos hongos modificó el despliegue de la morfología lo que tiene consecuencias sobre la capacidad de ganancia de recursos pudiendo promover su establecimiento a diferentes condiciones edáficas (Valdés 2011). En particular, se detectó que *M. ciliolata* bajo la inoculación dual desarrolló un mayor volumen de raíces y con un valor bajo de longitud radicular específica (LRE). Si bien un valor bajo de LRE, es indicador de una menor eficiencia en la captura de agua y nutrientes ya que son ligeramente más gruesas, y de lento crecimiento lo que puede favorecer la interacción ectomicorrícica (Colpaert *et al.* 1992, Perea- Estrada *et al.* 2005, Polanía 2009). A su vez, los individuos en el tratamiento dual potencialmente pueden explorar y explotar una mayor superficie de suelo ya que produjeron un mayor volumen de raíz. La inoculación con dos especies de hongos pudiera tener efectos negativos sobre el desempeño de la planta, debido a que estos competirían por los recursos y generarían una mayor demanda de carbohidratos por parte de la planta para su mantenimiento (Pera y Parladé 2005, Carrasco-Hernández *et al.* 2011). Sin embargo, en el presente estudio evidenció que la inoculación dual fue la que tuvo un mayor impacto en el crecimiento de *M. ciliolata* y en el despliegue de sus atributos morfofuncionales. La presencia de los dos hongos favoreció el crecimiento de la planta y modificó el despliegue de la raíz para incrementar la capacidad de ganancia de recursos. Derivado de los resultados del presente, se puede recomendar que en las estrategias de restauración con esta especie de arbusto del sotobosque se utilice la inoculación con este par de hongos micorrícicos. Sin embargo, se recomienda hacer estudios exploratorios en campo, para determinar si la inoculación de las dos especies se mantiene en el ambiente no controlado.

1.7. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se documenta por primera vez la germinación de *Monnina ciliolata*, así como las interacciones micorrícicas con los hongos *Pisolithus arhizus* y *Scleroderma verrucosum*. La germinación de *Monnina ciliolata* inició a los 21 días con el tratamiento control, con una germinación del 63% en el control. Los resultados del experimento muestran que no se requiere de tratamiento pregerminativo, sin embargo, es una semilla que tarda en iniciar el proceso de germinación.

Las especies micorrícicas *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* pueden micorrizar exitosamente plántulas de *Monnina ciliolata* como tratamientos independientes o inoculaciones conjuntas, confiriendo esta última mayores efectos en el crecimiento de la planta. Además, se observó una mayor biomasa de raíz y volumen en este tratamiento, lo que puede derivar a incrementar la capacidad de ganancia de nutrientes del suelo por parte de la raíz.

Los hongos micorrícicos utilizados en este experimento tienen efecto en el incremento de las variables aéreas y radicales de las plántulas de *Monnina ciliolata* para su posible establecimiento en algún lugar perturbado, esto a pesar de tener bajos porcentajes de micorrización. Los resultados sugieren que *M. ciliolata* es una especie que potencialmente se puede utilizar en proyectos de restauración ecológica, además de incentivar su uso por ser una especie nativa de bosques templados, esperando que se obtengan los mismos resultados de este estudio (en condiciones controladas) en campo.

1.8. BIBLIOGRAFÍA

- Arriaga, V., V. Cervantes y A. Vargas-Mena. 1994. **Manual de reforestación con especies nativas: Colecta y preservación de semillas, propagación y manejo de plantas**. México. Instituto Nacional de Ecología, SEDESOL. 219 pp.
- Balvanera, P., H. Cotler *et al.* 2009. **Estado y tendencias de los servicios ecosistémicos, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio**. Conabio, México. 185-245 pp.
- Calva-Soto K. y P. Pavón. 2018. **La restauración ecológica en México: una disciplina emergente en un país deteriorado**. *Madera y bosques* 24(1): e2411135.
- Caravaca, F., M. Alguacil, R. Azcón, J. Parladé, P. Torres y A. Roldán. 2005. **Establishment of two ectomycorrhizal shrub species in a semiarid site after in situ amendment with sugar beet, rock phosphate, and *Aspergillus niger***. *Microbial Ecology* 49: 73-82.
- Carrasco-Hernández, V., J. Pérez-Moreno, V. Espinosa-Hernández, J. J. Almaraz-Suárez, R. Quintero-Lizaola y M. Torres. 2011. **Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales**. *Revista chilena de historia natural* 84(1): 83-96.
- Chávez-Vergara B. y F. García-Oliva. 2013. **Consecuencias funcionales de la diferenciación taxonómica entre secciones del género *Quercus*: el caso de la reabsorción de nutrientes**. *Biológicas* 15(1): 1-7.
- Chimal-Hernández, A., M. González-Ibarra y C. Hernández-Díaz. 2013. **La flora vascular del parque estatal El Faro, Tlalmanalco de Velázquez, Estado de México**. Universidad Autónoma Metropolitana. Cd. Mx., México. 176 pp.
- Choi, D.S., A.M. Quoreshi, Y. Maruyama, H.O. Jin y T. Koike. 2005. **Effect of ectomycorrhizal infection on growth and photosynthetic characteristics of *Pinus densiflora* seedlings grown under elevated CO₂ concentrations**. *Photosynthetica* 43 (2):223-229.

- Colpaert, J. V., J. A. Vanassche and K. Lijstens. 1992. **The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth-response of *Pinus sylvestris* L.** *NewPhytol* 120: 127-135.
- CONAFOR, Comisión Nacional Forestal. 2009. **Restauración de ecosistemas forestales. Guía básica para comunicadores. 1era Edición.** Zapopan, Jalisco, México. 63 pp.
- Cornejo-Tenorio G. y G. Ibarra-Manríquez. 2007. **Plant reproductive phenology in a temperate forest of the Monarch Butterfly biosphere reserve, Mexico.** *Interciencia* 32(7): 445-452.
- Doria J. 2010. **Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento.** *Cultivos tropicales* 31(1): 1-10.
- Figueroa J. A. y F. M. Jaksic. 2004. **Latencia y banco de semillas en plantas de la región mediterránea de Chile central.** *Rev. Chilena Historia Natural* 77(1): 201-215.
- Gómez-Romero M., R. Lindig-Cisneros y E. del Val. 2015. **Efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus pseudostrobus* y *Pisolithus tinctorius*.** *Botanical Sciences* 93: 731-740.
- Gómez- Romero, M., E. De la Barrera Montppellier, J. Villegas y R. Lindig- Cisneros. 2013. **Fertilización y asociación con especies pioneras herbáceas en el crecimiento de *Pinus pseudostrobus*.** *Phyton*. 82:135-143.
- Harris-Valle, C., M. Esqueda, E. M. Valenzuela-Soto y A. E. Castellanos. 2009. **Tolerancia al estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrízico arbuscular: metabolismo energético y fisiología.** *Revista fitotecnia mexicana* 32(4): 265-271.
- Hartmann H. y F. Kester.1988. **Propagación de plantas. Principios y prácticas.** México. Compañía Editorial Continental S. A. 760 pp.
- Hernández, L., P. Guadarrama, I. Sánchez-Gallen, J. Ramos-Zapata. 2008. **Micorriza arbuscular: colonización intrarradical y extracción de esporas.** En: Álvarez-

Sánchez, J; Monroy-Ata, A (comp.). **Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración.** Las prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F. pp. 1-16.

Molina, L., M., L. Mahecha y M. Medina. 2005. **Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles.** *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18: 162-175.

Parra Y. y F. Cuevas. 2002. **Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura.** *Cultivos Tropicales* 23(3): 31-41.

Pera J. y J. Parladé. 2005. **Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España.** *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales* 14(3):419-433.

Perea-Estrada, V.M., J. Pérez-Moreno, M. L. Isla-de Bauer, M. E. Fenn, A. Trinidad-Santos y T. Hernández-Tejeda. 2005. **Fertilización, tipos de suelo y hongos micorrízicos y endófitos radicales asociados al eucalipto.** *Terra Latinoamericana* 23(2):201-212.

Piñero, D., J. Caballero- Mellado, D. Cabrera- Toledo, C. Canteros, A. Casas, América Castañeda, A. Castillo, R. Cerritos, O. Chassin-Noria, P. Colunga-García, P. Delgado, P. Díaz-Jaimes, L. Eguiarte, A. Escalante, B. Espinoza, A. Fleury, S.Flores, G. Fragoso, J. González-Astorga, V. Islas, E. Martínez, F. Martínez, J. Martínez-Castillo, A. Mastretta, R. Medellín, L. Medrano-González, F. Molina-Freaner, B. Morales, A. Munguía, E. Payró de la Cruz, M. Reyes-Montes, M. Robles, G. Rodríguez-Arellanes, L. Rojas-Bracho, R. Romero-Martínez, J. Sahaza-Cardona, R. Salas, E. Sciutto, C. Baker, Y. Schramm, C. Silva, V. Souza, M. Taylor, J. Urbán, M. Uribe-Alcocer, M. Vázquez, E. Vázquez-Domínguez, A.Vovides, A. Wegier, A. Zaldívar y G. Zúñiga. 2008. **La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de**

México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México. 437-494 pp.

Polanía, J. A., I. Rao, S. Beebe y R. García. 2009. **Desarrollo y distribución de raíces bajo estrés por sequía en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en un sistema de tubos con suelo.** *Agronomía Colombiana* 27(1): 25-32.

Quiroz, M.I., E. R. García, M. O. González, P. G. P. Chung y H. G. Soto. 2009. **Vivero forestal. Producción de plantas nativas a raíz cubierta.** Concepción, Chile: Centro Tecnológico de la planta forestal, Gobierno de Chile. 128 pp.

Ramírez-Herrera, C., J.J. Vargas- Hernández y J. López-Upton. 2005. **Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*.** *Acta Botánica Mexicana* 72: 1-16.

Rancho Santa Elena. 2018. Plantas de Santa Elena. <http://santaelena.com.mx/wp-content/uploads/2019/04/plantas-2018-pdf.pdf> (25 de enero 2021)

Razo- León Á. E. 2015. **(Hymenoptera: Apoidea: Anthophila) y sus interacciones con la flora en la Sierra de Quila, Tecolotlán, Jalisco.** Tesis Maestría. Universidad de Guadalajara. 129 pp.

Sánchez-González A. 2008. **Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México.** *Madera y Bosques* 14(1):107-120.

Sánchez-Ramos G. y R. Dirzo. 2014. **El bosque mesófilo de montaña: un ecosistema prioritario amenazado.** In: Gual-Díaz M. y A. Rendón-Correa, comps. **Bosques mesófilos de montaña de México: diversidad, ecología y manejo.** CONABIO. México, D.F. pp. 109-139.

Thomas, E., R. Jalonen, J. Loo, D. Boshier, L. Gallo, S. Cavers, S. Bordács, P. Smith y M. Bozzano. 2014. Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. *Forest Ecology and Management* 333: 66-75.

Tien, T. M., M. H. Gaskins y D. H. Hubbell. 1979. **Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet**

(*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environment Microbiology* 37: 1016- 1024.

Turjaman, M., Y. Tamai, H. Segah, S.H. Limin, J.Y. Cha, M. Osaki y K. Tawarayaya. 2005. **Inoculation with the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus arhizus* and *Scleroderma* sp. improves early growth of *Shorea pinanga* nursery seedlings**. *New Forests* 30 (1), 67-73.

Uribe-Salas, D., M. L. España-Boquera y A. Torres-Miranda. 2019. **Aspectos biogeográficos y ecológicos del género *Quercus* (Fagaceae) en Michoacán, México**. *Acta Botánica Mexicana* 126: e1342.

Valdés Ramírez M. 2011. **El cambio climático y el estado simbiótico de los árboles del bosque**. *Revista mexicana de ciencias forestales* 2(5): 05-13.

Valencia A. S. 2004. **Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México**. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (75):33-53.

Varela S. A. y A. Aparicio. 2011. **Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos**. En: Varela, S. A. y Aparicio, A. (eds.). **Serie técnica: “Sistemas Forestales Integrados” Área Forestal - INTA EEA Bariloche Sección: “Silvicultura en vivero”**. Cuadernillo N° 3: ISSN: 1853-4775 pp.1-10.

Vázquez-Yanes, C., A. I. Batis Muños, M. I. Alcocer Silva, M. Gual Díaz y C. Sánchez Dirzo. 1999. **Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación**. Reporte técnico del proyecto J084. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/inicio.pdf

Villaseñor J.L. 2010. **El Bosque Húmedo de Montaña en México y sus Plantas Vasculares: Catálogo Florístico-Taxonómico. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. Universidad nacional autónoma de México. México. 40 pp.

Williams-Linera G. 2015. **El bosque mesófilo de montaña, veinte años de investigación ecológica ¿qué hemos hecho y hacia dónde vamos?**. *Madera y bosques* 21: 51-61.

CAPÍTULO II. INFLUENCIA DE HONGOS MICORRÍDICOS Y UNA BACTERIA REGULADORA DE CRECIMIENTO SOBRE EL DESARROLLO DE *Tecoma stans*

1.1. RESUMEN

Los lugares afectados tras un disturbio antropogénico o natural requieren de intervención para su recuperación; es importante el empleo de especies nativas, debido a las adaptaciones bióticas y abióticas del sitio. Sin embargo, poco se conoce de estrategias que incrementen la germinación en estas especies. El arbusto *Tecoma stans* (L.) Juss. Ex Kunth (1-10 m) se considera una especie con potencial para restauración, por su amplia distribución. Para su establecimiento, se propone utilizar hongos micorrícicos, por el efecto positivo en el crecimiento y supervivencia, y la regeneración de ecosistemas degradados. Los objetivos de este estudio son conocer el efecto de tratamientos pregerminativos, y evaluar la interacción con hongos micorrícicos y con una bacteria en plantas de *T. stans*. El experimento de germinación consta de un tratamiento y control con 100 réplicas cada uno, con una semilla por contenedor, riego a capacidad de campo y evaluación cada tercer día. Se obtuvo velocidad y porcentaje de germinación. Para la micorrización, se colocó una semilla por contenedor y se inoculó; se establecieron cinco tratamientos y un control (50 réplicas), con mezcla fibra de coco-agrolita (70%-30%). Se evaluaron durante seis meses diversas variables tanto de las partes aéreas como radicales, así como el porcentaje de micorrización. Como resultados, la germinación de semillas de *T. stans* inició a los nueve días y germinó un 83% de las semillas. En las interacciones, se obtuvo que la inoculación con *S. verrucosum* confiere diferencias positivas en la parte aérea, en la raíz benefició en volumen, diámetro y longitud de raíz. Se concluye que no es necesario de tratamientos pregerminativos para la germinación; la inoculación micorrícica en plantas de *T. stans* tiene efecto sobre el crecimiento aéreo y radical. Esto puede conferirle ventajas importantes en condiciones de campo en sitios perturbados como especie potencial para proyectos de restauración ecológica.

Palabras clave: *Scleroderma verrucosum*, germinación, restauración

1.2. ABSTRACT

The affected places by a natural or anthropogenic degradation need intervention to be recover easier. This can be possible through the reforestation or restoration projects, according to the place damage conditions, the usage of native species gets important due their biotic and abiotic adaptations. Nevertheless, the knowledge of treatments that increase the native species germination is still shallow. The shrub *Tecoma stans* (L.) Juss. exKunth (1-10 meters tall) is considered a restoration potential species due its wide distribution. For the establishment, mycorrhizal fungi can be used, due to its potential effect on growth and survival, facilitating the assimilation of nutrients and degraded ecosystems regeneration. The objectives in this study are the pregerminative treatments knowledge by four mycorrhizal fungi and one bacterias species in *T. stans* plants, and evaluate the mycorrhizal interaction. The germination experiment had one treatment and a control group with 100 replicates each. One seed per plastic container was placed in a mixture of substrates with peat-moss-agrolite (70% -30%). It was irrigated beneath field capacity and evaluated every third day. Various aerial and radical variables were evaluated for six months, in addition to the percentage of mycorrhization. As results, the seeds began germination at nine days with 83% of *T. stans* plants. In the mycorrhizal interactions, it was obtained that the inoculation with *S. verrucosum* confers positive differences in the aerial parts, on the other hand, in the root part, it benefited with greater volume, diameter and root length. It is concluded that pregerminative treatments are not require to initiate germination. Inoculation with mycorrhizal fungi in *T. stans* plants has an effect on aerial and radical growth. Because all of this, *T. stans* can get significant advantages in its establishment under conditions at disturbed sites as a potential species for ecological restoration projects.

Key words: *Scleroderma verrucosum*, germination, restauration

1.3. INTRODUCCIÓN

La degradación de los bosques depende del grado de amenaza que sufren estos ecosistemas afectados por la interacción de varios componentes: densidad poblacional, situación socioeconómica de la comunidad, intereses políticos nacionales e internacionales que determinan la capacidad de un bosque de suministrar bienes y servicios muchas veces haciendo uso irracional de estos recursos provocando la pérdida de especies e interacciones biológicas (Meli 2003, Sabogal *et al.* 2015). Los lugares afectados tras un disturbio antropogénico o natural requieren de intervención para facilitar su recuperación, como lo puede ser la reforestación o algún tipo de restauración. Por lo regular, estos sitios tienen poca agua o son de difícil acceso, generando sequías y estrés hídrico, limitando los riegos de auxilio en épocas de estiaje lo que provoca un estrés y muerte en algunas las plantas que se utilizan normalmente en los proyectos de restauración (Cruz 1999, Luna- Flores *et al.* 2012). Algunas estrategias para mitigar la pérdida de plantas tras una reforestación en campo es realizar inoculaciones con hongos micorrícicos, ya que le confiere resistencia a la sequía del huésped. A su vez, se ha observado que bajo la presencia de hongos micorrizógenos ayudan en la retención de agua de la rizosfera (Pera y Parladé 2005, Gómez- Romero *et al.* 2015). El grado de especificidad en la interacción puede determinar su supervivencia de los organismos a condiciones ambientales adversas, tales como sequía y salinidad (Harris-Valle *et al.* 2009). Se ha observado que cuando la planta establece una interacción con hongos endomicorrícicos mejora su crecimiento, probablemente vinculado a una mejor adquisición de P (fósforo) y otros nutrientes. A su vez, se ha detectado que después de un evento de sequía plantas inoculadas con hongos micorrícicos han mostrado una mayor asimilación de nitrógeno y una mejor nutrición de nitrógeno durante el desarrollo y la recuperación de la sequía, con indicadores como menos marchitamiento o necrosis de las hojas, aumento de los movimientos protectores de las hojas, más y menos abscisión de las hojas, mayor extracción de agua del suelo y recuperación más rápida después de la sequía (Augé 2001, Guadarrama *et al.* 2004). Por otra parte, los hongos micorrícicos arbusculares mejoran el crecimiento y estado hídrico de las plantas en condiciones de estrés hídrico. Tal efecto benéfico de la simbiosis, modifica no solamente la asimilación de nutrientes,

sino también la adquisición y distribución de fotoasimilados y agua en la planta mediante las hifas externas que también contribuyen a dar estructura y estabilidad al suelo (Guadarrama *et al.* 2004). Debido a que durante la simbiosis la planta transfiere al hongo parte de sus fotoasimilados, debe existir un balance entre el costo de transferir carbono al hongo y los beneficios que obtiene la planta para adaptarse a las condiciones de estrés (Harley 1989). Además de los beneficios que les conceden los hongos micorrícicos a las plantas también existen otros agentes simbióticos como los reguladores de crecimiento, uno de ellos es la bacteria promotora de crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense*. Su interacción se ha demostrado en diversos cultivos y dentro de sus principales beneficios se encuentran: la proliferación de raíces laterales y pelos radiculares y aumentando las superficies absorbentes de nutrientes, y en consecuencia se espera un aumento en el crecimiento, así como en el peso seco de las plantas (Tien *et al.* 1979, Parra y Cuevas, 2002). Además, la inoculación de las raíces de una planta con más de un microorganismo, con esperados efectos benéficos para el vegetal, se ha ensayado combinando hongos ectomicorrícicos y bacterias promotoras del crecimiento de plantas, dando resultados que sugieren en algunas ocasiones fundamentales las relaciones entre más de un organismo en el huésped (Pera y Parladé 2005).

Sin embargo, aparte de los beneficios que conlleva la inoculación de plantas con hongos micorrícicos, también es importante implementar el uso de especies nativas resistentes a estrés hídrico como puede ser *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, un árbol o arbusto bajo. que se encuentra en la Lista de Especies para Restauración de la UICN (ORMACC 2015) como especie con potencial para restauración a las que resisten la sequía (Comisión Nacional Forestal- SEMARNAT). Se ha demostrado que las semillas de *T. stans* germinan bien en las áreas abiertas (sol directo) en el rango de 15 a 40 ° C con la ocurrencia de un alto reclutamiento de plántulas que indica el potencial de invasión de la especie en tales condiciones de luz, considerándola por su agresividad de establecimiento ideal para programas de restauración (Socolowski *et al.* 2008). También es una especie muy útil para la conservación de suelos, pues en pocos años produce una red de raíces que favorece la estabilización y retención del suelo en suelos deforestados (Alvarado- López *et al.* 2014).

Algunos estudios muestran que las micorrizas tuvieron efectos negativos en el proceso de germinación para *T. stans* con la interacción entre el hongo endomicorrícico *Rhizophagus intraradices*, sin ser evaluado el crecimiento de las plántulas (Ballina - Gómez *et al.* 2017). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar los efectos que tienen sobre el desarrollo de *Tecoma stans* la presencia de hongos endomicorrícicos y una bacteria promotora del crecimiento.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de semillas de *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth se realizó en el mes de diciembre de 2018 en la comunidad del Nispo, Municipio de Copándaro de Galeana, Michoacán de Ocampo (Longitud -101.225278 y Latitud 19.887778) a 1860 m snm. Se colectaron los frutos maduros, posteriormente se removieron las semillas manualmente, se colocaron en bolsas herméticas para almacenarse en un lugar seco y fresco. El clima que se presenta en la zona de estudio, es templado subhúmedo con lluvias en verano, y se caracteriza porque su temperatura media anual oscila entre los 7.8 y 23.4 °C. Tiene una precipitación pluvial anual de 849.6 milímetros, y vientos dominantes que provienen del noreste al suroeste. La vegetación está compuesta principalmente por agricultura de riego, selva baja caducifolia, agricultura de temporal, entre otros. Aunque la mayor parte del territorio municipal está cubierto por las aguas de La Laguna de Cuitzeo (H. Ayuntamiento de Copándaro).

Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth es un árbol o arbusto bajo, perennifolio o caducifolio, de 1 a 10 m (hasta 20 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 25 cm (Martínez y Ramos 2012), contiene semillas pequeñas, aplanadas y aladas, que son dispersadas por el viento (Comisión Nacional Forestal – SEMARNAT s/f). Su distribución va desde Estados Unidos a Sudamérica, incluyendo las islas Bahamas, desde nivel del mar hasta los 2800 m snm (Gentry 1992). Se considera una especie con potencial para restauración como lo menciona la Lista de Especies para Restauración de la UICN porque ayuda a la conservación del suelo y control de la erosión, estabilización de cauces fluviales, protección de mantos acuíferos y restauración de yermos (ORMACC 2015), resiste a la sequía (Comisión Nacional Forestal- SEMARNAT s/f). Para acelerar el proceso de germinación de esta especie

no son necesarios tratamientos pregerminativos, no obstante, se recomienda la imbibición de las semillas en agua templada las 24 horas previas a la siembra. Las semillas germinan entre los 7(-20) días posteriores a la siembra, finalizando a los 20(-40) días de la misma, con un porcentaje de germinación de entre 75 y 89%. Se pueden almacenar en condiciones ambientales, manteniéndose viables hasta por siete meses. Propágulos del hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices* y de la bacteria *Azospirillum brasilense* se obtuvieron del laboratorio BIOSUSTENTA - Corporativo De Desarrollo Sustentable, S.A. DE C.V. y las esporas de *Pisolithus arhizus* se obtuvieron de la empresa Plant Health Care de México S. de R.L. de C.V. Por otra parte, se colectaron cuerpos fructíferos de *Scleroderma verrucosum* en agosto de 2019 en la estación “Vasco de Quiroga” en la localidad de Toreo el Alto, municipio de Uruapan Michoacán entre los 19°29’27.09” latitud norte y los 102° 00’23.24” longitud oeste en el Bosque mesófilo de montaña.

Rhizophagus intraradices N.C. Schenck & G.S. Sm. antes conocido como *Glomus intraradices* N.C. Schenck & G.S. Sm, es miembro de la familia *Glomeromycota* y ha sido ampliamente utilizado para la micorrización de distintas especies vegetales como *Fraxinus uhdei*, incluso se ha llegado a emplear en conjunto con *Pisolithus arhizus* favoreciendo el desempeño de las plantas (Báez- Pérez *et al.*, 2015). En el trabajo realizado por Leyva- Morales *et al.* (2019) con la especie *Trifolium subterraneum* bajo estrés hídrico, *R. intraradices* mantuvo hifas de mayor diámetro, los cambios sugirieron una compensación para evitar la desecación y almacenar recursos y mantener la exploración del suelo y la capacidad de absorción de agua (Imagen 1 a).

Scleroderma verrucosum (Bull.) Pers. (Imagen 1 b) es un hongo globoso ectomicorrízico empleado para micorrizar árboles y arbustos como *Cistus albidus* y *Quercus coccifera* con inoculaciones exitosas dando como resultado un efecto positivo y significativo en el crecimiento de las plantas desarrolladas en vivero en comparación con el grupo de plantas control (Pera y Parladé 2005).

Pisolithus arhizus (Scop.) Rauschert (Imagen 1 c) es un hongo gasteroide, globoso, ectomicorrízico que ha sido utilizado en la micorrización de distintos árboles y arbustos, teniendo un efecto positivo en el crecimiento, así como, en el volumen y la longitud de

la raíz, aspectos que son muy importantes para el establecimiento de las plantas en condiciones naturales (Gómez- Romero *et al.* 2015).

Azospirillum brasilense es una bacteria que se caracteriza por presentar forma de varilla o bacilar, es una gram negativa, con movimiento vibratorio característico y patrón flagelar mixto. Tamaño de 0.8-1 μm de largo y 2-4 μm de ancho (Bashan y Holguin 1997). Produce una hormona de crecimiento vegetal que al aplicarse en la raíz de las plantas produce el aumento en volumen de la misma, permitiendo una mejor asimilación de los nutrientes del suelo, puede inhibir a los patógenos de la raíz, fija el nitrógeno atmosférico y permite solubilizar el fósforo como en cultivo de la caña de azúcar (Pérez y Casas, 2006). También se ha demostrado que en presencia de *A. brasilense* se aumenta significativamente la cantidad de raíces laterales en la cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Zepeda- Guzmán *et al.* 2018) (Imagen 1 d).



Imagen 1. Especies del estudio. a) Planta de *Tecoma stans* en floración; b) Cuerpo fructífero del hongo ectomicorrícico *Scleroderma verrucosum*; c) Cuerpo fructífero del hongo ectomicorrícico *Pisolithus arhizus*; d) Bacilos de la bacteria *Azospirillum brasilense*.

Experimento de germinación.

Se colocó una semilla por tubete con capacidad de 100cm³, en sustrato en combinación de 70% turba (peat-moss) y 30% agrolita. Se inició el 21 de febrero (dos meses después de colectadas las semillas) con un tratamiento de imbibición durante 48 horas y un control, cada uno con 100 réplicas. Se regaron y revisaron cada tercer

día contabilizando la germinación acumulada hasta dejar de presentar cambios. Se obtuvo la velocidad y porcentaje de germinación por tratamiento, con la finalidad de determinar el mejor tratamiento pregerminativo y cotejar lo mencionado en la literatura.

Preparación del inoculante micorrícico

En el caso de la especie *Scleroderma verrucosum* los cuerpos fructíferos (colectados en agosto 2019) se deshidrataron para su posterior pulverización de las partes fértiles y así realizar el conteo de esporas viables (teñidas) en cámara de Neubauer. Para la muestra de viabilidad se tomó una muestra de 0.1gr del hongo molido al que se le agregó 1ml de Azul de tetrazolio, se dejó reposar sin luz a una temperatura de 22°C por 72 h para realizar el conteo de esporas teñidas (viables) con cámara de Neubauer, dando una viabilidad de 7,650,000 esporas viables por gramo de inóculo puro, se hizo la homogenización con turba micronizada para el medio millón de esporas por 0.5gr para cada dosis individual. La especie *Pisolithus arhizus* con una viabilidad de 250 millones de esporas por gramo en el inóculo puro, para su manejo este fue diluido en turba micronizada hasta obtener medio millón de esporas en 0.5gr del hongo micorrícico. Para la inoculación del hongo *Rhizophagus intraradices*, así como la bacteria *Azospirillum brasilense* se utilizaron inoculantes líquidos, por lo tanto, para tener la misma proporción utilizada que en los inoculantes secos se utilizó 0.5 ml equivalente al medio millón de esporas. En cuanto *A. brasilense* se utilizó la cantidad de 0.5 ml con una concentración de 2.5×10^5 UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

Experimento de inoculación en presencia de hongos micorrícicos y una bacteria promotora de crecimiento

Las semillas de *Tecoma stans* se germinaron (quince meses después de colectadas) después de ser embebidas durante 48 horas en agua, se sembró una semilla por cada contenedor. Este consiste en tubetes rígido de plástico con capacidad de 100 cm³, como sustrato se utilizó polvillo de coco (70%) y agrolita (30%), germinación. El diseño experimental es al azar, con seis tratamientos con 50 réplicas cada tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos para la propagación de plantas de *Tecoma stans* con hongos micorrícicos y una bacteria promotora de crecimiento, donde + es con la presencia del hongo/bacteria y – con la ausencia del hongo/bacteria.

Tratamiento de inoculación	<i>Rhizophagus intraradices</i>	<i>Pisolithus arhizus</i>	<i>Scleroderma verrucosum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>
Control	-	-	-	-
Individual	+	-	-	-
Individual	-	+	-	-
Individual	-	-	+	-
Individual	-	-	-	+
Triple	+	+	-	+

El crecimiento en altura, diámetro a la altura de la base (DAB) y la cobertura mediante dos diámetros con la fórmula de la elipse ($\pi r_1 r_2$), se evaluarán mensualmente.

Análisis de raíz y hojas

Con el fin de demostrar la interacción y el efecto de las inoculaciones en la raíz de las plantas de *Tecoma stans*, una vez transcurrido los seis meses de evaluación de los experimentos, se llevó a cabo la cosecha de cinco ejemplares por tratamiento para evaluar por método destructivo la parte aérea y radical.

Se realizó la limpieza de las raíces dos horas antes del análisis retirando la mezcla de sustrato mediante agua corriente y coladores de plástico para evitar dañar y perder las raíces durante el proceso. Se colocó el tallo (con las hojas) y la raíz de forma independiente por cada individuo para su análisis. Para el escaneo de hojas y raíz se utilizó un escáner EPSON PERFECTION V800 Photo y el programa WinRHIZO. Una vez realizado el escaneo de hojas y raíz, se colocó la parte aérea y radical por separado en bolsas de papel etiquetadas por individuo para su secado en horno a 70 ° C. Posteriormente, cada componente se pesó de manera individual con una balanza analítica (0.0001 g). Las variables analizadas fueron densidad de raíz (peso seco de raíz/ volumen de raíz) (g/cm^3), longitud total del sistema radicular (cm), diámetro promedio de la raíz (mm), volumen de raíz (cm^3), número de puntas, biomasa aérea (g), Área Foliar Específica (AFE: cm^2/g), biomasa del sistema radicular, el cociente

longitud del sistema radicular entre el área foliar total, Longitud Radicular Específica (LRE: longitud sistema radicular/ peso seco del sistema radicular), número de puntas/ área foliar, cociente peso seco raíz/ peso seco parte aérea (R:S Ratio). Además, se obtuvo la tasa de crecimiento relativo (TCR) con el cociente de la diferencia de la altura final menos la inicial entre la altura final. Posteriormente se siguió la técnica de Hernández *et al.* (2008) (modificado de Phillips y Hayman 1970) para la tinción de las raíces y realizar el porcentaje de micorrización. Para el porcentaje de micorrización se utilizaron 10 muestras por individuo, se hizo el conteo de las muestras con signos de micorrización (hifas) para obtener el promedio por tratamiento, esto mediante la utilización de un microscopio con cámara marca AmScope, se utilizó el objetivo 40X principalmente para mejor detalle de las hifas, también se utilizó 20X y 100X para algunas fotografías.

Análisis de datos

Los datos de germinación se analizaron mediante una prueba de riesgos proporcionales de Cox, Chi- cuadrado y un Modelo Linear Generalizado (GLM). Los datos de crecimiento, biomasa y arquitectura de raíz, fueron analizados mediante análisis de varianza y una prueba de comparaciones múltiples Tukey. Los análisis se realizaron con los programas estadísticos R y JMP Versión 8 con ayuda de Excel para la captura de datos.

1.5. RESULTADOS

Experimento de germinación.

La germinación inicia a los nueve días tanto en el control como en tratamiento de imbibición por 48 h. Se dejaron de percibir cambios hasta el día 42, en ambos tratamientos se obtuvo un porcentaje de germinación del 83% (Figura 1). Las semillas de la especie *Tecoma stans* no requieren de tratamiento pregerminativo ($\chi^2 = 2.85$; $P = 0.09$) como lo menciona la literatura (ORMACC, 2015), por lo que se puede colocar la semilla directamente en el sustrato.

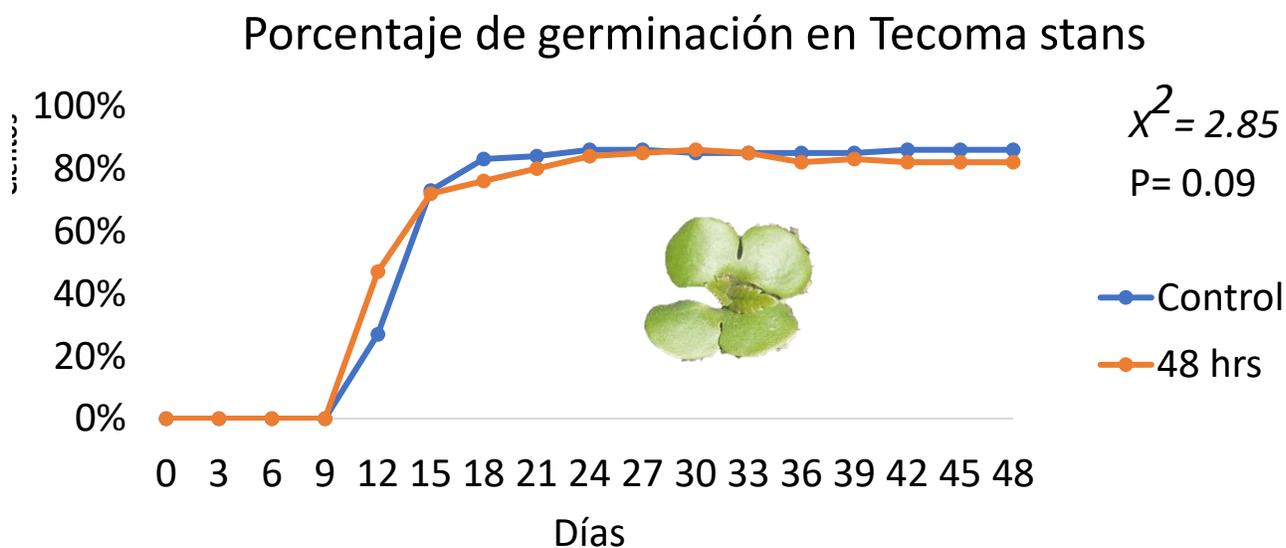


Figura 1. Germinación acumulada de *Tecoma stans*. De color azul se muestra el tratamiento control y de color naranja se muestra el tratamiento de imbibición de agua 48 h. En la esquina superior derecha se muestra la prueba de chi-cuadrado y GLM.

Experimento de propagación en presencia de hongos micorrícicos y una bacteria promotora de crecimiento

Crecimiento

Después de seis meses de mediciones mensuales, se observaron diferencias entre los tratamientos en plantas de *Tecoma stans*. En la Imagen 2, se observan los cinco

tratamientos y el control, donde se muestra que el tratamiento con inóculo de esporas de *S. verrucosum* es el tratamiento con el mayor número de hojas, altura y cobertura.

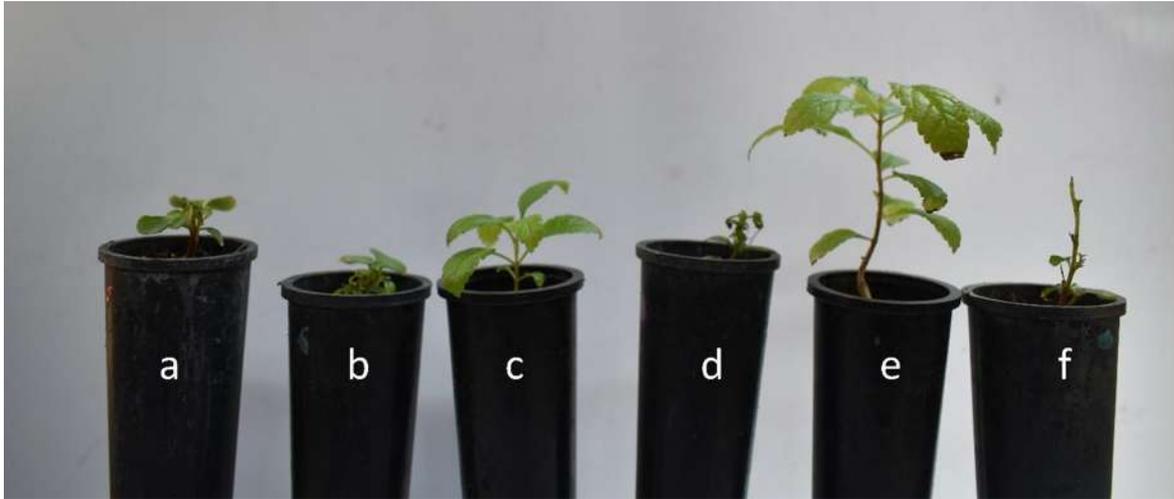


Imagen 2. Crecimiento de las plantas de *Tecoma stans* bajo los distintos tratamientos del experimento de inoculación. Los tratamientos: a tratamiento control; b tratamiento con *Rhizophagus intraradices*; c tratamiento con la bacteria *Azospirillum brasilense*; d tratamiento con *Pisolithus arhizus*; e tratamiento con *Scleroderma verrucosum*; f tratamiento triple *Azospirillum brasilense*, *Pisolithus arhizus* y *Rhizophagus intraradices*.

Para las variables de crecimiento analizadas se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en la altura, número de hojas, cobertura final y en la tasa relativa de crecimiento (Tabla 2; Figura 2 y 3). En general, con el tratamiento de inoculación con *S. verrucosum* se promovió un mayor crecimiento de *Tecoma stans* de la parte aérea, ya que al final del experimento se observa claramente cómo este tratamiento contiene plantas más altas, con mayor cobertura y número de hojas, en comparación con el resto de los tratamientos desarrollados (Tabla 2, Figura 2; Imagen 2 y 3).

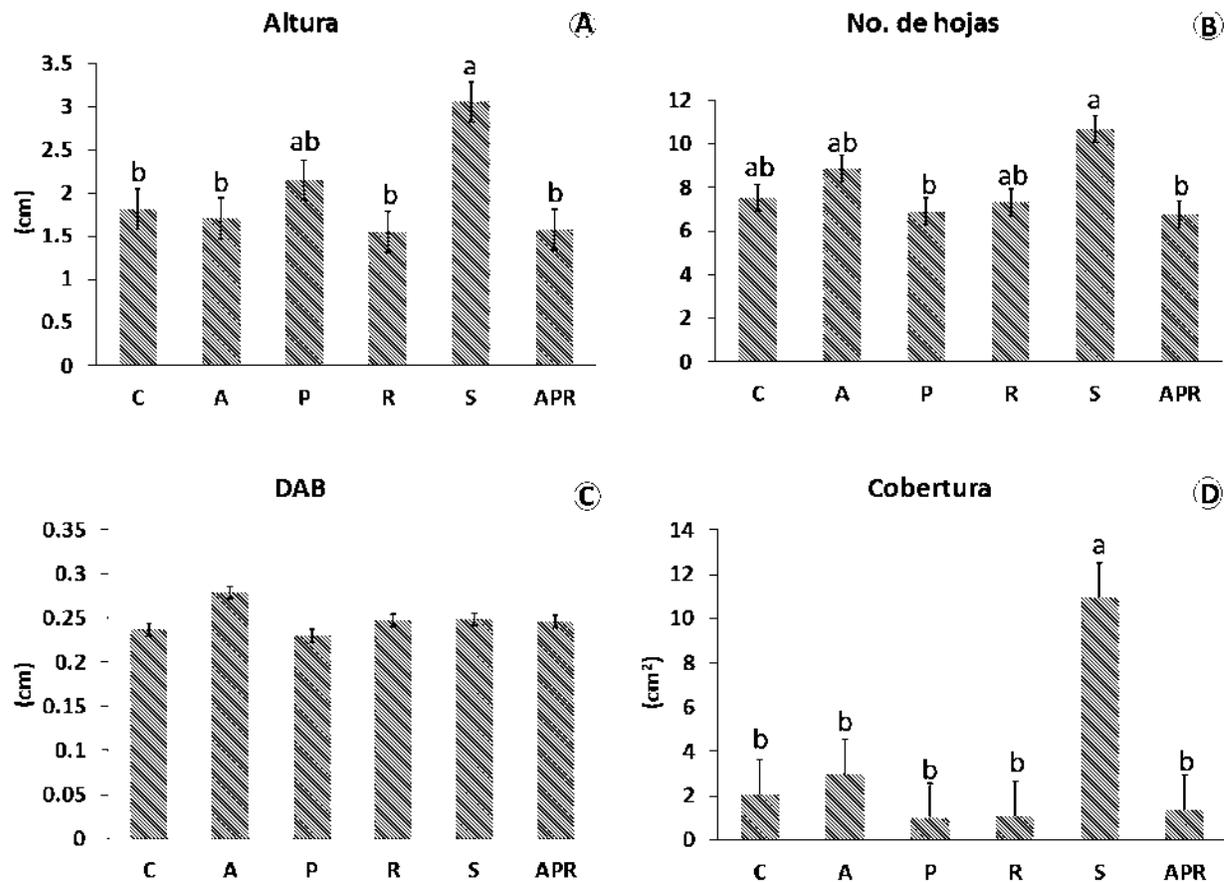


Figura 2. Variables de crecimiento final entre los distintos tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos. Variables de crecimiento: A) Altura; B) No. de hojas; C) DAB; D) Cobertura. Acrónimos de los tratamientos: C=Control, A=*Azospirillum brasilense*, P=*Pisolithus arhizus*, R= *Rhizophagus intraradices*, S= *Scleroderma verrucosum*, APR=*A. brasilense*, *P. arhizus* y *R. intraradices*. Las barras representan el error estándar. Las letras distintas representan diferencias significativas exploradas con la prueba de *Tukey*.



Imagen 3. Plantas de *Tecoma stans* por tratamiento de inoculación, en la imagen se aprecia las diferencias entre cobertura y altura final. a) tratamiento control; b) tratamiento con *Azospirillum brasilense*; c) tratamiento con *Pisolithus arhizus*; d) tratamiento con *Rhizophagus intraradices*; e) tratamiento con *Sclerotium verrucosum*; f) tratamiento con inoculación triple; g) *A. brasilense*, *P. arhizus* y *R. intraradices*).

Atributos morfofuncionales de raíz y hojas

Para los atributos morfofuncionales de la hoja, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2).

Para el caso de los atributos morfofuncionales de la raíz, la interacción con el inóculo del hongo también tuvo efectos sobre los mismos. En general, en el tratamiento con el hongo *Sclerotium verrucosum* *T. stans* generó un sistema radicular con una mayor biomasa radical y un mayor valor de longitud de raíz (raíces más largas) indicando mayor capacidad para explorar los nutrientes provenientes del suelo (Tabla 2, Figura 3). Por otra parte, en la variable volumen de raíz se observó que los individuos del tratamiento con *Sclerotium verrucosum* tienen valores altos en comparación con los

otros tratamientos desarrollados (Tabla 2, Figura 3). También se detectaron diferencias significativas en la variable R:S Ratio (Tabla 2); el tratamiento con *Rhizophagus* fue el que presentó un valor mayor al resto de los tratamientos. En la imagen 4 se observa la arquitectura de la raíz por cada tratamiento.

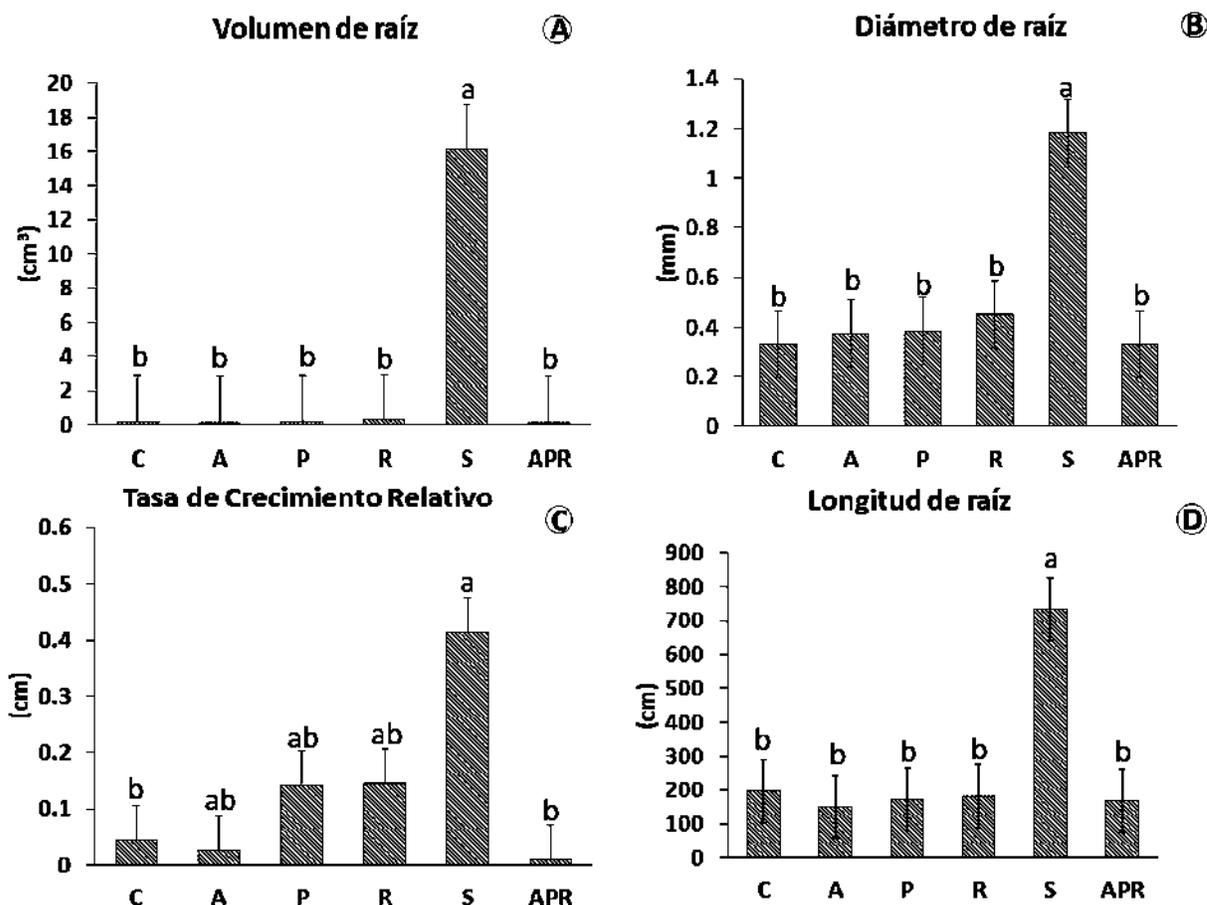


Figura 3. Variables de atributos morfofuncionales de raíz y tasa de crecimiento relativo. Variables: A) Volumen de raíz; B) Diámetro de raíz; C) TCR; D) Longitud de raíz. Acrónimos de los tratamientos: C=Control, A= *Azospirillum brasilense*, P=*Pisolithus arhizus*, R= *Rhizophagus intraradices*, S= *Sclerotinia verrucosum*, APR=*A. brasilense*, *P. arhizus* y *R. intraradices*. Las barras representan el error estándar. Las letras distintas representan diferencias significativas exploradas con la prueba de Tukey.

Tabla 2. Atributos morfofuncionales de *T. stans*, bajo los distintos tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos. En la tabla se muestran los valores promedios de cada atributo obtenidos bajo el tratamiento Control, inoculación con *Azospirillum brasilense* (A), inoculación con *P. arhizus* (P), inoculación con *Rhizophagus intraradices* (R), inoculación con *S. verrucosum* (S) e inoculación triple con *A. brasilense* + *P. arhizus* + *R. intraradices* (APR). A su vez, se muestran los estadísticos F y el valor de P obtenido a partir del análisis de varianza. Los valores en negritas y con * indican diferencias significativas. Las diferencias entre los tratamientos se exploraron con una prueba de *Tukey* y se observan con letras distintas. La descripción de los acrónimos se puede ver en la sección de métodos. por cada variable en plantas de *Tecoma stans*.

Variable	Promedio						F	P
	Control	A	P	R	S	APR		
Altura (cm)	1.81 b	1.63 b	2.07 ab	1.55 b	3.05 b	1.52 b	4.008	0.002*
DAB (cm)	2.04	2.79	2.3	2.47	2.48	2.46	0.474	0.795
Cobertura (cm ²)	2.04 b	2.79 b	0.945 b	1.063 b	10.93 a	1.32 b	8.338	<0.001*
Número de hojas	7.53 ab	8.31 ab	6.64 b	7.32 ab	10.65 a	6.47	2.616	0.027*
Biomasa aérea (g)	0.038 b	0.040 b	0.027 b	0.023 b	0.109 a	0.026 b	5.67	0.0014*
AFE (cm ² /g)	445.55	367.11	384.31	1164.92	433.16	1010.06	1.52	0.218
Long/ Área foliar (cm/cm ²)	50.88	105.86	34	163.49	33.57	113.012	1.045	0.384
No. puntas/ Área foliar	582.27	917.79	134.3	574.27	20.92	291.69	1.135	0.368
TCR (cm)	0.044 b	0.026 ab	0.141 ab	0.144 ab	0.415 a	0.01 b	3.57	0.0045*
Biomasa radical (g)	0.024 ab	0.018 b	0.029 ab	0.026 ab	0.075 a	0.024 ab	2.82	0.0382*
Densidad de raíz (cm ³ /g)	0.24	0.146	0.141	0.093	0.089	0.209	1.502	0.226
Volumen de raíz (cm ³)	0.22 b	0.145 b	0.195 b	0.297 b	16.11 a	0.151 b	3.536	0.0155*
Longitud de raíz (cm)	195.1 b	150.48 b	171.53 b	182.05 b	732.83 a	168.40 b	5.006	0.003*
LRE (cm/g)	8002.3	9267.8	6507.2	7092	13463.4	7500.7	0.794	0.564
Diámetro de raíz (mm)	0.33 b	0.376 b	0.384 b	0.451 b	1.181 a	0.331 b	5.287	0.002*
R:S Ratio (g/g)	0.665 bc	0.499 c	1.008 abc	1.150 a	0.676 abc	1.01 ab	4.98	0.003*
No puntas	1786.8	1236.2	631.4	715.6	483.8	496	1.96	0.1213
Porcentaje de micorrización	0 c	-	40 ab	38 b	30 bc	72 a	11.1	<0.001*

Grado de infección en raíces

En lo que respecta al porcentaje de micorrización, se observó contaminación en el tratamiento control, no descartando que se trate de organismos endófitos. Por otro

lado, el tratamiento con inóculo de tres especies *A. brasilense*, *P. arhizus* y *R. intraradices*, tuvo un mayor porcentaje de micorrización, después la inoculación individual con *Pisolithus*, seguido de *Rhizophagus* y por último la inoculación con *Scleroderma* (Tabla 2). En la imagen 5 se muestran las estructuras observadas en la microscopía.

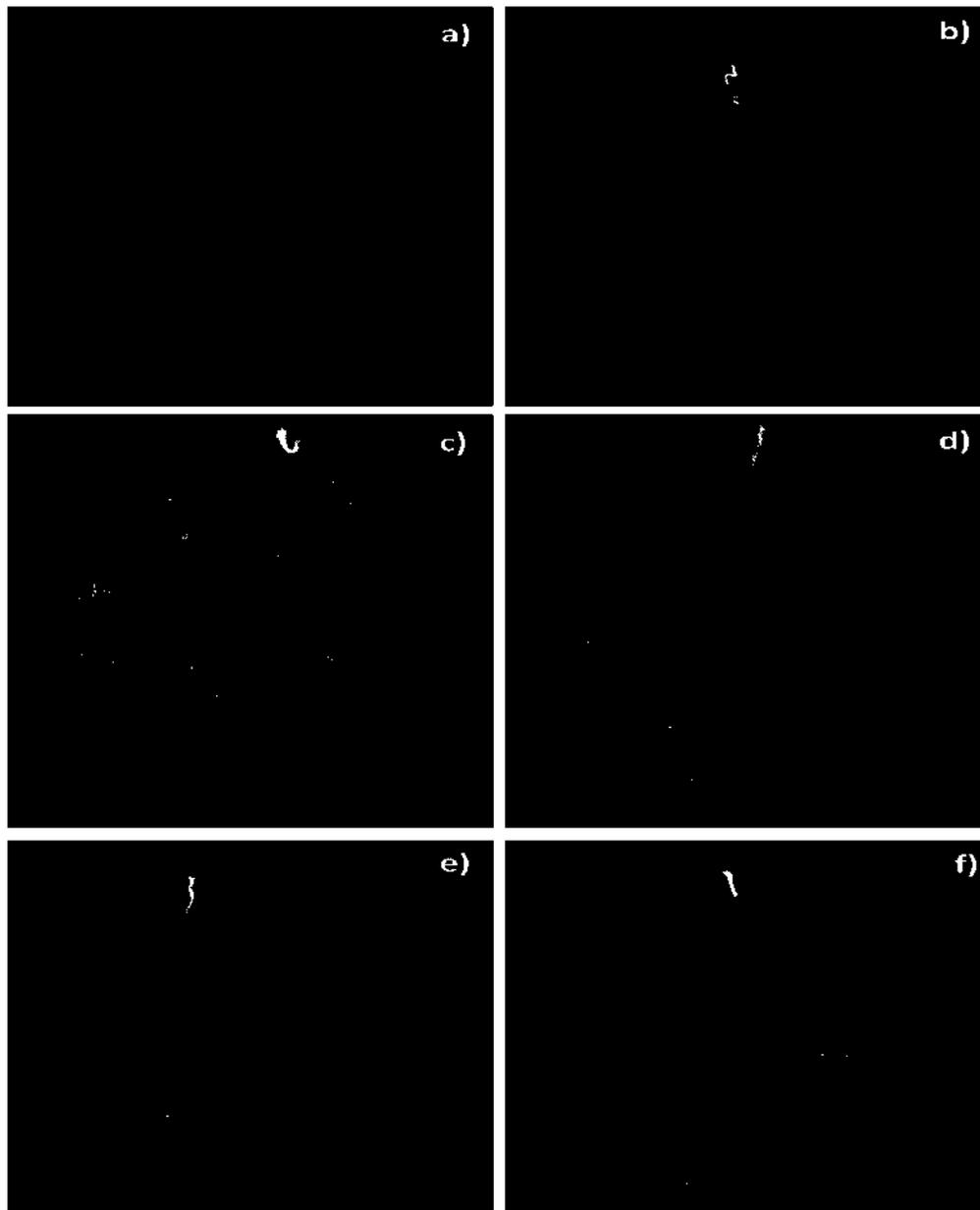


Imagen 4. Arquitectura de raíz de las plantas de *Tecoma stans* por tratamiento. a) tratamiento control, b) tratamiento con *Azospirillum brasilense*, c) tratamiento con *P. arhizus*, d) tratamiento con *Rhizophagus intraradices*, e) tratamiento con *S. verrucosum*, f) tratamiento con *R. intraradices*, *P. arhizus* y *A. brasilense*.

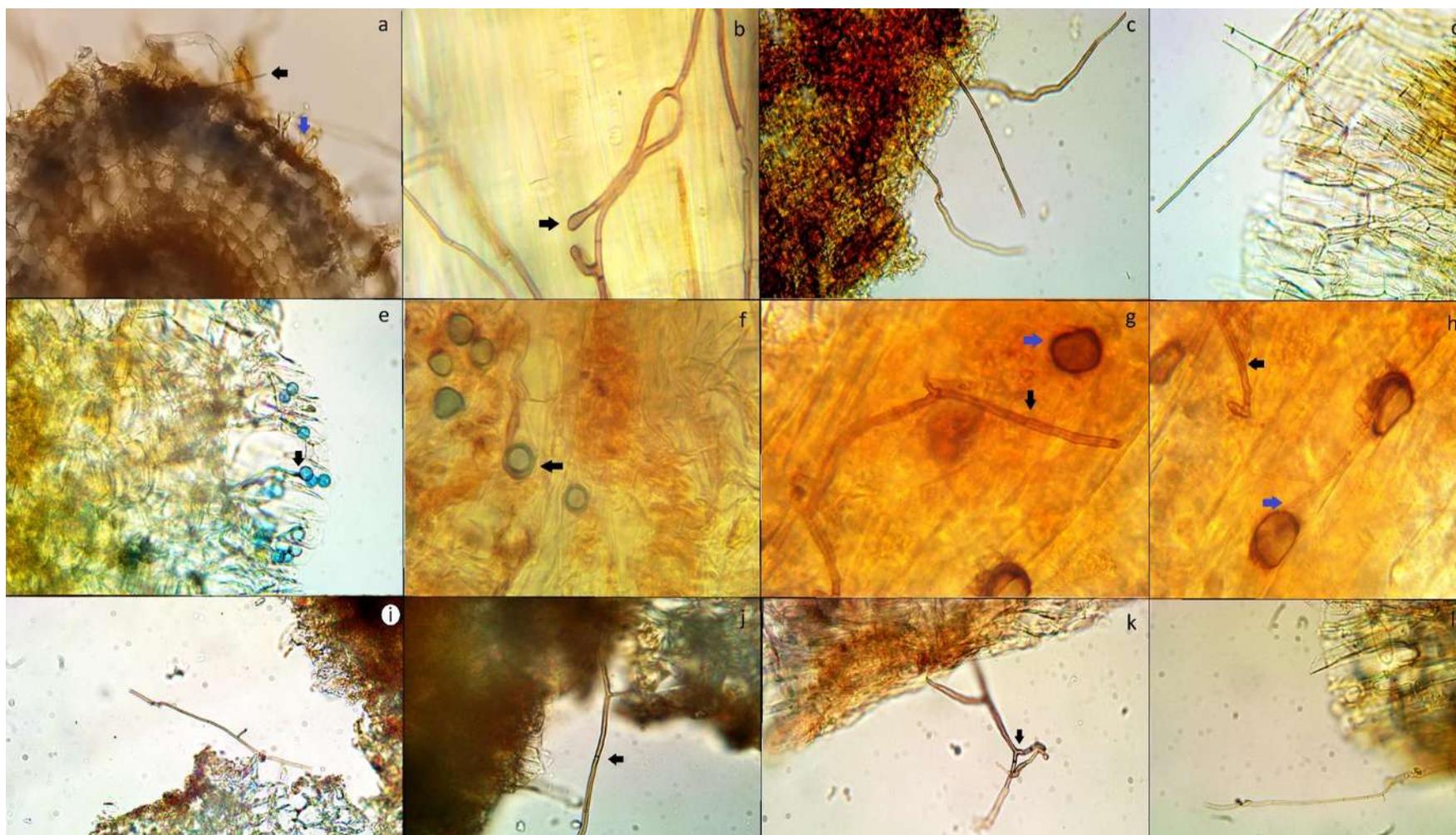


Imagen 5. Microscopia de raíces inoculadas de *Tecoma stans* por tratamiento 40X. Las figuras de la a-d pertenecen al tratamiento con *Pisolithus arhizus*, e-f al tratamiento con *Rhizophagus intraradices*, g-h al tratamiento con inoculación con *R. intraradices*, *P. arhizus* y *A. brasilense*, i-l con el inóculo de *Pisolithus arhizus*. a) Hifa externa (flecha negra) y manto (flecha azul) 10X; b) Hifa con terminación simple; c) Hifas externas; d) Hifa externa; e) Vesícula (flecha negra); f) Vesícula 100X; g) Vesícula (flecha azul) e hifa septada (flecha negra) 100X, h) Vesícula (flecha azul) e hifa septada con terminación simple (flecha negra) 100X; i) Hifa externa; j) Hifa septada (flecha negra); k) Hifa doble terminación; l) Hifa septada.

1.6. DISCUSIÓN

El arbusto *Tecoma stans* mostró un porcentaje de germinación del 83%, mientras que otros autores obtuvieron entre 85 y 100%, además, que no se requieren tratamientos pregerminativos para este proceso (López *et al.* 2017, Vargas-Figueroa y Torres-González 2018, Cordero 1991). Para el experimento de inoculación se utilizó la semilla 15 meses después de la colecta (15 de diciembre de 2018), se realizaron pruebas de germinación nuevamente, dando como resultado un 78% de viabilidad, contrario a lo que menciona la literatura (ORMACC 2015, Comisión Nacional Forestal- SEMARNAT s/f). Donde se señala la pérdida de viabilidad en condiciones ambientales después de los 7 meses de colecta. En el presente estudio hubo un descenso del 5% en el porcentaje después de quince meses de almacenamiento, sin embargo, sigue siendo un éxito de germinación alta. Las semillas de especies del tipo ortodoxo se pueden mantener *ex situ* satisfactoriamente a largo plazo en entornos apropiados (Hong & Ellis 1996). Para poder discernir si *Tecoma stans* tiene semillas ortodoxas se requiere experimentar con un mayor tiempo de almacenaje.

El arbusto nativo *Tecoma stans* ha sido tradicionalmente para diversidad de uso medicinal como diabetes y dolor bilioso, así como, por ser una especie ornamental muy apreciada por sus bellas flores amarillas, también tiene reputación de ser planta melífera importante (Rzedowski y Calderón 1993, Comisión Nacional Forestal 2010, Niembro *et al.* 2010). Lo anterior también es importante tomarlo en cuenta a la hora de querer restaurar un sitio, ya que son aspectos importantes a considerar como se menciona en los atributos de los ecosistemas restaurados, como son el uso de especies nativas y que al ser melífera puede atraer otros grupos funcionales que ayuden a la recuperación de la estructura, composición y funcionamiento de un sitio después de ser degradado (Society for Ecological Restoration 2004, Vargas 2011).

En general, detectamos que la infección por los hongos micorrícicos tuvo efectos sobre el crecimiento y despliegue de los atributos funcionales indicadores del uso de recursos. Nuestros resultados, coinciden con las observaciones de estudios previos donde se inoculó con las especies micorrícicas *Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus arhizus* en *Shorea pinanga* en tratamientos independientes afectando positivamente el

número de hojas, crecimiento en altura, diámetro, peso fresco y seco en comparación del tratamiento control (Turjaman *et al.* 2005). Por otra parte, el inóculo de *S. verrucosum* fue el tratamiento más exitoso en la estimulación del crecimiento y peso seco en las plántulas de *Pinus pinea*, *P. elliottii* y *P. radiata* (Rincón *et al.* 2001, Chen *et al.* 2006), lo que coincide con los resultados de este estudio. Para la inoculación de *Pinus pinea* L. Rincón *et al.* (2001) utilizaron 10^5 esporas por planta llegando a un porcentaje de micorrización del 86% , mientras que en este trabajo se utilizó la mitad de inóculo (500 000 esporas) con 30% de micorrización, lo que indica que podemos incrementar la cantidad de esporas para alcanzar porcentajes de micorrización más altos y esto pudiera tener aún más consecuencias positivas sobre el crecimiento. Por otra parte, no se detectó que la interacción *Rhizophagus intraradices* afectará de forma positiva el crecimiento de *T. stans*. En contraste, en un estudio previo la interacción micorrícica con el hongo arbuscular *Rhizophagus intraradices* afectó la germinación *T. stans* (Ballina- Gómez *et al.* 2017). Sin embargo, esta especie micorrícica ha sido utilizada en otras especies vegetales bajo estrés hídrico mostrando que el micelio redujo la longitud de la raíz, pero manteniendo las hifas de mayor diámetro (Leyva-Morales *et al.* 2019). Esto concuerda con lo observado en el presente estudio. Es necesario hacer más exploraciones sobre las consecuencias de la presencia de este hongo sobre el crecimiento de las plantas.

Se ha demostrado que, entre otros rasgos funcionales, la longitud de específica de raíz y la tasa de crecimiento, altura de la planta, influyen en la productividad primaria, en la acumulación de carbono del suelo y la descomposición, los cuales a su vez brindan servicios ecosistémicos que contribuyen a la regulación del clima en función del secuestro biológico de carbono y la fertilidad de suelos (Polania *et al.* 2011). Además, valores altos en la biomasa y en LRE indica la intensidad de exploración de las raíces en el suelo y la habilidad para competir por los nutrientes que se encuentren en el suelo (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013). Por lo anterior, se corrobora que *Tecoma stans* puede verse beneficiada ante aspectos de sequía aumentando las posibilidades de éxito con el establecimiento de inoculaciones con hongos micorrícicos (Harris *et al.* 2009), siempre y cuando las semillas de *T. stans* no rebasen los potenciales hídricos en el suelo sean igual o menores de -1.0 MPa (Cordero 1991). En particular, la

presencia de *Scleroderma verrucosum* favoreció el crecimiento de la planta y modificó la longitud de la raíz para incrementar la capacidad de exploración de suelo y ganancia de recursos. Derivado de los resultados del presente, se puede recomendar que en las estrategias de restauración con esta especie de arbusto del sotobosque se utilice la inoculación con este hongo micorrícico. Sin embargo, se recomienda hacer estudios exploratorios en campo, para determinar si la inoculación de *S. verrucosum* se mantiene en el ambiente no controlado.

1.7. CONCLUSIONES

El arbusto *Tecoma stans* no requiere de ningún tratamiento para su germinación (83%), aún después de transcurridos quince meses de su colecta y almacenadas a temperatura ambiente, disminuye un cinco por ciento su viabilidad. Esta especie germina a los siete días de sembrado, dejando de percibir cambios de germinación al día 42.

Las plantas de *Tecoma stans* responden a la inoculación de *Scleroderma verrucosum*, siendo la primera vez que se realiza la inoculación con esta especie arbustiva. Esta interacción confiere diferencias positivas en la parte aérea en el número de hojas, crecimiento en altura, cobertura, mientras que en la parte radical benefició en un contenido mayor de volumen, diámetro y longitud de raíz. Esto puede conferirle ventajas importantes al momento de ser transferida a condiciones de campo en sitios perturbados como parte de su propuesta como especie con potencial para restauración ecológica.

Se demuestra la interacción con el hongo ectomicorrícico *Pisolithus arhizus*, sin embargo, no se observó alguna diferencia que dominara entre los tratamientos durante los seis meses evaluados. Tampoco el hongo micorrícico arbuscular *Rhizophagus intraradices* mostró dominancia en alguna de las variables analizadas.

Por lo que se concluye que la inoculación con el hongo *Scleroderma verrucosum* confiere características morfofuncionales en la parte aérea como radical, que le permitan a la especie *Tecoma stans* mayor resistencia y supervivencia, haciendo que sea candidata ideal como especie para restauración ecológica.

2.8. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado-López, S., D. Soriano, N. Velázquez, A. Orozco-Segovia y A. Gamboa-de Buen. 2014. **Priming effects on seed germination in *Tecoma stans* (Bignoniaceae) and *Cordia megalantha* (Boraginaceae), two tropical deciduous tree species.** *Acta Oecologica* 61: 65-70.
- Augé R. M. 2001. **Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis.** *Mycorrhiza* 11:3-42.
- Ballina-Gómez, H. S., E. Ruiz-Sánchez, E. Ambriz-Parra y C. J. Alvarado-López. 2017. **Efecto de la luz y micorrizas en la germinación de semillas de árboles de selvas secas.** *Madera y bosques* 23(3): 29-37.
- Báez-Pérez Ana Laura, Gómez-Romero Mariela, Villegas Javier, de la Barrera Erick, Carreto-Montoya Lorena, Lindig-Cisneros Roberto. 2015. **Inoculación con hongos micorrízicos y fertilización con urea de plantas de *Fraxinus uhdei* en acrisoles provenientes de sitios degradados.** *Bot. Sci* 93(3) : 501-508.
- Barragán-Soriano, J. L., J. Pérez-Moreno, J. J. Almaraz-Suárez, M. G. Carcaño-Montiel y K. I. Medrano-Ortiz. 2018. **Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb.** *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente* 24(1): 3-16.
- Bashan Y., y G. Holguin. 1997. ***Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances 1990-1996.** *Canadian Journal of Microbiology* 43(2): 103-121.
- Dai A. 2012. **Increasing drought under global warming in observations and models.** *Nature Climate Change* 3:52-58.
- Chen, Y. L., L. H. Kang, N. Malajczuk y B. Dell. 2006. **Selecting ectomycorrhizal fungi for inoculating plantations in south China: effect of *Scleroderma* on colonization and growth of exotic *Eucalyptus globulus*, *E. urophylla*, *Pinus elliotii*, and *P. radiata*.** *Mycorrhiza* 16:251-259.

Comisión Nacional Forestal- SEMARNAT. s/ f.**Informe. Sistema Nacional de Información Forestal. Tecoma stans.** Recuperado en <https://www.cnf.gob.mx:8443/snif/portal/libraries/.../UsosPDF.php?...TecomaStans>

Comisión Nacional Forestal. 2010. **Plantas medicinales de la Farmacia Viviente de Cefofor: Usos terapéuticos tradiciones y dosificación.** Primera edición Comisión Nacional Forestal. Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico. Gerencia de Educación y Capacitación. 188 pp.

Cordero S. R. A. 1991. **Efecto de estrés osmótico sobre la germinación de semillas de *Tecoma Stans* (Biononiaceae).** *Rev. Biol. Trop.* 39(1): 107-110.

Cruz Ulloa B. S.1999. **Micorrización en la conservación de los bosques. CIENCIA ergo-sum.** *Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva* 6(2):160-164.

Guadarrama Chávez, P., I. Sánchez, J. Álvarez y J. Ramos. 2004. **Hongos y plantas, beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares.** *Ciencias* 73: 38-45.

H. Ayuntamiento de Copándaro. S/f. **Versión abreviada del programa municipal de desarrollo urbano de Copándaro.** Recuperado en <http://copandaro.gob.mx/contenidos/copandaro/transparencia/VERSINZABREVIADAZPMDUZCOPNDARO.pdf>

Harley L. 1989. **The Fourth Benefactor's Lecture. The Significance of Mycorrhiza.** *Mycol. Res.* 92 (2): 129-139.

Harris-Valle, C., M. Esqueda, E. M. Valenzuela-Soto y A. E. Castellanos. 2009. **Tolerancia al estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrízico arbuscular: metabolismo energético y fisiología.** *Revista fitotecnica mexicana* 32(4): 265-271.

Leyva-Morales, R., M. E. Gavito y S. M. Carrillo-Saucedo. 2019. **Morphological and physiological responses of the external mycelium of *Rhizophagus intraradices* to water stress.** *Mycorrhiza* 29:141–147.

- Lopez, L. E., J. D. Macías Pinto y D. J., Macías Pinto. 2017. **Frutos, semillas, germinación y desarrollo de plántulas de *Amphilophium paniculatum* (L.) Kunth. (*Bignoniaceae*).** *Colombia Forestal* 20(1): 45-54.
- Luna-Flores, W., H. Estrada-Medina, J. J. M. Jiménez-Osornio y L. L. Pinzón-López. 2012. **Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias.** *Terra Latinoamericana* 30(4): 343-353.
- Martínez E. y C. H. Ramos. 2012. ***Bignoniaceae*.** Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. 104:1-58.
- Meli P. 2003. **Restauración Ecológica en Bosques Tropicales. Veinte años de investigación académica.** *Interciencia* 28:581-589.
- Moreno L. P. 2009. **Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión.** *Agronomía Colombiana* 27(2): 179-191.
- Niembro R., A., M. Vásquez Torres y O. Sánchez Sánchez. 2010. **Árboles de Veracruz. 100 especies para la reforestación estratégica.** Gobierno del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave, CITRO. Veracruz, México. pp 255.
- ORMACC (Oficina Regional de UICN para México, América Central y El Caribe). 2015. **Especies para Restauración.** Recuperado en https://www.especiesrestauracion-uicn.org/data_especie.php?sp_name=Tecoma%20stans
- Parra Y. y F. Cuevas. 2002. **Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura.** *Cultivos Tropicales* 23(3): 31-41.
- Pera J. y J. Parladé 2005. **Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España.** *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales* 14(3):419-433.

- Pérez J. y M. Casas. 2006. **Estudio de la interacción planta-*Azospirillum* en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum sp.*)**. *Cultivos Tropicales* 26 (4): 13-16.
- Pérez-Harguindeguy, N., S. Díaz, E. Garnier, S. Lavorel, H. Poorter, P. Jaureguiberry, M. S. Bret-Harte, W. K. Cornwell, J. L. Craine, D. E. Gurvich, C. Urcelay, E. J. Veneklaas, P. Reich, L. Poorter, I. J. Wright, P. Ray, L. Enrico, J. G. Pausas, A. C. de Vos., N. Buchmann, G. Funes, F. Quétier, J. G. Hodgson, K. Thompson, H. D. Morgan, H. terSteege, M. G. A. van der Heijden, L. Sack, B. Blonder, P. Poschlod, M. V. Vaieretti, G. Conti, A. C. Staver, S. Aquino y J. H. C. Cornelissen. 2013. **New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide**. *Revista Australian Journal of Botany* 61: 167-234.
- Polania C., L. Pla, y F. Casanoves. 2011. **Diversidad funcional y servicios ecosistémicos**. En Casanoves, F., Pla, L. y Di Rienzo, J.A. (Eds). **Valoración y análisis de la diversidad funcional y su relación con los servicios ecosistémicos**. CATIE, Turrialba, Costa Rica. pp. 84.
- Rincón, A., I. Alvarez and J. Pera. 2001. **Inoculation of containerized *Pinus pinea* seedling with seven ectomycorrhizal fungi**. *Mycorrhiza* 11:265–271.
- Rzedowski J. y G. Calderón de Rzedowski. 1993. **Familia *Bignoniaceae***. *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes* 22: 1-44.
- Sabogal C., C. Besacier y D. McGuire. 2015. **Restauración de bosques y paisajes: conceptos, enfoques y desafíos que plantea su ejecución**. *Unasylva* 66: 3-10.
- Shao, H.B., L.Y. Chu, C.A. Jaleel y C.X. Zhao. 2008. **Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants**. *C.R. Biologies* 331: 215-225.
- Society for Ecological Restoration (SER) International, Grupo de trabajo sobre ciencia y políticas. 2004. **Principios de SER International sobre la restauración ecológica**. www.ser.org y Tucson: Society for Ecological Restoration International (18 de febrero 2021)

- Socolowski, F., D. C. Mascia y M. Takaki. 2008. **Interaction of temperature and light on seed germination in *Tecoma stans* L. Juss. ex Kunth (*Bignoniaceae*).** *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51(4): 523-53.
- Tien, T. M., M. H. Gaskins y D. H. Hubbell. 1979. **Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.).** *Applied and Environment Microbiology* 37: 1016- 1024.
- Vargas S. 2015. **Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and maternal plant sex on seed germination and early plant establishment.** *American journal of botany* 102(3): 358- 366.
- Vargas O. 2011. **RESTAURACIÓN ECOLÓGICA: BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN.** *Acta biol. Colomb.*16 (2): 221 – 246.
- Yepes A., y M. Silveira. 2011. **Respuestas de las plantas ante los factores ambientales del cambio climático global (revisión).** *Colombia Forestal* 14(2):213-232.
- Zepeda-Guzmán S., M. Gómez-Romero, C. Sosa-Aguirre y J. Villegas. 2018. **Effects of *Rhizogloium intraradices*, *Azospirillum brasilense* and plant growth regulators application on root architecture in barley (*Hordeum vulgare* L.).** *Pyton* 87: 183-190.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

El conocimiento de la germinación de especies nativas es fundamental para facilitar la manipulación de especies de interés, aumentando su propagación y potencialmente su conservación (Vázquez- Yanes *et al.* 1997, Varela y Aparicio 2011). Además, proporciona elementos básicos para delinear las técnicas de propagación masiva de especies nativas, fundamental para los programas de reforestación (Arriaga *et al.* 1994).

Con este trabajo se aporta conocimiento del método de germinación de semillas de la especie *Monnina ciliolata*, la cual no requirió tratamientos pregerminativos, además, este arbusto tiene características tradicionales y es atrayente de polinizadores nativos que ayudarían recuperar las interacciones bióticas. A su vez, se encontró que el arbusto *Tecoma stans* posee altas tasas de germinación y no requiere de tratamientos pregerminativos y se puede almacenar sus semillas en refrigeración sin perder rápidamente su viabilidad, además de tener mayor resistencia a la sequía, lo que aportaría su establecimiento en lugares degradados con poco acceso de agua. Al igual que la otra especie, también es usada en la medicina tradicional y es atrayente de polinizadores por sus flores melíferas. Por lo anterior, se considera que ambas especies vegetales son buenas candidatas para su uso en estrategias de restauración, ya que pueden ayudar a reestablecer las interacciones bióticas en algún sitio perturbado.

En general, el uso de inoculaciones micorrícicas promovió el crecimiento en altura y mayor biomasa y volumen radicular en *M. ciliolata* con el inóculo conjunto de los hongos *Pisolithus arhizus* y *Scleroderma verrucosum*, mientras que en *T. stans* la inoculación individual con esporas de *S. verrucosum* favoreció el aumento en el número de hojas, crecimiento en altura, cobertura, mientras que en la parte radical benefició a la raíz con mayor de volumen, diámetro y longitud. De acuerdo a lo antes mencionado, se propone el establecimiento de inoculaciones entre las especies mencionadas, ya que esto puede ayudar a la recuperación de la estructura, composición y funcionamiento de un sitio después de ser degradado a través del manejo de la restauración ecológica. En particular, la interacción con los hongos

micorrícicos no sólo potenció el crecimiento de la planta sino también su capacidad de ganancia de recursos de las plantas. Se detectó que para el caso de la raíz, en los casos donde hubo inoculación con más de un hongo el sistema radicular fue de mayor volumen. Un mayor volumen de raíz o longitud indicaría una mayor capacidad en la intensidad de la exploración del suelo y la capacidad de una especie para competir por los nutrientes del suelo, además de que las especies micorrícicas utilizadas producen abundantes rizomorfos que ayudan al transporte de agua para el hospedero (Rincón *et al.* 2001). Conjuntamente, se mostraron cambios en la densidad del tejido de la raíz lo que se relaciona positivamente con la resistencia a los patógenos y la sequía, ya que determina la capacidad de extracción de agua del suelo adyacente a las raíces (Barrios- Gómez *et al.* 2012, Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013).

En este trabajo se obtuvo una inoculación dual exitosa (*Scleroderma verrucosum* y *Pisolithus tinctorius*) en plantas de *Monnina ciliolata* proporcionando mayor crecimiento en la parte aérea y volumen radicular. Mientras que en la especie *Tecoma stans* no hubo efectos en la inoculación triple (*Azospirillum brasilense*, *Pisolithus tinctorius* y *Rhizophagus intraradices*), pero si se obtuvieron efectos positivos en la inoculación individual con el hongo *Scleroderma verrucosum*. La falta de efecto en la inoculación triple se puede deber a que las plantas utilizadas eran muy pequeñas para proporcionar los carbohidratos necesarios para soportar los micobiontes (Colpaert *et al.* 1992). En la interacción planta-hongo micorrizógeno se han encontrado algunos eventos similares a los de la interacción planta-patógeno del presente estudio, el hongo necesita degradar señales de la planta para evadir la activación de los genes de respuesta de defensa o tener la carencia de especificidad entre los simbioses que permitan establecer la interacción micorrícica (Camarena-Gutiérrez 2012). El hecho de que se obtengan diferentes resultados ya sea con una o varias inoculaciones indica que existe una especificidad entre los simbioses que determina el éxito de los organismos asociados en su adaptación a condiciones ambientales adversas (Harris-Valle *et al.* 2009). En la micorrización de plántulas se requiere que las inoculaciones múltiples o individuales sea de forma equilibrada sin que sobresalga alguna de las especies esto se puede lograr variando las proporciones de micelio y espóra, de uno y otro hongo esto con el propósito que el uso múltiple de especies micorrícicas confiera

aspectos más efectivos en el crecimiento y adquisición de recursos como el fósforo para la planta (Pera y Parladé 2005, Ortas y Ustuner 2014). En ese sentido, se ha observado que altas tasas de esporas utilizadas en los inóculos al contrario de estimular el crecimiento de las plántulas, algunos hongos reducen significativamente el peso seco de las plántulas (Rincón *et al.* 2001). Las interacciones con micorrizas pueden crear redes comunes de hongos principalmente formados por hongos micorrícicos arbusculares y hongos ectomicorrícicos (ECM) que pueden cubrir grandes áreas, potencialmente a escala de campo. La capacidad de algunos hongos ECM para formar tales redes interconectadas pueden tener efectos importantes en la configuración de la estructura de la comunidad en los bosques que promueven el crecimiento y la supervivencia de las plántulas (Pierre- Louis *et al.* 2020).

La inoculación entre los hongos micorrícicos y las especies *M. ciliolata* y *T. stans* utilizados no tienen reportes anteriores en la literatura de interacción previas con excepción del hongo arbuscular *R. intraradices* con el *T. stans*. En el presente estudio se utilizaron cuerpos fructíferos dos especies de hongos gasteroides (*S. verrucosum* y *P. arhizus*) y se recomienda su uso ya que mostraron ser efectivos colonizadores en árboles de interés forestal por su gran producción de esporas dando buenos resultados en el porcentaje de micorrización y mejoran el crecimiento de todas las plantas hospedantes sobre todo en especies de lento crecimiento como los pinos (Chen *et al.* 2006). Además son de fácil recolección, beneficio, almacenado y aplicación, sin embargo, es importante que esta fuente inóculo provenga de especies nativas que no representen riesgo a las comunidades de hongos nativos (Prieto *et al.* 2009). También, es importante impulsar de especies nativas debido a que se puede contribuir de forma negativa en el ambiente al introducir especies de microorganismos no nativos que pueden alterar y dañar el suelo (Cruz 1999) y que en el caso de los consorcios micorrícicos nativos suelen ser más efectivos, que aquellos constituidos por especies exóticas (Ortas y Ustuner 2014). Si bien este trabajo fue realizado en condiciones controladas, se espera comprobar los resultados en condiciones de campo en experimentos futuros. Sin embargo, la prioridad de inocular plántulas cultivadas con micorrizas mejora en la supervivencia y por consiguiente el crecimiento en el campo (Chen *et al.* 2006).

Los datos de tipo fenológico, como la germinación, dormancia y viabilidad de semillas, se desconocen para la mayoría de las especies nativas como menciona Valencia (2004), por lo que son poco utilizadas y aprovechadas de manera ineficiente, lo que dificulta su posible uso en cuestiones forestales y facilita su pérdida en el ecosistema. Razones por las cuales, la falta de este conocimiento de algunas especies nativas afecta no sólo a estas especies en sí, sino a su vez interrumpen interacciones, algunas veces específicas, eliminando fuentes de refugio y de alimento para otros animales y vegetales. Es por ello, que la aplicación del enfoque socioecológico en el manejo de los bosques templados es clave para su mantenimiento, uso sostenible y resiliencia; y para asegurar el uso de bienes tangibles e intangibles con el apoyo de las comunidades que viven de los bosques, que eviten la disminución de las poblaciones y aumenten el conocimiento biológico (Galicía *et al.* 2018).

VII. RECOMENDACIONES

Para el manejo de la mezcla de sustratos es importante no compactar demasiado ya que esto puede limitar el crecimiento de la raíz y se sugiere el uso de contenedores grandes. Por otra parte, el sustrato que se utilizó fue difícil limpiarlo de las raíces para ser analizadas, ya que este se adhiere a las raíces promoviendo que sean dañadas o se rompan en el proceso.

La limpieza de la semilla de *Monnina* necesita ser meticulosa, no debe contener restos del fruto, ya que esto puede provocar contaminación en las semillas. Para conocer el almacenaje y tiempo de viabilidad se recomienda continuar con el estudio y colecta de semillas de *Monnina ciliolata*.

Se recomienda realizar el remojo de las semillas de *Tecoma stans* para facilitar el manejo, ya que al estar húmedas se pueden descartar las vanas, son un poco más flexibles, se maltratan menos y se adhieren mejor al sustrato. Además, para conocer más sobre la viabilidad de semillas se requiere experimentar con un mayor tiempo de almacenaje.

Para realizar los inoculantes con hongos ectomicorrícicos es factible utilizar solo la parte fértil de los cuerpos fructíferos o, en su defecto, sólo las esporas. También hacer el conteo de viabilidad y la inoculación poco tiempo después de colectados los hongos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Allen, C. D., A. K. Macalady, H. Chenchouni, D. Bachelet, N. McDowell, M. Vennetier, T. Kitzberger, A. Rigling, D. D. Breshears, E. H. Hoff, P. Gonzalez, R. Fensham, Z. Zhang, J. Castro, N. Demidova, J. H. Lim, G. Allard, S. W. Running, A. Semerci and N. Cobb. 2010. **A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests.** *Forest Ecology and Management* 259: 660–684.
- Arriaga, M.V., V.G. Cervantes y A. Vargas-Mena. 1994. **Manual de reforestación con especies nativas: colecta y preservación de semillas, propagación y manejo de plantas.** 1ª edición. Instituto Nacional de Ecología, SEDESOL, UNAM. México, D.F. pp. 179.
- Augé R. M. 2001. **Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis.** *Mycorrhiza* 11:3-42.
- Barrios-Gómez, E., C. López-Castañeda, J. Kohashi-Shibata, J. A. Acosta-Gallegos, S. Miranda-Colín, J. Canul Ku y N. Mayek-Pérez. 2012. **Comparación de las estructuras morfológicas en raíz e hipocótilo en frijol.** *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 3(4): 655-669.
- Booth M. G., y Hoeksema, J. D. 2010. **Mycorrhizal networks counteract competitive effects of canopy trees on seedling survival.** *Ecology* 91(8): 2294–2302.
- Camarena-Gutiérrez G. 2012. **INTERACCIÓN PLANTA-HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES.** *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18(3): 409-421.
- Chen, Y.L., L. H. Kang, N. Malajczuk y B. Dell. 2006. **Selecting ectomycorrhizal fungi for inoculating plantations in south China: effect of *Scleroderma* on colonization and growth of exotic *Eucalyptus globulus*, *E. urophylla*, *Pinus elliotii*, and *P. radiata*.** *Mycorrhiza* 16: 251–259.

- Colpaert, J. V., J. A. Vanassche and K. Lijstens. 1992. **The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth-response of *Pinus sylvestris* L.** *NewPhytol.* 120: 127–135.
- Cruz Ulloa B. S.1999. **Micorrización en la conservación de los bosques.** **CIENCIA ergo-sum.** *Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva* 6(2):160-164.
- Dell'Amico, J. M., P. Rodríguez, A. Torrecillas, A. Morte y M. J. Sánchez-Blanco. 2002. **Influencia de la micorrización en el crecimiento y las relaciones hídricas de plantas de tomate sometidas a un ciclo de sequía y recuperación.** *Cultivos Tropicales* 23 (1): 29-34.
- Galicia, L., B. Chávez-Vergara, M. Kolb, R: I. Jasso-Flores, L. A. Rodríguez-Bustos, L. E. Solís, V. Guerra de la Cruz, E. Pérez-Campuzano, Enrique, y A. Villanueva. 2018. **Perspectivas del enfoque socioecológico en la conservación, el aprovechamiento y pago de servicios ambientales de los bosques templados de México.** *Madera y bosques* 24(2): e2421443.
- Gómez-Ruiz P. A. y R. Lindig-Cisneros. 2017. **La restauración ecológica clásica y los retos de la actualidad: La migración asistida como estrategia de adaptación al cambio climático.** *Revista de Ciencias Ambientales (Trop J Environ Sci)* 51(2): 31-51.
- Navarro, J. A., M. Goberna, G. González, V. M Castillo y M. Verdú. 2017. **Restauración ecológica en ambientes áridos. Recuperar las interacciones biológicas y las funciones ecosistémicas.** Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid España. pp.158.
- Ojea, E., J. Martin-Ortega and A. Chiabai. 2012. **Defining and classifying ecosystem services for economic valuation: the case of forest water services.** *Environmental Science & Policy* 19-20: 1-15.
- Ortas I. and O. Ustuner. 2014. **The effects of single species, dual species and indigenous mycorrhiza inoculation on citrus growth and nutrient uptake.** *Eur. J. Soil Biol.* 63: 64-69.

- Pera J. y J. Parladé. 2005. **Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España.** *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales* 14(3):419-433.
- Pérez-Harguindeguy, N., S. Díaz, E. Garnier, S. Lavorel, H. Poorter, P. Jaureguiberry, M. S. Bret-Harte, W. K. Cornwell, J. L. Craine, D. E. Gurvich, C. Urcelay, E. J. Veneklaas, P. Reich, L. Poorter, I. J. Wright, P. Ray, L. Enrico, J. G. Pausas, A. C. de Vos., N. Buchmann, G. Funes, F. Quétier, J. G. Hodgson, K. Thompson, H. D. Morgan, H. terSteege, M. G. A. van der Heijden, L. Sack, B. Blonder, P. Poschlod, M. V. Vaieretti, G. Conti, A. C. Staver, S. Aquino and J. H. C. Cornelissen. 2013. **New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide.** *Revista Australian Journal of Botany* 61: 167-234.
- Pierre-Louis, A., Y. Zhang, L. Gilbert y D. Johnson. 2020. **Can common mycorrhizal fungal networks be managed to enhance ecosystem functionality?** *Plants, People, Planet* 00:1–12.
- Prieto R., J. A., J. L. García R., J. M. Mejía B., S. Huchin A. y J. L. Aguilar V. 2009. **Producción de planta del género *Pinus* en vivero en clima templado frío.** Campo Experimental Valle del Guadiana. Centro de Investigación Regional Norte Centro. INIFAP. Publicación Especial Núm. 28. Durango, Dgo. México. pp 47.
- Rincón, A., I. Alvarez and J. Pera. 2001. **Inoculation of containerized *Pinus pinea* seedling with seven ectomycorrhizal fungi.** *Mycorrhiza* 11:265–271.
- Sáenz-Romero C. 2014. **Guía técnica para la planeación de la reforestación adaptada al cambio climático.** Tomado de [http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/19/6688Guía Técnica para la Planeación de la Reforestación.pdf](http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/19/6688Guía_Técnica_para_la_Planeación_de_la_Reforestación.pdf)

- Sáenz-Romero, C., G. E. Rehfeldt, N. L. Crookston, P. Duval, Pierre and J. Beaulieu. 2012. **Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Michoacán State, México: Impacts on the vegetation.** *Revista fitotecnia mexicana* 35(4): 334-345.
- Shao, H.B., L.Y. Chu, C.A. Jaleel y C.X. Zhao. 2008. **Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants.** *C.R. Biologies* 331: 215-225.
- Sturrock, R. N., S. J. Frankel, A. V. Brown, P. E. Hennon, J. T. Kliejunas, K. J. Lewis, J. J. Worrall, A. J. Woods. 2011. **Climate change and forest diseases.** *Plant Pathology* 60: 133–149.
- Uribe E. 2015. **El cambio climático y sus efectos en la biodiversidad de América Latina.** Comisión Económica para América Latina y el Caribe. Chile. pp 86.
- Valencia A. S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (*Fagaceae*) en México. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** (75):33-53.
- Vázquez-Yanes, C., A. I. Batis Muños, M. I. Alcocer Silva, M. Gual Díaz y C. Sánchez Dirzo. 1999. **Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación.** Reporte técnico del proyecto J084. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/inicio.pdf
- Varela S. A. y A. Aparicio. 2011. **Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos.** En: Varela, S. A. y Aparicio, A. (eds.). **Serie técnica: “Sistemas Forestales Integrados” Área Forestal - INTA EEA Bariloche Sección: “Silvicultura en vivero”.** Cuadernillo N° 3: ISSN: 1853-4775 pp.1-10.
- Vázquez-Yanes, C., A. Orozco S. , M. E. Sánchez-Coronado, M. Rojas-Aréchiga, y V. Cervantes. 1997. **La reproducción de las plantas: semillas y meristemos. La ciencia para todos.** Ed. Fondo de Cultura Económica. México. pp.167.