



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**“Interacción micorrícica – nanopartículas” de *Morus celtidifolia* con fines de rehabilitación de ecosistemas”**

**TESIS**

**como requisito parcial para obtener  
el título profesional de**

**Maestra en Ciencias Biológicas**

Presenta:

**Lucero Chavic Pérez Ruiz**

**Directora de tesis: Dra. Mariela Gómez Romero.**

**Co-director de tesis: Dr. Javier Villegas.**

Morelia, Mich. A Mayo del 2023



**FACULTAD DE  
BIOLOGÍA**

## Índice de contenido

TESIS.....	i
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES .....	10
II.I. Asociación micorrícica .....	10
II.II. Asociación Ectomicorrícica ( <i>Pisolithus arhizus</i> ).....	13
II.III. Asociación micorrícica arbuscular ( <i>Rizophagus intraradices</i> ).....	18
II.IV. Nanotubos de Carbono .....	25
III. HIPOTESIS .....	32
IV. OBJETIVO .....	33
IV. I. OBJETIVO GENERAL.....	33
IV.II. OBJETIVOS PARTICULARES .....	33
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
V.I. Obtención de material .....	34
V.II. Inoculación .....	34
V.III. Evaluación de variables respuesta.....	35
V.IV. Influencia de los NTC en la germinación de semillas de <i>M. celtidifolia</i> . .....	35
V.V. Análisis de clorofila .....	35
V.VI. Análisis de datos.....	36
VI. RESULTADOS.....	37
VII. DISCUSIÓN .....	47
VIII. CONCLUSIONES.....	51
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	52

## Índice de figuras

Figura 1. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado a: a) Altura, b) Diámetro a la altura de la base (DAB), c) Cobertura y d) Número de hojas en plantas de <i>M. celtidifolia</i> . Las letras indican grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. .....	37
Figura 2. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado a la longitud de raíz en plantas de <i>M. celtidifolia</i> en interacción con y sin nanotubos de carbono.....	39
Figura 3. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado al peso fresco de raíz en plantas de <i>M. celtidifolia</i> en interacción con y sin nanotubos de carbono.....	39
Figura 4. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado al volumen radical en plantas de <i>M. celtidifolia</i> en interacción con y sin nanotubos de carbono.....	40
Figura 5. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado al volumen radical en plantas de <i>M. celtidifolia</i> en interacción con y sin nanotubos de carbono.....	40
Figura 6. Evaluación de clorofila mediante absorción de fotones en hojas plántulas de <i>M. celtidifolia</i> .....	41
Figura 7. Representación radical de <i>M. celtidifolia</i> por tratamiento a 10 meses de crecimiento.....	42
Figura 8. Representación de plántulas de <i>M. celtidifolia</i> por tratamiento a 9 meses de crecimiento.....	42
Figura 9. Germinación de semillas de <i>Morus celtidifolia</i> , localidad de Morelia en.....	44
Figura 10. Germinación de semillas de <i>M. celtidifolia</i> , localidad de Yotatiro en.....	45
Figura 11. Germinación de semillas de <i>M. celtidifolia</i> , localidad de La Cadena en presencia de NTC 20 y 40 µg/ml.....	46

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Diseño experimental en ausencia/presencia de hongos micorrícicos, nanotubos de carbono.....	34
Cuadro 2. Semillas de <i>M. celtidifolia</i> colectadas en Morelia, Mich., adicionadas con NTC. ....	44
Cuadro 3. Semillas de <i>M. celtidifolia</i> colectadas en Yotatiro, Mich., adicionadas con NTC. ....	45
Cuadro 4. Semillas de <i>M. celtidifolia</i> colectadas en La Cadena, Mich., sometidas a NTC. ....	46

## Resumen

En este estudio se evaluó la respuesta de plántulas de *Morus celtidifolia* en sustrato peat moss, en interacción con hongos endomicorrízico y ectomicorrízicos, adicionadas con nanotubos de carbono, de pared múltiple (NTC) de origen natural (*Pinus oocarpa*). El experimento constó de ocho tratamientos: control, asociación ectomicorrízica (HEM), asociación micorrízica arbuscular (HMA), asociación ectomicorrízica y arbuscular (HEM-HMA), nanotubos de carbono (NTC), asociación ectomicorrízica en adición de nanotubos de carbono (HEM-NTC), asociación micorrízica arbuscular en adición de nanotubos de carbono (HMA-NTC), asociación ectomicorrízica y arbuscular en adición de nanotubos de carbono (HEM-HMA-NTC). Posteriormente se evaluaron las siguientes variables en la planta: biomasa aérea y radical, altura, diámetro a la altura de la base (DAB), longitud y volumen de raíz. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples por medio de la prueba de Tukey, obteniendo que los tratamientos más efectivos para la propagación de *M. celtidifolia* en vivero, eran el 3 (HMA), seguido del 2 (HMA).

Por otro lado, se analizó la cantidad de clorofila presente en hojas de *M. celtidifolia*, a través de la variable de absorción de fotones, obteniendo que el tratamiento más significativo fue el 2 (HEM=  $P > 0.0247$ ).

Se obtuvieron semillas de *M. celtidifolia* de tres localidades distintas: Morelia, Yotatiro y La Cadena, pertenecientes al estado de Michoacán, éstas, fueron adicionadas con nanotubos de carbono a concentraciones de 20  $\mu\text{g}$  y 40  $\mu\text{g}$ , respectivamente y control, y puestas en cámara de crecimiento a 25°C, 12 horas oscuridad, 12 horas luz. Se analizó porcentaje de supervivencia y de germinación. De acuerdo a los datos obtenidos, las semillas de La Cadena a una concentración de 20  $\mu\text{g}$  mostraron el porcentaje de germinación más alto (29.25%).

Por último, se analizó la arquitectura de raíz por método destructivo a través de las variables de longitud y volumen de raíz, de acuerdo a los datos obtenidos, los tratamientos significativos corresponden al 3 (HMA) y 2 (HEM).

Cabe señalar que la asociación micorrízica favoreció el incremento de las variables evaluadas. Por lo que se recomienda su empleo en los programas de restauración forestal para mejorar las condiciones para el establecimiento de *M. celtidifolia*.

Palabras clave: germinación, supervivencia, restauración, endomicorrízico, ectomicorrízico.

## **Abstract**

This study evaluated the response of *Morus celtidifolia* seedlings in peat moss substrate, in interaction with endomycorrhizal and ectomycorrhizal fungi, added with multi-walled carbon nanotubes (NTC) of natural origin (*Pinus oocarpa*). The experiment consisted of eight treatments: control, ectomycorrhizal association (EMH), arbuscular mycorrhizal association (AMA), ectomycorrhizal and arbuscular association (EMH-AMA), carbon nanotubes (NTC), ectomycorrhizal association in addition to carbon nanotubes (EMH-NTC), arbuscular mycorrhizal association in addition to carbon nanotubes (HMA-NTC), ectomycorrhizal and arbuscular association in addition to carbon nanotubes (HEM-HMA-NTC). Subsequently, the following plant variables were evaluated: aerial and root biomass, height, diameter at base height (DBH), root length and root volume. The data were analyzed by analysis of variance and the multiple comparisons test using Tukey's test, obtaining that the most effective treatments for the propagation of *M. celtidifolia* in the nursery were 3 (HMA), followed by 2 (HMA).

On the other hand, the amount of chlorophyll present in leaves of *M. celtidifolia* was analyzed through the photon absorption variable, obtaining that the most significant treatment was 2 (HEM=  $P > 0.0247$ ).

Seeds of *M. celtidifolia* were obtained from three different localities: Morelia, Yotatiro and La Cadena, belonging to the state of Michoacán, these were added with carbon nanotubes at concentrations of 20  $\mu\text{g}$  and 40  $\mu\text{g}$ , respectively and control, and placed in a growth chamber at 25°C, 12 hours of darkness, 12 hours of light. Survival and germination percentages were analyzed. According to the data obtained, La Cadena seeds at a concentration of 20  $\mu\text{g}$  showed the highest germination percentage (29.25%). Finally, root architecture was analyzed by destructive method through the variables of root length and volume, according to the data obtained, the significant treatments correspond to 3 (HMA) and 2 (HEM).

It should be noted that the mycorrhizal association favored the increase of the evaluated variables. Therefore, its use is recommended in forest restoration programs to improve conditions for the establishment of *M. celtidifolia*.

Key words: germination, survival, restoration, endomycorrhizal, ectomycorrhizal.

## I. INTRODUCCIÓN

El cambio climático puede alterar drásticamente la distribución de las distintas especies que habitan nuestro planeta, esto debido a las variaciones que se presentaran en la temperatura, precipitación y estacionalidad (Sáenz- Romero *et al.*, 2010; Hansen 2012; Lemoine 2015; Sáenz- Romero *et al.*, 2016). Como efectos del cambio climático, la temperatura aumenta en el tiempo (Hansen *et al.* 2012).

Las áreas forestales pueden contrarrestar el cambio climático al reducir sus efectos negativos, por lo que es necesario favorecer su recuperación para que puedan ser funcionales. En el caso de las plantas, el estrés hídrico es provocado por las altas temperaturas y la baja humedad en el ambiente, constituyendo uno de los principales retos de supervivencia en la vida silvestre (Luna-Flores *et al.* 2012).

El estrés hídrico también conocido como estrés por sequía, afecta a las plantas en su desarrollo morfológico (crecimiento aéreo y radicular; pérdida de hojas; falta de follaje) y fisiológico (capacidad fotosintética).

En las plantas, el transporte de agua se da en el xilema, formando una red de sistemas de conducción.

En ciertas especies de árboles, se ha observado un ajuste en la anatomía del xilema en respuesta a la variación interanual en la disponibilidad de recursos, principalmente agua (Albuixech *et al.*, 2012). Esto podría prevenir fallas en el sistema hidráulico, especialmente en años muy secos. Se ha reportado que en programas de restauración ecológica, el estrés hídrico puede ser una limitante para el establecimiento de las plantas utilizadas, reduciendo su tasa de supervivencia hasta un 50% o más.

Sin embargo, especies arbóreas pueden resistir y adaptarse a condiciones ambientales cambiantes (Fettig *et al.*, 2013). En este sentido, las especies nativas poseen una mayor capacidad de adaptación a las condiciones del sitio, tales como la topografía, el tipo de suelo y el clima particular. Un ejemplo es

*Morus celtidifolia*, esta representa una especie con alto grado de adaptabilidad a diferentes ecosistemas, dado su rango de distribución geográfica muy amplio.

Sin embargo, es una especie que presenta poblaciones reducidas en cuanto al número de ejemplares por área. *M. celtidifolia* presenta diversas ventajas y por ello, se le puede considerar como una especie potencial para fines de restauración ecológica.

Entre sus ventajas, destaca su alta producción de frutos de mora que son alimento de diversas aves y otros mamíferos. Por otro lado, las aves jugarían un rol importante en la dispersión de semillas. Lo que bien podría incrementar el número de individuos.

Los frutos contienen una cantidad numerosa de semillas, aspecto importante a considerar en restauración, debido a que facilita la recolección de semillas y a la vez el procesamiento de las mismas (Flores y Linding-Cisneros, 2005).

Cabe señalar, que la restauración ecológica de un sitio degradado, utilizando la especie *M. celtidifolia*, bien podría tener como finalidad a largo plazo, la obtención de los recursos maderables de que provee, pues en varios estados se considera a su madera de muy buena calidad, de allí que pueda ser utilizada en la producción de muebles o material de construcción. En algunos estados donde se le encuentra, es común el uso de sus ramas como leña para combustible. Los frutos de *M. celtidifolia* bien podrían considerarse como un recurso para fines alimenticios, de allí que tenga potencial en la venta comercial, y cabe señalar que, mediante un método adecuado de tratamiento y sanidad, podrían ser exportados. Los frutos también son empleados en la obtención de tinturas (Escobedo-López y Núñez-Colín, 2016).

Por otro lado, se ha documentado que el estudio de plantas con potencial para formar asociaciones simbióticas tanto con hongos micorrícicos arbusculares como con hongos ectomicorrícicos, puede contribuir a mejorar las estrategias de restauración ecológica (Gómez-Romero *et al.*, 2012).

La micorriza es una asociación promotora de la diversidad vegetal, facilita el establecimiento de las plantas y a su vez, constituye uno de los principales componentes microbianos que intervienen en la estabilización y regulación de las

comunidades vegetales de un ecosistema (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001). Es por ello, que se deriva su importancia para proyectos de propagación a fin de que resulten exitosos a largo plazo, puesto que no sólo favorecen el establecimiento de las plántulas, sino que les confieren grandes beneficios frente a condiciones adversas.

La promoción de la simbiosis en proyectos de restauración forestal, permite incrementar el éxito de los mismos, debido al incremento del nivel de supervivencia de las plantas que se manejen. Otro beneficio de esta asociación es la restauración de los sitios degradados. Son las micorrizas las encargadas de contribuir en el desarrollo óptimo de las comunidades vegetales.

Resultan ser organismos que proveen de efectos muy positivos a sus hospedantes, por los beneficios que le generan frente a las condiciones ambientales tan fluctuantes, derivadas del cambio climático global (FerreraCerrato *et al.*, 2009; Gómez-Romero *et al.*, 2013).

La asociación micorrícica permitió la evolución y adaptación de las plantas en los ecosistemas terrestres (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001). Algunas plantas tienen potencial para establecer relaciones simbióticas con hongos micorrícicos arbusculares (HMA), no formadores de manto fúngico o bien, con hongos ectomicorrícicos (HE), formadores de manto fúngico.

Ambos tipos de hongos son colaboradores para el establecimiento de las plantas, lo cual favorece por su parte las estrategias de restauración ecológica (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012; Gómez-Romero *et al.*, 2012; Báez-Pérez *et al.*, 2105). Para aprovechar la capacidad de los hongos micorrícicos en las plantas, es importante conocer los que tengan mayor afinidad hacia el hospedante, de otra manera, es probable que la asociación no sea exitosa. La inoculación con hongos nativos del suelo (Osorio *et al.*, 2008), suele ser mucho más favorable y con mejores resultados, pues estos, tienen la capacidad de adaptarse fácilmente a las condiciones edafoclimáticas en que se desarrolla la planta, lo que ayuda a potenciar el desarrollo de estas.

*Pisolithus arhizus*, antes *P. tinctorius* es un hongo ectomicorrícico (HEM) muy común en México. Presenta un cuerpo fructífero de alrededor de ~20 y 5 cm de

altura con un diámetro de ~ 10 cm, es fibroso con una coloración pardo-amarillenta. Presenta esporas globosas de tonalidades marrón-canela de 7-12  $\mu\text{m}$  y espinas de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de largo. Su temporada de fructificación se manifiesta a comienzos del otoño (García-Rodríguez *et al.*, 2006; Gómez-Romero *et al.*, 2013).

Los hongos micorrízico arbusculares, en especial *Rizophagus intraradices*, han sido encontrados en suelos con condiciones altamente estresantes, ya sea por sus condiciones hídricas, falta de nutrientes o por la presencia de metales pesados (Krishnamoorthy *et al.*, 2015), en los que se han encontrado una densidad de esporas alta con respecto a otros hongos micorrízico arbusculares de la microbiota del suelo. Lo que le confiere características especiales para su utilización bajo condiciones de perturbación.

*R. intraradices*, por otro lado, es un hongo endomicorrízico o micorrízico arbuscular (HMA), con una gran distribución geográfica, de allí que sea usado comúnmente en la inoculación de especies frutales, forestales, endémicas, por las respuestas favorables que induce en sus relaciones mutualistas. “Las micorrizas arbusculares constituyen una de las simbiosis mutualistas más esenciales en la naturaleza, cumplen funciones en el ecosistema, pueden mejorar el crecimiento y salud de las plantas, han demostrado ser buenos aliados en la restauración de ecosistemas degradados” (Monray-Ata y Ramírez-Saldívar, 2018).

No se tiene registro del potencial de *M. celtidifolia* para formar asociación con un hongo micorrízico arbuscular o uno ectomicorrízico, de allí la importancia de analizar la respuesta de esta planta con dichas asociaciones.

La determinación de la micorriza adecuada permitirá facilitar su propagación, a fin de asegurar una mayor supervivencia de las plántulas mediante una mayor captación de agua y nutrientes para un buen desarrollo.

Se han estudiado algunas interacciones micorrízicas que han resultado exitosas con *Fraxinus uhdei*, una planta endémica de México, la cual puede formar asociaciones con HMA y HE, las cuales le permiten establecerse en condiciones

de suelos altamente degradados, favoreciendo además su supervivencia (BáezPérez *et al.*, 2015).

Gianinazzi (1991), observó que los hongos micorrízico arbusculares estimulan la formación de raíces laterales a partir de estacas, debido a la capacidad fisiológica que poseen para sintetizar determinados reguladores de crecimiento, principalmente auxinas y citocininas. Alarcón y Ferrera-Cerrato (2003), han recomendado la inoculación con HMA en plantas de vivero, debido a que esta estrategia incrementa la supervivencia y crecimiento de las plantas durante los procesos de propagación.

La asociación micorrízica arbuscular, genera una respuesta favorable de las plantas, manifiesta a través de una mejor absorción y aprovechamiento de fósforo y nitrógeno, lo cual se observa en el incremento del vigor y crecimiento de las plantas.

Gómez-Romero *et al.*, (2013), demostraron que la presencia del hongo ectomicorrizogénico *Pisolithus tinctorius* en plantas de *Pinus pseudostrobus* para propagar en un área de cárcavas desprovista de vegetación, incrementa la supervivencia de esta especie frente a condiciones adversas. El efecto principal, radica en el aumento de supervivencia y crecimiento en las plantas de *P. pseudostrobus*. A su vez los autores recomiendan la implementación de asociaciones micorrízicas como una inversión para mejorar el éxito en los programas de reforestación.

Por otro lado, recientemente se han probado otras interacciones como los nanotubos de carbono (NTC), se han utilizado para evaluar los efectos en plantas, así como las interacciones que puedan tener con otros componentes característicos de ecosistemas forestales como hongos micorrízicos; se ha reportado efectos en la germinación y el desarrollo de plantas de importancia económica relacionados con modificaciones en la absorción de agua (Wang *et al.*, 2012), así como en plantas forestales *Lupinus elegans* y *Eysenhardtia polystachya*, donde se proporciona evidencia que apoya la generación y las posibles funciones ecológicas de los nanotubos de carbono en la naturaleza (Lara-Romero *et al.*, 2017; Juárez-Cisneros *et al.*, 2020).

Los nanotubos, un alótropo de carbono de forma cristalina con hibridación  $sp^2$ , presentan un diámetro que va de 1 a 100 nm. Los nanotubos de Carbono pueden estar formados por varias capas de átomos de carbono llamadas láminas gráficas, las cuales se encuentran formados por una red hexagonal y se enrollan entre sí dando origen a los nanotubos de carbono. En sus extremos pueden estar abiertos o cerrados. Algunas de las principales propiedades fisicoquímicas de los nanotubos de carbono son su alta conductividad eléctrica, por lo que se les ha llegado a considerar como “alambres moleculares”. Tienen una dureza más alta que el diamante y cuentan con calores de resistencia a la tracción muy altos, por los que son funcionales en la elaboración de los materiales compuestos, son maleables, activan fósforos a un voltaje de 1-3 V, y sin olvidar que son transmisores de calor (González, 2015).

Las funciones que se les ha dado a estas nanopartículas, son en el área de los materiales, por lo que su uso en el área de las ciencias biológicas, resulta novedoso e interesante, por las implicaciones que pueden derivar de su aplicación en interacción con sistemas biológicos.

Son cada vez más las aplicaciones que se le dan a los nanomateriales, sin embargo aún existe cierta incertidumbre a su uso, por algunos efectos de fitotoxicidad que se ha documentado, pero la introducción del campo de la nanotecnología en la medicina, electrónica, farmacéutica, agricultura ha tenido efectos positivos que han potenciado su uso por la capacidad de los nanomateriales para incrementar la productividad de los sistemas vegetales en que se apliquen, por su capacidad de captura, inmovilización y liberación controlada de los nutrientes en sitios perturbados o de difícil acceso a los elementos esenciales. Otra característica importante y distintiva de los nanomateriales es su capacidad de mejorar la eficacia de los plaguicidas ya que al funcionalizarse con esas moléculas pueden permanecer más tiempo en la planta, permitir su lenta liberación y reducir sus efectos ambientales la reducirse su lixiviación.

La nanotecnología ha sido una herramienta moderna, introducida principalmente en la elaboración de textiles antimicrobianos, de mejor calidad comparados a los

ya existentes. Sin embargo, en el caso de la agricultura es una herramienta nueva que puede potencializar la producción mediante el incremento de la misma con menos insumos químicos y como ya se mencionó anteriormente, actúan mejorando la acción de fertilizantes y plaguicidas, además de que existe nanopartículas que actúan como sensores ante la presencia de organismos fitopatógenos (Lira-Saldivar *et al.*, 2018).

Recientes hallazgos han documentado que se pueden generar nanotubos de carbono durante los incendios forestales. Esto es de gran relevancia, ya que la presencia de estas nanopartículas en esos ambientes, puede ser utilizada para el mejoramiento de las plantas con interés forestal, sin tener que adicionar componentes que puedan afectar a los ecosistemas, al ser estos naturales como lo son los nanotubos de carbono (Lara-Romero *et al.*, 2017). El uso de este tipo de materiales para programas de restauración es novedoso y aún la información científica documentada sobre sus beneficios potenciales es limitada por lo que el presente estudio pretende evaluar el efecto de los hongos micorrícicos *Pisolithus arhizus*, hongo ectomicorrizogénico (HEM) y *Rhizophagus intraradices* hongo endomicorrícico o micorrícico arbuscular (HMA), así como el efecto en interacción con nanotubos de carbono de origen natural en la germinación, supervivencia y crecimiento de *Morus celtidifolia*.

## II. ANTECEDENTES

### II.I. Asociación micorrícica

Pérez (1998), considera a la asociación micorrícica como un componente homeostático de los ecosistemas ya que actúa como un conector y regulador entre dos sistemas, el sistema primario (planta) y el sistema descomponedor (microbiota del suelo), lo cual genera beneficios entre ambos sistemas (ciclo autocatalítico).

Una de las interacciones más importantes que desarrollan los hongos micorrícicos en el suelo, es la que parte de la inducción de poblaciones bacterianas, entre ellas, algunas con importancia como promotoras de crecimiento en plantas. En algunos estudios, se ha encontrado la presencia de un mayor número de bacterias diazotróficas y simbióticas, así como bacteria solubilizadoras de fosfatos insolubles, lo cual mejora la adquisición de los nutrientes por las plantas (González, 1993; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001). Los hongos micorrícicos mayor representados en zonas templadas son los ectomicorrizogénicos (HE), por otro lado, en las zonas tropicales son más abundantes los hongos micorrizogénicos arbusculares (HMA) (Marschner, 1990). Los hongos micorrícicos arbusculares, pertenecen a un grupo monofilético del phylum Glomeromycota que cuenta con aproximadamente 270 taxas, los cuales a su vez son capaces de formar asociaciones simbióticas con un 72%-80% de las plantas existentes (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2003; Brundrett, 2009). Los HMA tiene principal aplicación en sistemas que requieren una fase en vivero antes de ser integradas en medios naturales, ello para incrementar la supervivencia de las plántulas en sus primeras etapas de crecimiento (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999).

Ferrera-Cerrato *et al.*, (2009), analizan la respuesta de varias especies de leguminosas arbóreas destinadas a la reforestación en zonas con suelos severamente degradados, en base a la comparación de estudios previos. Las leguminosas eran inoculadas con HMA, la inoculación fue realizada mediante una técnica especializada de selección de rizobacterias y de HMA seleccionado. La germinación de las semillas se hizo en un sustrato inerte y posteriormente

fueron trasplantadas a bolsas de polietileno con sustrato estéril con disponibilidad de fósforo reducida. La inoculación fue realizada en el momento del trasplante. En todos los casos se concluye que, se obtuvo una respuesta positiva en la asociación con un incremento significativo en el crecimiento de las leguminosas. Se han estudiado algunas interacciones micorrícicas que han resultado exitosas con *Fraxinus uhdei*, una planta endémica de México, la cual puede formar asociaciones con HMA y HE, las cuales le permiten establecerse en condiciones de suelos altamente degradados, favoreciendo además su supervivencia (BáezPérez *et al.*, 2015).

Báez-Pérez *et al.*, (2015), analizaron la respuesta entre *Pisolithus tinctorius*, *Rizopagus intraradices* y fertilización con urea en plantas de *Fraxinus uhdei* en acrisoles provenientes de sitios degradados. Los resultados sugieren que la coexistencia de ambos hongos en las plántulas favorece el crecimiento de la especie en cuestión y señalan la importancia de este tipo de estrategias para la recuperación de áreas altamente degradadas.

La asociación micorrícica al permitir una mejor exploración del suelo hace posible una mayor absorción de agua y nutrientes del suelo. Esto se ha analizado en zonas muy severas con alto grado de exposición a la sequía, lo que permite asegurar que la inoculación de plantas que quieran ser destinadas a la repoblación les conferirá mayores ventajas en cuanto a supervivencia, crecimiento y establecimiento (Barroetaveña *et al.*, 2012; Gómez-Romero *et al.*, 2015). Se han utilizado por lo general especies de hongos cosmopolitas, como *P. tinctorius*, hongo ectomicorrizogénico, el cual ha tenido un gran éxito en la inoculación de plantas forestales de los cinco continentes. Este hongo ha establecido asociación simbiótica con más de veinte géneros de angiospermas y gimnospermas, que presentan una distribución mundial, algunas de esas especies forestales pertenecen a la familia Casuarinaceae, Myrtaceae, Oleaceae y Pinaceae (Valdés-Ramírez *et al.*, 2012; Gómez-Romero *et al.*, 2015). *P. tinctorius* presenta alta resistencia en condiciones de suelos altamente empobrecidos, áreas perturbadas, así como suelos ácidos, o con presencia de

metales pesados y además resiste frente a condiciones de estrés hídrico (GarcíaRodríguez *et al.*, 2006; Gómez-Romero *et al.*, 2015).

Li *et al.*, (2013), a través de un experimento en presencia/ausencia de plantas de maíz con lombrices de tierra y *R. intraradices*, concluyen que la actividad de este hongo micorrízico arbuscular, incrementa la biomasa en brotes y raíces de las plantas. Al incrementarse la biomasa en brotes y raíces, se presenta un aumento de producción en la cosecha en condiciones de campo. Así mismo, concluyen que la inoculación con lombrices, favorece la actividad de la comunidad de hongos micorrízicos del suelo, lo que a su vez repercute en la fertilidad y calidad del suelo. La inoculación de ambos favorece la fertilidad biológica del suelo, este tipo de experimentos deben considerarse como estrategias que incrementen la sustentabilidad en el uso de suelo en sistemas de agricultura.

Los hongos micorrízicos arbusculares presentan un micelio delgado y septado, el cual se establece en la zona cortical del sistema radical de la planta, penetra en su interior y le confiere un mejor intercambio nutricional. Las raíces micorrizadas sufren una modificación en sus propiedades de absorción de los nutrientes en las que es necesario el crecimiento de hifas extramatriciales en el suelo. La absorción de fósforo por parte de las hifas extramatriciales, hacen posible la traslocación del fósforo a través de las hifas a distancias considerables y por último, que se lleve a cabo la transferencia de fósforo del hongo a las células corticales (Bolan, 1991; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999). Por otro lado, existe la formación de arbusculos, que son estructuras que se desarrollan en el interior de las células corticales y favorecen en intercambio de nutrientes, así como su asimilación en ambos organismos. También se forman otro tipo de estructuras llamadas vesículas, estas son las encargadas de almacenar sustancias para casos en que se encuentren escasas y así asegurar la supervivencia tanto del hongo como de la planta (Johnson *et al.*, 1999).

El micelio es otra estructura importante y fundamental en el desarrollo de las estructuras anteriormente descritas, pero es, además, el encargado de permitir la traslocación de polifosfatos a las zonas de la planta donde sean requeridos. Los hongos micorrízicos arbusculares, se propagan únicamente por esporas, de

allí que sea necesario su hospedaje en una planta para poder crecer y multiplicarse (Varela, 1997; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999).

Se sabe que las plantas de la familia Ericaceae tienden a presentar asociaciones micorrícicas, entre otros hongos presentes en el microbioma del suelo, debido a que mejoran la captación de nutrientes, como el fósforo, el agua, o bien la resistencia a la presencia de metales pesados. Li *et al.*, (2021), realizaron un estudio donde analizaron la micorrización de raíces del arándano ojo de conejo (*Vaccinium virgatum* Ait) en presencia de hongos ericoides y endófitos septados oscuros, en el cual además agregan como sustrato turba finlandesa, cuya naturaleza era esterilizada y no esterilizada, de este modo, no se excluyó por completo la presencia de hongos ericoides y de los endófitos.

Basado en sus resultados, explican que las plántulas con turba finlandesa no esterilizada presentaron los mayores niveles de brote, así como de longitud, no. de hojas, área foliar que en el sustrato esterilizado.

También demostraron que las plántulas en sustrato no esterilizado, el peso fresco y seco de brotes, hojas y raíces fueron más altos en comparación con los de sustrato esterilizado (aprox. 4.51 g y 0.90 g respectivamente como los pesos secos máximos; y 15.25 g y 3.08 g para los pesos frescos máximos respectivamente). De esta manera, concluyeron que el uso de turba sin esterilizar es un sustrato óptimo para mejorar la asociación simbiótica micorrícica entre el arándano ojo de conejo, así como incrementar el enraizamiento y número de brotes, variables importantes para su propagación.

## **II.II. Asociación Ectomicorrícica (*Pisolithus arhizus*)**

Se estudiaron dos especies de hongos micorrícicos ectomicorrícicos autóctonos: *Pisolithus tinctorius* y *Lactarius deliciosus* para analizar su capacidad de inmovilización y tolerancia hacia el aluminio en suelos ácidos. Se sabe que el aluminio es un elemento que disminuye drásticamente el crecimiento y el desarrollo de las plantas en suelos ácidos. Se ha documentado que existe una inhibición con la presencia de 0.04-0.15 mM Al disuelto en suelo. Se ha documentado que el aluminio reduce o inhibe el desarrollo o crecimiento de los

pelos radiculares, y colateralmente el crecimiento y producción de las plantas, al no poder obtener nutrientes desde la raíz.

En un análisis de literatura científica, se encontró que los hongos ectomicorrícicos son capaces de promover una mayor tolerancia en las plantas que le permite crecer y eficientar la exploración de nutrientes en el suelo mediante la quelación del Al por exudación producida por los hongos ectomicorrícicos, aminoácidos y ácidos grasos. Además, previene el transporte y absorción del Al a la planta, puede fijar al Al en la vacuola de la célula fúngica de tal manera que este no tenga el suficiente contacto con la planta y reducir su fitotoxicidad (Xirong *et al.*, 2021).

Sur (2018), analizó la relación costo-beneficio en la utilización de *P. tinctorius* en distintas condiciones de cultivo de plantas forestales. En Sudamérica el uso de este inóculo ha cesado considerablemente en viveros forestales, sin embargo, esto puede deberse a las condiciones bajo las cuales se inocula a las plántulas. La inoculación de las plántulas bajo el uso de fungicidas, puede reducir la supervivencia del inóculo por lo que no se obtendrán los resultados esperados, cabe señalar, sin embargo, que no todos los fungicidas inhiben la acción de *Pisolithus*. Además, donde existan suelos fertilizados la acción de los hongos micorrícicos no será significativa.

La aplicación de *P. tinctorius*, puede no ser tan efectiva tomando en cuenta la relación costo-beneficio, sin embargo, algunos investigadores han optado por usar entre 0.1 y 0.03 mg de inóculo de *P. tinctorius* por plántula generando resultados eficaces.

Baptista y colaboradores (2021), analizaron la interacción entre el hongo ectomicorrícico *P. tinctorius* y el hongo saprófito *Hypholoma fasciculare*. Se conoce que los hongos ectomicorrícicos son elementos cruciales para mantener la sustentabilidad de los bosques, en este caso, *Pisolithus* ayuda en la captura de nutrientes y agua en suelos, protege a las raíces y a la planta contra agentes patógenos provenientes del mismo suelo. También, favorece la captura de aquellos nutrientes de difícil acceso para la planta por su baja movilidad en suelo, como el fósforo y el nitrógeno.

Otro dato importante, es la participación de los hongos ectomicorrícicos en la degradación de la materia orgánica como la hojarasca, entre otras materias orgánicas, cabe señalar, que anteriormente, este aporte era un rol dado para los hongos saprófitos, sin embargo, se ha documentado evidencia de la participación de los hongos micorrícicos en la descomposición de la materia orgánica.

No se sabe mucho sobre la interacción entre hongos ectomicorrícicos y hongos saprófitos, si bien es conocido el efecto antagónico entre hongos micorrícicos y agentes patógenos, no se ha estudiado mucho el primero, de allí que Baptista y colaboradores lo analizaron, encontrando que hay un efecto negativo cuando ambas especies se encuentran juntas.

La exudación de compuestos volátiles por parte de *Hypholoma fasciculare* crea una respuesta estresante en *P. tinctorius*, esto para condiciones *in vitro*. En otra investigación, se analizó la aplicación de *Pisolithus arhizus* para favorecer a las comunidades de hongos micorrícicos en suelos altamente ácidos. Se sabe que este tipo de suelos son el resultado de la entrada de azufre o nitrógeno por deposiciones de las actividades humanas o industriales. Las principales consecuencias de la alteración de estos suelos se verán reflejadas en la perturbación de sus comunidades microbianas, e incluso, la alteración de los ciclos biogeoquímicos, así como la pérdida de la biodiversidad.

La vegetación presente en suelos que han sido severamente perturbados mediante la acidificación, ha tenido alteraciones en sus procesos fisiológicos, se les encuentra con pérdida de biomasa, alteración estomática en cuanto al proceso de intercambio gaseoso, y disminución de la productividad de clorofila. Otro efecto negativo importante es la perturbación a las asociaciones micorrícicas ocasionadas por la acidez del suelo. Los hongos ectomicorrícicos son organismos esenciales en los ecosistemas forestales, estos obtienen de las plantas su fuente de carbono y el hongo a su vez, le provee de una mayor cobertura en la raíz, lo que a su vez amplifica el área de obtención de nutrientes, también, le protege contra organismos patógenos.

Un deterioro en la parte foliar por afectación de la lluvia ácida, puede impedir o anular el flujo constante de carbohidratos a la raíz, lo que a su vez afecta a la

asociación micorrícica. La acidez del suelo es un factor que puede impedir la presencia de hongos micorrícicos o alterar el desarrollo de los mismos, pero no solo de estos, puede alterar todo el microbioma.

Cuando los ecosistemas forestales han sido afectados, considerar la inoculación de hongos ectomicorrícicos puede ser una propuesta potencialmente positiva para mejorar el establecimiento y desarrollo de la diversidad microbiana en suelos, ya que estos hongos producen enzimas que ayudan a amplificar la disponibilidad de nutrientes esenciales.

Para evaluar los efectos de la lluvia ácida sobre las comunidades vegetales y microbianas del suelo, se analizó el efecto de *P. tinctorius* sobre *Pinus massoniana*, una especie forestal nativa del centro y sur de China, comúnmente plantada en bosques en el Sur de China para sustituir la falta de bosques naturales, sin embargo, es sensible a la lluvia ácida. Se encontró que la inoculación de *Pisolithus*, ayuda en el desarrollo de la especie forestal ante condiciones estresantes por lluvia ácida. Además, se encontró que la aplicación de *P. tinctorius* ayuda en la biorremediación de ecosistemas forestales mediante la mejora en las comunidades microbianas y fúngicas, así como en la disponibilidad de nutrientes y manejo de la materia orgánica disponible (Maltz *et al.*, 2018).

Díaz-Espejo *et al.*, (2004), llevaron a cabo un experimento sobre reforestación de un suelo agrícola con *Pinus halepensis*. En dicho experimento, las plántulas de *P. halepensis* se inocularon con las siguientes especies fúngicas: *P. tinctorius*, *Suillus mediteraneensis*, *Suillus collinitus* y *Rizhopogon roseolus* y los resultados indican que las plántulas micorrizadas, presentaban una mayor supervivencia y desarrollo debido a una mejor captación de los nutrientes, y a la capacidad de las micorrizas de estimular el crecimiento. Sin embargo, también se concluyó en este estudio la importancia en la selección de micorrizas, dependiendo de la especie de planta, para asegurar un mayor éxito en la reforestación.

Baeza-Guzmán *et al.* (2017), caracterizaron morfológica y genéticamente las comunidades de hongos ectomicorrícicos asociados a *Pinus hartwegii* en el parque nacional Cofre de Perote, Veracruz. Se encontraron 14 morfotipos

asociados: *Piloderma olivaceum*, *Cortinarius diasemospermus*, *C. mucosus*, *Hydnellum conrescens*, *Russula* aff. *betularum*, *Sebacina vermifera* y *Sistotrema confluens* y los géneros *Byssocorticium* y *Pseudotomentella*. Dichos hongos ectomicorrícicos presentan gran capacidad de asociación. Dada su capacidad de interacción, bien se les puede considerar como especies potenciales en planes de reforestación. Se obtuvieron resultados que indican un incremento de supervivencia en las plántulas de *P. hartwegii*. Por otro lado, se ha reportado, baja supervivencia en plántulas, debido a alta mortalidad por efecto de herbívoros pequeños.

El uso de hongos ectomicorrícicos deberían considerarse como una alternativa para la restauración y preservación de especies forestales, entre otras.

Gómez-Romero *et al.*, (2013), demostraron que la presencia del hongo ectomicorrizogénico *P. tinctorius* en plantas de *P. pseudostrobus* para propagar en un área de cárcavas desprovista de vegetación en la localidad de Atécuaro, Michoacán, incrementa la supervivencia de esta especie frente a condiciones adversas. El efecto principal radica en el aumento de crecimiento y supervivencia en las plántulas de *P. pseudostrobus*. A su vez los autores recomiendan la implementación de asociaciones micorrícicas como una inversión para mejorar el éxito en los programas de reforestación.

Así mismo, Gómez-Romero *et al.*, (2015), analizó la respuesta de *P. pseudostrobus* en presencia/ausencia de *P. tinctorius* en condiciones controladas de riego y sequía. Los autores reiteran la importancia de la asociación micorrícica para contrarrestar los efectos de las condiciones adversas, mediante un incremento en la retención de agua, favoreciendo el desarrollo de la especie de *P. pseudostrobus* y su supervivencia.

García-Rodríguez *et al.*, (2006), consideran que en las plantaciones forestales de México existen hongos ectomicorrícicos que pueden ser utilizados para la inoculación en vivero de brizales de *Eucalyptus urophylla* y *Pinus sp.* Tal como es el caso de *Pisolithus tinctorius* con un rango de distribución geográfica muy amplio. Sin embargo, debido a que en la actualidad se realizan mezclas de hongos ectomicorrícicos para la inoculación de plantas, recomiendan estudiar los

cultivos de otras especies de este tipo de hongos que prosperan en zonas tropicales.

Harrington *et al.*, (2001), llevaron a cabo la inoculación de *P. tinctorius* en plántulas de varias especies de coníferas con el fin de analizar la influencia en asociación con el hongo ectomicorrícico, ello para determinar la capacidad de supervivencia que le confiere dicha simbiosis. Los resultados permitieron concluir que la asociación favorece la supervivencia en diferentes porcentajes dependiendo de la especie de conífera.

### **II.III. Asociación micorrícica arbuscular (*Rizophagus intraradices*)**

En la actualidad, la producción agrícola requiere de la utilización de diversos productos químicos, como fertilizantes, o fungicidas para incrementar la producción de sus cosechas. Sin embargo, en años recientes se ha ido intensificando el interés del consumidor por productos que no tengan agroquímicos, por lo que se buscan distintas soluciones a esta mejora en el área de la agricultura. Por lo cual, Aguirre-Medina y colaboradores (2021), realizaron la coinoculación de plantas de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw., con *Rizophagus intraradices* y *Azospirillum brasilense*, en adición de *Phytophthora capsici* como agente patógeno, por su alta frecuencia infectiva en cultivos agrícolas. El principal daño de este agente patógeno es la infección de la raíz y del tallo. En este experimento se realizaron 7 tratamientos y el control, en base a la inoculación para cada interacción y la inoculación dual, con o sin la presencia de *P. capsici*.

En base a los resultados de medición de biomasa y componentes morfológicos de la planta, encontraron que la coinoculación es una estrategia ventajosa para incrementar la productividad y la resistencia a *Phytophthora capsici* para el chayote. Por otro lado, el tomate es considerado el segundo vegetal más consumido a nivel mundial después de la papa, sin embargo, las condiciones climáticas actuales tales como la sequía, el incremento en la temperatura ha ocasionado un declive considerable en las cosechas de esta hortaliza. Este cultivo requiere de abundante riego, por lo que las condiciones de sequía vuelven

un problema su cultivo. Se ha optado por procesos de la ingeniería genética para incrementar la producción del cultivo del tomate bajo condiciones estresantes de sequía y alta temperatura. Sin embargo, esto solo ha dejado de lado las importantes interacciones biológicas que pueden contribuir a la tolerancia del tomate bajo condiciones de sequía.

Una de las principales interacciones biológicas para asegurar la sobrevivencia y producción de los sistemas agrícolas es la interacción simbiótica con las micorrizas, en este caso *R. intraradices*, un hongo micorrícico arbuscular, promotor del crecimiento, que crea estructuras peculiares en las raíces de las plantas, llamadas “arbusculos”, en este caso, en el tomate. El hongo le provee a la planta agua y otros nutrientes de difícil captación, mediante sus hifas que se extienden por el suelo en la búsqueda de agua y nutrientes cuando estos se encuentran escasos, de ahí que su presencia sea de vital importancia para las plantas en condiciones de sequía.

Fracasso, y colaboradores (2020), realizaron un estudio sobre la interacción del tomate (*Solanum lycopersicum* cv 'Zelig') con *R. intraradices* para reducir su mortalidad y medir la respuesta fisiológica ante las condiciones de estrés hídrico, además, analizaron la morfología de la planta, así como la captación de fósforo. Encontraron que la asociación micorrícica tiene un efecto positivo en bajas concentraciones de inóculo, es decir, el 1% mezclado con el sustrato. Además, se obtuvo una mayor producción de frutos con la inoculación, por lo que recomiendan el uso de la asociación micorrícica con *R. intraradices*, una opción prometedora para la estabilización en la producción del tomate aun cuando se encuentre en condiciones de sequía.

Krishnamoorthy y colaboradores (2015), realizaron un estudio a partir de muestras de suelo en una fundidora de Janghag, en la Provincia de Chungcheong en Corea del Sur, las muestras fueron colectadas a partir de tres distancias desde la fundidora (240 m, 260 m y 3500m). La fundidora se encuentra cerrada y las cercanías se encuentran altamente contaminadas por metales pesados, entre otras sustancias. De acuerdo a los análisis, las principales

especies de hongos micorrícicos encontrados fueron: *Funneliformis mosseae*, *R. intraradices*, *Claroideoglobus claroideum* y *Funneliformis caledonium*.

Siendo *R. intraradices* y *F. mosseae* las especies encontradas en todas las muestras pertenecientes a los tres sitios colectados.

Cabe señalar, que estas especies se encontraban en mayor número con respecto a su densidad de esporas en condiciones más altas de contaminación. Núñez-Castillo y Álvarez-Sánchez (2009), reportaron en su estudio sobre el crecimiento y la reproducción de una palma del trópico húmedo (*Astrocaryum mexicanum*), el efecto de los hongos micorrizogénicos arbusculares, así como la importancia para el establecimiento y supervivencia de la palma. Se utilizan estos hongos por su efecto positivo, favoreciendo la captación y aprovechamiento de los nutrientes. Por otro lado, se analizó la relación existente entre la producción de estructuras especializadas de los HMA y la reproducción de la planta, debido a los porcentajes altos de estructuras del HMA, durante la temporada de reproducción de la palma. Los HMA presentan diferentes niveles de colonización, los cuales se encuentran determinados por las condiciones bióticas y abióticas del ecosistema donde se encuentren.

Gianinazzi (1991), observó que los hongos micorrícicos arbusculares estimulan la formación de raíces laterales a partir de estacas, debido a la capacidad fisiológica que poseen para sintetizar determinados reguladores de crecimiento, principalmente auxinas y citocininas.

Alarcón y Ferrera-Cerrato, (1999) han recomendado la inoculación en plantas de vivero, debido a que esta estrategia incrementa la supervivencia y crecimiento de las plantas durante los procesos de propagación. La asociación micorrícica arbuscular, genera una respuesta favorable de las plantas, manifiesta a través de una mejor absorción y aprovechamiento de fósforo y nitrógeno, lo cual se observa en el incremento del vigor y crecimiento de las plantas.

Se han realizado experimentos para analizar la capacidad de asociación de hongos micorrícicos arbusculares con especies de pinos en vivero y han resultado exitosos (Rincón *et al.*, 2001). Además, se le puede considerar como un tipo de hongos favorable para la inoculación de otras especies de árboles en

sitios de reforestación, gracias a su alta producción de esporas y a su resistencia en suelos con diferentes condiciones de estrés, así como en aquellos que son salinos (Chen *et al.*, 2001).

Por otro lado, varios autores (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2003; Alarcón *et al.*, 2003), señalan la importancia de las asociaciones micorrícico arbusculares por los efectos positivos que se han reportado en el caso de especies frutales tales como los cítricos, el cacao (Azizah, 1991), la papaya (Escalona *et al.*, 2000), el café (Trejo-Aguilar *et al.*, 2000), el kiwi (Schubert *et al.*, 1992), entre otros. Los HMA favorecen la captación de distintos elementos a través de las estructuras propias del hongo y su flujo hacia la planta. Se concluye que la asociación micorrícica es una de las más importantes interacciones mutualistas, por los beneficios que ofrecen los hongos a sus plantas hospedantes.

Gardezi *et al.*, (2000), evaluaron el crecimiento del chapulixtle (*Dodonaea viscosa*). El chapulixtle es una especie perteneciente a zonas áridas, y se asignó la inoculación con hongos endomicorrícicos, pertenecientes al género *Glomus* sp. En condiciones de invernadero, los resultados permitieron concluir que la asociación simbiótica micorrícica favorece la absorción de nutrientes y por ende incrementa el crecimiento y desarrollo del chapulixtle.

Fiorilli *et al.*, (2013), realizaron un estudio para analizar los mecanismos moleculares implicados durante el proceso de transporte de nutrientes, en ese caso del fosfato. Se logró conocer que la expresión del gen (GintPT) de *Rhizophagus intraradices*, en las estructuras fúngicas tales como arbusculos, esporas, micelio extraradical es regulada por la disponibilidad de Pi. Esta asociación micorrícica representa una importante estrategia en algunas plantas para la obtención de fósforo. En altas concentraciones de este elemento, se da una mayor expresión del gen del transportador de fosfato (PT) de alta afinidad (GintPT) de *R. irregularis*.

Padmavathi *et al.*, (2015), estudiaron el efecto de la inoculación de *R. intraradices* y *Acinetobacter junni* en plantas de *S. lycopersicum* y *Capsicum annum*. Los resultados indicaron que la inoculación dual promueve aspectos del crecimiento y desarrollo de ambas plantas. También, se incrementó la biomasa, se obtuvo

una mayor cosecha de frutos. El porcentaje de glomalina en suelos fue alto derivado de ambas interacciones con las plantas, lo que permitió deducir que el uso de HMA y la bacteria *Acinetobacter junni*, tuvieron una repercusión favorable como promotores del crecimiento y biofertilizantes potenciales en la agricultura. Sin embargo, su función no se reserva únicamente para especies de importancia agrícola, de allí la importancia de realizar investigaciones que permitan conocer los potenciales socios microbianos de *R. intraradices*.

Díaz-Franco *et al.*, (2014), analizaron el porcentaje de productividad de un cultivo de sorgo en el estado de Tamaulipas, donde se evaluó la asociación de *R. intraradices* y una rizobacteria promotora del crecimiento, *A. brasilense*. A través de inoculación simple y mediante coinoculación, se obtuvo un incremento significativamente superior respecto a la altura de las plantas, biomasa (foliar y radical), longitud de la panoja. Cabe señalar que hubo un mayor rendimiento del grano, así como en la cantidad de proteína de los mismos, en aquellas plantas inoculadas con *R. intraradices*. La coinoculación presentó porcentajes muy inferiores a la inoculación simple del HMA y la rizobacteria. Los beneficios que le aporta el hongo micorrícico arbuscular a la planta, igualan e incluso superan los aportados por fertilizantes químicos, que es su caso altera las propiedades del suelo. En ausencia de fertilizante, la acción de las micorrizas nativas se incrementa, favoreciendo los cultivos, aún aquellos en condiciones adversas, gracias a una mejor captación de agua y nutrientes minerales.

Li *et al.*, (2014), reporta que la asociación con *R. intraradices* y la presencia de pelos radicales, incrementa la captación de agua y de nutrientes minerales en una planta tolerante a la sequía (*Hordeum vulgare* L. cv. Pallas). Cabe resaltar que el potencial hídrico en las hojas, índice fotosintético, índice de transpiración, la conductancia estomática y la eficiencia en el uso del agua, fueron incrementados por la interacción con *R. intraradices*. Por otro lado, los pelos radicales contribuyen a mejorar el crecimiento y la capacidad fotosintética de la planta mediante una mayor captación de nutrientes incluido el fósforo.

Augé (2001), reportó a *G. intraradices* como un hongo micorrícico arbuscular en asociación con un gran número de plantas, según se muestra en diversos

artículos científicos, algunas de importancia económica como *Zea Mays*, entre otras. Las plantas asociadas con este hongo, presentan un incremento en su capacidad de tolerancia y evasión en condiciones de sequía. Se analizaron también, los efectos principales derivados de esta asociación en cuanto al nivel fotosintético e intercambio gaseoso, además de que la colonización por este HMA mejora la estructura y nivel de humedad en suelo.

Ruiz-Lozano (2003), analizó la disminución del estrés osmótico debido a la presencia simbiótica de arbuscular *R. intraradices*. Estudió la expresión del gen Mn-sodIII, cuyo incremento es relativo al aumento de la tolerancia a la sequía. Así mismo, reporta que las plantas con presencia del HMA, tienen una alta tasa de conductancia estomática, nivel de transpiración y captación de agua, en comparación a plantas no micorrizadas. Se sugiere, que los HMA, incrementan la habilidad de las raíces para excavar y extraer agua aún en suelo seco.

Pérez-Moncada *et al.*, (2011), determinan un sistema de micorrizas arbusculares para la propagación in vitro de la mora de castilla (*Rubus glaucus*), variedad sin espinas, mediante la inoculación de *Glomus sp.* Este experimento se diseñó con la finalidad de incrementar la producción (foliar y radical), así como mejorar el vigor de las plántulas por la mayor absorción de agua y nutrientes minerales, principalmente de fósforo, y a su vez, proteger contra organismos patógenos, gracias a la presencia del HMA. El estudio de la asociación entre *R. glaucus* y *Glomus sp.* conlleva, además, la oportunidad de generar una alternativa para los agricultores a fin de obtener cultivos de mayor calidad, con mayor sobrevivencia y producción.

Roveda *et al.*, (2011), analizaron el efecto de la inoculación de micorrizas arbusculares en plantas de mora (*R. glaucus*), para incrementar el porcentaje de supervivencia en plántulas cultivadas in vitro que serán trasplantadas *ex situ*. La etapa de aclimatación resulta demasiado crítica en el proceso de micropropagación. Durante esta etapa, es donde se registra un índice elevado de mortalidad (50%-90%), lo que genera grandes pérdidas para los agricultores. Por la alta mortalidad registrada, surge la importancia de generar biotecnologías que aporten mayores beneficios a los productores de plantas hortifrutícolas y

aumenten el rendimiento de sus cultivos. En este estudio, los HMA que mostraron un efecto significativo superior a otros en la inoculación durante la transferencia de condiciones *in vitro* a *ex situ* fueron *Glomus sp.* y *Acaulospora sp.* Los anteriores hongos micorrícicos incrementaron el vigor de las plántulas, la biomasa foliar y radical, así como el área foliar. El estado nutricional, además, se vio favorecido por una mejor absorción de los nutrientes esenciales: fósforo, nitrógeno, calcio y magnesio. Cabe señalar que gracias a la inoculación de HMA, se logró sustituir un 50% el uso de fertilizantes comerciales. Otra investigación sobre el efecto positivo de la aplicabilidad de *R. intraradices* lo reporta Yang *et al.*, (2020), al realizar un experimento mediante la aplicación de melatonina, una enzima exógena presente en animales y plantas que se ha demostrado ayuda en la inhibición del crecimiento en plantas por condiciones de salinidad-alcalinidad de suelos.

Al tener una buena tasa fotosintética se tendrá un buen desarrollo de las plantas, lo que se verá reflejado en el crecimiento de la raíz, y si esta se encuentra en óptimas condiciones, las asociaciones micorrícicas se verán incentivadas por un alto aporte de azúcares de la raíz a las micorrizas. Sin embargo, los hongos micorrícicos arbusculares proveen de diversas ventajas a las plantas asociadas. Los suelos salinos-alcalinos son inhibidores del crecimiento de las plantas al crear un ambiente de tensión iónica sobre éstas. Este tipo de suelos ha afectado en condiciones agrícolas, principalmente en climas áridos y semiáridos. Las plantas son afectadas de diversas maneras, entre las que destacan el estrés osmótico, lesión iónica y alteraciones en el pH de los suelos, además, de afectar los procesos de respiración e intercambio gaseoso.

Aplicaron melatonina exógena y *R. intraradices* en plantas de *Leymus chinenses*, un ejemplar altamente extendido en la región oriental de la estepa euroasiática. Se ha encontrado evidencia de que la aplicación de un hongo micorrícico arbuscular sobre *L. chinenses* puede potenciar su crecimiento y repercutir en el establecimiento para la restauración de la estepa del prado en China considerando la importancia económica y ecológica para la zona.

Sin embargo, también se evaluó la respuesta de *R. intraradices* a la melatonina exógena en cajas de Petri y los resultados indicaron un crecimiento en la longitud de las hifas de la micorriza, además de una alta esporulación. En cuanto a *L. chinenses*, se encontró un efecto positivo mediante la aplicación de melatonina exógena y *R. intraradices* en condiciones de salinidad-alcalinidad, además de que presentaron mayor actividad fotosintética. Esto nos sugiere, que la aplicación de melatonina exógena y hongos micorrícicos pueden ser una estrategia potencial para la restauración de sitios salinos-alcalinos.

#### **II.IV. Nanotubos de Carbono**

La ciencia de la nanotecnología enfoca su estudio en aquellos materiales en escala nano. Esto mediante el ordenamiento y manipulación de los átomos que componen a este tipo de materiales nanotecnológicos. Se debe su descubrimiento al Sumio Iijima en 1991, al observarlos a través del microscopio mediante una muestra de hollín derivado de descargas del arco eléctrico, utilizando grafito (Maubert *et al.*, 2009; Vizquete-Medrano, 20013).

Los nanotubos de carbono son formas alótropas del Carbono con hibridación  $sp^2$  y  $sp^3$ . Los NTC tienen una gran diversidad en sus propiedades físico-químicas dependientes de la estructura química, tamaño, método de síntesis y pureza. Es por ello que en la actualidad son uno de los materiales más ampliamente usados en la industria farmacéutica como catalizadores, sensores moleculares, en la industria textil, entre otras (Maubert *et al.*, 2009; Vizquete-Medrano, 2013).

Entre algunas de las principales propiedades que poseen los NTC son su alta conductividad eléctrica, resistencia mecánica, peso ligero, estas propiedades los han vuelto candidatos perfectos para su empleo en la creación de nuevas tecnologías. De esta manera, los podemos encontrar en pantallas táctiles, pantallas incandescentes, por mencionar algunos (Vizquete-Medrano, 2013). Lira-Saldivar y colaboradores (2018), realizaron una revisión bibliográfica en el que detallan los principales efectos positivos de los nanomateriales como una herramienta potencial en la agricultura. Recalcan la eficiencia en captura, y liberación de los insumos necesarios en la agricultura, como lo son los

plaguicidas, en el caso de control de organismos patógenos, y en el de los fertilizantes. En su literatura mencionan los nanomateriales metálicos, entre los cuales se encuentra el zinc en forma de óxido de Zinc (ZnO) en nanoescala, usado en la agricultura para mejorar la producción en los cultivos de maní en la India.

En otro experimento, realizado por Prasad *et al.*, (2012), realizaron distintos tratamientos de soluciones de ZnO quelado y ZnO a nanoescala disueltos en agua desionizada y dispersada por vibración ultrasónica (100 W, 40 KHz), a concentraciones de 400, 1000 y 2000 ppm en los que se inhibieron cinco semillas por réplica de cada tratamiento y se mantuvieron por tres horas. Cabe señalar que son cuatro réplicas por tratamiento y un control, en este las semillas fueron remojadas en agua destilada por el mismo tiempo. Por otro lado, se tuvieron unas semillas separadas para sembrarlas en condiciones de maceta y otras para condiciones de campo, las cuales fueron suplementadas con una solución de ZnO quelado y ZnO a nanoescala en las mismas concentraciones.

De acuerdo a la población en creciente aumento y a la demanda de alimentos que se incrementa, por ende, es necesario llevar la labor de campo hacia una agricultura sostenible, que logre abastecer la gran demanda de la población, y que sea una práctica amigable con el ambiente.

Los nanotubos de Carbono es un avance científico-tecnológico con un impacto en muchos campos de la vida diaria. Uno de estos campos es el de la agricultura, donde algunos de los principales beneficios de los NT es que proveen de herramientas para la detección temprana de estrés en plantas o fitopatógenos, así como también, permiten una mejor captación del agua y de los nutrientes (Lira-Saldivar *et al.*, 2018).

Es en este punto, donde también es necesario denotar algunas de las desventajas conocidas de los Nanomateriales. Como ya se mencionó, el tamaño de los nanomateriales les permite acceder a lugares exactos, donde incluso un virus o una bacteria no podría acceder, esto por su diminuto tamaño. En esta cuestión, es que para la farmacéutica han resultado ser una herramienta importante en la elaboración de medicamentos.

Cabe señalar, que no se conocen muchas de las reacciones que pueden tener estas partículas en el ser humano, por lo que urge su investigación. Algunos autores han mencionado que pueden acceder fácilmente al sistema sanguíneo y por ende, lograr expandirse hacia partes remotas del cuerpo, tales como el cerebro, y el sistema respiratorio, en el cual parece ser que tienen predilección (Lam *et al.*, 2004).

Por otro lado, también deben considerarse diversas cuestiones sobre las NP como son su capacidad de disolución, en el caso de las que son sintetizadas e incluyen algún elemento de la tabla periódica. Es en esta cuestión, donde los cuerpos de agua son los principales depósitos de los mismos. Sin embargo, esto más que ser bueno, es todo lo contrario, Ale (2018), realizó una investigación sobre la repercusión en peces y moluscos ante la presencia de nanopartículas de plata en su medio acuático (dulce y salado) para evaluar las repercusiones que generarán en los organismos ante una cantidad baja y otra de relevancia ambiental de dichas nanopartículas. Se llevaron a cabo ensayos *in vivo* y *ex vivo* (branquias) en peces pertenecientes a cuerpos de agua dulces y en moluscos de cuerpos de agua salada. Las concentraciones de las nanopartículas de plata consistieron de 2.5 y 25  $\mu\text{g}$  de AgNP, los organismos fueron expuestos en dichos ensayos en tiempos prolongados.

Según los resultados de dicho experimento, se observó un grave daño hepático, estrés oxidativo e inhibición de la actividad antioxidante, así como de otras enzimas. Cabe señalar, además, que se encontró bioacumulación de las NP, las cuales también presentaban acción contra hígado y aparato digestivo, siendo estos los órganos blancos de dichas partículas. Otro efecto importante, fue la inhibición de las colonias bacterias que viven a nivel sobre la superficie de los organismos, las cuales son benéficas para los mismos. Y también hubo una proliferación significativa de las células de mucus, como respuesta de defensa ante las AgNp presentes en su medio.

Este estudio arroja información de suma importancia por el efecto que tienen las nanopartículas en el medio ambiente, y que, si bien son usadas en la agricultura, es importante tener en cuenta el destino final de las mismas, ya que no hay

antecedentes sobre el tiempo de degradación de estas, considerando además la reactividad que presentan, información también que debe ser analizada prontamente.

Del Rocío-Coutiño y colaboradores (2017), realizan una revisión en la que analizaron los principales efectos tóxicos de los nanomateriales, en especial de las nanopartículas de plata. Si bien mencionan, que la aplicación y estudios de este tipo de materiales se encuentra en auge por las funciones tan relevantes que pueden llegar a cumplir, algunos de los efectos que causan tales como la inducción a estrés oxidativo, necrosis y apoptosis de las células deben ser un dato a considerar para regular su uso. Sin embargo, el uso de las nanopartículas, es una herramienta altamente eficiente por el tamaño, solubilidad, lo que les permite tener una eficiente difusión en el área o material que se desee. Un claro ejemplo de esto, es la utilidad que tienen las AgNP en el tratamiento de enfermedades infecciosas, inclusive en el tratamiento del cáncer (Ávalos *et al.*, 2013).

Un dato importante que mencionan, es la actividad microbicida que tienen estas partículas contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, esto derivado de la desnaturalización de los enlaces disulfuro de sus proteínas, lo que induce a la muerte de las bacterias, esto además de la desactivación en el funcionamiento de diversas enzimas, cabe aclarar que su efecto citotóxico no se reduce únicamente en bacterias, también afecta células eucarióticas, dañando la pared o membrana celular.

Un efecto importante que ha sido descrito, es el de la Ag para con la ubiquinona, participe de la respiración en las mitocondrias celulares, además de la intervención que tiene este elemento para con la bomba sodio-potasio de las membranas celulares, principalmente en células nerviosas. Recalcando también, el efecto de inducción a estrés oxidativo por parte de las AgNPs (Kim *et al.*, 2009). La pregunta importante es, a qué está vinculada la toxicidad de las nanopartículas, en este caso de las AgNPs, y bien, esto va a depender de las vías de exposición, cómo se absorbe en los cuerpos, la difusión y la acumulación que se genere (Rocío-Coutiño *et al.*, 2017). Relacionado con el metabolismo de

las mismas se desconocen algunos aspectos tales como la entrada, su período de almacenamiento y su eliminación. Al menos en estudios en ratones a los cuales se les expusieron oral, dermatológica y mediante inhalación a las nanopartículas de plata, se encontró que estas podían difundirse a través del aparato circulatorio y a partir de allí moverse a diversos órganos, principalmente riñón, hígado, corazón, cerebro y piel (Van der Zande *et al.*, 2012).

Pastelín-Solano y colaboradores (2020), realizan un estudio sobre el efecto de las nanopartículas de plata en la micropropagación de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. Para ello evaluaron la capacidad de enraizamiento, multiplicación, longitud y número de hojas en vástagos cultivados a partir de segmentos nodales en condiciones *in vitro*.

Se usaron AgNPs en concentraciones de 0, 25, 50 y 100 mg/L<sup>-1</sup>. De acuerdo a los datos obtenidos, los vástagos a los que se les adicionaron AgNP en concentraciones de 100 mg/L<sup>-1</sup>, presentaron los porcentajes de contaminación más reducidos (23.3, 21.6 y 16.6%), así mismo, los que fueron expuestos a las concentraciones de 25 y 50 mg/L<sup>-1</sup>, mostraron los números más altos en cuanto a las variables de multiplicación del vástago, longitud y número de hojas. En base a los datos anteriormente citados, se concluye que el uso de AgNP, es efectivo para la micropropagación de la especie *Vanilla planifolia*, principalmente en la promoción del desarrollo de la misma.

En su tesis doctoral, Juárez-Cisneros (2020), describe los efectos benéficos, así como los citotóxicos de los nanotubos de carbono de pared múltiple, este tipo de efectos tóxicos se encuentra muy relacionado con las propiedades intrínsecas de los nanotubos y principalmente la dosis que se aplica a los sistemas biológicos. Entre los principales efectos tóxicos que va a ocasionar a la planta son la interferencia en el crecimiento, en la germinación de las semillas, así como disminución en la biomasa. Los efectos dañinos que se vean en la planta van a derivar de la afectación en la actividad enzimática y daño a la membrana celular provocados por la entrada de los NT, la cual, a su vez, en contacto con los organelos celulares interferirá en la proliferación celular causando, por ende, la muerte celular. Es por ello, que una dosis adecuada puede ser crucial para

obtener un efecto benéfico en el desarrollo y crecimiento en los sistemas biológicos. Así mismo, se muestra el efecto de los nanotubos de carbono de pared múltiple naturales y sintéticos en dos sistemas biológicos (*E. polystachya* y *A. thaliana*) para analizar su efecto derivado de la interferencia con la vía de señalización de la proteínacinas TOR. Esta vía de señalización juega un papel importante en el ciclo celular y crecimiento vegetal. En plantas como *A.thaliana* se ha encontrado un solo gen de los dos existentes en levaduras y otros microorganismos.

El complejo TORC1 presente en las plantas, se encuentra integrado por las siguientes proteínas: proteínas TOR, RAPTOR (Regulatory Associated Protein of TOR) y Lethal with SEC 13 protein 8 (LST8). Este complejo cumple con diversas funciones asociadas al crecimiento de la planta tales como la elongación y proliferación celular de meristemos y zona radical. Por otro lado, se encuentra relacionado con la respuesta al estrés y organismos patógenos.

Cabe mencionar que el complejo TORC1 se encuentra dependientemente relacionado con la correcta producción de algunas sustancias químicas tales como lo son las auxinas y citocininas, cuya acción principal recae en una correcta progresión del ciclo celular y por ende la óptima organogénesis.

Mientras que, Treviño *et al.*, (2021), analizaron el efecto de nanopartículas de selenio absorbidas en hidrogeles de quitosán-polivinil alcohol en la producción de pepino injertado. Para llevar a cabo este experimento se dispersaron nanopartículas de selenio en los hidrogeles para obtener nanocompuestos de 1, 2.5 y 5 mg/L. Dichos geles fueron adicionados en injertos y no injertos de pepino (*Cucumis sativus* L.). Las variables evaluadas fueron longitud, diámetro de tallo, área foliar, área foliar específica, peso seco y fresco de las hojas, longitud de raíz, peso fresco de la raíz, posteriormente a 60 días de realizar trasplante de planta para la producción, se midieron longitud, diámetro, peso y número de los frutos, así como el rendimiento de la planta.

Para concluir, en base a los datos obtenidos, el rendimiento óptimo en la producción de pepino destaca en aquellas plantas sin injertar con dosis de nanopartículas de 1 y 5 mg/L. En cambio, las plantas injertadas adicionadas con

5 mg/L de nanopartículas de Selenio mostraron la mayor productividad, evaluada en longitud del fruto, diámetro del tallo y el peso fresco. Por último, el incremento en área foliar y desarrollo vegetal óptimos, lo presentaron las plantas no injertadas y adicionadas con 1 mg/L de NPs de Se.

### III. HIPOTESIS

La interacción entre el hongo ectomicorrícico *Pisolithus arhizus* y/o *Rizopogon irregularis* - nanotubos de carbono, incrementará la supervivencia y crecimiento de *Morus celtidifolia*.

Las semillas de *Morus celtidifolia* con nanotubos de carbono 20 µg/ml presentarán los porcentajes de germinación y supervivencia más altos en comparación con las semillas control y las adicionadas con nanotubos de carbono a 40 µg/ml.

## **IV. OBJETIVO**

### **IV. I. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos ecofisiológicos en plántulas de *Morus celtidifolia* inoculadas con hongos micorrícicos (*Pisolithus arhizus* - *Rizophagus irregularis*) y adicionadas con nanotubos de carbono solos o en interacción.

### **IV.II. OBJETIVOS PARTICULARES**

Evaluar la supervivencia y crecimiento de plántulas de *Morus celtidifolia* con hongos micorrícicos (*Pisolithus arhizus* - *Rizophagus irregularis*) y adicionadas con nanotubos de carbono solos o en interacción.

Analizar la velocidad y el porcentaje de germinación en semillas de *Morus celtidifolia* en adición de NTC a 20 µg/ml y 40 µg/ml.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.I. Obtención de material

Se realizó la colecta de semillas entre los meses de marzo y abril de 2021 en el Municipio de Morelia, Mich. de la mayor cantidad de árboles posible. Posteriormente se llevó a cabo la limpieza de las semillas de *Morus celtidifolia* y fueron propagadas en condiciones de invernadero en contenedores rígidos de plástico de 375cm<sup>3</sup>, se utilizará como sustrato turba, esterilizada previamente en autoclave durante dos periodos de 20 minutos.

El diseño experimental constó de un diseño completamente al azar, en un experimento ortogonal de tres factores (ectomicorriza, endomicorriza, nanopartículas), la inoculación de los hongos micorrícicos se realizó de forma individual y dual en presencia / ausencia de nanotubos de carbono.

Se utilizaron un total de ocho tratamientos con 30 réplicas, haciendo un total de 240 plantas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental en ausencia/presencia de hongos micorrícicos, nanotubos de carbono.

Cuadro 1. Diseño experimental en ausencia/presencia de hongos micorrícicos, nanotubos de carbono.

Tratamiento	Especie	<i>Pisolithus arhizus</i> (ectomicorriza)	Rizophagus intraradices (endomicorriza)	Nanotubos de carbono
1	<i>Morus celtidifolia</i>	-	-	-
2	<i>Morus celtidifolia</i>	+	-	-
3	<i>Morus celtidifolia</i>	-	+	-
4	<i>Morus celtidifolia</i>	+	+	-
5	<i>Morus celtidifolia</i>	-	-	+
6	<i>Morus celtidifolia</i>	+	-	+
7	<i>Morus celtidifolia</i>	-	+	+
8	<i>Morus celtidifolia</i>	+	+	+

### V.II. Inoculación

El inóculo de *P. arhizus* se adquirió de forma comercial y se utilizó como vehículo turba micronizada. Se adicionó en seco 0.25 g con  $1 \times 10^6$  esporas por planta. (Se calculó el porcentaje de viabilidad de esporas mediante la técnica de Levitz y Diamond (1985), con

sales de tetrazolium). Para el inóculo *R. irregularis*, se adicionaron 100 propágulos por planta en forma líquida. Las plantas se inocularon ocho semanas posteriores a la germinación, directamente descubriendo una parte de la raíz.

Adición de nanotubos de carbono: Dos semanas después de agregar el inóculo micorrícico, se suplementaron las plantas con los nanotubos de carbono a las plántulas, en concentraciones 30µg/ml por planta, contenida en 1 ml de agua destilada. El material fue procesado en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

### **V.III. Evaluación de variables respuesta**

Se evaluó mensualmente supervivencia, altura, diámetro a la altura de la base y cobertura. Al finalizar (ocho meses) el experimento, se cosecharon 10 réplicas por tratamiento y se analizó biomasa aérea y radical en peso fresco y seco en una balanza semianalítica. Para la arquitectura de raíz se utilizó método manual.

### **V.IV. Influencia de los NTC en la germinación de semillas de *M. celtidifolia*.**

Se llevó a cabo un experimento para analizar la influencia de los nanotubos de Carbono de origen natural en la germinación de semillas de *M. celtidifolia*. Para ello se utilizaron semillas de *M. celtidifolia* de las distintas colectas obtenidas, es decir, de Morelia, Yotatiro y La Cadena, pertenecientes al estado de Michoacán.

Para dicho experimento fue necesario la aplicación de dos tratamientos con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono (20 y 40 µg/ml), más el control.

Se requirieron 1200 semillas de *M. celtidifolia* de cada localidad, las cuales fueron repartidas en 24 cajas de Petri de 25 cm de diámetro cada una, cada una con un contenido de 50 semillas, haciendo un total de 8 réplicas por tratamiento y el control.

Las cajas de Petri se colocaron en cámara de crecimiento a 25°C, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

### **V.V. Análisis de clorofila**

Para este análisis se requirió de un instrumento de medición de clorofila total, el cual indica la cantidad específica de clorofila total. Se evaluaron tres hojas de tres plantas de 9 meses

de edad por tratamiento. Posterior a ello se realizó análisis estadístico para corroborar el tratamiento más efectivo para una mayor producción de clorofila.

#### **V.VI. Análisis de datos**

Para analizar la germinación se realizó un análisis de supervivencia. Se monitoreará la supervivencia durante el experimento. El crecimiento de las plántulas fue analizado por factores para cada variable. Dependiendo de la respuesta de las variables, se realizaron análisis de varianza (ANOVA). Posteriormente, se realizó una prueba de comparaciones múltiples de medias por el método de Tukey. Para los análisis estadísticos, se utilizaron los programas estadísticos R (R Development Core Team, 2011), JMP versión 8 y S-Plus con ayuda de Excel para la captura de datos.

## VI. RESULTADOS

*Morus celtidifolia* presentó los valores mayores con diferencias estadísticamente significativos respecto a altura ( $F=2.36$ , G.L.= 7,  $P=0.02$ ), DAB ( $F=4.009$ , G.L.= 7,  $P=0.0011$ ), mientras que para el número de hojas se observó un incremento en los tratamientos con la asociación con hongos micorrícicos y NTC en sustrato, correspondiendo a los tratamientos 6 y 7 (*Pisolithus* + NTC y *Rizophagus* + NTC, respectivamente), lo cual indica que las asociaciones individualmente y el factor NTC son positivos para su propagación. Por su parte la cobertura presentó los siguientes valores estadísticos:  $F=2.36$ , G. L.=7 y  $P=0.02$  (Figura 1).

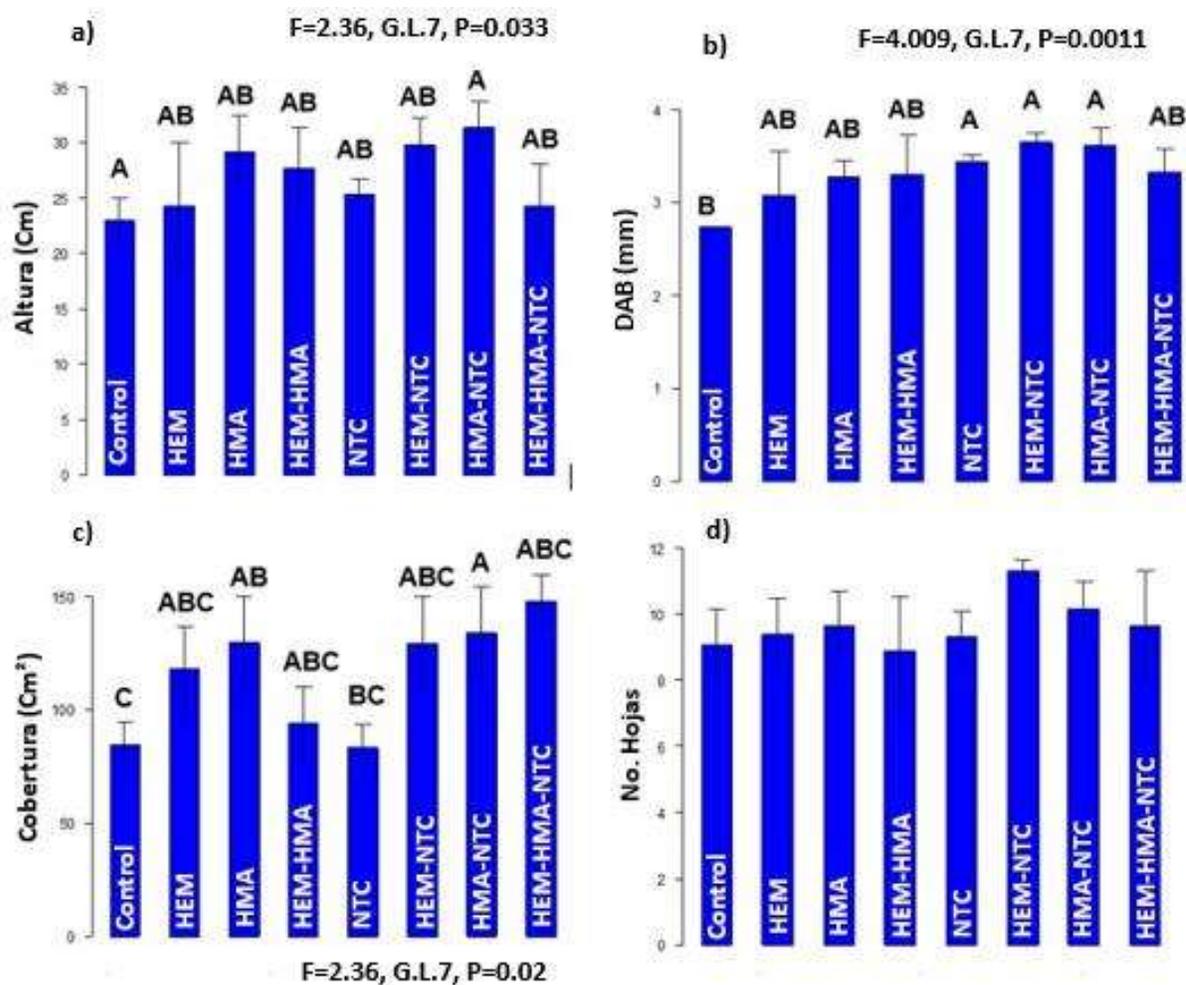


Figura 1. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado a: a) Altura, b) Diámetro a la altura de la base (DAB), c) Cobertura y d) Número de hojas en plantas de *M. celtidifolia*. Las letras indican grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey

Figura 1. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado a: a) Altura, b) Diámetro a la altura de la base (DAB), c) Cobertura y d) Número de hojas en plantas de *Morus celtidifolia*. Las letras indican grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey.

Los análisis de arquitectura de raíz por método destructivo arrojaron los siguientes datos: para la variable de longitud de raíz (figura 2), los valores significativos corresponden a los tratamientos 2 (HEM), seguidos del tratamiento 7 (HMA-NTC) y 6 (HEM-NTC), con los siguientes datos estadísticos:  $F=3.67$ , G.L. 7,  $P>0.022$ . Para la variable de peso fresco de raíz (figura 3), los valores significativos corresponden al tratamiento 3 (HMA), seguido del tratamiento 2 (HEM) y el tratamiento 7 (HMA-NTC), con los respectivos datos estadísticos de:  $F=2.32$ , G.L. 7 y  $P>0.0354$ . Además, en cuanto a la variable de volumen de raíz (figura 4) se obtuvo que el tratamiento mayormente significativo corresponde al 3 (HMA), seguido del 2 (HEM), con valores de  $F= 4.64$ , G.L. 7 y  $P>0.0003$ . Por otro lado, para el peso fresco (PFA), los valores significativos refieren a los tratamientos 4 (HEM-HMA), 7 (HMA-NTC), seguidos del 3 (HMA) y 2 (HEM) con valores de  $F=1.18$ , G.L.7 y  $P>0.0148$  (figura 5).

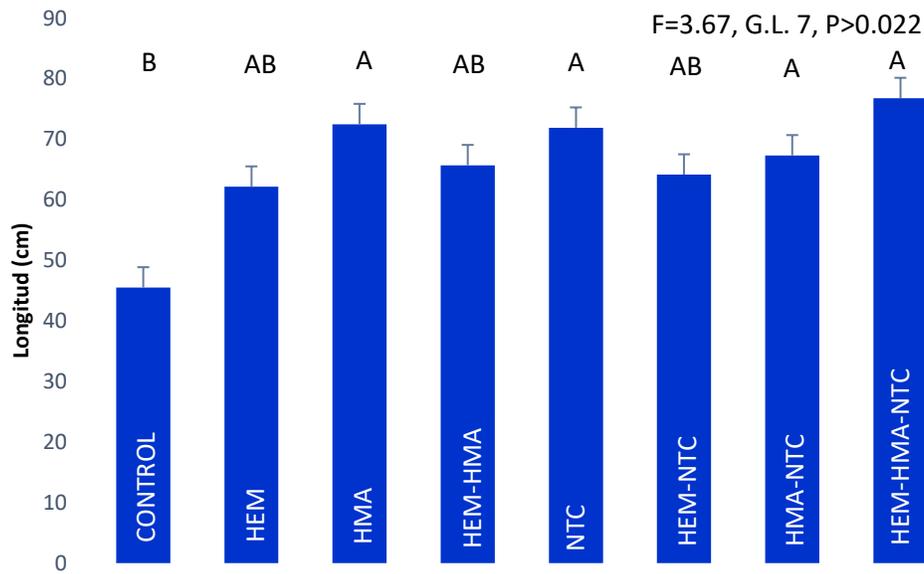


Figura 2. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado a la longitud de raíz en plantas de *M. celtidifolia* en interacción con y sin nanotubos de carbono.

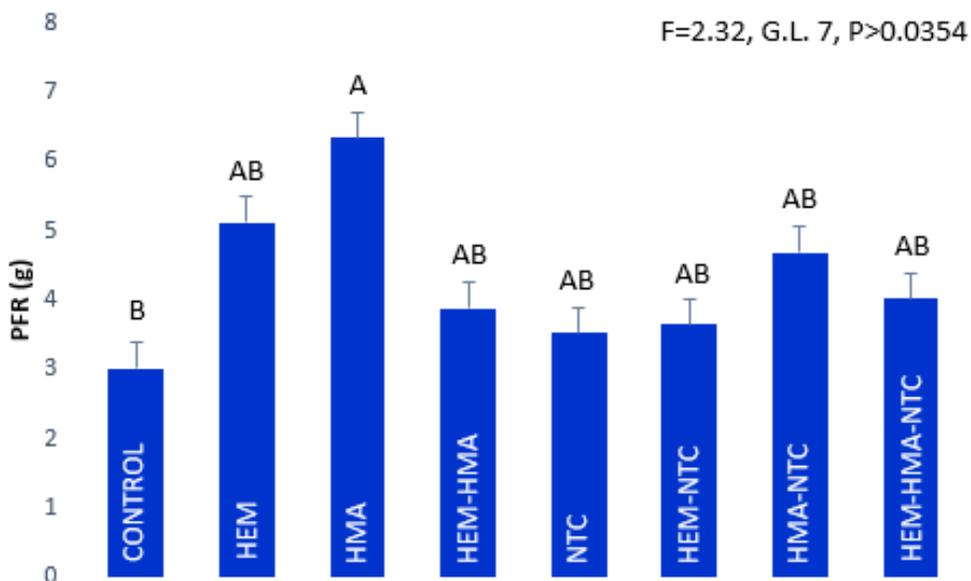


Figura 3. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado al peso fresco de raíz en plantas de *M. celtidifolia* en interacción con y sin nanotubos de carbono.

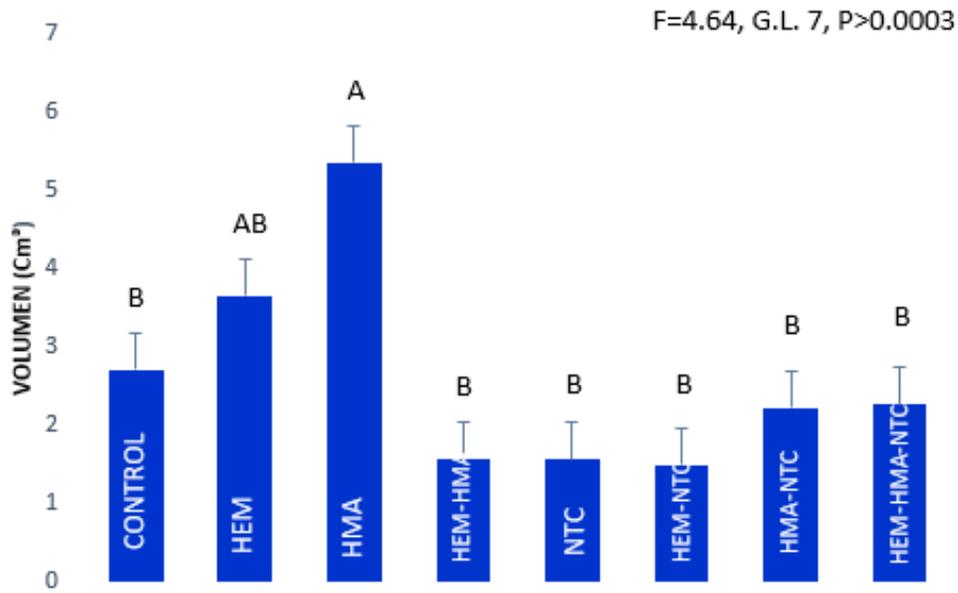


Figura 4. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado al volumen radical en plantas de *M. celtidifolia* en interacción con y sin nanotubos de carbono.

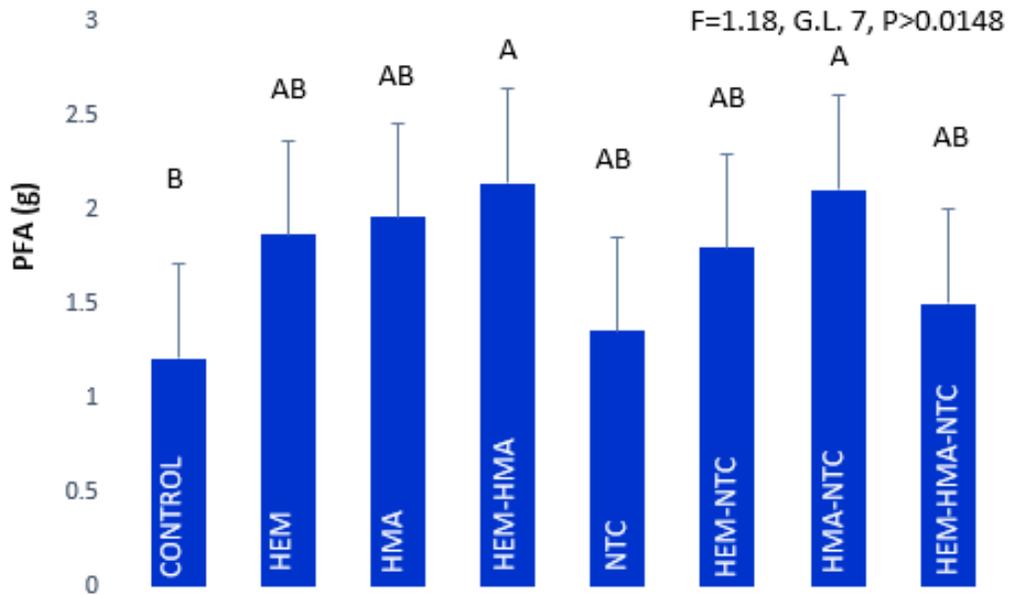


Figura 5. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado al volumen radical en plantas de *M. celtidifolia* en interacción con y sin nanotubos de carbono.

Así mismo, para el análisis de clorofila, refiriendo a la absorción de fotones, los valores más significativos corresponden al tratamiento 2, por lo que se puede decir que la asociación ectomicorrícica favoreció este aspecto en las plántulas de *M. celtidifolia*.

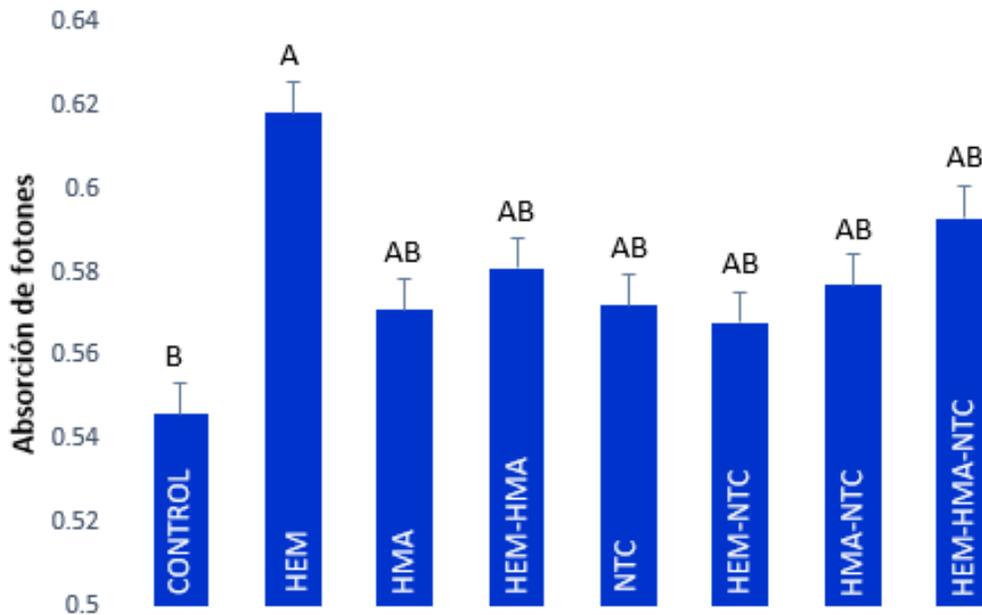


Figura 6. Evaluación de clorofila mediante absorción de fotones en hojas plántulas de *M. celtidifolia*.

En la figura 7 se muestra la representación de cada plántula respecto a cada tratamiento de *M. celtidifolia*. Entre algunas de sus diferencias más evidentes, encontramos el color, así como la altura y la cobertura representada por la cantidad de hojas mostradas.

Por otro lado, en la figura 8 se muestra una representación radical de las plántulas de cada tratamiento, las diferencias, de igual manera son notorias en cuanto a la longitud radical, cantidad de raíces secundarias y el color. Podemos observar que si bien hay raíces muy largas (NTC, HEM-NTC), tienen poca cantidad de raíces secundarias, por el lado contrario, tenemos raíces con mayor número de raíces secundarias y amplia longitud (HEM, HMA, HEM-HMA, HMA-NTC, HEM-HMA-NTC).

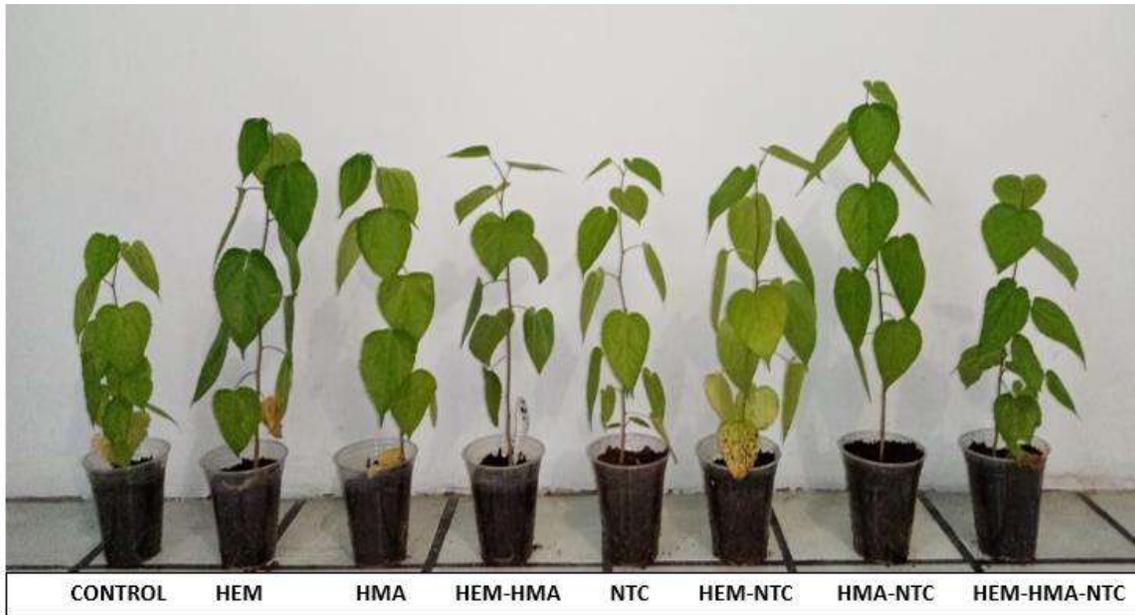


Figura 8. Representación de plántulas de *M. celtidifolia* por tratamiento a 9 meses de crecimiento.

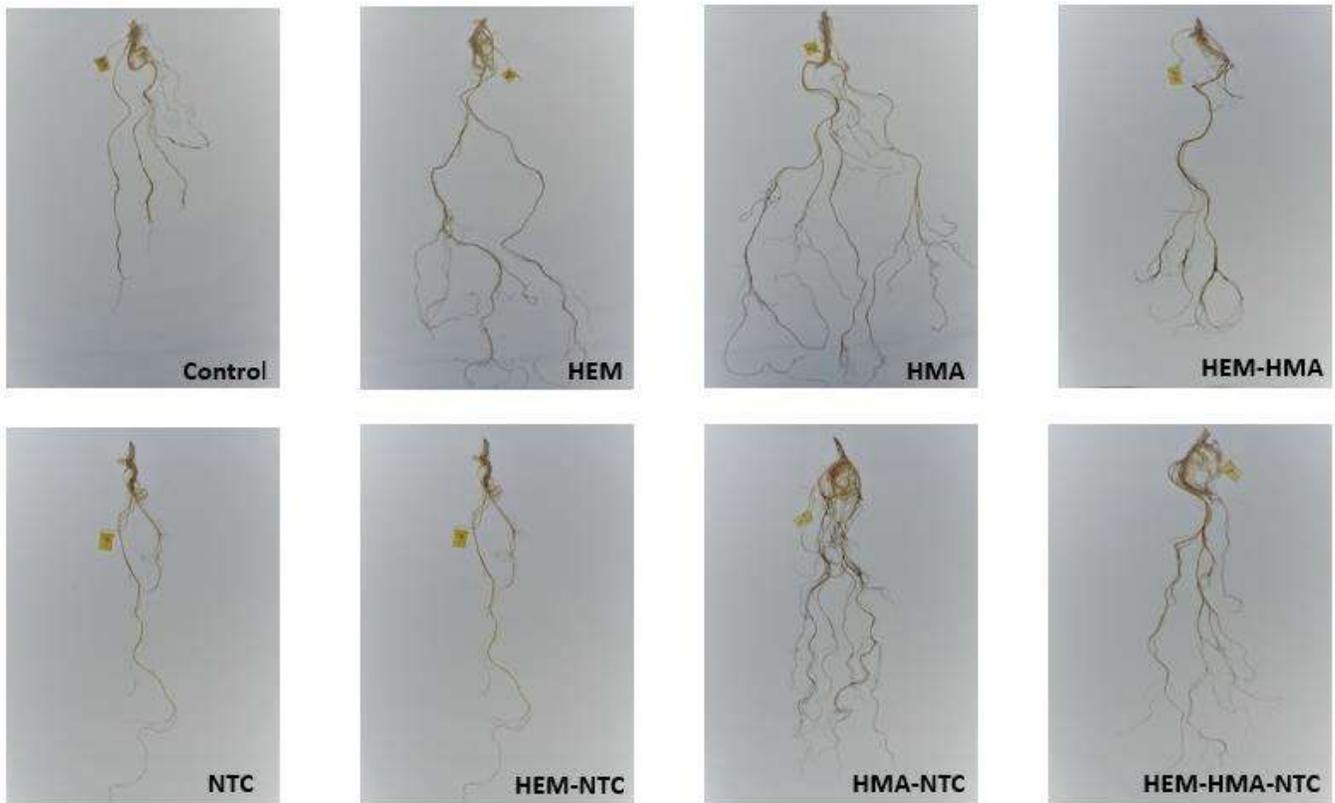


Figura 7. Representación radical de *M. celtidifolia* por tratamiento a 10 meses de crecimiento.

Con respecto a la influencia de los NTC en semillas de *M. celtidifolia*, la localidad de Morelia, Michoacán presentó los porcentajes de germinación menormente significativos, obteniendo los siguientes valores de acuerdo a las concentraciones de NTC de 20 µg/ml, 40 µg/ml y control: 18%, 16% y 17% (Cuadro 3), con valores de  $X^2=0.28$ , G.L. 2 y  $P=0.87$  (Figura 9). La localidad de Yotatiro (cuadro 4) con los siguientes porcentajes de acuerdo a las concentraciones de 20 µg/ml, 40 µg/ml y control (17.25, 21.75 y 25) con valores de  $X^2=6$ , G.L. 2 y  $P=0.05$  (Figura 10). Y, por último, la localidad de La Cadena presentó el porcentaje de germinación significativo (29.25%), en una concentración de NTC del 20 µg/ml de NTC, en comparación con el tratamiento de 40 µg/ml y el control, con porcentajes de 21.5 y 26.5 respectivamente (Cuadro 5) con valores de  $X^2=8.54$ , G.L. 2 y  $P=0.014$  (Figura 11).

Cuadro 2. Semillas de *M. celtidifolia* colectadas en Morelia, Mich., adicionadas con NTC.

Tratamiento	No. Semillas germinadas	% Germinación	Descripción del tratamiento
1	34	17	Control
2	36	18	20 µg/ml de NTC
3	32	16	40 µg/ml de NTC

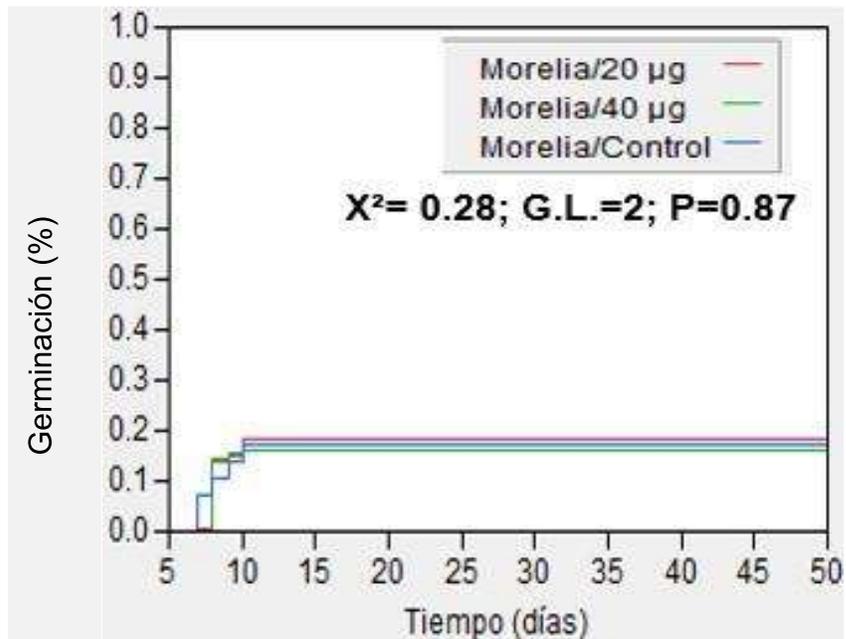


Figura 9. Germinación de semillas de *Morus celtidifolia*, localidad de Morelia en presencia de NTC 20 y 40 µg/ml.

Cuadro 3. Semillas de *M. celtidifolia* colectadas en Yotatiro, Mich., adicionadas con NTC.

Tratamiento	No. Semillas germinadas	% Germinación	Descripción del tratamiento
1	100	25	Control
2	69	17.5	20 µg/ml de NTC
3	87	21.75	40 µg/ml de NTC

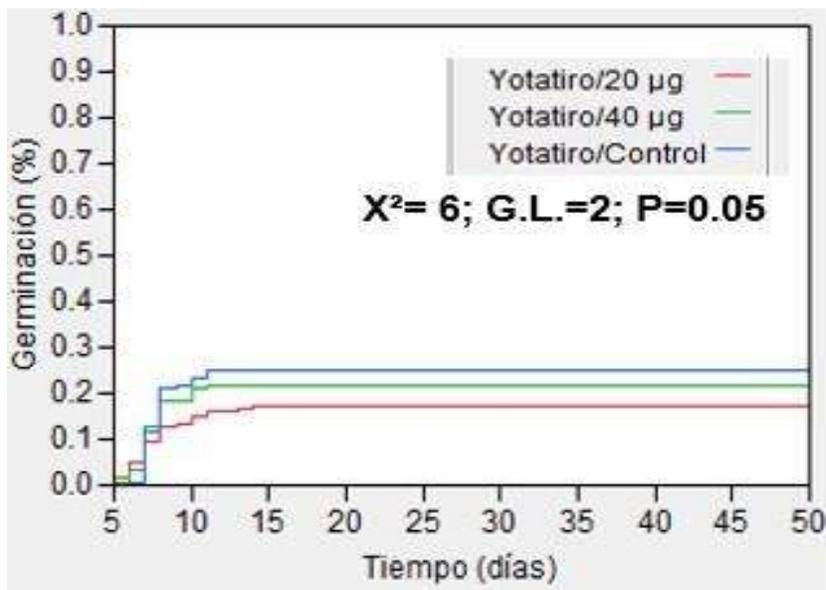


Figura 10. Germinación de semillas de *M. celtidifolia*, localidad de Yotatiro en presencia de NTC 20 y 40 µg/ml.

Cuadro 4. Semillas de *M. celtidifolia* colectadas en La Cadena, Mich., sometidas a NTC.

Tratamiento	No. Semillas germinadas	% Germinación	Descripción del tratamiento
1	86	21.5	Control
2	117	29.25	20 µg/ml de NTC
3	106	26.5	40 µg/ml de NTC

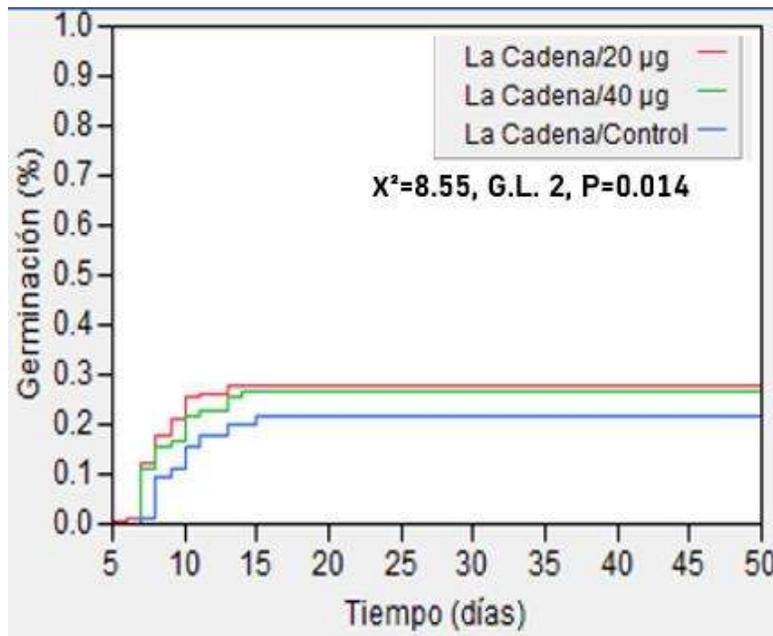


Figura 11. Germinación de semillas de *M. celtidifolia*, localidad de La Cadena en presencia de NTC 20 y 40 µg/ml.

## VII. DISCUSIÓN

La aplicación de NTC en plantas de importancia agrícola es un recurso novedoso y provechoso para incrementar la producción de dichos cultivos. Boulmaali y Zafour Hadj-Ziane (2018) evaluaron el porcentaje de germinación, biomasa y longitud de raíces en semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) sometidas a tratamientos con NTC en concentraciones de 0.5, 2 y 5 mg/l y control. Para dicho experimento colocaron semillas de frijol común en cajas de Petri, las cuales fueron adicionadas con las diferentes concentraciones de nanotubos y además carboximetilcelulosa como medio para suspender los NTC dada su nula toxicidad en materia vegetal o suelo. Las cajas de Petri se colocaron en cámara de crecimiento, a 25 °C durante 3 días. Posteriormente se evaluó el porcentaje de germinación, la biomasa y longitud radical.

Según los datos recabados, se muestra un incremento del 34% de germinación en los tratamientos sometidos a distintas concentraciones de NTC en o sin adición de Carboximetilcelulosa, en comparación al control. Además, la biomasa fresca radical mostró valores significativos en adición con NTC solos. En cuanto a la longitud de raíces, mostró valores significativos en aquellos tratamientos en adición con NTC.

Algo parecido se puede observar en las semillas de la localidad de La Cadena sometidas a distintas concentraciones de NTC. El porcentaje de germinación se incrementó en el tratamiento con 20 µg/ml de NTC con un valor de 29.25%, a diferencia del tratamiento de 40 µg/ml de NTC con un 26.5% de germinación, seguido por el control con un 21.5%.

Los valores de las semillas de la localidad de Yotatiro y Morelia no tuvieron valores significativos en porcentaje y velocidad de germinación aún en adición de 20 y 40 µg/ml de NTC y control (17.25%, 21.75% y 25%; 18%, 16% y 17%, respectivamente).

Otro experimento relevante referente a la germinación de semillas en adición con NTC, es el realizado por Xin y colaboradores (2022) en plántulas de *Zea mays*

L. suplementadas con nanopartículas de carbono y expuestas a estrés oxidativo causado por cobre. Los resultados reportados por estos autores mostraron que en adición de nanopartículas de carbono hubo una respuesta enzimática antioxidante, en comparación con las plántulas control, reduciendo así el causado por este en cultivos, ya que afecta en gran manera la producción en cosecha de esta especie.

Por otro lado, cabe recalcar, que la tasa de germinación se incrementó significativamente, así como se redujo el tiempo medio de germinación y se aumentó el índice de germinación general.

Para nuestro estudio, la variable de germinación en el tratamiento de 20 µg/ml de NTC en semillas de *M. celtidifolia* obtenidos de la comunidad de La Cadena, presentaron un mayor porcentaje y velocidad de germinación en comparación con el tratamiento de 40 µg/ml y el control.

Los nanotubos de carbono, además, resultan funcionales para optimizar la llegada de los nutrientes a partes especiales de la planta donde sean mayormente requeridos. En su estudio, Demirer y colaboradores (2019), analizan la funcionalidad de los nanotubos de carbono de pared simple como agentes transportadores de ADN plasmídico, ya que los NTC pueden atravesar las paredes celulares de las células vegetales, facilitando el transporte de dichas moléculas y optimizando de esta manera la expresión de las mismas.

Por otro lado, de acuerdo a la hipótesis propuesta, las plántulas que se encontraban en asociación micorrícica individual con NTC de los tratamientos 6 y 7 (*P. tinctorius*-NTC y *R. intraradices*-NTC) presentaron los valores más significativos de acuerdo a las gráficas de variables medidas: número de hojas, DAB, y altura, en comparación a los otros tratamientos y el control.

Maltz y colaboradores (2019), analizan el efecto de *P. tinctorius* sobre plantas, suelos y comunidades microbianas de *Pinus massoniana*, con factor de acidez en suelo. La extrema acidez tendrá un efecto negativo en el desarrollo y producción de la planta, además de cambiar las condiciones microbianas del

suelo. Según sus resultados, si bien *Pisolithus arhizus* no ejerce un efecto significativo sobre la planta, sí lo tiene para con el suelo y las comunidades microbianas, reduciendo el deterioro ocasionado por la acidez lo cual repercutirá en una mejora en la estructura de las comunidades microbianas. La inoculación de este hongo ectomicorrícico tiene beneficios significativos en el suelo de ecosistemas forestales.

Del mismo modo, Gu *et al.*, (2023), analizaron el efecto de *P. tinctorius* y *Lactarius deliciosus* en plántulas de *Pinus massoniana* en altas concentraciones de Al en suelo. Algunos hongos micorrícicos muestran resistencia a la toxicidad provocada por la acumulación de distintos elementos en suelo. Si la planta no muestra tolerancia al suelo contaminado puede tener pérdida drástica de su correcto funcionamiento. Según los datos obtenidos por estos investigadores, los hongos empleados incrementaron la tolerancia de *Pinus massoniana* ante las condiciones de Al en suelo, las plántulas incrementaron su biomasa vegetal aérea. Si bien ambos hongos mostraron beneficios en las plántulas, los valores significativos fueron para *Lactarius deliciosus*, como hongo predilecto para su empleo en programas de restauración forestal.

Castillo-Esparza y demás investigadores (2021), evalúan el efecto de los productos sobrenadantes derivados de la actividad de cultivos de *P. tinctorius* como agentes promotores de crecimiento radicular, y prueban su efecto sobre *A. thaliana*. *P. tinctorius* produce ácido indolacético, que actúa como un componente fúngico de gran interés en la promoción de crecimiento radicular vegetal. Según los datos obtenidos, los productos derivados de la actividad del HEM podrían actuar como promotores del crecimiento vegetal en plántulas ectomicorrícicas y no ectomicorrícicas, pues juega una función parecida a la de las auxinas sin tener efectos colaterales negativos.

*R. intraradices*, hongo micorrícico arbuscular, es un organismo empleado de igual modo para promover el crecimiento vegetal, así como factor importante para el establecimiento de especies de plantas frente a condiciones adversas. Fracaso

*et al.*, (2020) analizan el efecto fisiológico en plantas de tomate inoculadas con *Rizophagus intraradices* bajo efecto de estrés hídrico.

Derivado de sus análisis encuentran que la inoculación de HMA favorece la producción del tomate, además de que incrementa la tolerancia de este frente a condiciones estresantes, como el factor hídrico. Otros parámetros evaluados fueron la altura, contenido de clorofila, biomasa vegetal, en los cuales se encontró se igual manera un efecto significativo derivado de la colonización por *R. intraradices*.

## VIII. CONCLUSIONES

Las plantas en interacción con hongos micorrícicos (ectomicorrícicos y endomicorrícicos) favorecen el crecimiento, así como la supervivencia, por otro lado, su asociación tiene un efecto significativo para el incremento de las variables evaluadas, como fueron, altura, DAB, longitud de la raíz, volumen, y biomasa.

Cabe mencionar, que la adición de los nanotubos de carbono de pared múltiple y de origen natural (*P. oocarpa*), también tuvo un efecto significativo en la concentración (20 µg/ml), esto en la germinación de las semillas de *M. celtidifolia*.

El explorar sobre los aspectos ecofisiológicos de plantas con potencial para programas de restauración forestal, como *M. celtidifolia* es fundamental para mejorar las condiciones de los ecosistemas perturbados.

Al conocer los efectos sobre las interacciones que pueden potencializar la germinación y crecimiento de las especies seleccionadas.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Medina, J. F., Cadena-Iñíguez, J., Olguín-Hernández, G., Aguirre-Cadena, J.F. y M. I., Andrade-Luna. (2021). Co-Inoculation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Plants with *Rhizophagus intraradices* and *Azospirillum brasilense* to Reduce *Phytophthora capsici* Damage. *Agriculture*. 11 (391): 1-12.
- Alarcón, A., González-Chávez, M. C. y Ferrera-Cerrato, R. (2003). Crecimiento y fisiología de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq en simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares. *Terra Latinoamericana*, 21 (4): 503-511.
- Alarcón, A., y Ferrera-Cerrato, R. (1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana*, 17 (3), 179-191.
- Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. (2003). Aplicación de fósforo e inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y estado nutricional de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq. *Terra Latinoamericana*, 21 (1): 91-99.
- Albuixech J, Camarero J, Martí M (2012). Dinámica estacional del crecimiento secundario y anatomía del xilema en dos *Quercus* mediterráneos que coexisten. *Forest Systems*, 21(1), 9-22.
- Ale, A. (2018). Mecanismos de toxicidad de nanopartículas de plata en organismos acuáticos. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional del Litoral. No. Págs. 150.
- Augé, R. M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 11: 3-42.
- Avalos, A., Haza, A. I. Mteo, D., y Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata. Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2):1-23.
- Azarin, K., Usatov, A., Minkina, T., Plotnikov, A., Kasyanova, A., Fedorenko, A., Duplii, N., Vechkanov, E., Rajput, V. D., Mandzhieva, S., and Alamri, S. (2022). Effects of ZnO nanoparticles and its bulk form on growth, antioxidant defense system and expression of oxidative stress related genes in *Hordeum vulgare* L. *Chemosphere*, 287, 2: 132-167.
- Azizah, C. M. (1991). Effect of fertilizer and endomycorrhizal inoculum on growth and nutrient uptake of cocoa (*Theobroma cacao* L.) seedlings. *Biology and Fertility of Soils*, 11: 250-254.

- Baeza-Guzmán, Y., Medel- Ortiz, R. y Garibay-Orijel, R. (2017). Caracterización morfológica y genética de los hongos ectomicorrízicos asociados a bosques de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional Cofre de Perote, Veracruz. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88: 41-48.
- Báez-Pérez, Ana Laura, Gómez-Romero, Mariela, Villegas, Javier, de la Barrera, Erick, Carreto-Montoya, Lorena, y LindigCisneros, Roberto. (2015). Inoculación con hongos micorrízicos y fertilización con urea de plantas de *Fraxinus uhdei* en acrisoles provenientes de sitios degradados. *Botanical Sciences*, 93(3), 501-508. doi: 10.17129/botsci.207
- Barroetaveña, C., Bassani, V. N. y Rajchenberg, M. (2012). Inoculación micorrícica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. *Bosque*, 33(2):163-169.
- Bolan. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil*, 134: 189-207
- Boulmaalii, M. and Zafour Hadj-Ziane, A. (2018). Impact of Carbon Nanotubes on the Germination of the *Phaseolus Vulgaris* Seeds. In: Kallel, A., Ksibi, M., Ben Dhia, H., Khélifi, N. (eds) Recent Advances in Environmental Science from the EuroMediterranean and Surrounding Regions. EMCEI 2017. *Advances in Science, Technology & Innovation*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-31970548-4\\_123](https://doi.org/10.1007/978-3-31970548-4_123)
- Brundrett, M. C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil*, 320: 37-77. DOI 10.1007/s11104-008-9877-9
- Camargo-Ricalde, S. L., Montaña, M. N., De la Rosa-Mera, C. J. y Montaña A., S, A. (2012). Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*. 13(7): 1-20.
- Chen, D. M., Ellul, S., Herdman, K. y Cairney, G. J. W. (2001). Influence of salinity on biomass production by Australian *Pisolithus spp.* isolates. *Mycorrhiza* 11: 231-236

- Del Rocío-Coutiño, E. M., Ávila-Lagunes, L. y Helguera A., O. (2017). La nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de educación Bioquímica*, 36(2): 39-54.
- Demirer, G.S., Zhang, H., Goh, N.S., González-Grandío, E., and Landry P., M. (2019). Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants. *Nature Protocols*, 14, 2954–2971.  
<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0208-9>
- Díaz-Espejo, G., Gutiérrez-Abobal, A. y Honrubia G., M. (2004). Utilización de micorrización controlada en la reforestación de un suelo agrícola con pino carrasco. *Sociedad española de ciencias forestales*, 17: 151-156.
- Díaz, F. A., Escobar C., H. M., Gutiérrez V., J. (2014). Micorriza arbuscular como alternativa en la producción de sorgo en Tamaulipas, México. *Investigación y Ciencia*, 22(62): 56-68.
- Escalona, M., Trejo-Aguilar, D., Rivera, J, Lara, L. y Rivera, A. (2000). *Efecto de la endomicorriza arbuscular y diferentes fechas de fertilización sobre el crecimiento de papaya en campo*. En: Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato (Eds). *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza arbuscular*. Mundi-prensa, D. F. México. Pp. 99-108.
- Escobedo-López, D. y Núñez-Colín, C. A. (2015). Variabilidad genética de una población segregante de mora mexicana (*Morus celtidifolia* Kunth) determinada por marcadores ISSR. *Acta agrícola y pecuaria* 1(3): 93-98.
- Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*, 8(2): 175-185.
- 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.
- Fiorilli, V., Lanfranco, L. y Bonfante, P. (2013). The expression of GintPT, the phosphate transporter of *Rhizophagus irregularis*, depends on the symbiotic status and phosphate availability. *Planta*, 237:1267–1277. DOI 10.1007/s00425-013-1842-z
- Fracasso, A., Teló, L., Lanfranco, L., Bonfante, P. y S., Amaducci. (2020).

Physiological Beneficial Effect of Rhizophagus intraradices Inoculation on Tomato Plant Yield under Water Deficit Conditions. *Agronomy*. 10 (71): 1-21.

García-Ciudad, Antonia, Jiménez M., M.A., Vázquez-De-Aldana, B. R., García-Criado, L. y García-Criado, B. (2012). *Respuesta de la cebada a la inoculación con micorrizas combinada con la fertilización mineral*. Instituto de recursos naturales y Agrobiología de Salamanca. Pág. 517-522.

García-Rodríguez, J. L., Pérez M., J., Aldrete, A., Cetina A., V. M. y Vaquera H., H. (2006). Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia*, 40(5):665-676.

Gardezi, K. A., Cetina-Alcalá, V. M., Talavera. M., D., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez-Neave, F. y Larqué-Saavedra, M. (2000). Efecto de inoculación con endomicorriza arbuscular y dosis creciente de fertilización fosfatada en el crecimiento de chapulixtle (*Dodonaea viscosa*). *Terra Latinoamericana*, 18(2): 153-159.

Gianinazzi-Pearson, V, Smith, E., Gianinazzi, S. y Smith, F. A. (1991). Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas V. Is H<sup>+</sup>-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces. *New Phytologist*, 117:61-74.

González, C. (1993). La endomicorriza vesículo-arbuscular. En: R. Ferrera-Cerrato, C. González Y M. Rodríguez (Eds.). *Manual de agromicrobiología*. Trillas, México. Pp: 53-57

González V., V. J. (2015). Nanomateriales de Carbono, síntesis, funcionalización y aplicaciones. Tesis Doctoral. Universidad Carlos III de Madrid, España. 352 pp.

Gómez-Romero, M., Linding-Cisneros, R. y Del Val, E. (2015). Efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus pseudostrubus* y *Pisolithus tinctorius*. *Botanical sciences*, 93(4):731-740. doi: 10.17129/botsci.193

Gómez-Romero, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C. y Linding-Cisneros, R. (2013). Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrubus* en cárcavas. *Madera y Bosques*, 19(3):51-63.

- Ghorbanpour, M., Mohammadi, H., and Kariman, K. (2020). Nanosilicon-based recovery of barley ( *Hordeum vulgare* ) plants subjected to drought stress. *Environmental Science: Nano*. 7. 10.1039/C9EN00973F.
- Gu, X., Jia, H., Wang, X., Jiang, Y., Li, J., and He, X. (2023). Differential aluminum tolerance and absorption characteristics in *Pinus massoniana* seedlings colonized with ectomycorrhizal fungi of *Lactarius deliciosus* and *Pisolithus tinctorius*. *Journal of Forestry Research*.
- Hansen J, M. Satoa, y R. Ruedy. (2012). Perception of climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(37):15-23
- Harrington, J. T., Wagner, A. M. y Dreesen, D. R. (2001). The influence of *Pisolithus tinctorius* inoculation on greenhouse growth and first-year transplant survival of conifer seedlings. *American society for surface mining and reclamation*, 1: 255264.
- Johnson, N. C., O'Dell, T. y Bledsoe, C. S. (1999). *Methods for ecological studies of mycorrhizae*. En: Robertson *et al.*, Standart soil methods for long-term ecological research. Oxford University Press, Estados Unidos. Pp. 378-412.
- Juárez-Cisneros, G., M. Gómez-Romero, H. Reyes de la Cruz, J. Campos-García & Javier Villegas. (2020). Multi-walled carbon nanotubes produced after forest fires improve germination and development of *Eysenhardtia polystachya*. *PeerJ* 8:e8634 <http://doi.org/10.7717/peerj.8634> 13pp. (JCR: 2.118).
- Kim SC, J. E.Choi, J.Chung, K. H.Park, K.Yi, J.Ryu, D. Y. (2009) Oxidative stressdependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro Sep*, 23(6):1076-84.
- Krishnamoorthy R, Kim, C. G., Subramanian, P., Kim, K. Y., Selvakumar, G. y T. M. Sa. (2015) Arbuscular Estructura de la comunidad de hongos micorrízicos, abundancia y cambios de riqueza de especies en el suelo por diferentes Niveles de concentración de metales pesados y metaloides. *PLOS ONE*, 10 (6): 1-15.
- Lam, C. W., James, J. T., McCluskey, R.and Hunter, R. L. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*, 77(1):126-34.

- Lara-Romero, J., J. Campos-García, N. Dasgupta-Schubert, S. Borjas-García, DK Tiwari, F. Paraguay-Delgado, S. Jiménez-Sandoval, G. Alonso-Nuñez, M. GómezRomero, R. Lindig-Cisneros, H. Reyes De la Cruz and J. A. Villegas. (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.3658. 15 pp. (JCR: 2.118).
- 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.
- Levitz, S. M. and 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.
- Li, H., Wang, C., Li, X. y Xiang, D. (2013). Inoculating maize fields with earthworms (*Aporrectodea trapezoides*) and an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) improves mycorrhizal community structure and increases plant nutrient uptake. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8):1167-1178. DOI 10.1007/s00374-013-0815-5
- Li, T., Lin, G., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, S. y Chen, B. (2014). Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza*. Vol: 24. DOI 10.1007/s00572-014-0578-3.
- Li, YC., Chen, SJ. & Li, KT. Symbiotic fungi in nature Finnish peat moss promote vegetative growth in rabbiteye blueberry cuttings. *Hortic. Environ. Biotechnol*. 62, 191–198 (2021).
- Lira-Saldivar, R. H., Arguello M., B., De los Santos Villareal, G. y Vera-Reyes, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria, Multidisciplinary Scientific Journal*. 28 (2): 9-24.
- Lira-Saldivar, R. H., Arguello M., B., Vera-Reyes, I., y G., De los Santos-Villareal. (2018). Agrotecnología: una nueva herramienta para la agricultura moderna. *FCA UNCUYO*. 50(2): 395-411.

- Flores, H. y Linding-Cisneros, R. (2005). La lista de árboles y arbustos propios para repoblar los bosques de la República Mexicana de Fernando Altamirano y José Ramírez a 110 años de su publicación. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 76: 11-35.
- Lira-Saldivar, R. H., Arguello M., B., Reyes V., I., y G., De los Santos-Villareal. (2018). Agrotecnología: una nueva herramienta para la agricultura moderna. *FCA UNCUYO*. 50(2): 395-411.
- Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J. J. M., y Pinzón-López, L. L. (2012). Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias. *Terra Latinoamericana*, 30 (4).
- Núñez-Castillo, O. y Álvarez-Sánchez, J. (2009). Crecimiento y reproducción de una palma del trópico húmedo: efecto de los hongos micorrizogénicos arbusculares. En: Álvarez-Sánchez, F. J. ecología de micorrizas arbusculares y restauración de ecosistemas. Pp. 27-49. México, D. F. Editoriales Ciencias.
- Maltz, M. R., Chen, Z., Cao, J., Arogyaswamy, K., Shulman, H. y E. L., Aronson, (2019), Inoculation with *Pisolithus tinctorius* may ameliorate acid rain impacts on soil microbial communities associated with *Pinus massoniana* seedlings. *Fungal Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.11.011>
- Maubert F., Marisela, Soto S., Laura., Leon C., Ana María y Flores M., Jorge. (2009). Nanotubos de Carbono. La era de la nanotecnología. *Razón y palabra*, 68: 16054806.
- Monray-Ata. A. y K. Ramírez-Saldivar. (2018). Relación entre sucesión ecológica vegetal y hongos micorrizógenos arbusculares en un matorral xerófilo en el centro de México. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 21: 13-29.
- Padmavathi, T., Dikshit, R., Seshagiri, S. (2015). Effect of *Rhizophagus spp.* and plant growth-promoting *Acinetobacter junii* on *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annum*. *Brazilian Journal of Botany*, 38(2): 273-280.
- Pastelín-Solano, M. C., Ramírez-Mosqueda, M. A., Bogdanchikova, C. G., CastroGonzález, C. G., Bello-Bello, J. J. (2020). Silver nanoparticles affect the micropropagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews). *Agrociencia*, 54: 1-13.

- Pérez-Moncada *et al.*, (2011). Evaluación de un sistema para la micorrización in vitro en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*). Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Rincón, A., Álvarez, I. F., y Pera, J. (2001). Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 11(6): 265-271.
- Roveda, G., Cabra, L., Ramírez, M. M., y Peñaranda, A. (2007). Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*). *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1): 28-36.
- Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13(6): 309-317. DOI 10.1007/s00572-003-0237-6
- 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 Chance*. 102: 595-623.
- 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.
- Schubert, A., Bodrino, C. y Gribaudo, E. I. (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) micropropagated plants. *Agronomie* 12: 847-854.
- Sur B., D. (2018). Cost of inoculation seedlings with *Pisolithus tinctorius* spores. *REFORESTA*. 5:33-53.
- Tombuloglu, H., Slimani, Y., Tombuloglu, G., Almessiere, M., and Baykal, A.. (2019). Uptake and translocation of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles and its impact on photosynthetic genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Chemosphere*, 226: 110122.
- Trejo-Aguilar, D., Solís, G., Escalona, M. y Ferrera-Cerrato, R. (2000). Estudio preliminar del efecto de la asociación micorrícica en café en condiciones de campo. En.

- Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. (Eds). Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza arbuscular. Mundi-Prensa. D. F. México. Pp. 206-212.
- Treviño L., E. A., Sandoval-Rangel, A., Benavides M., A., Ortega O., H., Cadenas P., G. y Cabrera F., M. (2021). Selenium nanoparticles absorbed in chitosan-polyvinyl alcohol hydrogels in the *production of grafted cucumber*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 26.
- Valdés-Ramírez M., Ambríz-Parra, E., Camacho-Vera, A. y Fierros-González, A. M. (2010). Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 1: 53-63.
- Van der Zande MV, R. J. Van Doren, E. Kramer, E. Herrera Rivera, Z. Serrano-Rojero, C. S. Gremmer, E. R. Mast, J. Peters, R. J. Hollman, P. C. Hendriksen, P. J. Marvin, H. J. Peijnenburg, A. A. Bouwmeester, H. (2012) Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano Aug*, 28;6(8):7427-42.
- Varela F., L. (1997). Avances en la taxonomía de los hongos micorrízicos arbusculares. Pp. 50. In: Memorias del VI Congreso Nacional de Micología/IX Jornadas Científicas. Tapachula, Chiapas.
- Vizuite-Medrano, M. (2013). Diseño y síntesis de Nanotubos de Carbono con aplicaciones optoelectrónicas. Tesis de Doctorado. INAMOL, Universidad de Castilla- La Mancha. No. Págs. 307.
- Wang X., Gu X., Han H., Chen K., Liu X. & Lu D. (2012). Multi-walled carbón nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *J Nanopart Res.*, (14):841 (14):841.
- Watts-Williams, S. J., Jakobsen, I., Cavagnaro, T. R., Grønlund, M. (2015). Efectos locales y distales de la colonización micorrízica arbuscular en la captación de la vía directa Pi y el crecimiento de la raíz en *Medicago truncatula* , *Journal of Experimental Botany* , 66(13): 4061–4073, <https://doi.org/10.1093/jxb/erv202>
- Watts-Williams, S. J. and Cavagnaro, T. R. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi increase grain zinc concentration and modify the expression of root ZIP transporter genes in a modern barley (*Hordeum vulgare*) cultivar, *Plant Science*, 274: 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.015>

- Xin, X., Zhao, F., Judy D., J. y He, Z. (2022). Copper stress alleviation in corn (*Zea mays* L.): comparative efficiency of carbon nanotubes and carbon nanoparticles. *NanoImpact*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2022.100381>.
- Xirong, G., Yanan, G., Xiaohe, W., Hao, J., Jie, L., Yao, C., Jia, H., Qiaozhi, M., y Xinhua, H., (2021). Differences in aluminum tolerance and immobilization between two indigenous ectomycorrhizal fungi *Lactarius deliciosus* and *Pisolithus tinctorius* from Southwest China's forest stands
- Yang, Y., Cao, Y., Li, Z., Zhukova, A., Yang, S., Wang, J., Tang, Z., Cao, Y., Zhang, Y. y D., Wang. (2020). Interactive effects of exogenous melatonin and *Rhizophagus intraradices* on saline-alkaline stress tolerance in *Leymus chinensis*. *Mycorrhiza*, 30: 357-371.