



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas.**

**Facultad de Biología**

“Interacción ectomicorriza (*Pisolithus arhizus*)-nanopartículas, en la eficiencia fisiológica bajo estrés hídrico en *Abies religiosa* con fines de restauración y conservación”

**Tesis**

**que Presenta:**

Biol. Violeta Cortés Hernández

Como requisito para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Biológicas.

ASESORA: DRA. MARIELA GÓMEZ ROMERO.

COASESOR: DR. H. JAVIER A. VILLEGAS MORENO.

Morelia, Michoacán, mayo 2022.

## Dedicatoria

# *La culpa es de la flor*

A la vida.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por otorgarme las herramientas necesarias para ejercer mi libertad de decidir. Por apoyarme a continuar con mis estudios. Por todo el esfuerzo que fue necesario desde hace más de tres generaciones para ser la primera mujer que se gradúa de un posgrado.

A mis compañeras y compañeros de vida es decir de lucha, por apoyar mis decisiones, por alentarme a ser una mejor persona. Gracias por ese ConCiencias por la Humanidad, ahí aprendimos que nuestro interés por la ciencia es legítimo, real, y responde a las transformaciones de nuestro caminar, a la construcción de nuestra autonomía, es decir, de nuestra libertad

A todas mis amigas a mis y a mis colegas, que desde hace tiempo me acompañan, gracias por compartir sus conocimientos conmigo y motivarme a continuar con los estudios. A mis maestr@s, compañer@s y amig@s del Laboratorio de Micología, Laboratorio interacción planta-suelo-microorganismo y Restauración Ecológica, sin sus investigaciones este trabajo no sería posible.

A quien estuvo cerca para compartir el querer, el cuidado y el apoyo.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi Asesora la Dra. Mariela Gómez Romero y mi Co-Asesor el Dr. H. Javier A. Villegas Moreno, que sin conocerme me brindaron la oportunidad de realizar este trabajo de tesis bajo su dirección. Gracias por su tiempo y por las herramientas que me ofrecieron para poder realizar este trabajo. Por su apoyo en mi formación profesional, mi más sincero respeto. Tienes ideas brillantes.

A mi comité de sinodal, al Dr. Arnulfo Blanco García, Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero y al Dr. Fernando Pineda García, por su tiempo y por cada uno de los aportes y observaciones para la realización de este trabajo. Gracias por la oportunidad de seguir creciendo académicamente en mis estudios de Posgrado.

A las personas que conforman al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas en el área temática de Ecología y Conservación perteneciente a la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por facilitarme el proceso, los tramites y el préstamo de las instalaciones.

Al Pueblo de México que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me otorgaron la beca para la realización de mis estudios de posgrado.

## ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas.....	iii
Índice de Figuras.....	iv
RESUMEN .....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES .....	13
2.1. Cambio Climático.....	13
2.1.1. Impactos del clima en los bosques templados.....	14
2.2. Conservación y restauración de bosques templados.....	15
2.3. Bosque templado de <i>Abies</i> en México.....	17
2.3.1. <i>Abies religiosa</i> (Kunth Schltl. et Cham.) .....	18
2.4. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico.....	20
2.5. Asociaciones micorrizas.....	22
2.5.1. Ectomicorrizas.....	24
2.5.2. Comunidades de hongos ectomicorrízico asociados a plantas.....	26
2.6. Aplicación de Nanotecnología.....	27
2.6.1. Nanotubos de carbono de pared múltiple y su aplicación en plantas.....	28
3. HIPOTESIS .....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivos particulares .....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1. Diseño experimental.....	32
5.2. Montaje de experimento.....	32
5.2.1. Obtención de semilla.....	32
5.2.2. Estratificación de semilla.....	33
5.2.3. Germinación y propagación.....	33

5.2.4. Condiciones de riego estrés hídrico .....	33
5.2.5. Inoculación.....	35
5.2.6. Adición de NWCNTs.....	35
5.3. Variables evaluadas.....	35
5.3.1. Supervivencia.....	36
5.3.2. Crecimiento aéreo.....	36
5.3.4. Biomasa.....	37
5.3.5. Variables radicales y arquitectura de raíz.....	37
5.3.6. Porcentaje de colonización.....	37
5.4. Análisis estadístico.....	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1. Supervivencia .....	39
6.2. Crecimiento aéreo.....	41
6.3. Biomasa.....	45
6.4. Variables radicales y arquitectura de raíz.....	49
6.5. Porcentaje de colonización.....	54
7. DISCUSIÓN.....	55
8. CONCLUSIONES.....	60
9. BIBLIOGRAFIA.....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proyecciones climáticas para México y Michoacán (Sáenz-Romero <i>et al.</i> , 2009, 2010, 2012 <sup>a</sup> , 2020 y Rehfeld <i>et al.</i> , 2012) .....	14
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos aplicados a <i>Abies religiosa</i> , utilizando los factores Nanotubos de carbono, hongo ectomicorrízico y dos tipos de riego; libre de estrés hídrico y bajo estrés hídrico.....	32
<b>Tabla 3.</b> Análisis de varianza por factores aplicados a las variables de crecimiento en <i>A. religiosa</i> . Considerando como factores HEM <i>Pisolithus arhizus</i> (hongo), NWCNTs (nanotubos) y la condición de riego bajo estrés hídrico (estrés).....	41
<b>Tabla 4.</b> Análisis factorial de las variables de biomasa aplicado a las plantas de <i>A. religiosa</i> . Peso fresco de la parte aérea y radical, Peso seco parte aérea y radical y cociente de biomasa seca.....	45
<b>Tabla 5.</b> Análisis factorial de las variables radicales y arquitectura de raíz en plantas de <i>A. religiosa</i> .....	49

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Caída de humedad en el suelo en los cuatro tratamientos.....	36
<b>Figura 2.</b> Cronograma del montaje experimental y la evaluación de las variables, del diseño experimental de <i>Abies religiosa</i> en interacción ectomicorrizal y nanopartículas.....	36
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de supervivencia en plantas de <i>A. religiosa</i> . Los tratamientos en condiciones libres de estrés se muestran en líneas continuas y los tratamientos en condiciones de estrés hídrico en líneas punteadas.....	40
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de supervivencia en los tratamientos en condiciones de estrés hídrico que fueron aplicados a <i>Abies religiosa</i> .....	40
<b>Figura 5.</b> Tasa de crecimiento de altura en <i>Abies religiosa</i> durante los meses de septiembre 2020 a noviembre 21. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barras de color con trama. Las barras indican el error estándar.....	42
<b>Figura 6.</b> Tasa de crecimiento del diámetro en <i>Abies religiosa</i> durante los meses de septiembre 2020 a noviembre 21. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barras de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.....	43
<b>Figura 7.</b> Tasa de crecimiento de la cobertura en <i>Abies religiosa</i> durante los meses de septiembre 2020 a noviembre 21. Los tratamientos en condiciones libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barras de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.....	44
<b>Figura 8.</b> Biomasa del peso fresco de la parte aérea en plantas de <i>A. religiosa</i> . Los tratamientos regados a libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barras de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.....	44
<b>Figura 9.</b> Biomasa del peso fresco de la parte radical en plantas de <i>A. religiosa</i> . Los tratamientos regados a libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barras de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.....	44
<b>Figura 10.</b> Cociente de biomasa seca de raíz en plantas de <i>A. religiosa</i> . Los tratamientos regados a libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barras de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de	

Tukey.....48

**Figura 11.** Longitud de raíz en plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos regados a libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.....50

**Figura 12.** Volumen de raíz en plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.....51

**Figura 13.** Número de bifurcaciones en la raíz de plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.....52

**Figura 14.** Número de cruces en la raíz en las plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.....52

**Figura 15.** Número de puntas en raíz en las plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.....53

**Figura 15.** A. Escaneo de parte aérea y radical de *Abies religiosa*. Las raíces de colores ámbar o amarillo rojizos. B. Micorriza con forma no ramificada y dicotómicamente bifurcada.....54

## RESUMEN

Las especies de montaña en la actualidad se enfrentan a los efectos directos del cambio climático, debido al incremento de temperatura y cambios en el patrón de precipitación. Esto puede desarrollar condiciones de sequía o estrés por calor, a las cuales la especie no está adaptada, por lo que es necesario implementar estrategias que permitan que las especies puedan existir a largo plazo, ya que se predice que en las próximas décadas tendrá una reducción de hábitat y del clima al cual están adaptadas. *Abies religiosa* (Pinaceae) es una especie de clima templado que se encuentra restringida a las zonas montañosas, se distribuye ampliamente en los picos más altos de las montañas del Eje Neovolcánico Transversal en la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca. Esta especie requiere de estrategias que permitan su preservación, una posible estrategia consistiría en la adaptación de la especie a sitios donde se predice que el clima favorecerá su desarrollo. Se propone la inoculación con hongos ectomicorrízicos (HEM), para que la planta obtenga con mayor facilidad agua y nutrientes que le ayuden a tolerar las condiciones de estrés. Además de lo anterior, se propone adicionar nanotubos de carbono de pared múltiple (NWCNTs), que han demostrado un efecto significativo en la respuesta fisiológica y anatómica relacionada con la absorción. Por lo que este trabajo contribuye al conocimiento de los efectos ecofisiológicos en plantas de *Abies religiosa* al ser inoculadas con HEM *Pisolithus arhizus* y adicionadas con NWCNTs de forma individual y en interacción, sometidas a estrés hídrico. El experimento consta de ocho tratamientos con 30 réplicas, donde una réplica es una sola planta, se inocularon y se adicionaron NWCNTs, bajo dos condiciones de riego; libre y bajo estrés hídrico. Se evaluó la supervivencia y el crecimiento en plantas de *A. religiosa*, así como la biomasa del peso fresco y seco de la parte aérea y radical, así como la arquitectura radical. Se analizó con los programas estadísticos R, JMP y Excel. Los resultados de supervivencia y crecimiento de plantas de *A. religiosa*, mostraron diferencias significativas, todos los tratamientos en condiciones de estrés hídrico presentaron una menor supervivencia y menor crecimiento. En el tratamiento en condiciones de estrés hídrico la interacción entre ectomicorrizas y nanotubos de carbono incrementa un 17% en la supervivencia respecto al control. Las variables

de crecimiento, mostraron diferencias significativas en: altura, diámetro a la altura de la base y cobertura, hay una tendencia en los tratamientos bajo estrés hídrico a presentar menor crecimiento, lo que confirma la susceptibilidad de la especie ante las condiciones de cambio climático. En nuestros resultados observamos que los tratamientos aplicados a la especie *Abies religiosa* presentan diferencias significativas, para las variables de crecimiento, biomasa aérea y radical así como en la arquitectura de raíz, hay una tendencia en los tratamientos en condiciones de estrés hídrico a presentar una reducción en el crecimiento y acumulación de biomasa, por lo que podemos decir que la condición de estrés hídrico es el principal factor que determina el establecimiento de las plántulas. Se confirma que la especie de *Abies religiosa*, es una especie vulnerable y muy sensible ante condiciones de estrés hídrico, por lo que es importante continuar con la investigación de esta especie, en la búsqueda de estrategias que puedan mejorar las condiciones de crecimiento, pero sobre todo de supervivencia.

Palabras clave: micorrizas, nanotubos de carbono, oyamel.

## ABSTRACT

Mountain species today face the direct effects of climate change, due to rising temperatures and changes in precipitation patterns. This can develop drought or heat stress conditions, to which the species is not adapted, so it is necessary to implement strategies that allow the species to exist in the long term, since it is predicted that in the coming decades it will have a reduction in habitat and the climate to which they are adapted. *Abies religiosa* (Pinaceae) is a species of temperate climate that is restricted to mountainous areas, it is widely distributed in the highest peaks of the mountains of the Transverse Neovolcanic Axis in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve. This species requires strategies that allow its preservation, a possible strategy would consist of the adaptation of the species to places where it is predicted that the climate will favor its development. Inoculation with ectomycorrhizal fungi (HEM) is proposed, so that the plant obtains more easily water and nutrients that help it tolerate stress conditions. In addition to the above, it is proposed to add multi-walled carbon nanotubes (NWCNTs), which have demonstrated a significant effect on the physiological and anatomical response related to absorption. Therefore, this work contributes to the knowledge of the ecophysiological effects in seedlings of *Abies religiosa* when inoculated with HEM *Pisolithus arhizus* and added with NWCNTs individually and in interaction, subjected to water stress. The experiment consists of eight treatments with 30 replicas, where a replica is a single plant, NWCNTs were inoculated and added, under two irrigation conditions; free and low water stress. Survival and growth in seedlings of *A. religiosa* were evaluated, as well as the biomass of the fresh and dry weight of the aerial and radical part as well as the radical architecture. It was analyzed with the statistical programs R, JMP and Excel. The results of survival and growth of seedlings of *A. religiosa*, showed significant differences, all treatments in conditions of water stress presented a lower survival and lower growth. In the treatment in conditions of water stress, the interaction between ectomycorrhizae and carbon nanotubes increases by 17% in survival with respect to the control. The growth variables showed significant differences in: height, diameter at the height of the base and coverage, there is a tendency in treatments under water stress to present lower growth, which confirms

the susceptibility of the species to climate change conditions. In our results we observe that the treatments applied to the species *Abies religiosa* present significant differences, for the growth variables, aerial and radical biomass as well as in the root architecture, there is a tendency in the treatments in conditions of water stress to present a reduction in the growth and accumulation of biomass, so we can say that the condition of water stress is the main factor that determines the establishment of the seedlings. It is confirmed that the species of *Abies religiosa*, is a vulnerable species and very sensitive to conditions of water stress, so it is important to continue with the research of this species, in the search for strategies that can improve the conditions of growth, but above all of survival.

Keywords: mycorrhizae, carbon nanotubes, oyamel.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los acelerados cambios globales, como el cambio en el clima, el agotamiento de la biodiversidad, la acidificación y contaminación de los océanos han desencadenado una crisis ambiental (Rockström *et al.*, 2009). En la última década se ha observado una mayor variabilidad climática, se presentan cambios en factores como la radiación, la temperatura, la precipitación y la estacionalidad, estos factores alteran drásticamente la distribución de las especies que habitan nuestro planeta (Malcolm *et al.*, 2002, Lemoine 2015, Hansen 2012;). Esto ha llevado a los científicos a desarrollar modelos matemáticos que permiten hacer estimaciones futuras, con el objetivo de comprender como va a cambiar el clima y los efectos en los biomas. En México estos modelos proyectan para las próximas décadas un aumento en la temperatura media anual y una disminución en la precipitación, además una expansión de los climas propicios para los matorrales desérticos y una disminución en el hábitat climático para los bosques templados de coníferas (Rehfeldt *et al.*, 2012). Estos cambios podrían provocar que los bosques de coníferas se extiendan hacia las zonas más altas y por otra parte existe la posibilidad de que las especies de las zonas altas de las montañas sean los primeros grupos de especies en extinguirse (Parmesan 2006; Sáenz-Romero *et al.*, 2009; 2010; 2012a; Rehfeldt *et al.*, 2012; Sáenz-Romero *et al.*, 2020, Gómez-Pineda *et al.*, 2020, ICPP, 2020).

Las especies de alta montaña, como resultado de su evolución tiene una distribución restringida, los bosques de oyamel por ejemplo se presentan como un remanente de los bosques boreales, estos bosques requieren de condiciones climáticas diferentes al resto de las demás coníferas (Madrigal 1967; Rzedowski 2006, Martínez Méndez *et al.*, 2016). Es posible que ya se estén presentando cambios en estos bosques como una respuesta al clima, se predice que estas poblaciones se puedan ver afectadas al estar sometidas a condiciones de climas más cálidos y secos (Trejo *et al.*, 2007). Los bosques como ecosistemas pueden contrarrestar los efectos negativos del cambio climático, por lo que es importante favorecer su recuperación para que puedan ser funcionales y ser capaces de tolerar las condiciones ambientales que existirán a largo plazo (Gómez-Ruiz y Lindig-Cisneros,

2017). Estas poblaciones de oyamel ocupan en México una extensión total de 144 000 hectáreas (FAO 2010), lo que es relativamente pequeña, se enfrenta en algunos casos a un manejo forestal sin control, con incendios forestales frecuentes, la tala ilegal y el cambio de uso de suelo, que elimina gran parte de la vegetación (SEMARNAT, 2007). Aunado a esto se presentan periodos de sequía o el estrés por calor, estas alteraciones en las poblaciones de coníferas pueden operar como un factor desencadenante que predispone a la mortalidad de las especies, por la relación que existe entre la sequía y los aspectos fisiológicos en las plantas (Breshears *et al.*, 2005; Allen *et al.*, 2010; Sturrock *et al.*, 2011).

*Abies religiosa* (Pinaceae) es una especie que se encuentra restringida a los picos más altos de la montaña, en el Estado de Michoacán se localiza una población en la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca (Madrigal, 1967; Pérez-Miranda *et al.*, 2014; Ortiz-Bibian *et al.*, 2019). Al tener ciertas particularidades climáticas un cambio en el clima la convierte en una especie vulnerable, además de enfrentarse a otros factores que provocaría una reducción en su nicho ecológico (Sáenz-Romero *et al.*, 2012; Carbajal-Navarro *et al.*, 2019; Manzanilla-Quiñones *et al.*, 2018; Ortiz-Bibian *et al.*, 2019, Gómez-Pineda *et al.*, 2020), por lo que es necesario implementar estrategias para la conservación y la restauración de la especie para asegurar que pueda resistir a las condiciones a un largo plazo (Gómez-Mendoza y Arriaga, 2007; Sáenz-Romero *et al.*, 2016; Gómez-Ruiz y Lindig-Cisneros, 2017; Ipinza, 2018).

Las especies de alta montaña son poco resistentes al estrés por sequía, una de las estrategias que se propone para su establecimiento en sitios de restauración es la inoculación con hongos micorrícicos. Las asociaciones ectomicorrícicas pueden tener efectos positivos sobre la planta, ya que el hongo le otorga ventajas para su establecimiento (Harris-Valle *et al.*, 2009; Gómez-Romero *et al.*, 2013; 2015). La planta explora mayor volumen de suelo, absorben y transportan elementos nutritivos hacia la raíz, lo que incrementa el crecimiento y mejora el estado fisiológico de la planta (Sierverding, 1989; Honrubia, 2009). Sin embargo, se hace necesario

explorar otras áreas de la ciencia como la nanotecnología la cual ha desarrollado nanomateriales que son utilizados en procesos biológicos y que se ha demostrado tienen un efecto significativo en la respuesta fisiológica de las plantas (Khan *et al.*, 2019). Actualmente se utilizan los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) para evaluar los efectos en plantas, así como las interacciones que puedan tener con otros componentes característicos de ecosistemas forestales como los hongos ectomicorrízicos.

Algunos autores han reportado efectos importantes en la germinación y el desarrollo de plantas de importancia económica, cambios relacionados con modificaciones en la absorción de agua (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Modal *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012), así como en plantas forestales *Lupinus elegans* y *Eysenhardtia polystachya*, donde se muestra evidencia que sugiere que la naturaleza proporciona condiciones para la formación de nanotubos de carbono (Lara-Romero *et al.*, 2017). Por lo que se hace necesario el desarrollo de estrategias de restauración ecológica que puedan contribuir a la conservación de las especies vulnerables.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cambio climático

Los cambios en el clima ocurren de manera natural a través de un tiempo determinado, sin embargo, en las últimas décadas se ha observado una mayor variabilidad climática a consecuencia de las actividades humanas. Los cambios en el clima tienen un efecto negativo a nivel global, como el aumento de la temperatura y cambios en los patrones de precipitación que pueden ocasionar alteraciones en los ciclos de energía y del agua (Hasen, 2008; Hasen, 2012; Fetting *et al.*, 2013; Ripple *et al.*, 2019). Las actividades humanas, han contribuido con las emisiones de gases de efecto invernadero, consecuentemente genera un aumento de temperatura, lo que posibilita desarrollar condiciones de sequía extrema, olas de calor prolongado, así como cambios en la frecuencia y la duración de las lluvias (Hasen 2012; Fetting *et al.*, 2013).

Esta preocupación ha llevado a generar modelos matemáticos que permiten hacer estimaciones con el objetivo de comprender el clima y proyectar diferentes escenarios del cambio climático para México (Sáenz-Romero *et al.*, 2009; Sáenz-Romero *et al.*, 2010, ICPP 2020). Estos modelos hacen inferencia en las relaciones planta-clima, al predecir la ocurrencia de los climas futuros. Entre las proyecciones destacan la expansión de los climas adecuados para los bosques tropicales secos y matorrales desérticos y una reducción de hábitat climático propicio para los bosques templados de coníferas (Sáenz-Romero *et al.*, 2010, Rehfeltdt, 2012). Para el estado de Michoacán indicaron que podría ocurrir una reducción del área ocupada por el hábitat climático propicio para vegetación propia de climas templados, en contraste con el hábitat propicio para tipos de vegetación de clima cálido o semiárido (Sáenz-Romero *et al.*, 2012), (Tabla 1).

**Tabla1.** Proyecciones climáticas para México y Michoacán (Sáenz-Romero *et al.*, 2009, 2010, 2012<sup>a</sup>, 2020 y Rehfeld *et al.*, 2012).

	Año 2030	Año 2060	Año 2090
México	1.5 °C	2.3 °C	3.7 °C
	Aumento en la temperatura media anual		
	Precipitaciones con menos de 200mm		
	Climas: expansión de bosques tropicales, matorrales desérticos; reducción: bosques de coníferas.		
Michoacán	1.4 °C	2.2 °C	3.4°C
	< precipitación		
	Clima: expansión de climas cálidos o semiáridos; Reducción de climas templados.		

### 2.1.2 Impacto del clima en los bosques templados

Las condiciones climáticas son responsables de la distribución de las especies, el clima es un factor que controla la estructura y la productividad de una comunidad vegetal (Gitay *et al.*, 2002, López-Mata *et al.*, 2012; Walte-Vega *et al.*, 2017). Las especies arbóreas a lo largo de su historia de vida se han adaptado a los cambios ambientales, su plasticidad fenotípica les permitió a los individuos y las poblaciones sobrevivir por décadas a las condiciones adversas, y producir genotipos que estuvieran adaptados. Sin embargo, las anomalías climáticas que se presentan ocurren con mayor frecuencia e intensidad ocasionando que las especies no puedan adaptarse y sus poblaciones no puedan crecer y reproducirse ante las nuevas condiciones de cambio (Hamrick *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2010; Rehfeldt *et al.*, 2012; Fettig *et al.*, 2013).

Se ha documentado que el aumento en la temperatura y la disminución en la precipitación, crean condiciones de climas más áridos, existe la probabilidad de que condiciones de sequía se extiendan a sitios que se consideraban húmedos deteriorando la vegetación, ocasionando un desfase adaptativo entre las poblaciones vegetales y el clima al cual están adaptadas (Ledig, 2004; Sáenz-

Romero *et al.*, 2010). Este desacoplamiento puede alterar la composición, estructura y biogeografía de los bosques, ocasionando un aumento en la mortalidad de árboles en una zona o región geográfica amplia, asociados con el estrés fisiológico inducido por la sequía o estrés por calor (Allen *et al.*, 2010; Sáenz-Romero *et al.*, 2015).

La sequía puede operar con un factor desencadenante que predispone a la mortalidad de las especies. Los árboles que se encuentra estresados son más susceptibles a los ataques biológicos por hongos patógenos o insectos, generando brotes de plagas y enfermedades de manera extendida. Se sabe que algunas de las especies de insectos no intervienen directamente la mortalidad de las especies arbóreas, pero si estos insectos atacan constantemente y además se asocian con hongos, pueden ser vectores de enfermedades que pueden causar la muerte del individuo (Breshears *et al.*, 2005; Sturrock *et al.*, 2011). Además, se está investigando sobre los efectos en la fisiología de las plantas, como consecuencia de la sequía, ya que se han observado algunas respuestas fisiológicas que, de manera general, predisponen a la planta a la mortalidad como consecuencia de estrés por sequía (Allen *et al.*, 2010). Es posible que algunos bosques ya estén cambiando en respuesta al clima, en México se espera que entre el 20 y 47% de la cobertura vegetal, se vea afectada al estar sometidas a condiciones de clima más cálido y seco (Trejo *et al.*, 2007).

## **2.2. Conservación y restauración de bosques templados**

Los bosques se enfrentan a diversos procesos que modifican su estructura y su funcionamiento, por lo que se requiere buscar estrategias y acciones que posibiliten la conservación de estos ecosistemas y de las especies que los habitan (Rodríguez-Trejo & Myers, 2010; Sturrock *et al.*, 2011, Burney *et al.*, 2015; Gómez & Lindig 2017; López-Barrera *et al.*, 2017; Lindig-Cisneros, 2018). A nivel mundial los bosques son territorios que albergan una gran abundancia de recursos deben protegerse, las especies de coníferas son el grupo taxonómico principal que

determina los límites de áreas naturales protegidas, reconociendo así la importación de biomas completos para la conservación de otras especies (Myers *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2004). En la actualidad sabemos por los reportes mundiales de áreas naturales protegidas que para el año 2000 solo el 3.5% de la superficie terrestre del planeta estaba destinada a la conservación, en 2004 aumentó a un 11.9%, sin embargo, sólo el 5.1% de estas áreas se destinan explícitamente para la conservación de la biodiversidad. Los biomas con mayor cobertura de área protegida son los bosques templados de coníferas con un 25%, seguido por pastizales y sabanas inundadas (18%) y selvas húmedas o bosques subtropicales de hoja ancha (18%) (Brooks *et al.*, 2004; FAO 2010).

Los bosques templados de México constituyen alrededor de 20% de la cobertura vegetal, lo que los hace la clase de bosques más ampliamente distribuidos y donde hay más esfuerzos de conservación (Galicia *et al.*, 2018). Los bosques, de manera general, contribuyen en la regulación del ciclo hidrológico y del clima, además de desempeñar un papel importante en la estabilización y protección de los suelos, amortiguan el impacto del calentamiento global, también proveen a la humanidad de recursos y servicios por lo que es fundamental su conservación ya que posibilitan la vida en la Tierra (Daily *et al.*, 1997; MEA 2005). A partir de la década de los 90, se han desarrollado investigaciones que tienen el compromiso de cumplir con los acuerdos que involucran la conservación y la restauración de los bosques a nivel mundial, lo cual ha permitido el avance de prácticas exitosas en México (López-Barrera *et al.*, 2017).

En el estado de Michoacán se han desarrollado estrategias con el objetivo de conservar y restaurar los bosques templados, buscando incrementar la supervivencia y el crecimiento de las especies forestales. En los últimos años se han integrado estrategias que ayuden a disminuir el impacto de las condiciones ambientales derivadas del cambio climático como la sequía, buscando incrementar la resistencia de las especies favoreciendo la adaptación a largo plazo (Mendoza-

Maya *et al.*, 2015; Castellanos-Acuña *et al.*, 2015; Lindig-Cisneros *et al.*, 2018; Flores-García *et al.*, 2021).

### **2.3. Bosque templado de *Abies* en México**

En Mesoamérica y el norte de México, los oyameles o abetos (*Abies*, Pinaceae) se presentan como un remanente de los bosques boreales, con una distribución geográfica de manera dispersa y localizada; en algunos casos se presentan como manchones aislados o restringidos a un cerro, una ladera o cañada. Estos bosques de *Abies* requieren de condiciones climáticas sobresalientes al resto de las demás coníferas, su localización a menudo los protege de la acción de los vientos y la insolación intensa, estos árboles prosperan en zonas de clima templado y frío por lo que estos bosques están confinados a sitios de alta montaña, entre los 2 400 y 3 600 m de altitud (Madrigal, 1967; Rzedowski, 2006; Martínez Méndez *et al.*, 2016).

Las áreas continuas de bosque de *Abies* con mayor extensión se presentan en las serranías del Valle de México y las montañas sobresalientes del Eje Volcánico Transversal, en la Sierra Madre del Sur y del Norte, en la Sierra Madre Occidental y Oriental. En estas áreas se han reconocido seis especies de *Abies*; la clasificación de todas las especies ha sido delimitada a partir de caracteres vegetativos y reproductivos, así como sus preferencias ecológicas y su geografía, separando al género dentro de la familia Pinaceae (Rzedowski, 1978; Farjon & Rushforth, 1989; SEMARNAT, 2010; Martínez-Méndez *et al.*, 2016). Se han realizado estudios para intentar explicar algunos patrones filogenéticos entre las especies del género *Abies*, encontraron que la relación que existe entre los nichos de las especies que se distribuye en México son reflejo de su origen relativamente reciente y que comparten un ancestro en común junto con las otras especies que se distribuyen en Centroamérica (Jaramillo-Correa *et al.*, 2008; Martínez-Méndez *et al.*, 2016).

La extensión territorial que ocupa esta comunidad vegetal en México ha ido disminuyendo, Flores *et al.*, 1971 mencionan que la extensión de bosques era de

0.16% del área total del país, es decir 313 479.68 hectáreas. La SEMARNAT, en 2008, reportó una disminución en un 54.61%, es decir 171 210 hectáreas. En 2010 se registra que los bosques de *Abies* cubren alrededor de 144 000 hectáreas (FAO, 2010). Esta es un área relativamente pequeña, aunado a esto las áreas donde se distribuyen se enfrenta en algunos casos a un manejo forestal sin control, con incendios forestales frecuentes, la tala ilegal y el cambio de uso de suelo, que elimina gran parte de la vegetación (SEMARNAT, 2007).

De las especies que se registran seis son endémicas para México y están incluidas en alguna categoría de riesgo (Gernandt-Pérez de la Rosa, 2014; Martínez-Méndez *et al.*, 2016; González-Cubas *et al.*, 2017). En Michoacán se reportan dos especies *A. religiosa*, *A. guatemalensis* y una variedad *A. religiosa emarginata* (Silva-Sáenz, 2019).

Este género es de gran importancia económica por su madera para diversos usos, es utilizado como pulpa para papel, para resina, bálsamo de Canadá o bálsamo de abeto y como árboles de navidad (Madrigal-Sánchez y Chávez-Carmona, 1992). Los bosques de oyamel también proporcionan beneficios biológicos y sociales, protección contra la erosión, captación de agua, regulación de las escorrentías, recreación, etc.

### **2.3.1 *Abies religiosa* (Kunth Schtdl. et Cham.)**

*Abies religiosa* es una especie que tiene ciertas particularidades climáticas. Sus poblaciones se encuentran restringidas a los puntos más altos de las montañas, por lo que representan una comunidad bien definida por sus especificaciones ambientales, muchas veces en barrancas o terrenos con fuertes pendientes ya que ofrecen un microclima especial, entre los 2 400 y 3 500 msnm (Madrigal 1967; Rzedowski, 1978). En Michoacán su principal área de distribución se localiza en la Faja Volcánica Transversal y en la Sierra Madre del Sur. Los bosques más extensos se ubican al oriente en la frontera con el Estado de México, comprende los sitios de

hibernación de las poblaciones de *Danaus plexippus* L., en el área central de la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca (RBMM) (Pérez-Miranda *et al.*, 2014; Ortiz-Bibian *et al.*, 2019). La RBMM ha sufrido algunos eventos de perturbación como incendios forestales, tormentas de viento, brotes de plagas que son asociados con el cambio climático, estos hechos hacen que las poblaciones de *Abies religiosa* sean vulnerables (Sáenz-Romero *et al.*, 2012; Manzanilla-Quiñones *et al.*, 2018; Carbajal-Navarro *et al.*, 2019; Ortiz-Bibian *et al.*, 2019).

Las investigaciones que se realizan sobre estas especies son importantes ya que contribuyen a tener un mayor conocimiento que permitirá tener herramientas para la conservación y restauración de los bosques de oyamel. Uno de los estudios más importantes que se tienen para esta zona de la RBMM es el realizado por Sáenz-Romero *et al.*, (2012), en donde modelan el nicho ecológico de *A. religiosa* en relación con las afectaciones que puede provocar el cambio climático; sugieren estrategias de manejo y de conservación por ser uno de los sitios de estancia invernal de mariposas monarca en México. Proyectaron el nicho climático en los climas futuros y encontraron: una disminución del 69.2% para el 2030, 87.6% para el 2060, y 96.5% para 2090 a nivel nacional. Propusieron la migración asistida de *A. religiosa* en 275 m de altitud para que las poblaciones de 2030 ocupen los mismos climas que hoy en día. Las proyecciones también muestran que, para finales de siglo, el hábitat adecuado para la mariposa monarca no se encontrará dentro de la Reserva de la Biósfera. Por lo que se proponen opciones de gestión para asegurar la perpetuación del futuro hábitat de la especie. Castellanos- Acuña *et al.*, (2014) determinaron la existencia de diferencias morfológicas entre las poblaciones *Abies religiosa*, con esto se establece una zonificación altitudinal, que comprende las diferencias genéticas para predecir el movimiento de semillas en los programas de reforestación. Se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones que se distribuyen a lo largo de un gradiente altitudinal, por lo que se sugieren zonificaciones provisionales para la recolecta y la producción de planta en viveros y la reforestación en sitios ubicados en la misma zona. En otro estudio Pérez-Miranda *et al.*, (2014), realizaron un trabajo para ver las posibles modificaciones del paisaje

como efecto del cambio climático determinando los niveles de aptitud del terreno para esta especie, en el cual se muestra una disminución del 9% de la superficie adecuada para su establecimiento, con respecto al terreno forestal de coníferas.

Las poblaciones endémicas de *Abies religiosa* poseen gran importancia económica, ecológica y social (Oros-Ortega *et al.*, 2017). Los bosques de oyamel aportan valiosos dividendos económicos al sector industrial. En la parte central del país donde se registran las zonas de producción maderable, contribuye con 2.8% de la producción de madera anual (SEMARNAT, 2016; Flores, 2019). La SEMARNAT en 2018, reportó que la producción forestal maderable en Michoacán fue de 35 290.34m<sup>3</sup>, por lo que se necesita tomar en cuenta las características de la especie y los cambios a los cuales se enfrenta para hacer un mejor manejo forestal y permitir la recuperación de estos bosques (Sáenz-Romero *et al.*, 2012).

#### **2.4 Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico.**

Las plantas de manera individual responden funcionalmente a los cambios tanto en condiciones óptimas como desfavorables. Cuando una planta está sometida a condiciones ambientales significativamente diferentes a las óptimas y que además influyen de manera negativa en ellas, se dice que está sometidas a estrés. Las plantas pueden experimentar periodos severos o transitorios de estrés, en los cuales activan mecanismos de aclimatación como respuesta a esta condición, esta respuesta a su vez puede presentar alteraciones en la anatomía, morfología, fisiología y bioquímica afectando su desarrollo y crecimiento, y en consecuencia su productividad (Hsiao, 1973; Levitt, 1980; Hsiao, 1983; Nilsen y Orcutt, 1996; Nonami 1998a; UNER, 2011; Ojeda-Silvera, 2015).

El estrés causado por déficit hídrico limita el establecimiento exitoso de las plantas, está directamente relacionado con la disponibilidad de agua en el suelo, el déficit de vapor en la atmósfera y las condiciones estructurales de la planta misma. El balance hídrico de la planta va a permitir regular la absorción y la pérdida de agua, así como permitir la difusión y el flujo masivo de solutos que son esenciales para el transporte

y distribución de nutriente y metabolitos en las plantas (Kramer, 1963; Soriano, 1980; Hsiao & Bradford, 1983; Ojeda-Silvera, 2015).

El suelo tiene una gran capacidad de contener agua, puede encontrarse en un rango que va desde la capacidad de campo (saturación) hasta el porcentaje de marchitez permanente. El agua que se encuentra disponible es absorbida por la planta gracias al balance hídrico que permite el movimiento del agua; la cual se mueve de una zona donde el potencial hídrico es mayor, hacia zonas donde es menor, por lo que la planta solamente absorberá agua si su potencial hídrico interno es menor que su potencial externo (Azcón-Bieto y Talón, 2013). El potencial hídrico, representa la capacidad de las moléculas de agua para moverse en cualquier sistema y es una medida de la energía libre del agua, además constituye la resultante de fuerzas de orígenes diversos (osmótica, capilar, turgente) que liga al agua del suelo a los diferentes tejidos de la planta. (Martín de Santa Olalla *et al.*, 2005; Taiz y Zeiger, 2006).

El estrés por déficit hídrico puede describirse según Hsiao (1973) en tres grados: estrés leve, moderado y severo. El estrés leve o moderado se traduce en alteraciones del metabolismo de respuesta reguladoras. Es poco probable que un estrés leve pueda causar daños en los componentes bioquímicos o los orgánulos de la célula, pero tendrá efectos pronunciados como en el crecimiento celular, síntesis de pared y síntesis de proteínas. Dependiendo de la especie, un estrés leve como el crecimiento celular reducido puede producir un efecto indirecto como un cambio en la turgencia celular, y este cambio de turgencia puede producir cambios en la presión a través de la pared celular puede producir; es decir un efecto directo del estrés hídrico conduce a efectos secundarios.

Por tanto, sabemos que las plantas sometidas a estrés tienen como respuesta diferentes mecanismos de resistencia, lo que ha permitido comprender los procesos involucrados en la adaptación de las plantas a un ambiente adverso y conocer hasta cierto punto la respuesta que tendrá una planta a los cambios globales (Valladares *et al.*, 2014).

Diversos autores han realizado clasificaciones de las principales estrategias de las plantas ante estrés hídrico, en general se denominan tres mecanismos de resistencia: evitación, escape y tolerancia. El mecanismo de escape se presenta en especies que completan el ciclo vital antes del período de estrés, las plantas ajustan su fenología para cumplir su ciclo fuera de los períodos de déficit hídrico, tienen un alto grado de plasticidad que le permite realizar estos cambios fisiológicos. Otras plantas evitan la deshidratación celular maximizando la absorción de agua por diferentes estrategias como el desarrollar sistemas radicales profundos, cierre de estomático, ligeros descensos del contenido hídrico dentro de los tejidos, lo que permiten que la planta se encuentre un estado de turgor. Este mecanismo evitación permitiría a las plantas sobrevivir al estrés y continuar creciendo y desarrollándose en condiciones de estrés. En el mecanismo de tolerancia, la planta sigue siendo funcional aun con la pérdida de agua, es decir resisten en forma reversible a la deshidratación de los tejidos. Realizan un ajuste bioquímico para sobrevivir al potencial hídrico bajo, desarrollando dos tipos de mecanismo: mantenimiento de la turgencia celular mediante el ajuste osmótico y elástico y permitiendo la tolerancia a la deshidratación, tolerancia protoplasmática. (Kramer, 1963; Hickman, 1970; Hsiao, 1973; Levitt, 1980; Sánchez & Aquirreolea, 2000; Azcón-Bieto y Talón, 2013; Valladares *et al.*, 2014; Ojeda-Silvera, 2015).

## **2.5. Asociaciones micorrízicas**

Las asociaciones micorrízicas son el resultado de la relación que se establece entre las raíces de las plantas y el micelio de los hongos, su principal función es el intercambio de nutrientes (Brundrett, 1991). Este intercambio beneficia a las especies vegetales al realizar una mejor asimilación de los nutrientes, es una condición común en la mayoría de las plantas, el establecimiento no solo depende de los simbiosis sino de la existencia de condiciones que incluyen factores químicos, físicos y biológicos (Smith y Read, 1997; Read y Pérez-Moreno, 2003).

La clasificación de las micorrizas se basa en las características morfológicas de la colonización (el grado de penetración del hongo) y en los taxones de los simbioses (Smith & Read, 1997). Se reconocen al menos siete tipos de asociaciones micorrizas, que involucran diferentes grupos de hongos y plantas; ericoides, arbutoides, monotropoides, orquideoides, ectendomicorrizas y ectomicorrizas, en cualquiera de ellas se debe establecer un contacto íntimo entre las hijas y las células vegetales (Allen, 1991; Honrubia *et al.*, 1992; Smith y Read, 1997; Honrubia, 2009).

En la actualidad estos siete tipos de micorrizas han sido agrupadas en tres grandes grupos basados en la anatomía de las plantas: ectomicorrizas, endomicorrizas y un grupo intermedio denominado ectendomicorrizas (Peyronel *et al.*, 1969; Molina *et al.*, 2005). Estos hongos micorrícicos pertenecen a las divisiones Basidiomycota, Ascomycota y Zygiomycota (Brundrett, 1991; Comandini *et al.*, 2012).

El proceso de micorrización inicia con el desarrollo del micelio del hongo el cual procede de la germinación de las esporas, desarrollando filamentos conocidos como hifas, los cuales son los encargados de llevar a cabo el contacto con la raíz; las hifas se modifican en una estructura llamada apresorio, la cual, al adherirse al sustrato, permite que el micelio penetre intercelularmente las células de su hospedero. La formación de esta simbiosis concluye al producir estos cambios fisiológicos, morfológicos y estructurales en los tejidos colonizados por el hongo y la pared celular del simbionte fúngico, dado lugar a una alteración de las actividades enzimáticas que integran los procesos metabólicos (Smith y Read, 1997).

Los beneficios de las micorrizas en ecosistemas forestales, tiene un papel clave en los procesos cíclicos en los ecosistemas y la estructura del suelo, funcionan como la interfaz principal suelo-planta para los hospederos. Las plantas no son capaces de sobrevivir en ausencia de la asociación, es por esto que pueden tener un efecto benéfico a nivel fisiológico e incrementar la asimilación de nutrientes al facilitar la captura de forma iónica, de compuestos como el fosforo o el Nitrógeno (Brundrett, 2002).

Uno de los mayores beneficios que tienen las micorrizas es la capacidad de absorción de agua, generando en la planta tolerancia a estrés hídrico. Esta

tolerancia se debe a que las plantas que son micorrízicas tienen un incremento en la turgencia, en su potencial de agua foliar, su conductancia estomatal, conductividad hidráulica de la raíz, capacidad de absorción, recuperación de la capacidad fotosintética (Bethlenfalvay *et al.*, 1988). Es decir, los cambios en el potencial osmótico contribuyen a una mayor tolerancia a condiciones de sequía (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995). Se incrementa la conductividad hídrica de la planta al desarrollar una extensa red de hifas e incrementar la capacidad de exploración, le permite tener una mayor absorción al llegar a zonas más allá de la cual tiene acceso el sistema radical de la planta (Molina *et al.*, 2005). Estos beneficios son la base que le permite a las plantas micorrizadas presentar una mayor adecuación, mayor competitividad y productividad (Molina *et al.*, 2005; Smith y Read, 2008.)

### **2.5.1. Ectomicorrizas**

Las ectomicorrizas, a veces se denominan asociaciones ectotróficas o micorrizas de revestimiento. Son asociaciones mutualistas entre hongos superiores y plantas de gimnospermas o angiospermas (Brundret, 1996). El término ectomicorriza (ECM) fue propuesto por Peyronel *et al.*, (1969), se define como una micorriza en la que el hongo se desarrolla fuera de las células de la raíz. La simbiosis ECM tiene tres componentes estructurales; raíces modificadas que contienen tejidos vegetales y fúngicos; estructuras fúngicas reproductoras; micelio externo que incluye hifas absorbentes, cordones miceliales y rizomorfos (Brundrett *et al.*, 1996). Esta asociación se forma predominantemente en las finas puntas de las raíces del hospedero, donde el hongo crece y forma un manto compacto en la superficie de la raíz cortas y penetra el córtex intercelularmente para producir una red micelial conocida como “red de Hartig”, que es considerada la interfaz simbiótica (Marx, 1972; Brundrett *et al.*, 1996, Smith y Read 1997; Brundrett, 2002; Pérez-Moreno & Read, 2004; Comandini *et al.*, 2012).

Se han realizado varias estimaciones sobre la diversidad de estos hongos, la mayoría de estas estimaciones se basan en el estudio de los cuerpos fructíferos

bajo el reconocimiento morfológico, en la actualidad un trabajo de Comandini *et al.*, (2012), estimaron que existen entre 20 000 a 25 000 especies de hongos ectomicorrízicos, se reconocen 7 950 especies descritas y 234 géneros, la gran mayoría son basidiomicetes y ascomicetes (Pérez-Moreno & Read, 2004).

Los hongos ectomicorrízico no se encuentra de forma aislada en el ambiente, están sujetos a la interacción con las plantas hospederas, las condiciones ambientales y del suelo (Brundrett, 1991). Son un componente dominante de la comunidad microbiana en la rizosfera de árboles y arbustos en las regiones boreales y alpinas, tienen una estrecha relación con las raíces de angiospermas o gimnospermas, ya que tienen mayor probabilidad de ocurrir en suelos con alta materia orgánica donde hay una predominancia de nutrientes orgánicos, pero también son importantes en bosques templados caducifolios y bosques tropicales (Brundrett, 1991; Honrubia *et al.*, 1992; Smith y Read, 1997, Brundrett 2002; 2005).

Las plantas pertenecen principalmente a las familias: Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, en zonas tropicales, las familias Nothofagaceae, Myrtaceae, Dipterocarpaceae, y varios géneros Cesalpinioides (Comandini *et al.*, 2012). Los hongos ectomicorrízicos basidiomicetes pertenecen principalmente a las familias Amanitaceae, Boletaceae, Cortinariaceae, Russulaceae, Tricholomataceae, Rhizopogonaceae y Sclerodermataceae. Varios órdenes de ascomicetos, principalmente Eurotiales, Tuberales, Pezizales y Helotiales (Marx, 1972).

Dentro de las ventajas de la asociación micorrízica las plantas asociadas a hongos ectomicorrízicos exploran más volumen de suelo, absorben y transportan elementos nutritivos hacia la raíz, cuando estos se encuentran con poca disponibilidad, lo que incrementa el crecimiento y mejora el estado fisiológico de la planta (Sierverding, 1989; Honrubia, 2009). En el ciclo de nutrientes son los encargados de adquirir los minerales requeridos por las plantas, de fuentes inorgánicas y orgánicas en el suelo, en general se asume que estos hongos tienen una mayor capacidad para adquirir las formas orgánicas, se ha demostrado que las raíces y las micorrizas mejoran significativamente la velocidad de descomposición de la materia orgánica (Gadgil y Gadgil, 1975; Dighton *et al.*, 1987; Smith y Read, 1997).

### 2.5.2. Comunidades de hongos ectomicorrízicos asociadas a plantas

Las especies vegetales pueden ajustarse a diferentes condiciones y variar su tolerancia a distintos factores, reduciendo los efectos limitantes de temperatura, luz, agua y otras condiciones físicas (Odum, 1972). Las especies arbóreas que se encuentran en zonas montañosas tienen un rango restringido, se han adaptado a condiciones específicas; por lo que son especies más sensibles al cambio de un factor biótico o abiótico (Parmesan, 2006).

Las asociaciones de micorrizas podrían influir en la estructura de una comunidad vegetal, al afectar la riqueza o uniformidad de las poblaciones de plantas coexistente o al cambiar la capacidad competitiva de las especies. Hay evidencia que de manera natural las especies de plantas tiene interconexiones miceliales con una o más especies de micorrizas, lo que les proporciona una mayor sobrevivencia en las plantas que se convierte en árboles, aun cuando esta asociación tenga un costo para las plantas de los bosques templado es obligada para el mantenimiento de estos sistemas (Brundrett, 1991; 2005).

Una forma en que las especies arbóreas de alta montaña encontraron para establecerse e incrementar su supervivencia en condiciones adversas es formando una asociación con las ectomicorrizas. Los hongos ectomicorrízicos traen beneficios a las plantas al participar activamente en el transporte y la absorción de nutrientes y agua, una reducción de la toxicidad de metales pesados y otros contaminantes, incrementa la resistencia a estrés por sequía o por patógenos. Esta estrecha relación entre simbioses origina frecuentemente una dependencia de las plantas asociadas, siendo entonces la ectomicorriza usualmente una relación obligada. Existen especies arbóreas que cubren extensas áreas del planeta, pertenecientes a géneros como *Abies*, *Betula*, *Pinus*, *Picea*, *Fagus* y *Quercus*, que no sobrevivirían en condiciones naturales en ausencia de la simbiosis ectomicorrízica (Pérez-Moreno & Read, 2004).

Gómez-Romero *et al.*, (2015) en sus resultados mostraron que las especies que se encuentran creciendo en condiciones de sequía se ven limitadas en su crecimiento

por lo que las especies vegetales crean asociaciones micorrícicas (con hongos ectomicorrízicos), que les permiten obtener nutrientes y posiblemente tolerar las condiciones de sequía. En su estudio, realizaron un ensayo con el hongo ectomicorrízico *Pisolithus arhizus*, el cual inocularon a *Pinus pseudostrabus*, encontraron que existen diferencias significativas en las variables de crecimiento por el efecto del tiempo de sequía, los tratamientos donde las plantas estaba en simbiosis con *P. tinctorius*, son las que amortiguaron el efecto en sequía extrema. Estos resultados muestran la importancia de la asociación micorrízica para tolerar condiciones de sequía.

## **2.6. Aplicaciones de la Nanotecnología.**

El avance de la ciencia y la tecnología en las últimas décadas ha llevado al estudio de la materia en la nanoescala (1-100nm), con el objetivo de manipular y controlar la materia a escala molecular y hacer uso de sus propiedades, se han desarrollado materiales y maquinaria que pueden analizar, estructurar y operar los materiales nivel nanométrico. La nanotecnología es una área de investigación con enfoque multidisciplinario que se basa en la generación de nanopartículas y nanoestructuras que son diseñadas para tener diferentes aplicaciones en diversas áreas como; el almacenamiento, producción y conversión de energía; producción agrícola; tratamiento y remediación de aguas; enfermedades y fármacos; procesamiento de alimentos; detección y control de plagas; informática y comunicación, entre otras (Carlo-Delgado, 2009; Maubert *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2019).

De forma general las nanopartículas pueden dividirse en dos grandes grupos de acuerdo a su composición química, las cuales pueden formarse naturalmente o sintéticamente, hablamos de las nanopartículas de carbono y las nanopartículas metálicas. Las nanopartículas de carbono, están formadas de una estructura cristalina con formas muy diversas, esféricas, elipsoidales, tubulares o los cilíndrico-tubulares conocidos como nanotubos; las nanopartículas de metal: pueden ser quantum dots (puntos cuánticos o transistores de un solo electrón o nanopartículas)

de oro, plata o de metales reactivos como el dióxido de titanio, entre otras (Maubert *et al.*, 2009; Lara-Romero *et al.*, 2017; Bhati *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2019).

### **2.6.1. Nanopartículas de carbono y su aplicación en plantas**

Las nanopartículas de carbono tienen un gran rango de aplicaciones biológicas, sus propiedades las convierten en una de las mejores nanoestructuras, ya que tiene un procedimiento de síntesis fácil, poseen una composición química y configuración anatómica sencilla, lo que lo hace un nanomaterial con una gran diversidad y riqueza en relaciones y estructuras y propiedades. En la actualidad existe la disponibilidad de diferentes nanocarbonos, los cuales tienen una amplia gama de aplicaciones como es el caso de los nanotubos de carbono múltiples (MWCNT) (Maubert *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2019). En los últimos años nanotecnología ha desarrollado nanomateriales que tiene un uso potencial para mejorar los procesos biológicos en plantas, los estudios que se han realizado han mostrado tener un efecto significativo en la respuesta fisiológica y en bioquímica de la planta que se ven reflejados en parámetros como la germinación de semillas, crecimiento de la raíz, biomas y en el desarrollo y producción de metabolitos secundarios (Khan *et al.*, 2019).

La función de las nanopartículas depende de las plantas en las que son probadas ya que pueden responder de manera diferente dependiendo de la nanopartícula que se utiliza y la concentración a la cual se aplican. El tiempo de exposición durante la aplicación de las nanopartículas puede tener un efecto perjudicial sobre las plantas, se ha visto que al aumentar el tiempo de exposición puede inhibir el crecimiento y la acumulación de biomasa en la planta (Khan *et al.*, 2019).

Dentro de sus aplicaciones, se ha demostrado el efecto en la germinación y crecimiento de especies de uso agrícola y forestal; existe evidencia del efecto positivo en la translocación y la acumulación de nanocarbonos, que causan impactos significativos en la fisiología de la planta, como la absorción del agua y

nutrientes (Martínez-Ballesta *et al.*, 2016; Lara-Romero *et al.*, 2017; Joshi *et al.*, 2018; Bhati *et al.*, 2018).

Lara-Romero *et al.*, (2017), mostraron evidencia de nanotubos de carbono multipared (MWCNT) producidos a partir de muestras de *Pinus oocarpa* y *Pinus pseudostrobus*, obtenidas después de un incendio forestal. Además, verificaron si la generación de MWCNT durante los incendios forestales tiene un efecto biológico, llevaron a cabo la germinación y el desarrollo de plantas de un ecosistema forestal después de un incendio, *Lupinus elegans* y *Eysenhardtia polystachya*, donde se demostró que la utilización de MWCNT sintéticos comparables aumentó las tasas de germinación de semillas y su desarrollo.

En el trabajo realizado por Martínez-Ballesta *et al.*, (2016), proporciona evidencias sobre el efecto de los MWCNT en las propiedades de la membrana plasmática célula vegetal, donde indujeron cambios en la composición de los lípidos, rigidez y permeabilidad de las membranas plasmáticas radicales, además se produjo una transducción mejorada de acuaporina, que mejoraron la captación y el transporte de agua, aliviando los efectos negativos del estrés salino. Posteriormente Joshi *et al.*, 2018, realizaron un estudio para entender los efectos sobre la germinación, el crecimiento, la anatomía, la fisiología y el rendimiento en *Triticum aestivum*. Reportaron una germinación temprana y una mayor longitud de la raíz. Lo que contribuyó a un crecimiento más rápido y un mayor rendimiento de las plantas de trigo, se facilitó la absorción de agua y minerales esenciales, aumentando el rendimiento de los cultivos, mejorando el rendimiento de grano por planta. Se registró un aumento del alargamiento celular en un 80%, mientras que los tamaños de xilema y floema se dilataron a casi el 83% y el 85% del control, mejorando así su capacidad para conducir agua y nutrientes.

## 1. HIPÓTESIS

La interacción entre el hongo ectomicorrízico *Pisolithus arhizus* y los nanotubos de carbono, facilitarán que la especie *Abies religiosa* pueda resistir condiciones bajo estrés hídrico, debido a que la interacción tendrá efecto sobre la fisiología de la planta.

## 2. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

- Determinar los efectos eco fisiológicos en plantas a temprana edad de *Abies religiosa*, inoculadas con el hongo ectomicorrízico *Pisolithus arhizus* y adicionadas con nanotubos de carbono de pared múltiple (NWCNTs) solos o en interacción, sometidas a estrés hídrico.

### 4.2. Objetivos particulares

- Evaluar la supervivencia y el crecimiento de las plantas de *A. religiosa* en inoculación con el hongo ectomicorrízico *Pisolithus arhizus* y la adición de nanotubos de carbono de pared múltiple, de forma individual y en interacción; en condiciones de riego libre de estrés hídrico y bajo estrés hídrico.
- Evaluar la biomasa, arquitectura de raíz y porcentaje de colonización en plantas de *Abies religiosa* inoculadas con el hongo ectomicorrízico *Pisolithus arhizus* y adicionadas con nanotubos de carbono de pared múltiple (NWCNTs) solos o en interacción, sometidas a estrés hídrico.
- Conocer el efecto de la interacción hongo ectomicorrízico *Pisolithus arhizus* y nanotubos de Carbono (NWCNTs), solos o en interacción, sometidas a estrés hídrico en plantas de *Abies religiosa*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. Diseño experimental.

El diseño experimental se ajustó a un modelo de completamente al azar. Las plantas fueron aleatorizadas para contrarrestar efectos de diferencia de luz, humedad relativa y temperatura en el sitio de experimento. Se establecieron 30 plantas(réplicas) por tratamiento con un total de ocho tratamientos (Tabla 2).

Los tratamientos consistieron en la inoculación del HEM *Pisolithus arhizus* y la adición de una concentración de nanotubos de carbono (30  $\mu$ ), solos y en interacción. El experimento se diseñó con dos condiciones de riego; libre de estrés hídrico y bajo estrés hídrico. Dos tratamientos se dejaron sin inocular, uno de ellos como control absoluto. El experimento permaneció 14 meses en condiciones de casa de sombra en el Jardín Botánico Nicolaíta, Melchor Ocampo de la UMSNH.

**Tabla 2.** Tratamientos aplicados a *Abies religiosa*, utilizando los factores Nanotubos de carbono, hongo ectomicorrízico y dos tipos de riego; libre de estrés hídrico y bajo estrés hídrico.

Tratamiento	Especie	HEM <i>Pisolithus arhizus</i>	Nanotubos 30 $\mu$ g	Riego: EH (15%- 20%)	Riego: LEH (40%)
1	<i>A. religiosa</i>	-	-	+	-
2	<i>A. religiosa</i>	-	-	-	+
3	<i>A. religiosa</i>	+	-	+	-
4	<i>A. religiosa</i>	+	-	-	+
5	<i>A. religiosa</i>	+	+	+	-
6	<i>A. religiosa</i>	+	+	-	+
7	<i>A. religiosa</i>	-	+	+	-
8	<i>A. religiosa</i>	-	+	-	+

### 5. Montaje de experimento

#### 5.2.1. Obtención de semilla

Las semillas fueron colectadas en diciembre de 2017 en un transecto altitudinal entre los 3 003 y 3 552 msnm dentro de la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca en el estado de Michoacán. Se tomó semilla de todas las procedencias

altitudinales colectadas y se mezclaron para tratar de tener representada todas las poblaciones.

### **5.2.2. Estratificación de semilla**

Para la estratificación de la semilla, inicialmente se procedió a lavar la semilla durante un minuto en solución de cloro al 10 % (Hipoclorito de Sodio; NaClO al 0.54%), con la finalidad de disminuir agentes patógenos que pudieran afectar la germinación. Posteriormente se eliminó el excedente de cloro con agua destilada. Una vez lavada la semilla, se envolvió en papel absorbente y se humedeció con una solución de Captán (2 g/l), se colocaron en charolas cerradas de plástico transparentes. Las charolas se situaron dentro del refrigerador a 4°C durante 14 días.

### **5.2.3. Germinación y propagación**

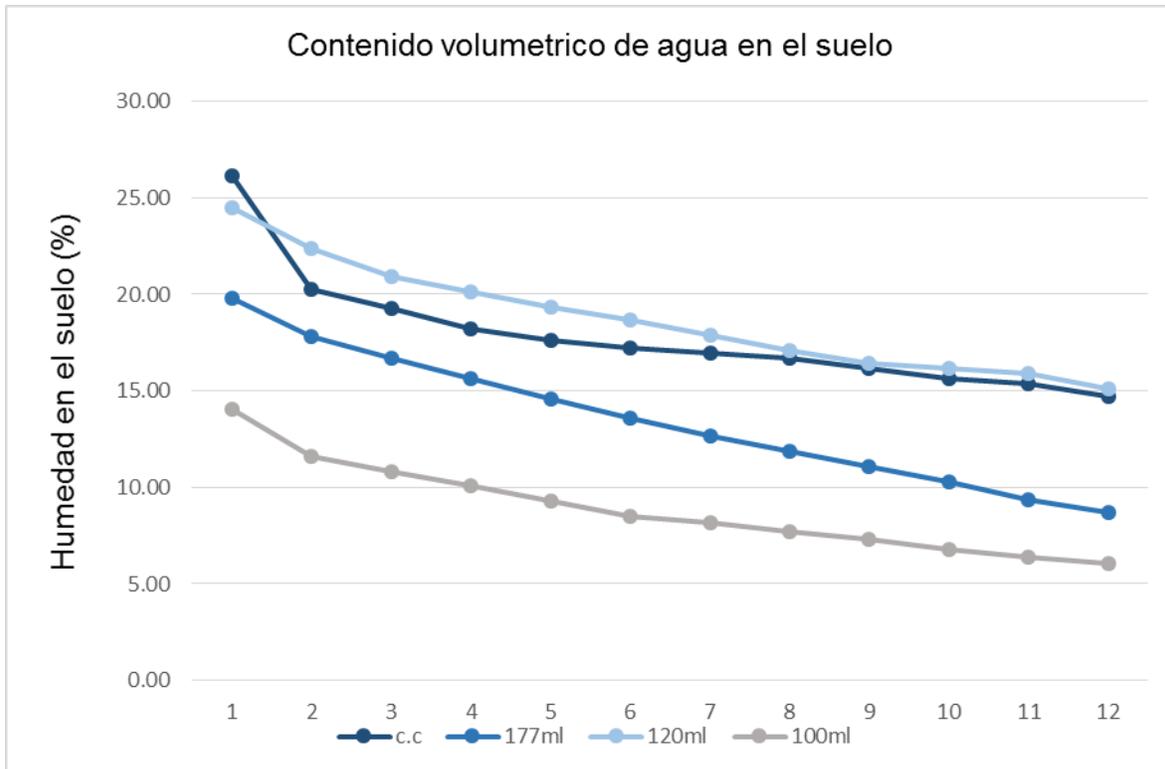
La propagación de la planta, se realizó en una casa de sombra (malla-sombra del 35 %) en el Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA) de la UMSNH. La germinación se hizo en almácigo, como sustrato se utilizó una combinación de sustratos (60% polvilla: 15% agrolita: 15% vermiculita: 10% peat moss), una vez preparado el sustrato, se esterilizó en plástico negro directamente al sol durante tres días. Posteriormente las semillas fueron sembradas en semilleros (plástico rígido de 60 x 40 x 7cm) con sustrato. Una vez germinadas las semillas, las plantas se trasplantaron a contenedores rígidos de plástico de 380 cm<sup>3</sup> y se colocaron en rejillas de 54 cavidades.

### **5.2.4. Condición de riego estrés hídrico**

Para determinar el riego necesario que provoca estrés hídrico en las plantas de *Abies religiosa*, se realizó un ensayo para calcular la retención de agua en el suelo y poder determinar la cantidad de agua que se debe agregar para generar estrés hídrico en plántulas. Se utilizó un medidor de humedad para monitorear la pérdida de humedad en las plantas.

**Humedad del suelo.** El experimento constó de 4 tratamientos (capacidad de campo, 177ml, 120ml y 100ml), con tres réplicas cada uno. El suelo fue esterilizado

en horno eléctrico a 115°C por 20min (4 repeticiones). Con ayuda de una balanza, se pesaron 100g de suelo seco en recipientes de 355ml que se realizó. Se agregó el contenido de agua correspondiente se dejó reposar por 20min y se pesaron. Se realizó la lectura del peso cada día durante 15 días para calcular el contenido volumétrico de agua (Figura 1).



**Figura 1.** Caída de humedad en el suelo en los 4 tratamientos.

Una vez que se realizó este ensayo, se ajustó el riego recuerdo al porcentaje de humedad propuesto por Ortiz-Bibian *et al.*, (2020), para mantener estrés hídrico es los 4 tratamientos entre un 17% y 20% con 18ml el riego es cada 10 días aproximadamente y para los tratamientos a libre de estrés hídrico el porcentaje de humedad está arriba de 20% al 40% con 36ml el riego se realiza cada 5 días aproximadamente. En todos los tratamientos se observa el porcentaje de humedad del suelo y si es necesario se hace un ajuste del riego.

### 5.2.5. Inoculación

El inóculo de *Pisolithus arhizus* se adquirió de forma comercial. La preparación del inóculo consistió en una mezcla de esporas con turba micronizada, por cada 250g de turba se añadieron cuatro gramos de esporas. Posteriormente en una báscula semianalítica se pesaron 0.5 g de conteniendo aproximadamente dos millones ( $1 \times 10^6$ ) de esporas, las cuales eran colocadas en bolsitas de plástico para después ser agregadas a cada una de las plantas. La inoculación se realizó 5 meses después del trasplante. El inóculo se agregó directamente a la raíz, a cuatro tratamientos.

### 5.2.6. Adición de NWCNTs

Tres semanas después de agregar el inóculo, se adicionaron los nanotubos de carbono de pared múltiple (NWCNTs) en concentración de  $30 \mu\text{g/ml}$ , esto con el fin de dar tiempo al HEM y a la planta para la interacción. Los NWCNTs, fueron sintetizados de manera natural a partir de muestras de madera quemada de árboles maduros de *Pinus oocarpa*, después de un incendio forestal (Lara-Romero *et al.*, 2017).

Fueron aplicados a cuatro tratamientos, la aplicación se realizó a manera de riego, se adicionó a la planta tres mililitros de la sustancia con NWCNTs.

## 5.3 Variables evaluadas.

Se evaluó mensualmente la supervivencia y las variables de crecimiento en altura, cobertura y diámetro a la altura de la base (DAB) mediante la fórmula de  $[(\text{Crecimiento final} - \text{crecimiento inicial}) / \text{crecimiento inicial} \times 100]$ .

Posteriormente se cosecharon 10 plantas (seleccionadas al azar) de cada tratamiento para analizar las variables para cada tratamiento.

- a) Biomasa: peso fresco y peso seco de parte aérea y radical, longitud de raíz específica y cociente de biomasa seca.
- b) Variables radicales: longitud, volumen, área radicular proyectada, área superficial radicular, diámetro, puntas, bifurcaciones y cruces.

c) Porcentaje de colonización: longitud, volumen, número de puntas y bifurcaciones.



**Figura 2.** Cronograma del montaje experimental y la evaluación de las variables, del diseño experimental de *Abies religiosa* en interacción ectomicorriza-nanopartículas.

### 5.3.1. Supervivencia.

El monitoreo de la supervivencia de plantas se realizó cada mes, en la base de datos se fue haciendo la observación del mes en el cual la planta moría. Posterior a la evaluación de los 14 meses se realizó el análisis factorial para graficar la supervivencia porcentualmente.

### 5.3.2. Crecimiento aéreo.

**Altura y diámetro del tallo a la altura de la base.** Se midió la parte aérea de la planta que comprende desde la base del tallo hasta el ápice de la planta, por medio de una regla de madera de 20 cm. Para medir en diámetro a la altura de la base utilizamos un vernier, para asegurarnos que cada mes se midiera a la misma altura realizamos una marca con un marcador para evitar medir de diferentes lugares.

**Cobertura.** Por medio de un vernier, se midió mensualmente los diámetros del follaje, para determinar la cobertura mediante la fórmula de la elipse ( $\pi r_1 r_2$ ).

#### **5.3.4. Biomasa.**

Para evaluar el peso fresco de las plantas se dividió en parte aérea y parte radical. El corte se realizó en la base del tallo y a partir de éste, hacia el ápice se tomó como parte aérea, mientras que la parte radical comprenderá desde la base del tallo, hasta la raíz más larga. Una vez que fueron pesadas se colocaron en bolsas de papel para ser colocadas en un horno de secado marca SHELIAB a 60°C durante 72 horas. El peso fresco se determinó por medio de una balanza semianalítica, el peso seco de igual manera, con el material previamente deshidratado.

#### **5.3.5. Variables radicales y arquitectura de raíz**

Una vez que se separó la raíz del sustrato, se dejó remojando durante 12 hrs., en un vaso de plástico, después se lavó cuidadosamente la raíz con agua. Una vez que las raíces quedaron limpias (libres de sustrato), con ayuda de un pincel se colocaron en la charola de plástico con agua para ser escaneadas, se utilizó el software WinRHIZO (Analysis of Washed Roots).

El procedimiento para la evaluación de las variables radicales post-cosecha, fue a través del escaneo donde se captura la imagen de la raíz y el programa genera una base de datos para su análisis. Las variables analizadas fueron, longitud, volumen, área radicular proyectada, área superficial radicular, diámetro, número de puntas, bifurcaciones y cruces. Con la variable longitud de raíz, se calculó la variable de longitud de raíz específica (*Longitud de raíz/Peso seco de raíz*) y el cociente de biomasa seca (*biomasa seca raíz/biomasa seca de parte aérea*).

#### **5.3.6. Porcentaje de colonización**

Al realizar el corte de la raíz se cortaron segmentos de 1 cm de longitud de diferentes áreas de la raíz, se colocaron en frascos de plástico en una solución de etanol al 70%.

Se observarán los cambios morfológicos en la raíz de *Abies religiosa* por efecto del hongo ectomicorrízico *Pisolithus arhizus*. Se contabilizará el porcentaje de colonización mediante la técnica propuesta por Newman (1966), Tennant (1975), Giovannetti & Mosse (1980) modificada por Brundrett (2000).

A partir de la imagen escaneada de las raíces, se diseñó una cuadrícula para el conteo de puntas micorrizadas. Previamente las muestras fueron revisadas con microscopio para confirmar la presencia de HEM. Para calcular el porcentaje de colonización utilizamos los datos obtenidos de la cuantificación de las raíces colonizadas y las no colonizadas, utilizamos las variables de raíz; longitud, número de puntas, número de bifurcaciones. Con la fórmula, porcentaje de colonización =  $(\text{Número total de raíces} \times \text{Raíces micorrizadas}) / 100$ .

#### **5.4. Análisis estadístico.**

Se realizaron análisis de supervivencia, mediante una prueba de riesgos proporcionales de Cox y un Modelo Linear Generalizado (GLM). El crecimiento se analizó a través de un análisis factorial (como factores hongo ectomicorrízico (HEM) *Pisolithus arhizus*, nanotubos de carbono de pared múltiple (NWCNTs), y estrés) para cada variable de forma mensual. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA), para cada una de las variables de crecimiento y pruebas de comparaciones múltiples de medias por medio de Tukey. Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas estadísticos R (R Development Core Team, 2011), JMP versión 13 y S-Plus 8.0 con ayuda de Excel para la captura de datos y algunos gráficos.

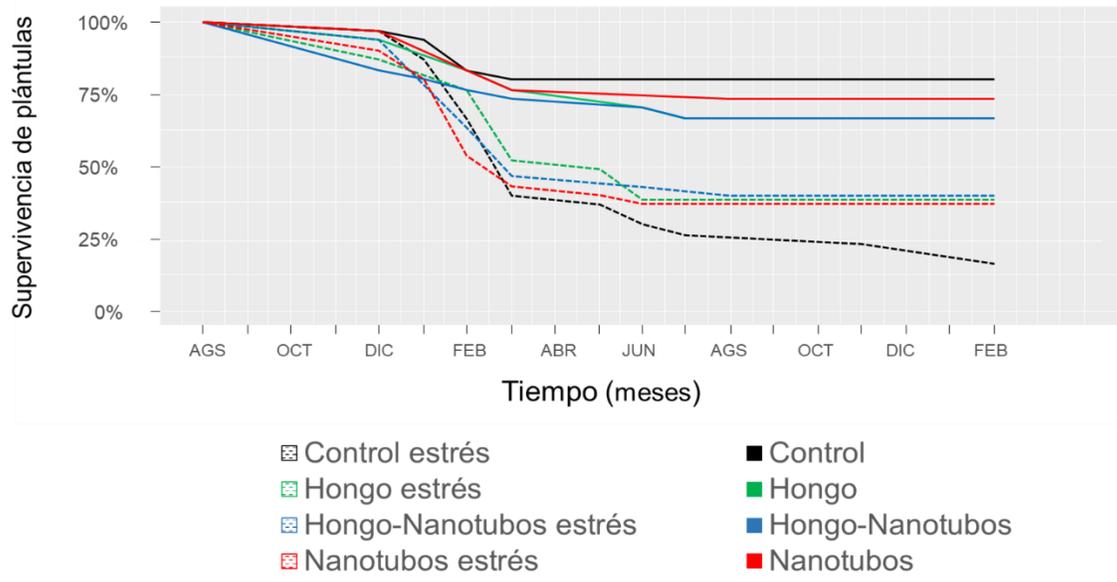
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Supervivencia

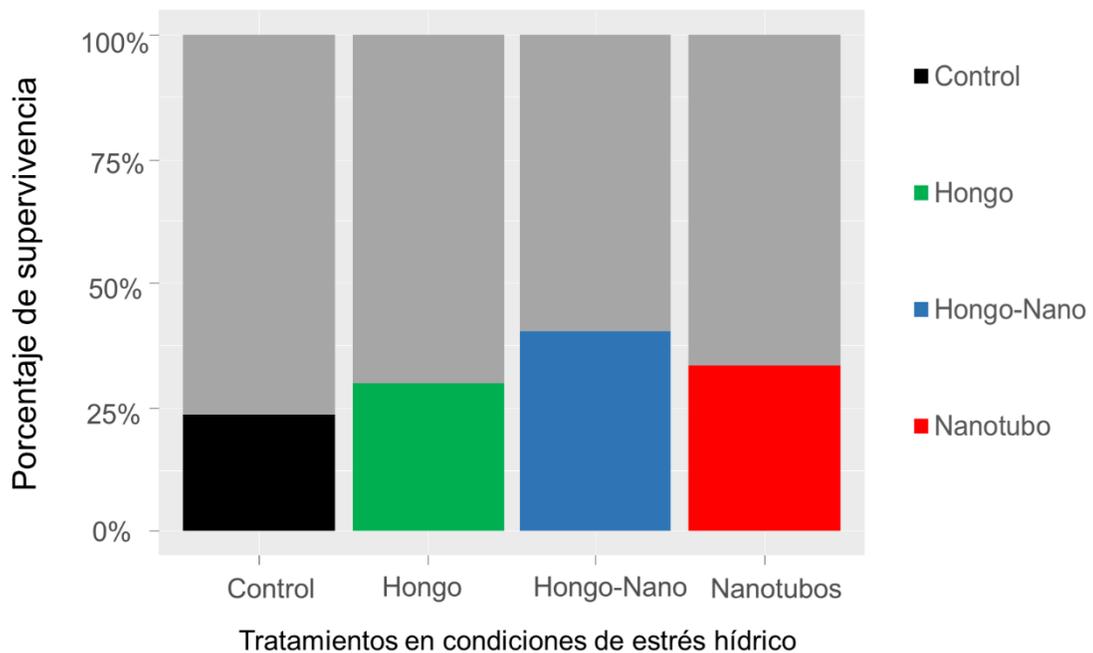
Se evaluó la supervivencia de los ocho tratamientos aplicados a las plantas de *Abies religiosa*; los cuales consistieron en la inoculación con el hongo ectomicorrízico (HEM) *Pisolithus arhizus* y la adición de nanotubos de carbono de pared múltiple (NWCNTs), de forma individual y en interacción; en condiciones de riego libre de estrés hídrico y bajo estrés hídrico.

Se observó que la supervivencia de las plantas en los tratamientos sometidos a estrés hídrico fue baja, independientemente del inoculo y la aplicación de nanotubos. Los resultados del análisis, muestran diferencias altamente significativas  $X^2 = 28.57$ , G.L.= 7, P= 0.0002.

Entre los tratamientos en condiciones de libre de estrés hídrico el menos afectado fue el tratamiento control, ya que presenta el mayor porcentaje de supervivencia (76.6%), seguido del tratamiento en adición de NWCNTs (73.3%), no son diferentes entre ellos (Figura 3). Todos los tratamientos en estrés hídrico presentan menor supervivencia, el control bajo condiciones de estrés presentó el menor porcentaje (23.3%), el tratamiento en condiciones de estrés hídrico que fue mayor respecto al control es el tratamiento inoculado con hongos y adicionado con nanotubos (40%) (Figura 4).



**Figura 3.** Porcentaje de supervivencia en plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos en condiciones libre de estrés se muestran en líneas continuas y los tratamientos en condiciones de estrés hídrico en líneas punteadas.



**Figura 4.** Porcentaje de supervivencia en los tratamientos en condiciones de estrés hídrico que fueron aplicados a *Abies religiosa*.

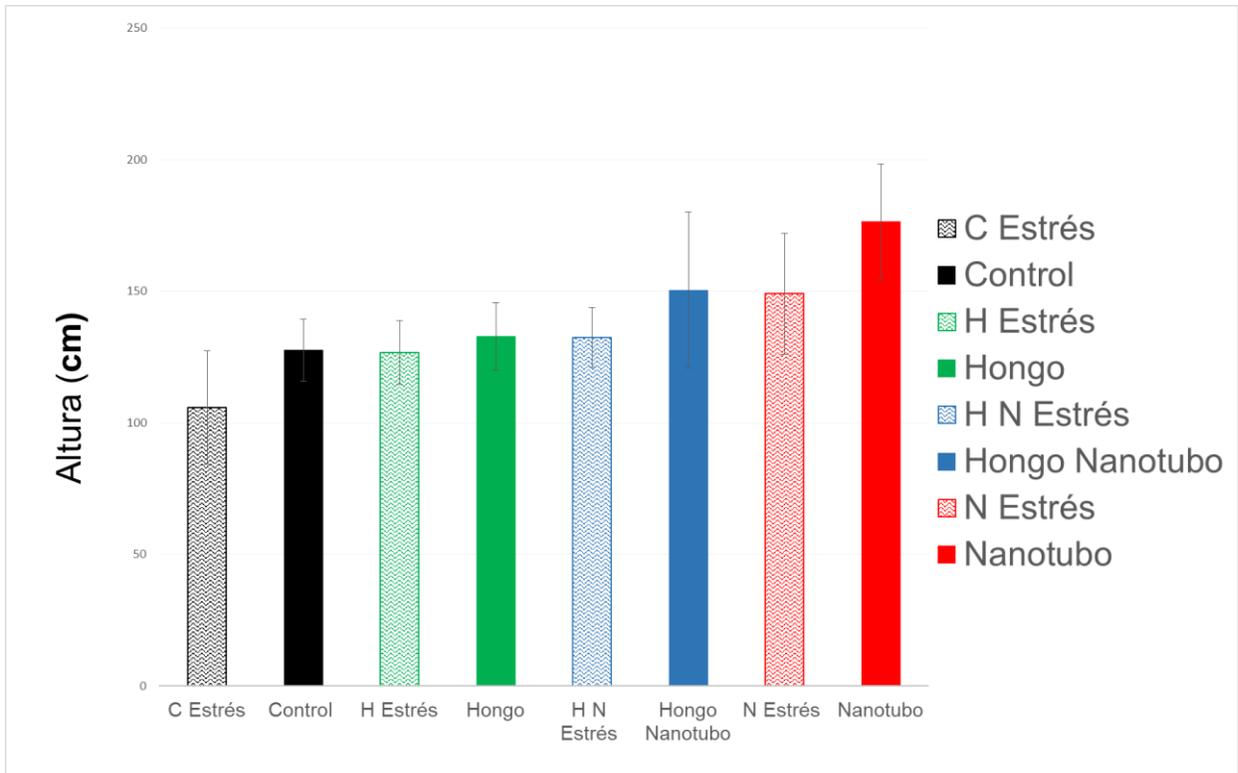
## 6.2. Crecimiento aéreo

Los análisis de varianza aplicados a las variables de crecimiento aéreo, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos para las variables de diámetro y cobertura. Se observó de manera general que las plantas de los tratamientos sometidos a estrés hídrico, tienen un menor crecimiento en comparación a las plantas de los tratamientos en condiciones libre de estrés. En el análisis factorial se presentaron diferencias significativas en el factor de nanotubos en la variable de altura ( $P=0.03$ ), para la variable de diámetro el factor de estrés presentó diferencias significativas ( $P<0.001$ ) y para las variables de cobertura el factor de hongos ( $P<0.001$ ) estrés ( $P=0.005$ ) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Análisis de varianza por factores aplicados a las variables de crecimiento en *A. religiosa*. Considerando como factores HEM *Pisolithus arhizus* (hongo), NWCNTs (nanotubos) y la condición de riego bajo estrés hídrico (estrés).

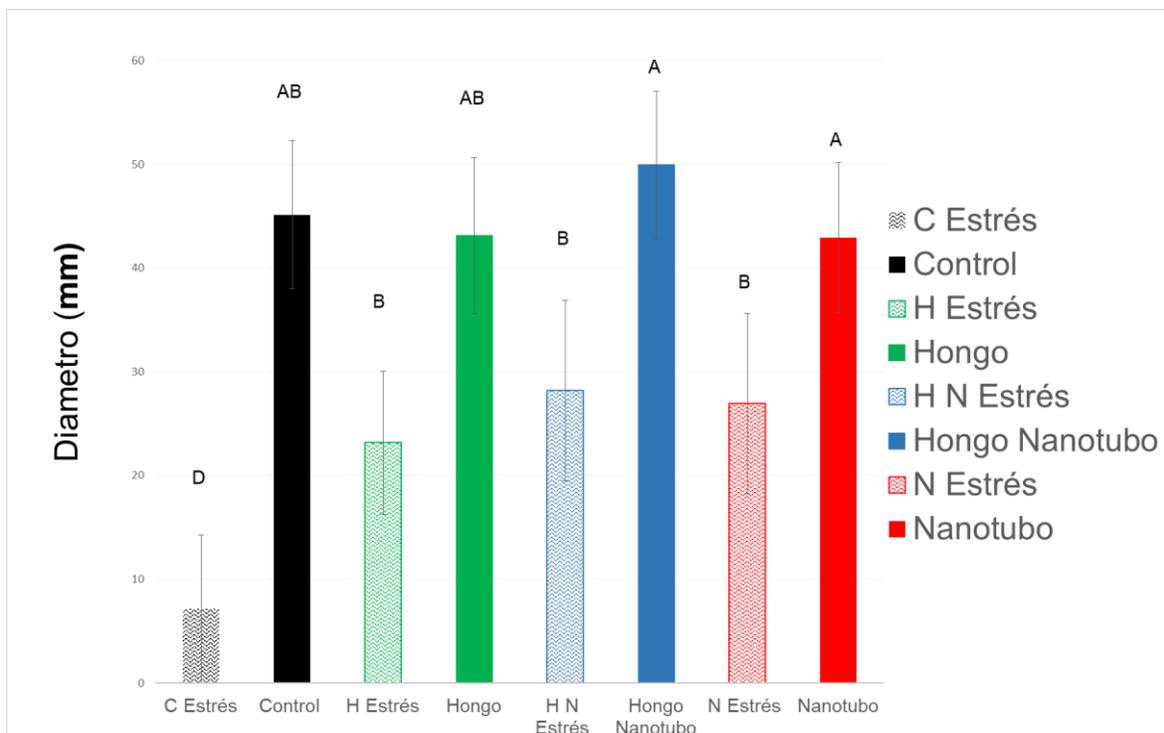
Altura					
FACTOR	G. L	S.C	C.M	Valor F	P
HONGO	1	1684	1684	0.26	0.60
NANOTUBOS	1	28641	28641	4.49	0.03
ESTRÉS	1	9894	9894	1.55	0.21
Residuals	122	777709	6374		
Diámetro					
HONGO	1	779	778	0.82	0.36
NANOTUBOS	1	227	227	0.24	0.62
ESTRÉS	1	17755	17755	18.85	<0.001
Residuals	122	114856	941		
Cobertura					
HONGO	1	169585	169585	11.94	<0.001
NANOTUBOS	1	59133	59133	4.16	0.04
ESTRÉS	1	114521	114521	8.06	0.005
Residuals	122	1731766	14194		

Para la variable de altura no se encontraron diferencias significativas, se observa que los tratamientos en condiciones de estrés hídrico obtuvieron valores ligeramente menores. El tratamiento que presentó un mayor efecto en el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés fue el aplicado con nanotubos de carbono (Figura 4).



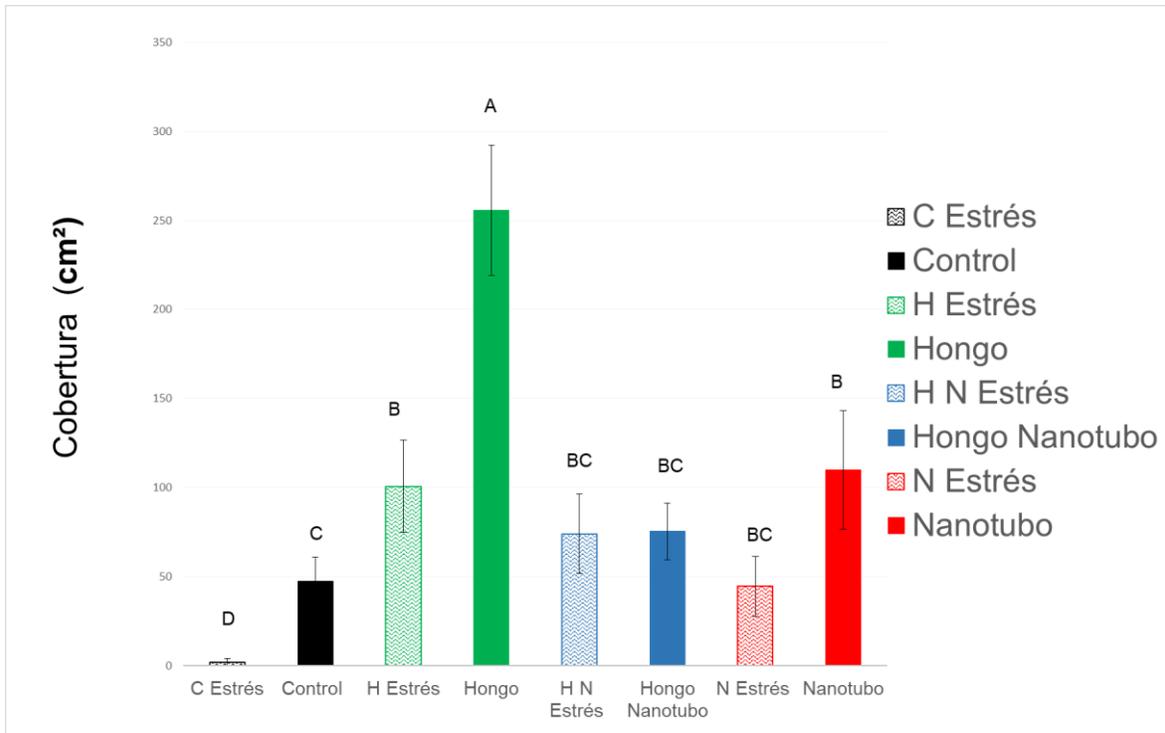
**Figura 4.** Tasa de crecimiento de altura en *Abies religiosa* durante los meses de septiembre 2020 a noviembre 21. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar.

Para la variable de diámetro los tratamientos en condiciones de estrés presentan los valores menores, el análisis factorial nos confirma el efecto por estrés hídrico en las plantas. Cuando las plantas se encuentran en estrés, los factores hongo y nanotubos de forma individual o dual, presentan un efecto positivo en el crecimiento en diámetro (Figura 5).



**Figura 5.** Tasa de crecimiento del diámetro en *Abies religiosa* durante los meses de septiembre 2020 a noviembre 21. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.

En la variable de cobertura se observa un crecimiento importante en el tratamiento en condiciones libre de estrés inoculado con el hongo ectomicorrícico, con respecto a los demás tratamientos. El tratamiento control bajo condiciones de estrés es el que tiene los valores más bajos para cobertura. El tratamiento con hongos ectomicorrícicos, presenta valores mayores a los demás tratamientos. En condiciones de estrés, todos los tratamientos son significativamente diferente al control (Figura 6).



**Figura 6.** Tasa de crecimiento de la cobertura en *Abies religiosa* durante los meses de septiembre 2020 a noviembre 21. Los tratamientos en condiciones libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barras de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.

### 6.3 Biomasa

El análisis muestra diferencias significativas en la biomasa en peso fresco y seco para los tratamientos, tanto en la parte aérea como la parte radical ( $P < 0.0001$ ) para el factor de estrés (Tabla 4).

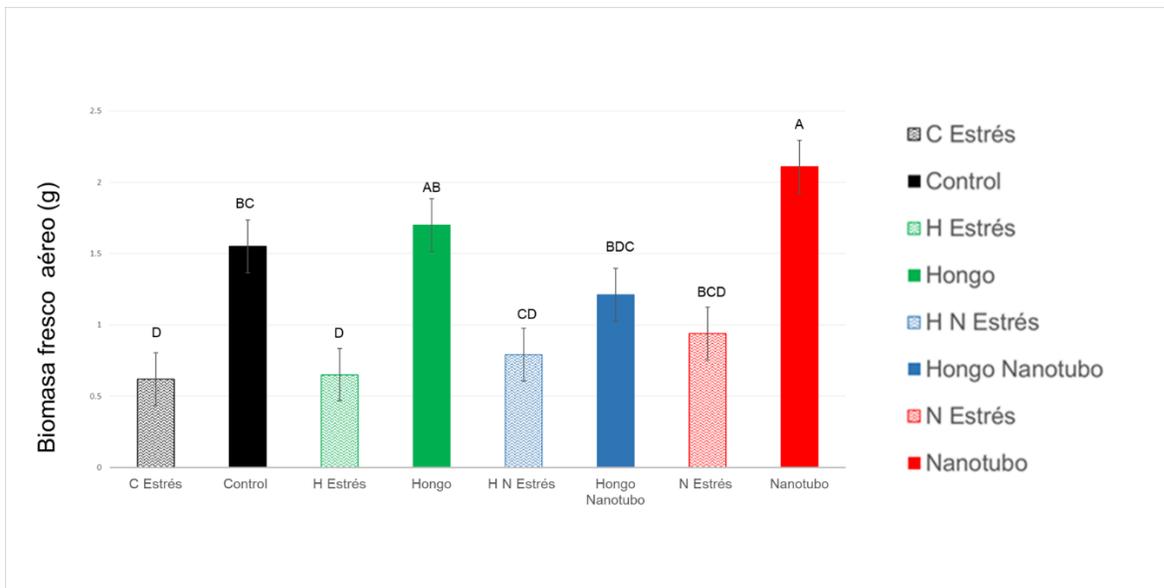
En las plantas en condiciones libre de estrés hídrico, se observó que los nanotubos muestran valores mayores en el peso fresco aéreo, no siendo diferente al control (Figura 6). En el peso fresco de raíz, los tratamientos con inoculación de hongos o nanotubos muestran diferencias significativas respecto al control (Figura 7). Para la longitud de raíz específica (Figura 8) y el cociente de biomasa seca (Figura 9), se presenta diferencia por efecto del estrés hídrico ( $P < 0.005$  y  $P < 0.001$ ) (Tabla 4).

En cuanto a los tratamientos sometidos a estrés hídrico se observó que tanto la inoculación individual como la adición con nanotubos de carbono si bien no promovieron la biomasa de la parte aérea y radical, tampoco hay un decremento en la biomasa de las plántulas, el tratamiento que se aplicó los nanotubos de carbono presenta los valores más altos respecto al control sin embargo no son significativos.

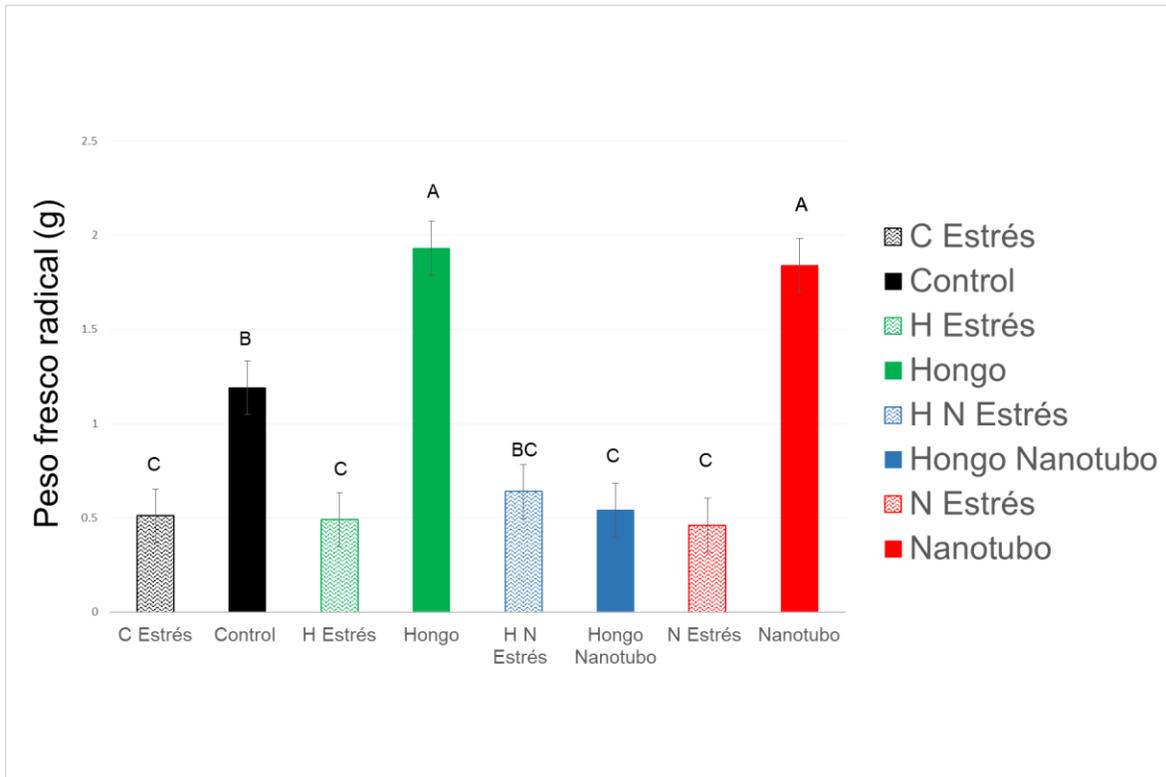
**Tabla 4.** Análisis factorial de las variables de biomasa aplicado a las plantas de *A. religiosa*. Peso fresco de la parte aérea y radical, Peso seco parte aérea y radical y cociente de biomasa seca.

Peso fresco parte aérea					
FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F	P
HONGO	1	0.94	0.94	2.55	0.11
NANOTUBOS	1	0.35	0.35	0.94	0.33
ESTRÉS	1	15.93	15.93	43.08	<0.0001
Residuales	76	28.10	0.36		
Peso fresco parte radical					
HONGO	1	0.20	0.20	0.61	0.43
NANOTUBOS	1	0.51	0.51	1.56	0.21
ESTRÉS	1	14.45	14.45	44.27	<0.0001
Residuales	76	24.80	0.32		
Peso seco parte aérea					
HONGO	1	0.14	0.14	2.11	0.14
NANOTUBOS	1	0.01	0.01	0.16	0.68
ESTRÉS	1	2.4992	2.49924	35.3989	<0.0001
Residuales	76	5.3658	0.07060		
Peso seco parte radical					
HONGO	1	0.03	0.03	1.42	0.23

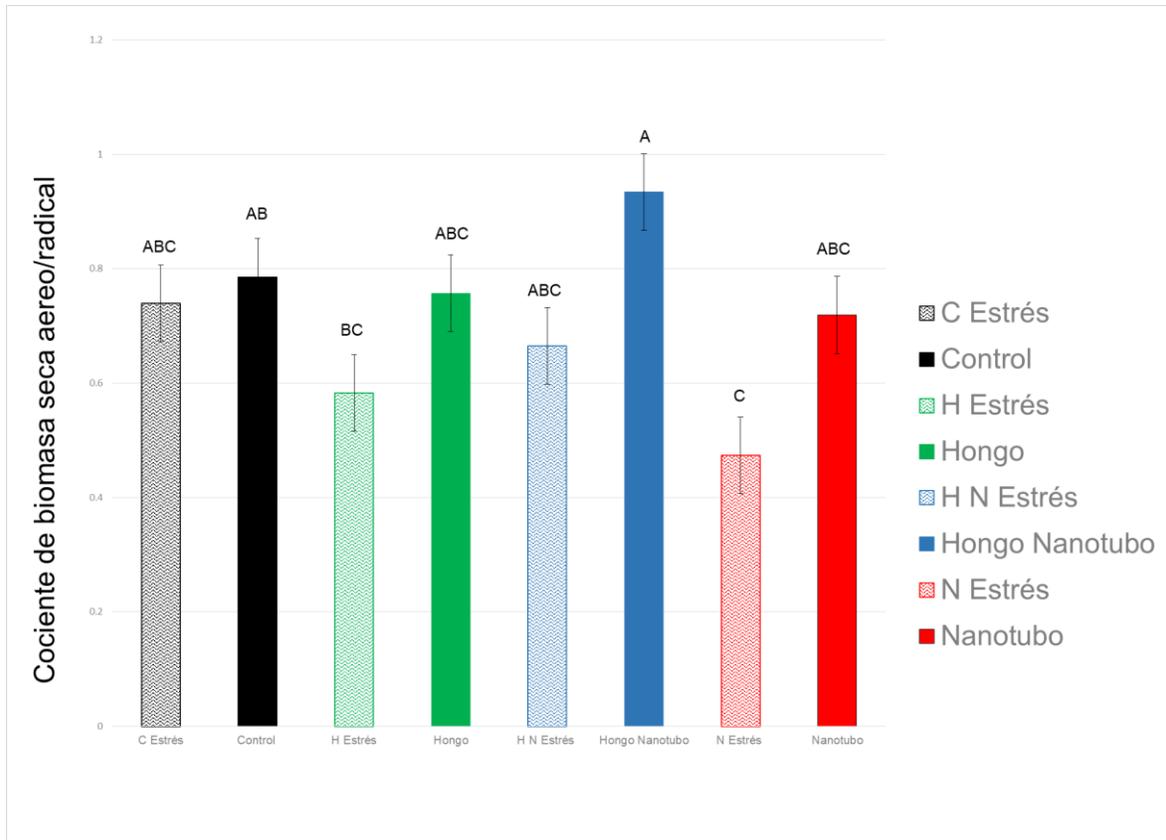
<b>NANOTUBOS</b>	1	0.00	0.00	0.00	0.95
<b>ESTRÉS</b>	1	1.90	1.90	87.16	<0.0001
<b>Residuales</b>	76	1.66	0.02		
Longitud de raíz específica					
<b>HONGO</b>	1	5117	5117	0.10	0.74
<b>NANOTUBOS</b>	1	4786	4786	0.10	0.75
<b>ESTRÉS</b>	1	3866	3866	8.16	0.005
<b>Residuales</b>	76	3599	4736		
Cociente de biomasa seca de raíz					
<b>HONGO</b>	1	0.05	0.05	1.11	0.29
<b>NANOTUBOS</b>	1	0.02	0.02	0.42	0.51
<b>ESTRÉS</b>	1	0.6661	0.66612	13.4196	<0.001
<b>Residuales</b>	76	3.7725	0.04964		



**Figura 7.** Biomasa del peso fresco de la parte aérea en plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos regados a libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.



**Figura 8.** Biomasa del peso fresco de la parte radical en plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos regados a libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.



**Figura 9.** Cociente de biomasa seca de raíz en plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos regados a libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.

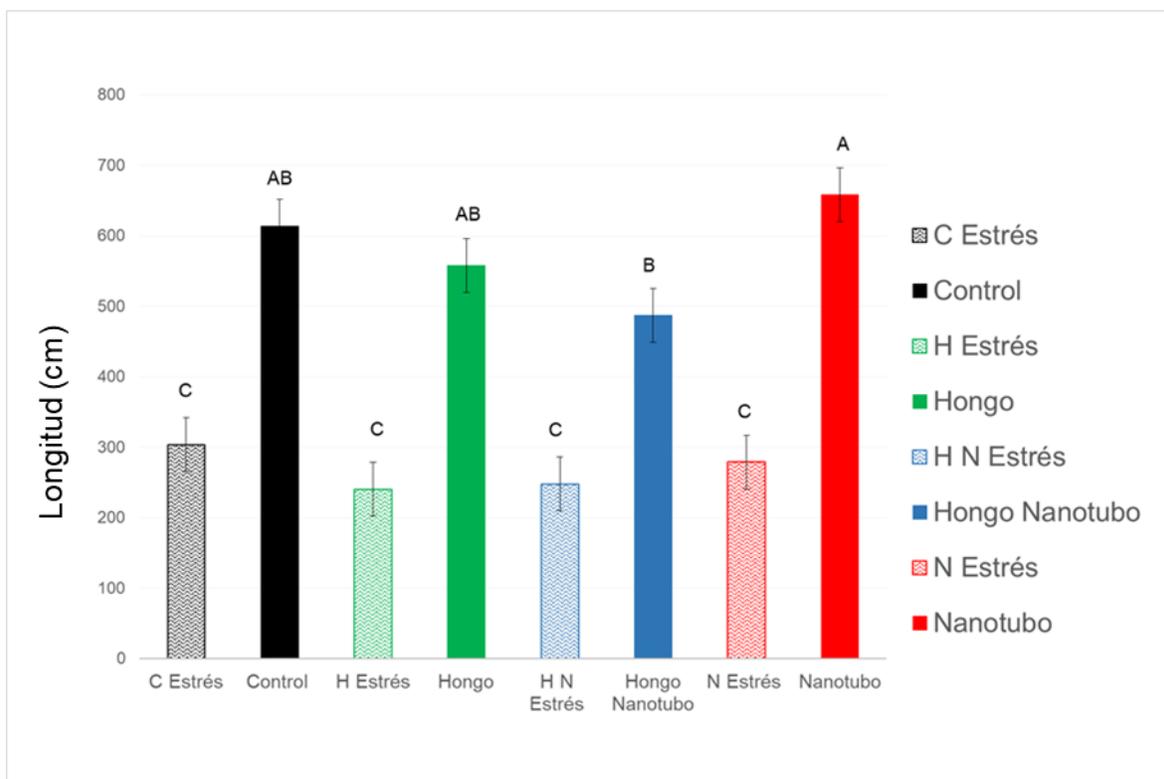
#### 6.4. Variables radicales y arquitectura de raíz

Las variables de raíz que se analizaron fueron, longitud, volumen, área radicular proyectada, área superficial radicular, diámetro, número de puntas, bifurcaciones y cruces, para todas ellas el factor estrés hídrico es significativo ( $P < 0.0001$ ). Las variables presentaron valores con diferencias significativas para el factor de inoculación con hongos, a excepción de la variable de diámetro (Tabla 4).

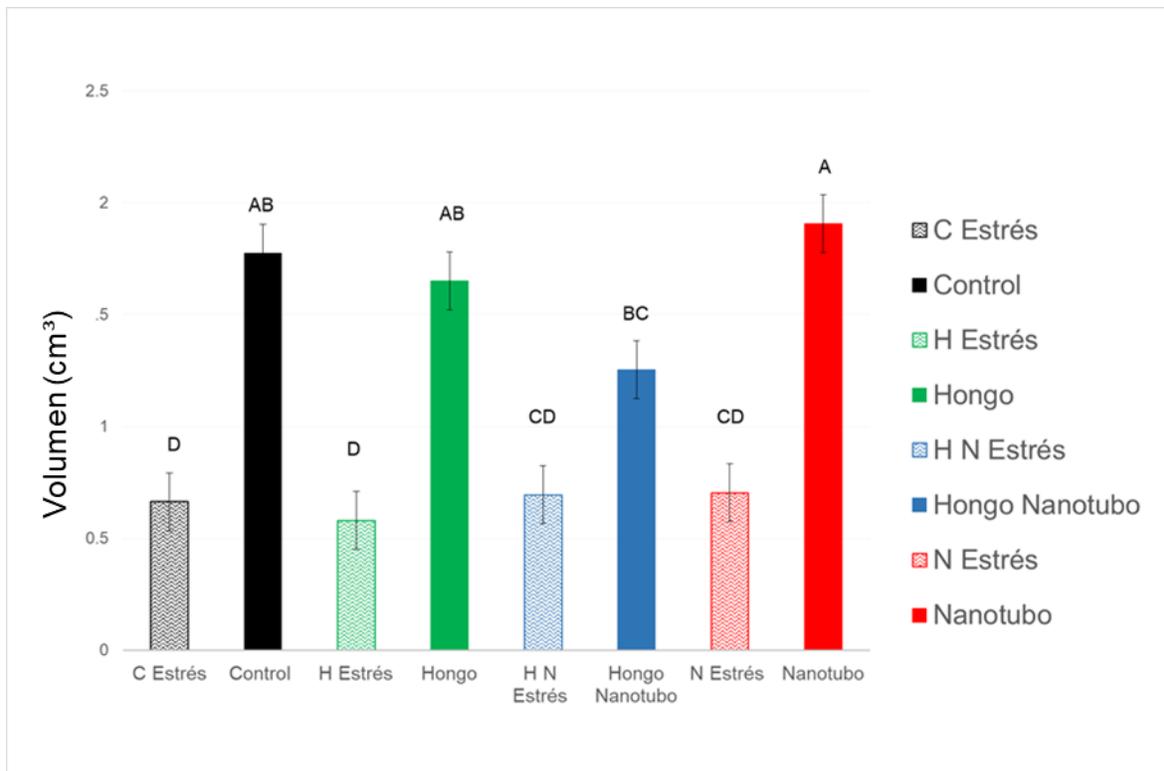
**Tabla 4.** Análisis factorial de la arquitectura de raíz en plantas de *A. religiosa*.

Longitud de raíz					
	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F	P
HONGO	1	6788	6788	23.48	<0.0001
NANOTUBOS	1	2324	2324	0.08	0.77
ESTRÉS	1	2975	2975	10.29	<0.0001
Residuales	76	2197	2890		
Volumen de raíz					
HONGO		4.8403	4.8403	14.08	<0.0001
NANOTUBOS	1	0.0147	0.0147	0.04	0.83
ESTRÉS	1	2.9437	2.9437	8.56	<0.0001
Residuales	76	26.1258	0.3438		
Área radicular proyectada					
HONGO	1	3.8	3.8	0.07	<0.05
NANOTUBOS	1	552.5	552.5	11.21	0.72
ESTRÉS	1	5270.9	5270.9	107.02	<0.0001
Residuales	66	3250.5	49.3		
Área superficial radicular					
HONGO	1	865	865	1.20	<0.05
NANOTUBOS	1	10702	10702	14.91	0.72
ESTRÉS	1	32923	32923	45.88	<0.0001
Residuales	76	54530	718		
Diámetro de raíz					
HONGO	1	19275	19274.6	17.20	0.38
NANOTUBOS	1	19297	19297.2	17.22	0.69
ESTRÉS	1	19336	19335.7	17.25	<0.05
Residuales	76	85144	1120.3		
Puntas					
HONGO	1	203	203	0.00	<0.0001
NANOTUBOS	1	1029569	1029569	19.27	0.09
ESTRÉS	1	266626	266626	4.99	<0.0001
Residuales	76	4059572	53415		
Bifurcaciones					
HONGO	1	1212007	1212007	9.60	<0.005
NANOTUBOS	1	68028	68028	0.53	0.46
ESTRÉS	1	10350111	10350111	81.99	<0.0001
Residuales	76	9593748	126234		
Cruces					
HONGO	1	16986	16986	6.90	<0.05
NANOTUBOS	1	75	75	0.03	0.86
ESTRÉS	1	128183	128183	52.0824	<0.0001
Residuales	76	187048	2461		

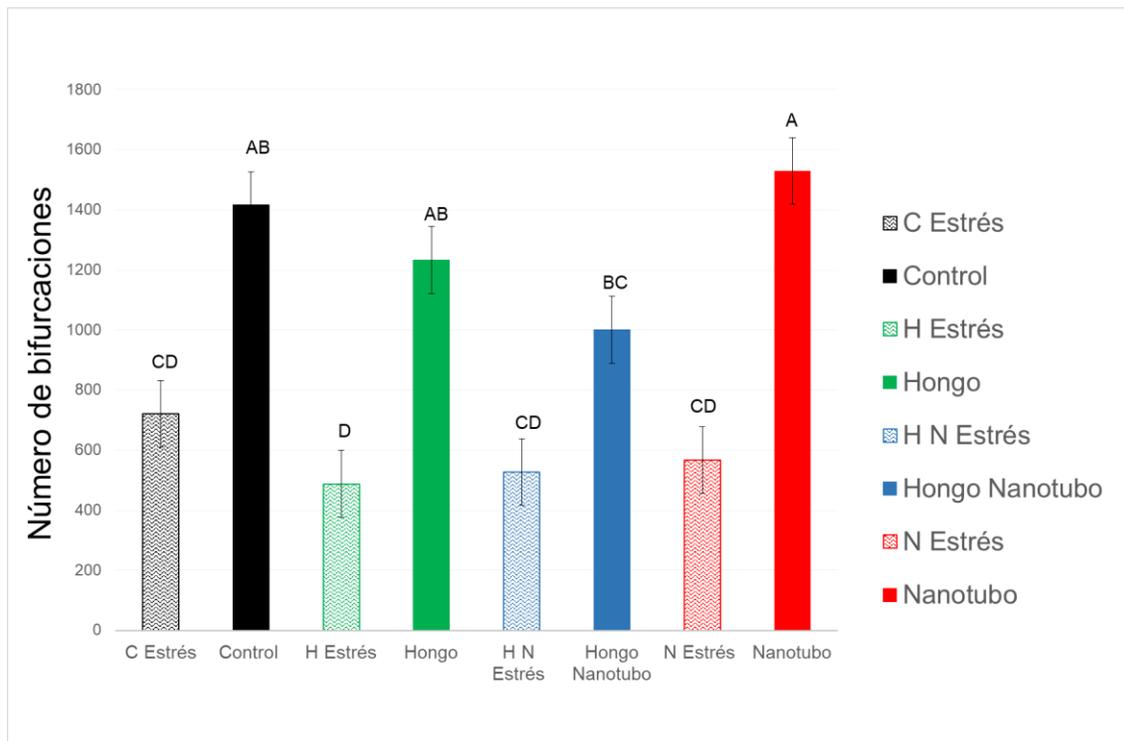
El estrés hídrico, está afectando significativamente las variables de crecimiento radical en las plantas de *Abies religiosa*, los tratamientos en esta condición presentan los valores menores para longitud, volumen, área radical, diámetro, puntas, bifurcaciones y cruces. Los tratamientos que fueron inoculadas con el hongo ectomicorrícico *Pisolithus arhizus* presentan valores significativos. Los tratamientos con nanotubos promovieron el crecimiento, sin embargo, no son significativos (Figuras 10-14).



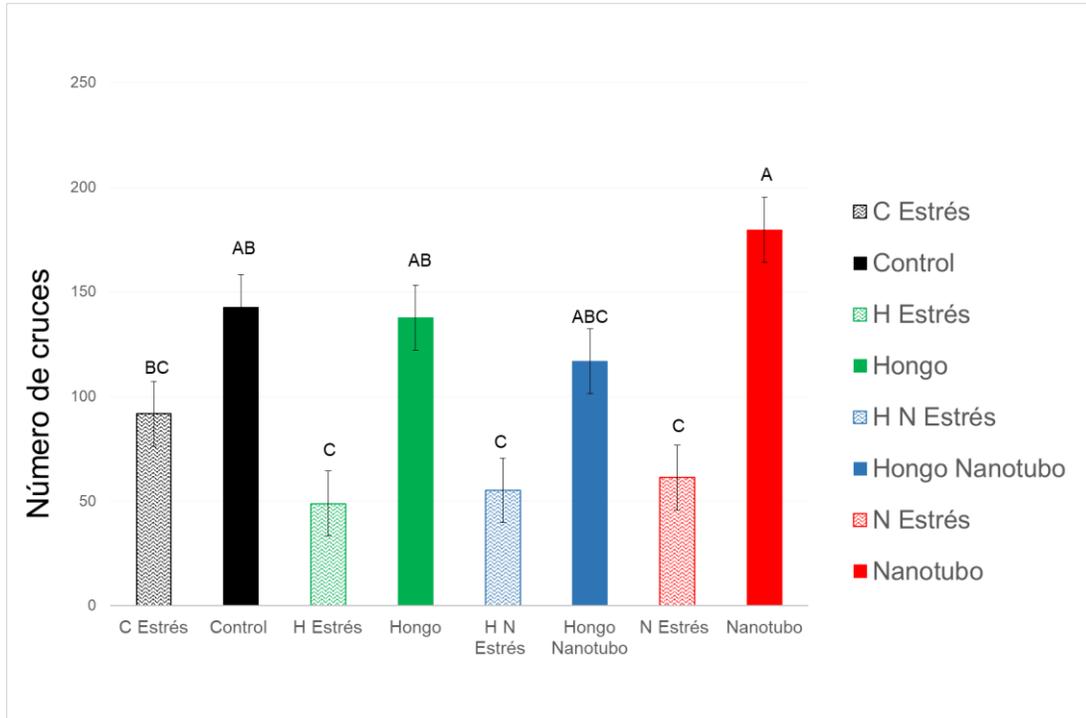
**Figura 10.** Longitud de raíz en plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos regados a libre de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.



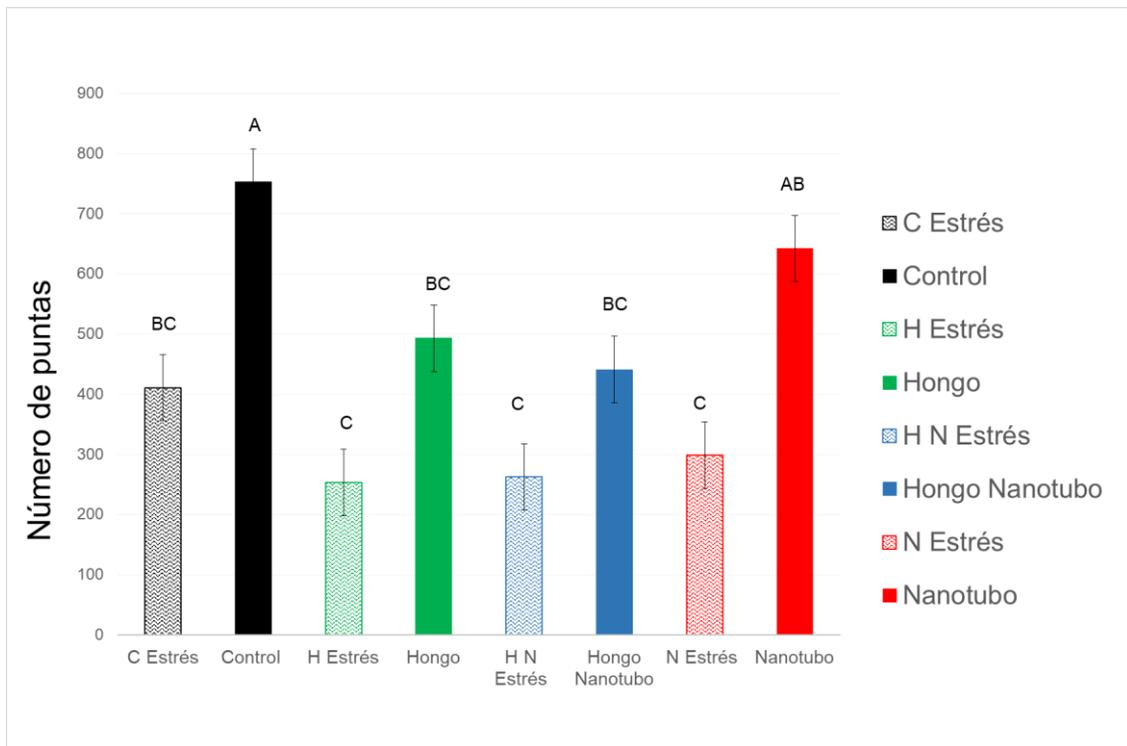
**Figura 11.** Volumen de raíz en plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.



**Figura 12.** Número de bifurcaciones en la raíz de plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.



**Figura 13.** Número de cruces en la raíz en las plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.



**Figura 14.** Número de puntas en raíz en las plantas de *A. religiosa*. Los tratamientos libres de estrés hídrico se muestran con barras de color uniforme y los tratamientos bajo estrés hídrico, en barrar de color con trama. Las barras indican el error estándar y las letras grupos de acuerdo a la prueba de Tukey.

#### 6.4 Porcentaje de Colonización

Se identificó el tipo de micorriza de acuerdo a las observaciones morfológicas, a trece meses de la inoculación, la especie *Pisolithus arhizus* mostró una efectividad en su capacidad colonizadora en las plantas de *Abies religiosa*. Las raíces presentaron colores ámbar o amarillo rojizos, se encontró formación de micelio externo color café rojizo, la micorriza se presenta con forma no ramificada y dicotómicamente bifurcada.

Las variables de raíz que fueron analizadas fueron longitud, volumen, número de puntas y bifurcaciones, estas variables son significativas ( $P < 0.005$ ) para el factor de hongo, lo que confirma la presencia del hongo ectomicorrícico.



**Figura 15.** A. Escaneo de parte aérea y radical de *Abies religiosa*. Las raíces de colores ámbar o amarillo rojizos. B. Micorriza con forma no ramificada y dicotómicamente bifurcada.

## 7. DISCUSIÓN

La restauración ecológica está en búsqueda de nuevas estrategias para la recuperación de los ecosistemas, en las que se busca que las especies sean capaces de tolerar las condiciones de cambio (Gómez-Ruiz y Lindig-Cisneros, 2017). En este trabajo se expone a la especie *Abies religiosa* a condiciones de riego bajo estrés hídrico, lo que permite predecir algunos de los impactos que traerá el cambio en el clima. Se evidenció que la supervivencia de las plantas de *A. religiosa* fue menor en los tratamientos en condiciones de estrés hídrico, hay mayor supervivencia en las plantas que están en condiciones libres de estrés. Aun cuando los tratamientos fueron inoculados con el hongo ectomicorrícico y adicionados con los nanotubos de carbono, la condición de estrés hídrico es el principal factor que determina la supervivencia y como consecuencia, el establecimiento de las plantas.

La condición de estrés fue determinada por el porcentaje de humedad en el suelo, Ortiz-Bibian *et al.*, (no publicado) considera como umbral crítico un 15% de humedad en el suelo, Miranda-Navarro (2020), en su trabajo registra la mayor mortalidad de plantas durante la temporada seca, los resultados del presente estudio, confirman que un porcentaje de humedad menor al 15% es crítico para la especie y se comprueba que *Abies religiosa* es una especie altamente vulnerable y muy sensible ante condiciones de estrés hídrico (Sáenz-Romero *et al.*, 2012; Cruzado-Vargas *et al.*, 2021).

Es importante conocer el desarrollo de la especie durante los primeros meses de vida para identificar los periodos en los que la especie es más vulnerable y esto pueda ser considerado para las estrategias de conservación de la especie. En este experimento se logra observar que la mortalidad de las plántulas ocurrió en dos momentos, durante la época más fría y en la época más cálida y seca. Los resultados son similares a los reportados por Carbajal-Navarro *et al.*, (2019), donde la mortalidad de las plántulas se presentó en diferentes condiciones ambientales en sitios abiertos y bajo sombra.

Un aspecto interesante a destacar es que cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés hídrico, es evidente que para incrementar la supervivencia de

las plantas de *Abies religiosa*, es necesario la adición del hongo micorrícico y de la nanopartícula, ya sea de forma individual o en interacción. Cuando las plantas no tienen ni el hongo, ni la nanopartícula, se registró la menor supervivencia de todos los tratamientos. Estos resultados concuerdan por lo reportado Lara-Romero *et al.* (2017), las especies forestales nativas *Lupinus elegans* y *Eysenhardtia polystachya*, adicionadas con nanopartículas presentaron un mayor porcentaje de supervivencia y crecimiento.

Los efectos de los nanomateriales en el crecimiento y desarrollo de las plantas han sido documentados recientemente y se ha sugerido que sus efectos dependerán de factores tales como el tipo de nanopartículas, la concentración, las especies de plantas y condiciones, incluido el método de absorción de nanopartículas. Dado que los nanotubos son producidos en bosques resinosos, como consecuencia de los incendios forestales, promueven la germinación de semillas y el crecimiento de plantas nativas en los ecosistemas forestales.

Por otra parte, se ha documentado que el uso de hongos micorrícicos puede incrementar la tolerancia al estrés hídrico y el crecimiento de las plantas, al modificar las condiciones de humedad en la rizosfera (Gómez-Romero *et al.*, 2015). La tolerancia al estrés hídrico con la inoculación de los hongos micorrícicos *P. arhizus* y la adición de nanotubos de carbono pueden potencializar la tolerancia de *Abies religiosa*, así como presentar efecto en el crecimiento. Cabe mencionar que este efecto se observó en condiciones de vivero y aún falta hacer pruebas condiciones de campo. Sin embargo, con los resultados obtenidos en supervivencia, se pueden sugerir el uso del hongo ectomicorrícico *P. arhizus* la adición de las nanopartículas de carbono de pared múltiple, procesados a partir de *Pinus oocarpa*.

En cuanto al crecimiento aéreo, la variable de altura no presentó diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, las plantas en presencia de nanotubos presentaron los valores mayores. En la variable diámetro a la altura de la base (DAB), se confirma que, ante condiciones de estrés hídrico, la adición de factores de forma individual o en interacción, muestran diferencia estadísticamente significativa, con respecto a las plantas control. En cuanto a la variable cobertura, en las plantas en

condiciones de estrés, presenta el mismo efecto que en el diámetro, es decir, que las plantas en presencia de uno de los factores utilizados, presentará valores mayores en el crecimiento en cobertura. Otro aspecto importante de mencionar es que, en ausencia de estrés hídrico, las plantas inoculadas con el hongo, muestra diferencia significativa al resto de los tratamientos.

El peso fresco tanto de la parte aérea como radical, muestran valores mayores en el tratamiento en presencia de nanotubos de carbono de pared múltiple, mostrando un efecto positivo por la aplicación de los nanotubos y la inoculación con hongos ectomicorrícicos, de forma individual, en condiciones libre de estrés.

Los tratamientos en condiciones de estrés tienen una respuesta similar, el estrés muestra un efecto negativo, en todas las variables de crecimiento y biomasa.

Cuando el estrés hídrico se desarrolla de una forma lenta, tiene un efecto evidente en la expansión foliar, este es uno de los efectos asociados al déficit hídrico en el crecimiento de las coníferas, las cuales se ven afectadas por la poca disponibilidad de agua en el suelo lo que afecta directamente en la altura y la producción de biomasa (Martínez-Trinidad *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 2004; Martiñón *et al.*, 2010).

La variable biomasa, proporciona información sobre lo que pasa durante las primeras etapas de desarrollo de las plántulas de *Abies religiosa*, ya que está relacionada con la capacidad fotosintética de la planta la cual se ve afectada por el estrés hídrico. En el presente estudio, los resultados muestran que los tratamientos en condiciones de estrés se vieron afectados en la producción y la acumulación de biomasa tanto aérea como radical. Las especies leñosas tienen un sistema radical vigoroso y profundo, uno de los principales mecanismos que utilizan para la resistencia al estrés, es asignación de biomasa al sistema radical para aumentar la cantidad de agua accesible (Kowzlowski & Pallardy, 2002; Taiz & Zeiger 2009). Sin embargo, los tratamientos aplicados a las plantas de *Abies religiosa* no muestran diferencias significativas para la condición de estrés.

De acuerdo con los resultados, en condiciones de estrés hídrico, la interacción entre el hongo ectomicorrícico *P. arhizus*, influye de manera significativa en la

supervivencia y el crecimiento en diámetro y cobertura. Para la variable cobertura, todos los tratamientos son significativamente mayores al control. En otros trabajos se han demostrado que las ectomicorrizas mejoran el estado hídrico de coníferas en condiciones de estrés hídrico (Gómez-Romero *et al.*, 2015; Caro-Gómez, 2017), en esta especie, la inoculación con este hongo, presenta mayor efecto en las variables de crecimiento en condiciones libre de estrés hídrico.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el HEM *Pisolithus arhizus*, promueve el crecimiento en el diámetro y cobertura, la biomasa aérea y radical, así como la longitud y el volumen radical en las plántulas de *Abies religiosa* cuando existe humedad en el suelo. Lo mismo pasa con interacción con los nanotubos de carbono de pared múltiple, no influyen de manera significativa en las condiciones de estrés hídrico, excepto en la variable cobertura, pero sí en los tratamientos libres de estrés.

En las variables radicales se presenta un efecto negativo por efecto del estrés hídrico. Los nanotubos de carbono han demostrado tener un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas al aumentar la biomasa y presentar mayor crecimiento en altura (Modal *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012; Khodakovskaya *et al.*, 2013).

Se sugiere que los tratamientos pueden ser utilizados bajo otra estrategia de restauración si se asegura condiciones de humedad en el suelo como las que se logran con plantas nodrizas (Blanco-García *et al.*, 2011, Carbajal-Navarro *et al.*, 2019), en este sentido, las plantas de *Abies religiosa*, serían beneficiadas con la protección de la sombra que aportan las plantas acompañantes, al mejorar las condiciones de humedad por la creación de micrositios.

Los factores aquí experimentados, podrían presentar un mayor efecto. Sin embargo, un aspecto importante de mencionar, es que inicialmente, ante condiciones de estrés hídrico, la supervivencia es prioritaria y el estudio muestra el efecto de los factores probados como son los HEM *P. arhizus* y la inoculación con nanotubos de carbono de pared múltiple en una concentración de 30µg/ml y puede potencializar el crecimiento en variables importantes como son el diámetro y la cobertura. Se sugiere en una segunda etapa, realizar el experimento en condiciones de capo para

evaluar el efecto de los factores *in situ*, con la finalidad de continuar desarrollando estrategias que puedan impactar en la permanencia de la especie *Abies religiosa*.

## 8. CONCLUSIONES

- Las plantas de *Abies religiosa* presentaron efectos positivos al ser inoculada con los hongos ectomicorrícicos y los nanotubos de carbono de pared múltiple a una concentración de 30µg/ml, de forma individual y en interacción.
- El estrés hídrico afecta de manera significativa la supervivencia y crecimiento de las plantas de *A. religiosa*. Siendo una especie altamente vulnerable ante las condiciones de cambio climático. Efecto mostrado en todas las variables evaluadas.
- En ausencia de estrés hídrico, las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrícico *Pisolithus arhizus*, presentan mayor crecimiento en cobertura y mayor peso radical.
- La interacción hongo ectomicorrícico-nanotubo de carbono de pared múltiple, incrementan en 21%, la supervivencia ante condiciones de estrés hídrico (40%-19% respectivamente).
- La tendencia en los tratamientos en condiciones de estrés hídrico es presentar menor crecimiento. Existen diferencias entre los tratamientos en estrés hídrico, para la variable de crecimiento en diámetro y cobertura, evidenciando la necesidad de realizar interacción.
- El crecimiento de la parte radical se vio afectada en los tratamientos en condiciones de estrés hídrico, la inoculación con hongos ectomicorrícicos presentaron un mayor desarrollo en la raíz en condiciones libre de estrés.
- Se comprobó la interacción entre las plantas de *Abies religiosa* y *Pisolithus arhizus*.
- La biomasa aérea y radical fue mayor en los tratamientos libre de estrés.
- Se confirma que *Abies religiosa*, es una especie vulnerable y muy sensible ante condiciones de estrés hídrico, por lo que es importante continuar con la investigación de esta especie, en la búsqueda de estrategias que puedan mejorar las condiciones de crecimiento, pero sobre todo de supervivencia.
- Con los resultados obtenidos se recomienda continuar con la investigación del experimento en condiciones controladas e *in situ*.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Allen, N.J. and Meyer, J.P. (1991) A Three-Component Conceptualization of Organizational Commitment. *Human Resource Management Review*, 1, 61-89. [http://dx.doi.org/10.1016/1053-4822\(91\)90011-Z](http://dx.doi.org/10.1016/1053-4822(91)90011-Z)
2. Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kizberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH, González P, Fensham R, Zhang Z, Castro J, Demidova N, Lim JH, Allard G, Running SW, Semerci A, Cobb N. 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.
3. Ángeles-Cervantes, E., & López-Mata, L. (2009). Supervivencia de una cohorte de plantas de *Abies religiosa* bajo diferentes condiciones postincendio. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 84, 25–33. <https://doi.org/10.17129/botsoci.2289>
4. Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal*. In McGrawHill.
5. Begon, M.; J.L. Harper y C.R. Townsend. 1996. *Ecology: individuals, populations and communities*. Third ed. Blackwell Sc. Publ. 759 p.
6. Benavides-Meza, H. M., Oriana, M., Guzmán, G., Fabiola, S., López, L., Morfín, F. C., Young, D., Grandizo, F., De, P., Lara, L. De, & Martínez, N. (2011). *Variabilidad en el crecimiento de plantas de ocho procedencias de Abies religiosa (H. B. K.) Schlecht. et Cham., en condiciones de vivero* *Growth variability in seedlings of eight provenances of Abies*. 17(3), 83–102.
7. Bethlenfalvai, G. J., Thomas, R. S., Dakessian, S., Brown, M. S., Ames, R. N. and Whitehead, E. E. 1988b. Mycorrhizae in stressed environments: effects on plant growth, endophyte development, soil stability and soil water. Pages 1015–1029 in C. F. Hutchinson and B. N. Timmermann, eds. *Arid-lands: today and tomorrow*.

8. Bhati A., Gunture, K. M. Tripathi, A. Singh, S. Sarkar and S. K. Sonkar. 2018. Exploration of nano carbons in relevance to plant systems. *New J. Chem.* 42, 16411–16427.
9. Breshears, D. *et al.*, 2005, “Regional vegetation die-off in response to global-change-type drought”, in *Proceedings of National Academy of Sciences*, 102: 15144-15148.
10. Brooks, T. M., Bakarr, M. I., Boucher, T., Da Fonseca, G. A. B., Hilton-Taylor, C., Hoekstra, J. M., Moritz, T., Olivieri, S., Parrish, J., Pressey, R. L., Rodrigues, A. S. L., Sechrest, W., Stattersfield, A., Strahm, W., & Stuart, S. N. (2004). Coverage provided by the global protected-area system: Is it enough? *BioScience*, 54(12), 1081–1091.
11. Brundrett, M. (1991). Mycorrhizas in Natural Ecosystems. In *Advances in Ecological Research* (Vol. 21, Issue C). [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60099-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60099-9)
12. Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuk, N. (1996). Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture Mycorrhizas of Australian Plants View project Banksia Woodland Restoration Project View project. June 1982, 374 pp. <https://www.researchgate.net/publication/227365112>
13. Brundrett, M. C. (2002). Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity. In *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity* (Issue May 2007). <https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9>
14. Carbajal-Navarro, A., Navarro-Miranda, E., Blanco-García, A., Cruzado-Vargas, A. L., Gómez-Pineda, E., Zamora-Sánchez, C., Pineda-García, F., O’Neill, G., Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R., Johnsen, K. H., Lobit, P., Lopez-Toledo, L., Herrerías-Diego, Y., & Sáenz-Romero, C. (2019). Ecological Restoration of *Abies religiosa* Forests Using Nurse Plants and Assisted Migration in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve, Mexico. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7(November). <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00421>
15. Cruzado-Vargas, A. L., Blanco-García, A., Lindig-Cisneros, R., Gómez-Romero, M., Lopez-Toledo, L., Barrera, E. de la, & Sáenz-Romero, C. (2021). Correction: Cruzado-Vargas *et al.*, Reciprocal common garden altitudinal

- transplants reveal potential negative impacts of climate change on *Abies religiosa* populations in the monarch butterfly biosphere reserve overwintering sites. *Forests* 2021, 12, 69. *Forests*, 12(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/f12091237>
16. Caro-Gómez E. 2017. Efecto de la interacción *Lactarius deliciosus* - nanotubos de carbono en el desempeño de *Pinus patula*. Tesis Profesional. Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo, Mexico. 106pp.
  17. Castellanos- Acuña D., R. Lindig-Cisneros, M. Silva-Farias y C. Sáenz Romero. 2014. Zonificación altitudinal provisional de *Abies religiosa* en un área cercana a la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca, Michoacán. *Revista Chapingo. Ciencias Forestales y del Ambiente*. 215-225.
  18. Castellanos-Acuña D., Lindig-Cisneros y Sáenz Romero. 2015. Altitudinal assisted migration of Mexican pines as an adaptation to climate change. *Ecosphere*.6 (1): 2.
  19. Comandini, O., A.C. Rinaldi, T.W. Kuyper, 2012. Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: A continuous challenge. In: M. Pagano (ed.), *Mycorrhiza: Occurrence in natural and restored environments*. Nova Science Publishers, Nueva York. p. 165-200.
  20. Cuyckens, G. A. E., L. R. Malizia y C. Blundo. 2015. Composition, diversity and structure of tree communities along an altitudinal gradient of subtropical forests of mountain (foothills of Zapla, Jujuy, Argentina). *Madera y bosques*. 21(3): 137-148.
  21. Daily G.C., S. Alexander, P. R. Ehrlich, L. Goulder, J. Lubchenco, P. A. Matson, H. A. Mooney, S. Postel, S. H. Schneider, D. Tilman & G. M. Woodwell 1997. *Servicios de los ecosistemas: beneficios que la sociedad recibe de los ecosistemas naturales*. Tópicos en ecología 2 (Ecological Society of America).
  22. Dawson, B. y M. Spannagle. 2009. *The complete guide to climate change*. Routledge, New York. 436p.

23. Delgado, G. C. (2006). Riesgos ambientales de la nanotecnología: nanopartículas y nanoestructuras Environmental Risks of Nanotechnology: Nanoparticles and Nanostructures. *Revista de Ciencias Ambientales*, 31(1), 34–39.
24. Dighton, J., Thomas, E. D., & Latter, P. M. (1987). Interactions between tree roots, mycorrhizas, a saprotrophic fungus and the decomposition of organic substrates in a microcosm. *Biology and Fertility of Soils*, 4(3), 145–150. <https://doi.org/10.1007/BF00256988>
25. Fagre, D. y D. L. Peterson. 2002. Modelling and monitoring ecosystem responses to climate change in three North American mountain ranges. In *Mountain biodiversity a global assessment*, C. Körner y E. M. Spehn (eds.). Parthenon, New York.
26. Fettig C. J., M. L. Reid, B J. Bentz, S. Sevanto, D. L. Spittlehouse, y T. Wang. 2013. Changing Climates, Changing Forests: A Western North American Perspective. *J. For.* 111(3): 214–228.
27. Flores García, A., Romero-Sánchez, M. E., Pérez-Miranda, R., & Moreno-Sánchez, F. (2020). Potencial de restauración de bosques de coníferas en zonas de movimiento de germoplasma en México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 12(63). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12i63.81>
28. Flores-Mata G., Jiménez-López J., Madrigal-Sánchez X., Moncayo-Ruiz F. y Takaki-Takaki F. 1971. Memoria del Mapa de Tipos de Vegetación de la República Mexicana. Secretaría de Recursos Hidráulicos, México, D.F.
29. Gadgil, R. L., & Gadgil, P. D. (1975). Suppression of litter decomposition by mycorrhizal roots of *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 5(1), 33–41.
30. Galicia, L., Chávez-Vergara, B. M., Kolb, M., Jasso-Flores, R. I., Rodríguez-Bustos, L. A., Solís, L. E., de la Cruz, V. G., Pérez-Campuzano, E., & Villanueva, Y. A. (2018). Perspectives of the socioecological approach in the preservation, utilization and the payment of environmental services of the temperate forests of Mexico. *Madera y Bosques*, 24(2), 1–18. <https://doi.org/10.21829/myb.2018.2421443>

31. Garnier, E., Navas, M.-L., & Grigulis, K. (2016). Plant Functional Diversity. In Plant Functional Diversity. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198757368.001.0001>
32. Gitay, H., A. Suarez, R.T. Watson, D.J. Dokken (eds). 2002. Climate Change and Biodiversity, IPCC. Technical Paper V. Intergovernmental Panel on Climate Change.
33. Gómez-Mendoza L. y L. Arriaga. 2007. Modeling the Effect of Climate Change on the Distribution of Oak and Pine Species of Mexico. *Conservation Biology*. 21(6): 1545–1555.
34. Gómez-Pineda, E., Sáenz-Romero, C., Ortega-Rodríguez, J. M., Blanco-García, A., Madrigal-Sánchez, X., Lindig-Cisneros, R., Lopez-Toledo, L., Pedraza-Santos, M. E., and Rehfeldt, G. E. 2020. Suitable climatic habitat changes for Mexican conifers along altitudinal gradients under climatic change scenarios. *Ecological Applications* 30(2): e02041. <https://doi.org/10.1002/eap.2041>
35. Gómez-Romero, M., E. De la B. Montpellier, J. Villegas y R. Lindig-Cisneros. 2013. Fertilización y asociación con especies pioneras herbáceas en el crecimiento de *Pinus pseudostrobus*. *Phyton*. 82: 135-143.
36. Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R. y E., Del Val. 2015. Efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus pseudostrobus* y *Pisolithus arhizus*. *Botánica Sciences*, 93(4): 731-740.
37. 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.
38. Hamrick J. L. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*. 197: 323–335.
39. Hansen J. (2008). Tipping point: perspective of a climatologist. In *State of the Wild: A Global Portrait of Wildlife*
40. Hansen J, M. Satoa, y R. Ruedy. 2012. Perception of climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(37):15-23

41. Harris- Valle C., M. Esqueda, E. M. Valenzuela-Soto y A. E. Castellanos. 2009. Rev. Fitotec. Mex. 32 (4): 265 – 271.
42. Hickman, J. C. 1970. Seasonal course of xylem sap tension. Ecology 51: 1052-1056.
43. Honrubia M., Torres P., Díaz G., Cano A., 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ICONA.
44. Honrubia, M. (2009). Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. Anales del Jardín Botánico de Madrid, 66: 133-144.
45. Hsiao, T. C. 1973. Plant responses to water stress. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 519-570
46. Hsiao, T. C., & Bradford, K. J. (1983). CHAPTER 6A Physiological Consequences of Cellular Water Deficits\*. 227–265.
47. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2000. Emissions Scenarios; Summary for Policymakers. Special Report of IPCC Working Group III. USA (<http://www.ipcc.ch/pdf/special-reports/spm/sres-en.pdf>).
48. Ipinza R. 2018. Migración asistida: el nuevo paradigma de la conservación de recursos genéticos forestales para la adaptación al cambio climático. Ciencia e Investigación Forestal. 24: 69-88.
49. IUCN. 1994. Red list categories. Species Survival Commission. IUCN Council Gland Switzerland, 59 pp.
50. Jaramillo-Correa J.P., Aguirre-Planter E., Khasa D.M, Eguiarte L.E., Piñero D., Furnier G.R. y Bousquet J. 2008. Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular18 Botanical Sciences 94 (1): 5-24, 2016.
51. Joshi, A.; Kaur, S.; Dharamvir, K.; Nayyar, H.; Verma, G. Multi-walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Sci. Food Agri. 2018, 98, 3148–3160.
52. Khan, M. A., Khan, T., Mashwani, Z. ur R., Riaz, M. S., Ullah, N., Ali, H., & Nadhman, A. (2019). Plant cell nanomaterials interaction: Growth, physiology and secondary metabolism. Comprehensive Analytical Chemistry, 84, 23–54. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.005>

53. Lambers, H., S. Chapin & T. Pons. 2008. Plant physiological ecology. Springer. New York. 604 p.
54. Lara-Romero *et al.*, (2017), Biological effects of carbon nanotubes generated in forest wildfire ecosystems rich in resinous trees on native plants. PeerJ 5: e3658; DOI 10.7717/peerj
55. Ledig, F. T., P. D. Hodgkiss, K.V. Krutovskii, D. B. Neale, and T. Eguiluz-Piedra. 2004. Relationships among the Spruces (*Picea*, Pinaceae) of Southwestern North America. Systematic Botany 29(2):275-295.
56. Ledig, F., 2012, "Climate change and conservation", in Acta Silvatica et Lignaria Hungarica, 8: 57-74.
57. Lemoine N. P. 2015. Climate Change May Alter Breeding Ground Distributions of Eastern Migratory Monarchs (*Danaus plexippus*) via Range Expansion of *Asclepias* Host Plants. PLoS One. 10(2):1-22.
58. Levitz, S. M. y R. D. Diamond. 1985. A Rapid Colorimetric Assay of Fungal Viability with the Tetrazolium Salt MTT. The Journal of Infectious Diseases. Oxford Journals. 5(152):938-945.
59. Lindig-Cisneros, R. A, Sáenz-Romero, C., Gómez-Pineda, E. (2018). Manejo adaptable de bosques ante alteraciones ambientales severas: lecciones del Volcán Parícutín y del cambio climático. Ciencia Nicolaíta., (74), 209–226.
60. López-Barrera, F., Martínez-Garza, C., & Ceccon, E. (2017). Ecología de la restauración en México: estado actual y perspectivas. Revista Mexicana de Biodiversidad, 88, 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.001>
61. López-Toledo L, Heredia-Hernández M, Castellanos-Acuña D, Blanco-García A. y Sáenz-Romero C. 2017. Reproductive investment of *Pinus pseudostrobus* along an altitudinal gradient in Western Mexico: implications of climate change. New Forests DOI 10.1007/s11056-017-9602-8
62. Madrigal Sánchez, Xavier. 1967. Contribución al conocimiento de la ecología de los bosques de oyamel (*Abies religiosa*) (H. B. K.) Schl. et Cham.) en el Valle de México. Boletín Técnico. SARH. N° 18.
63. Malcolm J. R., A. Markham, R. P. Neilson y Michael Garaci. 2002. Journal of Biogeography. 29: 835–849

64. Marx, D. H. (1972). Ectomycorrhizae as Biological Deterrents to Pathogenic Root Infections. *Annual Review of Phytopathology*, 10(1), 429–454. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.002241>
65. Manzanilla-Quiñones U., C.A. Martínez-Adriano. O. A. Aguirre-Calderón. 2018. Modelado espacial histórico y actual del oyamel (*Abies religiosa* [Kunth] Schltdl. & Cham.) en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. Vol. 25 (2).
66. Martín de Santa Olalla. M, F., Fuster, P. L. Belmonte, A. C. 2005. *Agua y Agronomía*. Universidad de Castilla- La Mancha. Edit. Mundi Prensa. España. p. 606.
67. Martínez Ballesta M. C., L. Zapata, N. Chalbi and M. Carvajal. 2016. Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *J Nanobiotechnology* 14:42. DOI 10.1186/s12951-016-0199-4
68. Martínez-Méndez N., E. Aguirre-Planter, L. E. Eguiarte y J. P. Jaramillo-Correa. 201. Ecología modelado de nicho ecológico de las especies del género *Abies* (Pinaceae) en México: algunas implicaciones taxonómicas y para la conservación. *Botanical Sciences* 94 (1): 5-24.
69. Maubert F., Marisela; Soto S., Laura; León C., Ana Ma.; Flores M., Jorge NANOTUBOS DE CARBONO - LA ERA DE LA NANOTECNOLOGÍA Razón y Palabra, núm. 68, mayo-junio, 2009 Universidad de los hemisferios Quito, Ecuador
70. Mátyás, Cs. Berki, I. Czúcz, B. Gálos, B. Móricz, N. Rasztovits, E. 2010. Future of Beech in Southeast Europe from the Perspective of Evolutionary Ecology. *Acta Silv. Lign. Hung.*, 6: 91-110.
71. Mendoza-Maya, E., Espino-Espino, J., Quiñones-Pérez, C. Z., Flores-López, C., Wehenkel, C., Vargas-Hernández, J. J., & Sáenz-Romero, C. (2015). Proposal for conservation of three endangered species of mexican spruce. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(3), 235–247. <https://doi.org/10.35196/rfm.2015.3.235>

72. Millenium Ecosystem Assessment 2005. Ecosystems and human well-being. Island Press, Washington DC, EUA.
73. Molina, M., Mahecha, L., & Medina, M. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2), 162–175
74. Molles, M. C. (2006). *Ecology: Concepts and applications*. Boston: WCB/McGraw-Hill.
75. Mondal A., Nandy P., Basu R. & Das S. (2011) Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: an agricultural prospect. *J Nanopart Res.* 13:4519–4528.
76. Mubarak Ali Khana, Tariq Khanb, Zia-ur-Rehman Mashwanic, Muhammad Suleman Riaza, Nazif Ullaha, Huma Alid, Akhtar Nadhman (2019). Plant cell nanomaterials interaction: Growth, physiology and secondary metabolism. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 84 <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.005>
77. Myers, N., Mittermeller, R. A., Mittermeller, C. G., Da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
78. Nilsen, E. T. y D. M. Orcutt. 1996. *Physiology of plants under stress*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
79. Nonami, H. (1998). Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials. *Journal of Plant Research*, 111(3), 373–382. <https://doi.org/10.1007/bf02507801>
80. Odum, E. P., & Gerhard Ottenwaelder, C. (1972). *Ecology*. Interamericana. México. 639 p.
81. Ojeda Silvera, C. M. (2015). Efecto de un producto bioactivo compuesto por oligogalacturónidos como mitigador del estrés hídrico en variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L). Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, Baja California Sur.

82. Oros-Ortega, I., Andrade-Torres, A., Lara-Pérez, L. A., Guzmán-Olmos, R. F., Casanova-Lugo, F., Sáenz-Carbonell, L. A., y Córdova-Lara, I. 2017. Ectomycorrhizal ecology, biotechnology and taxonomy for the conservation and use of *Abies religiosa* in temperate areas of Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 23(3): 411-426.
83. Ortiz-Bibian M. A., A. Blanco-García, R. A. Lindig-Cisneros, M. Gómez-Romero, D. Castellanos-Acuña, Y. Herrerías-Diego, N. M. Sánchez-Vargas y C. Sáenz-Romero. 2017. Genetic Variation in *Abies religiosa* for Quantitative Traits and Delineation of Elevational and Climatic Zoning for Maintaining Monarch Butterfly Overwintering Sites in Mexico, considering Climatic Change. *Genetic*. 66: 14-23.
84. Ortiz-Bibian, M. A., Castellanos-Acuña, D., Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R. A., Silva-Farías, M. A., and Sáenz-Romero, C. (2019). Variation among *Abies religiosa* (H.B.K.) schl. et cham populations along an elevational gradient of seed germination capacity. *Revist. Fitotecn. Mexican*. 42, 301–308.
85. Parmesan C. 2006. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37:637–69.
86. Pérez-moreno, J., & Read, D. J. (2004). a Los Árboles En La Naturaleza. *Read*, 29(May), 239–247.
87. Peyronel, B., Fassi, B., Fontana, A., & Trappe, J. M. (1969). Terminology of Mycorrhizae. *Mycologia*, 61(2), 410–411. <https://doi.org/10.1080/00275514.1969.12018747>
88. Khan, M. A., Khan, T., Mashwani, Z. ur R., Riaz, M. S., Ullah, N., Ali, H., & Nadhman, A. (2019). Plant cell nanomaterials interaction: Growth, physiology and secondary metabolism. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 84, 23–54. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.005>
89. Kramer 1963 en O’Leary, J. W. (1970). Water Stress and Plant Growth. *Ecology*, 51(1), 164–165. <https://doi.org/10.2307/1933615>
90. Khodakovskaya M., Watanabe M., Dervishi E., Biris A. S., Mahmood M. & Xu Y. 2009. Carbon Nanotubes Are Able to Penetrate Plant Seed Coat and

- Dramatically Affect Seed Germination and Plant Growth. American Chemical Society ACS NANO, (3)10: 3221-3227.
91. Rehfeldt, G., Nicholas L. Crookston, Cuauhtémoc Sáenz-Romero y Elizabeth M. Campbell. 2012. North American vegetation model for land-use planning in a changing climate: a solution to large classification problems, in: Ecological Applications, 22(1): 119-141
  92. Read DJ, Pérez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? New Phytol. 157: 475-492.
  93. Ripple, W.J., C. Wolf, T.M. Newsome, P. Barnard, and W.R. Moomaw. 2019. World Scientists' warning of a climate emergency. BioScience. <https://doi.org/10.1093/biosci/biz088>.
  94. Rockström, J., W. Steffen, K. Noone, Å. Persson, F. S. Chapin, III, E. Lambin, T. M. Lenton, M. Scheffer, C. Folke, H. Schellnhuber, B. Nykvist, C. A. De Wit, T. Hughes, S. van der Leeuw, H. Rodhe, S. Sörlin, P. K. Snyder, R. Costanza, U. Svedin, M. Falkenmark, L. Karlberg, R. W. Corell, V. J. Fabry, J. Hansen, B. Walker, D. Liverman, K. Richardson, P. Crutzen, and J. Foley. 2009. Planetary boundaries: exploring the safe operating space for humanity. Ecology and Society 14(2): 32.
  95. Rodríguez-Trejo, D. A., & Myers, R. L. (2010). Using Oak characteristics to guide fire regime restoration in Mexican pine-oak and oak forests. Ecological Restoration, 28(3), 304–323. <https://doi.org/10.3368/er.28.3.304>
  96. Ruiz-Lozano, J. M. y R. Azcón. 1995. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plant as affected by the fungal species and water status. Physiologia Plantarum. 95: 472-478.
  97. Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa, México, D. F. México. 283–313pp.
  98. Sáenz-Romero, C., Gerald E. Rehfeldt, Nicholas L. Crookston, Pierre Duval, Jean Beaulieu. 2009. Estimaciones de cambio climático para Michoacán. Implicaciones para el sector agropecuario y forestal y para la conservación de la Mariposa Monarca Cuadernos de Divulgación Científica y Tecnológica del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Michoacán. 3(28):1-21pp.

99. Sáenz-Romero C., G. E. Rehfeldt, N. L. Crookston, P. Duval, R. St-Amant, J. Beaulieu, B. A. Richardson. 2010. Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Mexico and their use in understanding climate-change impacts on the vegetation. *Climatic Change*. 102: 595-623.
100. Sáenz-Romero C. 2015. Efectos potenciales del cambio climático en los recursos forestales. La sabanización de las regiones continentales de México. *Sociedades rurales, producción y medioambiente*. 15(30): 91-110.
101. Sáenz-Romero C., R. A. Lindig-Cisneros, D. G. Joyce, J. Beaulieu. J. B. St. Clair. B. C. Jaquish. 2016. Assisted migration of forest populations for adapting trees to climate change. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 22(3): 303-323.
102. Sáenz-Romero C., G. E. Rehfeldt, P. Duval, R. A. Lindig-Cisneros. 2012. *Abies religiosa* habitat prediction in climatic change scenarios and implications for monarch butterfly conservation in Mexico. *Forest Ecology and Management*. 275:98-106.
103. Sáenz-Romero C., J. F. Charre-Medellín, T. Monterrubio- Rico, M. A.-J. y N. L. C. (2020). Proyecciones de hábitat climático para biomas de Michoacán, en escenarios de cambio climático. *Ciencia Nicolaíta.*, 79, 57–74.
104. Sánchez, D.M. Aquirreolea, J. 2000. Capítulo 2. El agua en la planta. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (J. Azcón-Bieto, M. Talón), Ed. McGraw-Hill Interamericana Ediciones de la Universidad de Barcelona, Madrid-Barcelona, pp. 17-82.
105. SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y de Pesca). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación.*, Segunda sección, 30 de diciembre, México, D. F. 77 p.

106. Sierverding 1989. Aspectos de la taxonomía y la identificación de hongos formadores de micorriza vesículo–arbuscular. Investigaciones sobre micorrizas en Colombia Palmira, Colombia, Facultad de Ciencias Agronómicas.
107. Silva-Sáenz, P. 2019. Gimnospermas: ahuehuetes, pinos, cedros y cícadás. En: La biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado 2, vol. II. CONABIO, México, pp.203-223.
108. Smith, S.E. and Read, D.J. (1997) Mycorrhizal Symbiosis. 2nd Edition, Academic Press, London.
109. Smith, R.L. y T. M. Smith. 2001. Ecology. 4a. ed. Pearson Addison Wesley. 775 p.
110. Smith S E, D J Read (2008) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. London, UK. 787 p.
111. Soriano, A. (1980). Ecofisiología del stress en las plantas (Vol. 1, Issue 1). [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29254/Documento\\_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29254/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
112. Sturrock, R. *et al.*, 2011, "Climate change and forest diseases", in Plant Pathology, 60: 133-149.
113. Taiz L. & E. Zeiger. 2006. Fisiología vegetal. Vol. I Y II. Universidad Jaume, Castellón de la Plana. Takeuchi,
114. Taiz, L. & E. Zeiger. 2009. Fisiología Vegetal. 3a ed. Artmed. Porto alegre. 581 p.
115. Trejo, I.; Hernández, L. J. y Villera, L. 2007. Afectación de las comunidades vegetales de México ante el cambio climático. Geopolítica, globalización y cambio ambiental: retos para el desarrollo latinoamericano. Bogotá, Colombia. 45 p.
116. UNER. (2011). Fisiología en condiciones de estrés. Facultad De Ciencias Agropecuarias, 1–17. [http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/WEBFV\\_2010/m\\_at\\_did/UT12\\_Estres.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/WEBFV_2010/m_at_did/UT12_Estres.pdf)

117. Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., & Julio, J. (2014). CAPÍTULO 6 Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. October.
118. Wang X., Gu X., Han H., Chen K., Liu X. & Lu D. 2012. Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. J Nanopart Res., (14):841 (14):841
119. Walte-Vega, J. K., A. García-Romero, L. L. Manzo-Delgado y J. López García. 2017. Factores de distribución de las comunidades del bosque húmedo de montaña: Volcán Cofre de Perote, México. Bosque (Valdivia) 38(1): 29-39. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002017000100004>