



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“EFECTO DE LA INTERACCIÓN *Lactarius deliciosus*
– nanotubos de carbono EN EL DESEMPEÑO DE
Pinus patula”

Tesis

que presenta:

Eneida Caro Gómez

Cómo requisito para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Biológicas

Director de Tesis:

Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno

Co-director de tesis:

Dr. Roberto Lindig Cisneros

Morelia, Mich., Febrero de 2017



**INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES**

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Interacción Suelo-Planta-Microorganismo, del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y en el Laboratorio de Ecología de Restauración del Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco) UNAM, Campus Morelia. Bajo la asesoría del Dr. Javier Villegas y el Dr. Roberto Lindig Cisneros.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

A mis asesores; el Dr. Javier Villegas Moreno y Dr. Roberto Lindig Cisneros por apoyar y aumentar las ideas para este trabajo, por su paciencia y comprensión, así como el invaluable aporte de conocimientos. Por apoyarme en este paso de mi formación profesional y el constante impulso hacia mejores cosas. Por esto y más, mi respeto y admiración.

A los integrantes de la comisión revisora, Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero, Dr. Philip Lobit y Dra. Mariela Gómez Romero por cada uno de los aportes y observaciones para la realización de este trabajo.

A todos los que hacen parte del laboratorio interacción planta-suelo-microorganismo por otorgarme su amistad, conocimientos y sobre todo, su apoyo incondicional.

A mis amigos, que me han acompañado durante gran parte de la vida, esta gran aventura con incontables alegrías, aprendizajes y desventuras.

A mi familia, ese gran ejército que me apoya y protege, por enseñarme a vivir y alentarme siempre a ser mejor.

A mis hermanos de sangre y de vida; Karla, Mau, Nadia, Sandra y los Joeles por quererme, cuidarme y creer en mí.

A mis padres, por su guía, amor y comprensión. Por confiar en mí y hacerme poseedora de la libertad de la que hoy gozo. Por otorgarme las herramientas para vivir mi vida y construir mi futuro. Por todo lo que aquí plasmo y lo que no logro expresar en palabras.

Mi gratitud por siempre.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. ANTECEDENTES.....	14
3.1. Bosque de <i>Pinus</i>	14
3.1.1. Patrones de variación entre procedencias.....	17
3.1.2. <i>Pinus patula Schlecht. & Cham.</i>	18
3.2. Estrés por déficit hídrico.....	21
3.2.1. Respuestas de las plantas al estrés por déficit hídrico.....	22
3.2.2. Cambios en la fijación de biomasa.....	25
3.2.3. Efectos asociados al déficit hídrico sobre el crecimiento de especies arbóreas.....	27
3.3. Asociaciones ectomicorrizas.....	28
3.3.1. Implicaciones ecológicas.....	30
3.3.2. Relaciones hídricas entre árboles y hongos ectomicorrízicos.....	31
3.3.3. Hongos ectomicorrízicos.....	41
3.4. Nanotubos de Carbono (CNTs).....	43
3.4.1. Efecto de los nanotubos de carbono en el crecimiento vegetal.....	45
3.4.2. CNTs en los mecanismos celulares.....	47
3.4.3. MWCNTs producidos a partir de materiales vegetales.....	51
4. HIPÓTESIS.....	51
5. OBJETIVO GENERAL.....	51
5.1. Objetivos particulares.....	52
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
6.1. Diseño experimental.....	52
6.2. Montaje del experimento.....	53
6.2.1. Obtención y preparación del inóculo.....	53
6.2.2. Desinfección y germinación de semillas.....	55
6.2.3. Siembra e inoculación.....	55
6.2.4. Adición de MWCNTs.....	56
6.3. Riego necesario para inducir estrés por déficit hídrico.....	56

6.4. Variables evaluadas	57
6.4.1. Altura y diámetro del tallo a la altura de la base	57
6.4.2. Cobertura del follaje	57
6.4.3. Biomasa	58
6.4.4. Longitud y volumen radical	58
6.4.5. Porcentaje de colonización	58
6.4.6. Extracción de micelio externo	59
6.5. Análisis estadístico	60
7. RESULTADOS	60
7.1. Altura	60
7.2. Diámetro del tallo a la altura de la base	62
7.3. Cobertura del follaje	64
7.4. Crecimiento mensual según procedencias	65
7.5. Biomasa	68
7.6. Crecimiento de la raíz y porcentaje de colonización	70
7.7. Supervivencia	71
8. DISCUSIÓN	72
9. CONCLUSIONES	80
10. LITERATURA CITADA	82

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Distribución del género <i>Pinus</i> en México.....	14
Figura 2. Raíces ectomicorrizadas y estructuras microscópicas.....	29
Figura 3. Dibujos esquemáticos de diferentes estrategias de exploración, representadas por cortes transversales de ectomicorrizas y el micelio extramatricial. ...	36
Figura 4. Carpóforo de <i>Lactarius deliciosus</i>	43
Figura 5. Modelo para la captación celular y la distribución de MWCNTs en protoplastos de <i>C. roseus</i>	49
Figura 6. Diagramas esquemáticos de alineación de MWCNTs raíces en el interior. ...	50
Tabla 1. Combinaciones de Nanotubos de carbono, hongo ectomicorrícico y niveles de humedad para el establecimiento de los tratamientos.	53
Figura 7. Deshidratación, molido y almacenamiento de carpóforos de <i>Lactarius deliciosus</i>	54
Figura 8. Esporas de <i>Lactarius deliciosus</i> teñidas con sales de tretrazolium.	54
Figura 9. Semillas de <i>Pinus patula</i> en pregerminación en caja de Petri, para su posterior trasplante a semilleros de polietileno en sustrato turba-agrolita 1:1.	55
Figura 10. Trasplante y montaje del experimento.....	56
Figura 11. Esquemmatización de la técnica para extracción de micelio externo y sus etapas.....	59
Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado a la altura de <i>Pinus patula</i> evaluado a los tres meses de aplicado el tratamiento.	61
Tabla 3. Porcentaje de supervivencia de plantas de <i>Pinus patula</i> inoculadas con <i>Lactarius deliciosus</i> , adicionadas con MWCNTs con distintos regímenes de riego.....	72

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Crecimiento en altura de <i>Pinus patula</i> durante los meses Marzo-Noviembre de 2015.	60
Gráfica 2. Crecimiento en diámetro a la altura de la base del tallo de <i>Pinus patula</i> durante los meses Marzo-Noviembre de 2015.	63
Gráfica 3. Crecimiento en superficie de cobertura del follaje de <i>Pinus patula</i> durante los meses Marzo-Noviembre de 2015.	64
Gráfica 4. Efecto de nanotubos de carbono y <i>Lactarius deliciosus</i> solos y en interacción sobre el crecimiento en altura, diámetro del tallo a la altura de la base y cobertura del follaje de <i>Pinus patula</i> de la procedencia de 2400 msnm durante los meses Marzo-Noviembre de 2015.	66
Gráfica 5. Efecto de nanotubos de carbono y <i>Lactarius deliciosus</i> solos y en interacción sobre el crecimiento en altura, diámetro del tallo a la altura de la base y cobertura del follaje de <i>Pinus patula</i> de la procedencia de 2540 msnm durante los meses Marzo-Noviembre de 2015.	67
Gráfica 6. Efecto de nanotubos de carbono y <i>Lactarius deliciosus</i> solos y en interacción sobre el crecimiento en altura, diámetro del tallo a la altura de la base y cobertura del follaje de <i>Pinus patula</i> de la procedencia de 2870 msnm durante los meses Marzo-Noviembre de 2015.	68
Gráfica 7. Biomasa de <i>Pinus patula</i> evaluada a los 10 meses de aplicado el tratamiento. A) Peso seco de parte aérea, B) Peso seco de la raíz.	69
Gráfica 8. A) Crecimiento radical en longitud de la raíz evaluado a los 10 meses de aplicado el tratamiento. B) Porcentaje de colonización radical una vez finalizado el experimento.	70
Gráfica 9. Supervivencia de <i>Pinus patula</i> durante los meses Marzo-Noviembre de 2015.	71

RESUMEN

México posee una gran diversidad de especies de pinos, un total de 46 especies, de las cuáles, el 55% son endémicas. Sin embargo, las alteraciones en la temperatura global provocan mayor frecuencia de eventos extremos como sequías, lo que se ha asociado con incrementos en la mortalidad de árboles forestales. Estos cambios en el clima, podrían producir la migración de especies forestales que no logren adaptarse a las nuevas condiciones climáticas y en casos extremos, generar extinciones locales.

Por lo que resulta necesario generar plantas forestales que resistan las condiciones de sequía y temperaturas elevadas esperadas, así como estrategias que puedan garantizar su establecimiento en campo para procesos de revegetalización y migración asistida.

Este trabajo propone utilizar semilla procedente de poblaciones adaptadas a dichas condiciones climáticas y microorganismos con potencial para proporcionar resistencia en plantas expuestas a condiciones de estrés hídrico como los hongos ectomicorrícicos, y herramientas que fomenten el crecimiento vegetal, tal como nanotubos de carbono que según lo reportado, podrían generar incrementos en el crecimiento de especies de interés agrícola.

Para este estudio se probó el efecto de dos concentraciones de nanotubos de carbono de pared múltiple (30 y 60 μg) y la inoculación de *Lactarius deliciosus* en el crecimiento y la supervivencia de plántulas de *Pinus patula* procedentes de semillas colectadas a tres altitudes diferentes (2 400, 2 540 y 2 870 msnm) y sometidas a dos condiciones de riego; capacidad de campo y estrés hídrico. Se montó un ensayo de bloques al azar con parcelas divididas y diseño factorial que se evaluó de marzo a diciembre de 2014 en condiciones de casa de sombra.

La concentración de 30 μg de Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple y *Lactarius deliciosus* actúan sinérgicamente fomentando el crecimiento en altura, diámetro a la altura de la base del tallo, biomasa y longitud radical en las plantas de *Pinus patula* con riego a capacidad de campo, mientras que en las plantas bajo condiciones de déficit hídrico, revierten y/o amortiguan los efectos adversos de éste. El déficit hídrico afecta la supervivencia de las plantas de *Pinus patula*, y es compensado por el efecto sinérgico de hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* y la dosis de 30 μg de Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple. No se encontraron diferencias significativas entre procedencias.

Palabras clave: Interacción, sinergia, MWCNTs, hongos ectomicorrícicos, déficit hídrico, procedencias.

ABSTRACT

Mexico has a great diversity of pine species, a total of 46 species, from which 55% are endemic. However, changes in global temperature cause a higher frequency of extreme events such as droughts, which has been associated with increases in forest tree mortality. These changes in the climate, could cause the migration of forest species that can not adapt to the new climatic conditions and, in extreme cases, generate local extinctions.

Therefore it is necessary to generate forest plants that resist the drought conditions and expected high temperatures, as well as strategies that can guarantee their establishment in the field for revegetation and assisted migration processes.

This research proposes to use seed from populations adapted to these climatic conditions and microorganisms with potential to provide resistance in plants exposed to water stress conditions such as ectomycorrhizal fungi and tools that promote plant growth, such as carbon nanotubes that reportedly, could generate increases in the growth of species from agricultural interest.

For this assay the effect of two concentrations of multiple walled carbon nanotubes was proved (30 and 60 μg) and inoculation of *Lactarius deliciosus* on the growth and survival of *Pinus patula* provenances from seeds collected at three different altitudes (2 400, 2 540 and 2 870 meters above sea level) and exposed of two moisture regimes; maximum capacity of water retention by the substrate and water stress. The trial remained under greenhouse conditions and was evaluated from March to December 2014 under shade conditions.

The concentration of 30 μg of Multiple Walled Carbon Nanotubes and *Lactarius deliciosus* act synergistically promoting growth in height, diameter at the base of the stem, biomass and root length in *Pinus patula* seedlings with maximum capacity of water retention by the substrate, while plants under conditions of water deficit, revert and moderate the adverse effects of this. The water deficit affects the survival of *Pinus patula* plants and is compensated by the synergistic effect of both, ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus* and 30 μg dose of Multiple Walled Carbon Nanotubes. There were no significant differences between provenances. Key words: Interaction, synergy, MWCNTs, ectomycorrhizal fungi, water deficit, provenances.

1. INTRODUCCIÓN

Las alteraciones en la temperatura global y el aumento en los niveles de gases invernadero, provoca que los eventos extremos como sequías sean cada vez más frecuentes. Estas alteraciones promueven cambios en la fenología, crecimiento y dinámica poblacional de numerosas especies forestales (Van Zonneveld *et al.* 2009; Matías 2010; Kreuzwieser & Gessler 2010). Por lo tanto, es importante desarrollar nuevas estrategias de manejo que logren contrarrestar estos cambios por medio del establecimiento de especies forestales más eficientes en la toma de CO₂ de la atmósfera.

En este sentido las micorrizas podrían jugar un papel clave en el establecimiento, crecimiento y toma de nutrientes de las plantas. Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre las raíces de plantas y algunos hongos; es una condición común en la mayoría de las plantas, pues más del 90% de las especies vegetales están asociadas a hongos micorrícicos (Smith & Smith 1990; Smith & Read 2000). La importancia de la micorriza radica en el intercambio de sustancias planta-hongo, mientras la planta proporciona al hongo una parte de los fotosintatos, el micobionte degrada, absorbe y traslada selectivamente a la planta ciertos nutrientes que la planta es incapaz obtener (Allen 1991, Smith & Read 2000).

Los hongos ectomicorrícicos (HEM) son un componente dominante de la comunidad microbiana en la rizósfera de árboles de zonas forestales templadas, pues se asocian benéficamente con las raíces finas de Gymnospermas y Angiospermas; entre los grupos más característicos se encuentran hayas, robles, eucaliptos y pinos. (Smith & Read 2000; Futai *et al.* 2008; Brundrett 2009).

En condiciones generales de humedad del suelo, la presencia de micorrizas ayuda a las plantas a mantener un mejor estado hídrico, debido a los cambios en las relaciones de agua. (Brundrett 2002, Ramesh *et al.* 2004; Futai *et al.* 2008). Por lo tanto, el aumento en el potencial hídrico podría tener un efecto indirecto y un mayor crecimiento en raíz y parte aérea de la planta.

Actualmente funciones como la exploración del sustrato facilitando la toma de agua y nutrientes a través del tejido radical de la planta son bien documentadas como efecto de la simbiosis micorrícica (Marschner 1995; Pérez-Moreno & Read 2000; Aguilar-Aguilar *et al.* 2009).

Actualmente la nanotecnología está revolucionando todas las áreas del conocimiento científico y las investigaciones en este campo están teniendo un crecimiento exponencial debido a sus extraordinarias características físicas y químicas. Los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) son estructuras de carbono cristalino que se forman a partir del grafeno y son protagonistas centrales de las nanociencias. Encontrándose la mayoría de los estudios que implican a estos componentes, en torno a las ciencias materiales (Ajayan & Zhou 2001). Si bien, en el área de bionanotecnología vegetal, las investigaciones con estos compuestos son aún incipientes, autores han reportado efectos importantes en la germinación y el crecimiento de plantas de importancia económica relacionados con modificaciones en la absorción de agua (Khodakovskaya *et al.* 2009; Modal *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012).

Sin embargo se desconocen los efectos de estos nanotubos en otras plantas así como las interacciones que puedan tener con otros componentes característicos de ecosistemas forestales como los hongos ectomicorrícicos.

2. JUSTIFICACIÓN

La madera producida por los árboles forestales durante el crecimiento secundario representa el secuestro del principal gas de efecto invernadero; el dióxido de carbono, en forma de energía almacenada como biomasa.

Sin embargo, los cambios en la temperatura global, el aumento en los niveles de gases invernadero, la disminución de las precipitaciones y un aumento en la frecuencia de eventos extremos como sequías, provocarán que las especies forestales tengan que adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones climáticas, migrar o enfrentarse a la extirpación.

Por lo tanto, es necesario diseñar nuevas estrategias de manejo forestal y revegetalización que permitan ampliar la capacidad de adaptación de las especies forestales ante nuevas condiciones climáticas. En este sentido es necesario evaluar estrategias que incluyan el uso de componentes característicos de ecosistemas forestales como son los hongos ectomicorrícicos (HEM) y el uso de nuevos materiales como los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) que podrían aportar soluciones potenciales, además de lograr la obtención de plantas más eficientes en la fijación de CO₂.

3. ANTECEDENTES

3.1. Bosque de *Pinus*

El bosque de Pino es característico de México, pues se distribuye sobre casi la totalidad del país, en cinco regiones principales, I) Baja California Norte y Sur, II) Sierra Madre Occidental: Chihuahua, Durango, Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Sonora y Zacatecas, III) Sierra Madre Oriental: Coahuila, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí y Tamaulipas, IV) Faja Volcánica Transmexicana: Aguascalientes, Colima, Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla, Tlaxcala y Veracruz, V) Sierra Madre del Sur, Macizo de Oaxaca, Sierra de San Cristóbal, Sierra de Oaxaca y Península de Yucatán: Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Campeche y Quintana Roo (Sánchez-González 2008) (Figura 1).

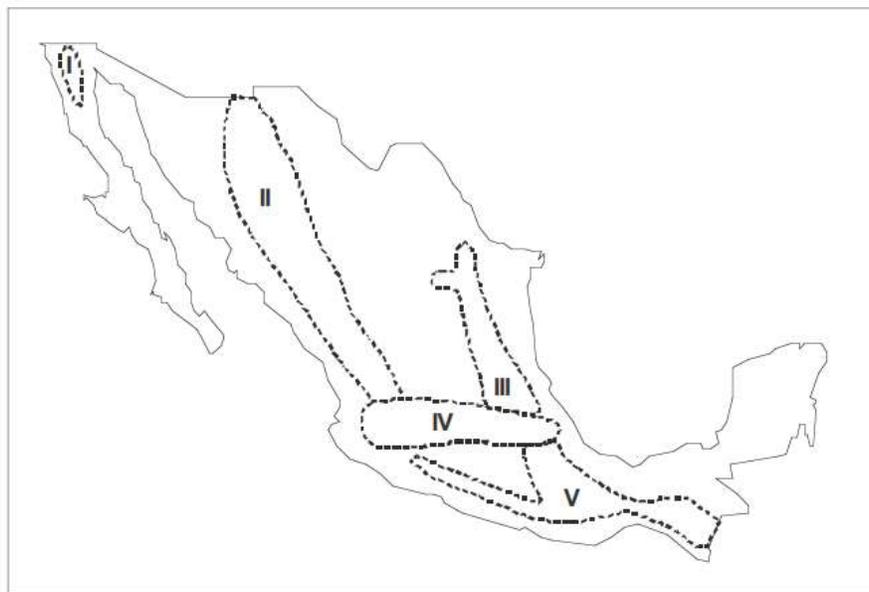


Figura 1. Distribución del género *Pinus* en México (En: Sánchez-González 2008).

En México habitan mayor número de especies de pinos que en cualquier otra región de superficie semejante en el mundo, un total de 46 especies, de las cuáles, el 55% son endémicas (Rzedowski 1978; Sánchez-González 2008). Gran parte de la masa forestal de pinos mexicanos tiene una distribución altitudinal que varía entre 1,500 y 3,000 m, donde la temperatura media anual fluctúa entre 6 y 28 °C, la precipitación promedio anual de 350 a más de 1,000 mm y se desarrollan generalmente sobre suelos ácidos, derivados de rocas ígneas y deficientes en componentes minerales (Sánchez-González 2008), por lo que las asociaciones micorrícicas influyen de manera importante en su supervivencia (Smith & Read 2000; Brundrett 2009).

Los pinares en México constituyen un recurso de primera importancia, por la demanda de madera, resina y pasta para papel, etc. El uso del pino como materia prima, se debe principalmente a la calidad de la madera, la facilidad de su explotación, la rapidez del crecimiento de muchas especies y sobre todo, a la extensa área de distribución y buen desarrollo que presentan estos bosques (Rzedowski & Rzedowski 2005; FAO 2010).

El 60% de las especies de los pinos Mexicanos tienen importancia comercial, las especies más explotadas son *P. patula*, *P. oocarpa*, *P. pseudostrobus*, *P. herrerae*, *P. leiophylla* y *P. arizonica* (Perry 1991; Le Maitre 1998; Ramírez-Herrera *et al.*, 2005).

En México se pierden alrededor 167,000 ha de bosque templado al año, por incendios y cambio de uso de suelo, debido al crecimiento de la mancha urbana y la explotación forestal inadecuada, sobre todo, la tala clandestina, así como los desmontes para fines de ampliación de campos agrícolas y ganaderos (Rzedowski

1978; Sánchez-González 2008; FAO 2010; SEMARNAT 2011). Todos éstos constituyen factores que restan superficie a los bosques, modifican la composición florística y faunística de los que quedan y contribuyen a la erosión del suelo, así como a la desertificación del planeta.

Aunado a esto, los importantes cambios en el clima registrados a escala global están induciendo cambios en la fenología, crecimiento y dinámica poblacional de muchas especies forestales (Matías 2012). Se han observado patrones globales de aumentos en la mortalidad de árboles forestales asociados al reciente aumento de la temperatura global (Allen *et al.* 2010), lo que sugiere que tanto el aumento de la temperatura, como la modificación del ciclo hidrológico podrían producir estrés crónico en árboles forestales.

Los modelos climáticos para México predicen un aumento en la temperatura media anual de 1.5°C para el año 2030 y de 3.7°C para el año 2090, así como una disminución de la precipitación anual de 6.7% y 18.2% respectivamente (Sáenz-Romero *et al.* 2010), por lo que se espera que una fuerte variabilidad inter e intra anual de tiempo provocará un aumento en el riesgo de eventos extremos como sequías y/o inundaciones (Kreuzwieser & Gessler 2010). Estos cambios, podrían exceder la capacidad de las especies forestales para permanecer dentro de su rango de distribución y tendrían que migrar hacia áreas con climas favorables; de no migrar tan rápido como ocurren los cambios en el clima, las especies podrían enfrentarse a la extinción local (Sáenz-Romero *et al.* 2011). Por lo que resulta necesario determinar cuáles poblaciones se encuentran mejor adaptadas para

resistir el aumento de temperatura y la disminución de las precipitaciones hasta ahora predichas.

3.1.1. Patrones de variación entre procedencias

Las poblaciones de árboles forestales de amplia distribución pueden diferenciarse genéticamente a lo largo su historia evolutiva, adaptándose a las condiciones climáticas y edáficas de los sitios en los que habitan. Esta diferenciación genética se expresa en caracteres adaptativos como la dinámica y tasa de crecimiento, resistencia a sequías y heladas, producción y dispersión de semillas, entre otros (Ramírez 2000). Éstos les permiten sobrevivir, crecer, competir y reproducirse en un ambiente determinado.

Las adaptaciones a nivel de poblaciones en regiones con gradientes ambientales, es muy evidente en regiones montañosas, que presentan grandes diferencias climáticas entre las partes altas y bajas de las montañas (Rehfeldt, 1988 En Sáenz-Romero 2014). La diferenciación, consiste en que poblaciones ubicadas a menor altitud tienen un mayor potencial de crecimiento, por estar genéticamente condicionadas a aprovechar al máximo las condiciones favorables de temperaturas que ocurren a bajas altitudes (Sáenz-Romero 2014). Por el contrario, poblaciones que habitan a mayores alturas están genéticamente condicionadas a tener un crecimiento moderado, debido a que detienen su crecimiento en invierno y lo reinician después para resistir al daño por heladas (Sáenz-Romero 2014). En algunos casos, las poblaciones con mayor potencial de crecimiento son las de la parte media de la distribución altitudinal, ya que su crecimiento no se limita en la temporada de sequía como en el caso de las poblaciones que crecen a menor

altitud, ni en invierno, como las poblaciones que crecen a altitudes elevadas; sin embargo, tampoco poseen resistencia a las condiciones ambientales extremas (Sáenz-Romero 2014).

Una procedencia se define como la fuente geográfica original o natural de un individuo, población o especie (Eguiluz 1988) y la selección apropiada de una procedencia como fuente de semillas para producción de planta en vivero destinada a plantación, repoblación o revegetalización de un determinado lugar, podría incrementar sustancialmente la supervivencia, establecimiento y crecimiento de las plantas. Por el contrario, una selección equivocada puede representar una gran pérdida económica, por lo que resulta importante lograr un acoplamiento entre la adaptación condicionada genéticamente y el clima del sitio que se reforesta.

3.1.2. *Pinus patula Schlecht. & Cham.*

3.1.2.1. *Características de la especie*

Es un **árbol** de 20 a 55 m de altura y de 50 a 120 cm de diámetro normal.

El tronco es característicamente recto y está libre de ramas hasta una altura de 20m. Las ramas son verticiladas, normalmente delgadas, cortas, extendidas y con escamas decurrentes de color café canela a verdosas; ramillas rojizas y escamosas, con ligero tinte blanquecino (Martínez 1948 y Nepomuceno 1994 En Sáenz *et al.* 2011).

Hojas están dispuestas en grupos de tres o cuatro, rara vez cinco por fascículo; miden alrededor de 14 a 21 cm; son delgadas de 0,5 a 0,8 mm de grueso, flexibles colgantes o algo extendidas, se notan verticalmente caídas, de color verde claro

brillante a amarillo verdosas; los bordes son finamente aserrados con diente-cillos muy finos. Vainas persistentes, fuertes, algo cenicientas de 12 a 23 mm (Martínez, 1948 En Sáenz *et al.* 2011).

Conos femeninos serotinos, largamente cónicos de 7-9 cm, a veces 12; duros, sésiles, reflejados algo encorvados, oblicuos y puntiagudos, generalmente agrupados en número de 3-8; frecuentemente se ven en el tronco y en las ramas gruesas y en este caso suelen ser solitarios, embutidos en la corteza. El color es amarillo ocre, rojizo y café o café-amarillento en estado de madurez; son tenazmente persistentes y se abren parcialmente en diferentes épocas. Las escamas son duras, casi uniformes, con el ápice redondeado; umbo deprimido o algo engrosado en las escamas basales, con una punta oscura, muy pequeña, extendida; miden cerca de 30 mm de largo por 12-14 de ancho (Martínez 1948; Nepomuceno 1994 En Sáenz *et al.* 2011).

La **semilla** es muy pequeña, casi triangular, aguda, de color moreno, alcanzando un tamaño medio de 15 mm incluida un ala, algo engrosada en la base, de color café claro con estrías oscuras (Martínez, 1948; Nepomuceno, 1994 En Sáenz *et al.* 2011).

3.1.2.2. Distribución geográfica y uso de la especie

Pinus patula es una conífera de la familia Pinaceae endémica de México. En la República Mexicana se distribuye sobre la Sierra Madre Oriental, el Eje Neovolcánico y la Sierra Madre de Oaxaca (SEMARNAP 2006 En: Sáenz *et al.* 2011). Forma parte de la flora de los estados de Querétaro, Estado de México,

Distrito Federal, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Veracruz y Oaxaca (Rzedowski & Rzedowski 2005).

La distribución natural de *P. patula* está influenciada grandemente por factores orográficos que a su vez afectan a los factores climáticos y edáficos. El clima recomendable para el crecimiento de esta especie de pino, es el templado subhúmedo (SEMARNAP 2006 En: Sáenz *et al.* 2011). La especie habita generalmente en localidades en donde la temperatura media anual se encuentra entre 12 y 18°C, con temperaturas máximas y mínimas en los meses calurosos y los fríos de 20-29°C y de 6-12°C, respectivamente; La precipitación media anual varía de 1200 a 1600 mm. En forma natural, los bosques en que domina, se encuentra entre 1800 y 3000 m de altitud (Rzedowski 1978; Rzedowski & Rzedowski 2005; SEMARNAP 2006 En: Sáenz *et al.* 2011).

Pinus patula es una especie apta para plantaciones comerciales y es el pino mexicano más plantado dentro y fuera de México (Salaya-Domínguez *et al.* 2012). Desde la introducción de la especie para plantaciones comerciales en Sudáfrica, Zimbabwe, Australia, Nueva Zelanda y Colombia, el interés en la especie aumenta debido a su rápido crecimiento, la calidad de la madera y la facilidad de manejo (Wormald 1975; Wright *et al.* 1995; Dvorak *et al.* 2000). Sin embargo, en México se siguen utilizando las poblaciones silvestres para aprovechamiento maderable (Salaya-Domínguez *et al.* 2012), lo que aumenta la presión demográfica sobre la especie.

Aunado a esto, autores predicen que la extensión del hábitat adecuado para *P. patula* podría reducirse de 3 a 39% para el año 2050 (Van Zonneveld *et al.* 2009 En

Sáenz-Romero et al. 2011). Por ello es importante la evaluación de estrategias para la producción de plantas resistentes y más productivas ante las condiciones de sequía esperadas, logrando un acoplamiento entre la adaptación condicionada genéticamente y el clima del sitio que se reforesta.

3.2. Estrés por déficit hídrico

El agua comprende entre 75% y 90% de la biomasa de las plantas y desempeña funciones únicas (Landmeyer 2013), pues es el solvente más abundante que permite el movimiento de moléculas; está implicada en el crecimiento y proliferación, exocitosis, endocitosis, cambios en la forma celular, señalización de hormonas, metabolismo, migración celular, obtención de nutrientes, filtración de desechos, necrosis y apoptosis (Wehner *et al.* 2003, Moreno 2009). Además, participa en la reacción fotosintética, por lo que juega un papel crucial para el desarrollo y crecimiento vegetal (Landmeyer 2013).

El estrés hídrico producido por la sequía, la salinidad y las altas temperaturas es el estrés abiótico prevaeciente que limita la sobrevivencia, el crecimiento, la reproducción, la estabilidad y en general, la productividad vegetal (Jaleel *et al.* 2009). Es la causa más común de mortalidad en la regeneración natural y en plantaciones forestales (Duan *et al.* 2005, Shvaleva *et al.* 2006, Furlan 2012, Sechi & Zwieniecki 2014). Los árboles enfrentan múltiples eventos de estrés hídrico durante su ciclo de vida, especialmente durante el estadio de plántulas, debido a la disminución del contenido de agua en los horizontes superficiales del suelo por infiltración de la precipitación pluvial y la subsecuente evapotranspiración (Duan *et al.* 2005, Shvaleva *et al.* 2006, Furlan 2012, Sechi & Zwieniecki 2014).

El déficit hídrico afecta varios de los procesos metabólicos de las plantas, como la síntesis de proteínas, de pared celular, el nivel de especies reactivas de oxígeno, de nitrato reductasa, y de las sustancias reguladoras del crecimiento como el ácido abscísico y el etileno (Danneberger 2000). La reducción a un nivel crítico afecta directamente el funcionamiento de la fotosíntesis, la transpiración, la respiración y el metabolismo de los carbohidratos, causando una reducción en el crecimiento. Finalmente, la deshidratación severa y prolongada causa trastornos en la integridad de la membrana, la desorganización del protoplasma y la muerte de la mayor parte de los organismos (Kozlowski 1999, Taiz & Zeiger 2006).

3.2.1. Respuestas de las plantas al estrés por déficit hídrico

El estrés por déficit hídrico o por sequía se produce en las plantas en respuesta a un ambiente escaso en agua, en donde la tasa de transpiración excede a la toma de agua. Las plantas han respondido al estrés hídrico desarrollando mecanismos fisiológicos de aclimatación a nivel morfológico, anatómico y celular, que se activan en respuesta al déficit hídrico y les permite vivir en condiciones de constante estrés (Nilsen y Orcutt 1996).

Cuando el estrés hídrico se desarrolla lentamente, se dan cambios en los procesos de desarrollo que tienen efectos evidentes sobre el crecimiento, uno de los principales es la limitación de la expansión foliar y la reducción del crecimiento de la planta, mientras que, el crecimiento radical continúa su desarrollo en búsqueda de agua en zonas más profundas del suelo (Moreno 2009).

3.2.1.1. Reducción de la pérdida de agua y protección de la maquinaria fotosintética

Cuando el mesófilo de la hoja comienza a sufrir deshidratación, se activa el proceso de cierre de estomas. Ante la detección de un aumento en la diferencia de presión vapor-hoja-aire, el contenido de ácido absícico (ABA) en la hoja se incrementa debido a la compartimentalización y redistribución desde los cloroplastos de las células del mesófilo y a la síntesis y transporte de las raíces, siendo liberado al apoplasto para llegar a las células guarda a través de la corriente de transpiración (Moreno 2009). Esta fitohormona produce una pérdida de iones K^+ y Cl^- o malato $^{2-}$ en las células guarda, que provoca la salida de agua del citoplasma, dando lugar al cierre del estoma y reduciendo de este modo la pérdida de agua a través de la transpiración. Este es un medio eficaz para controlar la pérdida de agua cuticular (Assmann *et al.* 2000).

A medida que se pierde agua de la hoja, la presión de turgencia de los tejidos de las hojas disminuye y las hojas empiezan a marchitarse. El marchitamiento de las hojas trabaja para proteger la maquinaria fotosintética de los rayos directos del sol (Larcher 1995). Por otra parte, el cierre de los estomas en condiciones de sequía restringe el flujo de CO_2 y por lo tanto la fotosíntesis, privando a las plantas de su mayor captador de energía solar (Redondo-Gómez *et al.* 2013).

3.2.1.2. Ajuste osmótico

A nivel celular, otra respuesta de tolerancia es el ajuste osmótico, que consiste en la disminución del potencial hídrico en los tejidos vegetales y que propicia la entrada de agua para evitar la pérdida de turgor o productividad fotosintética (Moreno 2009).

El ajuste osmótico ocurre mediante la acumulación de iones, fundamentalmente de K^+ y la síntesis de osmolitos orgánicos de bajo peso molecular (Redondo-Gómez *et al.* 2013). Los iones K^+ se acumulan principalmente en la vacuola, mientras que en el citoplasma se acumulan solutos de bajo peso molecular que no interaccionan con sustratos y cofactores enzimáticos como polioles, metilaminas, aminoácidos libres y derivados de éstos (Moreno 2009, Hopkins & Hüner 2009).

3.2.1.3. Respuestas moleculares

La respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés generalmente incluye la alteración en la expresión de proteínas. Estos cambios generalmente están relacionados con el aumento o la disminución de la expresión de genes específicos que dependen de la naturaleza, duración y severidad del estrés (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2007).

Entre las más importantes por su efecto protector potencial están las proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant Proteins), las involucradas en las vías de síntesis de osmolitos y las que funcionan como antioxidantes (Danon *et al.* 2004).

Un grupo grande de genes que se inducen por estrés osmótico codifican para proteínas LEA que han sido asociadas a la protección de la integridad celular y al mantenimiento de la homeostasis iónica. Se ha propuesto que las proteínas LEA protegen proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación, pues es posible que sustituyan el agua y mantengan a estructura de proteínas y membranas en ausencia de ésta (Bray 1993 En Moreno 2009).

La acumulación de prolina, además de inducir ajuste osmótico, protege las membranas y proteínas de la deshidratación y actúa como detoxificador de radicales libres. Otros osmolitos como la glicina, ha mostrado proteger enzimas y membranas, así como estabilizar complejos proteína-pigmento del PSII (Moreno 2009).

Otro grupo de proteínas que se sobre-expresan durante el estrés hídrico son las enzimas antioxidantes; la superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, peroxidasa, glutatión reductasa y la monodehidroascorbato reductasa que, junto con compuestos no proteicos, detoxifican a las plantas de los radicales libres como el superóxido y el peróxido de hidrógeno que se generan por un aumento en la tasa de fotorreducción del O₂ en los cloroplastos (Moreno 2009).

3.2.2. Cambios en la fijación de biomasa

En especies forestales, la sequía tarda días en ser estresante, sin embargo, cuando el déficit hídrico se genera a un ritmo suficientemente lento afecta significativamente la producción y asignación de biomasa, modificando la morfología de la planta (Furlan 2012).

El crecimiento de las plantas, resultado de la división celular y la subsecuente elongación, requiere del balance de carbono entre la fotosíntesis y la respiración. El crecimiento depende de la extensibilidad de la pared celular, de los gradientes de potencial hídrico y de la conductancia hidráulica en la vía del agua hacia las células a través de la continua absorción de agua y de presión de turgencia (Chaumont 2014).

El déficit hídrico afecta el crecimiento de manera directa, a medida que el contenido hídrico disminuye, las células pierden volumen y las paredes celulares pierden presión de turgencia. La membrana plasmática se hace cada vez más gruesa y comprimida porque cubre un área menor (Danneberger 2000). La pérdida de turgencia es extremadamente sensible al déficit de agua y es el primer efecto biofísico significativo del estrés hídrico. Una pequeña disminución en el potencial hídrico (-0.1 MPa) afecta el crecimiento, y se refleja en la reducción de la elongación celular (Kramer y Boyer 1995).

El crecimiento, también se ve afectado de manera indirecta, pues el cierre estomático genera un conflicto fisiológico entre la necesidad de conservar el agua y la necesidad de abrir los estomas para incorporar el dióxido de carbono atmosférico para realizar la fotosíntesis, exponiéndose a sufrir deshidratación (Taiz & Zeiger 2006).

Como la raíz es la estructura de las plantas que está en contacto directo con el suelo, es el primer sitio potencial de daño o de respuestas de defensa de las plantas expuestas ante el bajo del contenido de humedad en éste. Las raíces exhiben también una reducción en la elongación, la ramificación, el crecimiento del cambium y un aumento en la suberización de ápices (Wang & Yamauchi 2006).

Sin embargo, en condiciones de deshidratación, el estrés osmótico suele conducir la acumulación de ácido absícico (ABA). A niveles altos, la hormona ejerce un fuerte efecto negativo sobre el crecimiento del tallo, por lo que la traslocación de carbohidratos hacia la raíz aumenta (Castelan 2014). En especies leñosas el desarrollo de un sistema radical vigoroso y profundo es considerado uno de los

principales mecanismos de resistencia a la sequía, puesto que una mayor asignación de biomasa al sistema radical puede incrementar la cantidad de agua accesible para la planta. De esta manera pueden mantener altos potenciales hídricos, alto contenido de agua en los tejidos y satisfacer la demanda transitoria (Kowzlowski & Pallardy 2002; Taiz & Zeiger).

3.2.3. Efectos asociados al déficit hídrico sobre el crecimiento de especies arbóreas

Martínez-Trinidad *et al.* 2002 a y b sometieron plantas de *Pinus Leiophylla* de nueve meses de edad y 11 procedencias diferentes a déficit hídrico durante dos meses y a un posterior periodo de recuperación con alta disponibilidad de agua de cuatro meses. Determinaron que la disponibilidad de agua en el suelo afectó la tasa de consumo de las plantas y según las procedencias, identificaron dos grupos; uno agotador y uno ahorrador. El crecimiento promedio en altura y la acumulación de biomasa se redujeron 70% y 80% respectivamente por efecto del déficit hídrico, sin embargo, durante el periodo de recuperación se observó un efecto compensatorio en las plantas sometidas a severo déficit hídrico, pues crecieron 95% más que las plantas que no se sometieron a estrés. Concluyeron que el déficit hídrico afectó mayormente el crecimiento de las poblaciones ahorradoras, sin embargo, presentaron menor mortandad que las poblaciones del grupo agotador.

Martiñón *et al.* En 2010 evaluaron el efecto del estrés hídrico y del estrés por altas temperaturas en el crecimiento y distribución de biomasa de 12 procedencias o poblaciones de la especie *Pinus pinceana* Gordon. Concluyeron los dos tipos de estrés ocasionaron una reducción significativa en el crecimiento, siendo más severo

el efecto del estrés hídrico, reduciendo en más de 80% el incremento en altura, un 49% en diámetro a la altura de la base, 60% el número de ramas y entre 15 y 30% en la acumulación de biomasa. El aumento de temperatura ocasionó el engrosamiento del tallo, efecto que fue más notorio al estar en combinación con estrés hídrico. Se encontró una amplia variación entre las poblaciones en el potencial de crecimiento y en la asignación de biomasa en respuesta a los factores de estrés.

Prieto *et al.* 2004 evaluaron el efecto del estrés hídrico de la especie *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero y observaron que la tasa de crecimiento en las plantas sometidas a estrés hídrico se redujo significativamente con respecto a las plantas sin restricción de humedad, de 20.7% en altura a 1.3%, en diámetro del cuello de 69.4% a 9.8% y biomasa total, de 144.1% a 73.1%.

Panelles *et al.* 2004 evaluaron el efecto de tres niveles de estrés hídrico sobre el potencial de desarrollo radical de *Quercus ilex* L. Los resultados mostraron que el potencial de crecimiento radical es afectado negativamente por cualquiera de los niveles de estrés hídrico aplicados (bajo, moderado y fuerte), independientemente del tiempo de acondicionamiento a la sequía.

3.3. Asociaciones ectomicorrícicas

Los hongos ectomicorrícicos (HEM) son un componente dominante de la comunidad microbiana en la rizósfera de árboles de zonas forestales templadas, pues se asocian benéficamente con las raíces finas de Gymnospermas y Angiospermas (Smith & Read 2000; Futai *et al.* 2008; Brundrett 2009).

Los árboles con asociaciones ectomicorrícicas típicas son dominantes en bosques de coníferas. En México, gran parte de estos bosques están conformados por miembros de la familia Pinaceae, dentro de la cual, destaca en abundancia el género *Pinus*. Así mismo, se ha demostrado que un buen número de coníferas han sido hospederos de hongos ectomicorrícicos y generalmente, que las plantas que se asocian a este tipo de hongos son simbiontes obligadas (Brundrett 2002; 2009).

Las raíces ectomicorrizadas se caracterizan por la presencia del manto, que es formado por un conjunto de hifas que se entretajan y recubren la superficie de la raíz; la red de Harting, que es constituida por hifas laberintiformes que penetran la raíz y se sitúan en los espacios intercelulares de la epidermis o el cortex; el micelio extraradical, conformado por un sistema de hifas que funcionan como conexiones esenciales hacia el suelo y los cuerpos fructíferos de los hongos ectomicorrícicos (Smith & Read 2000; Brundrett 2002) (Figura 2).

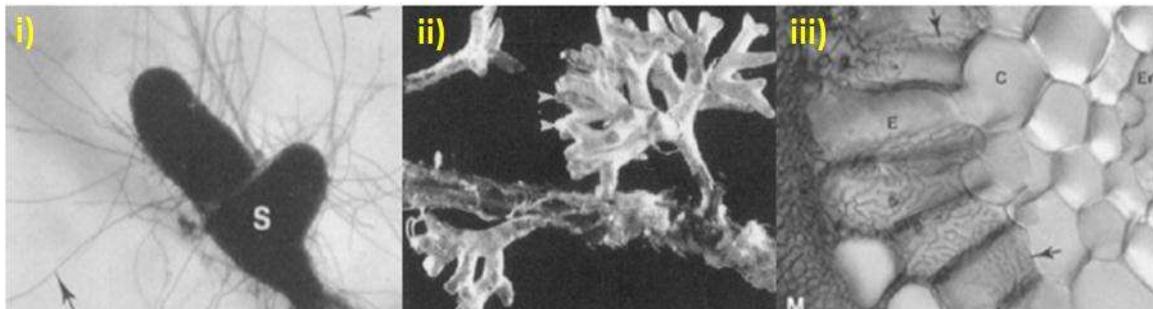


Figura 2. Raíces ectomicorrizadas y estructuras microscópicas. i) (S) Raíces cortas ectomicorrizadas de *Eucalyptus globulus* con *Cenococcum* y micelio externo. ii) Puntas ectomicorrizadas de *Pinus radiata* y *Amanita muscaria*. iii) Hifas laberintiformes de la red de Harting en células epidérmicas elongadas (E) de *Populus tremuloides*. El manto (M), cortex (C). (Brundrett 2002).

Dada la naturaleza heterótrofa de los micobiontes, éstos obtienen compuestos de carbono derivados fotosintéticamente a partir del fitobionte. Por su parte los

fitobiontes reciben una mayor cantidad de nutrimentos minerales y agua, ya que las micorrizas funcionan como extensiones radiculares (Smith & Read 2000; Perez-Moreno & Read 2000).

En tanto, las ectomicorrizas mejoran el estado fisiológico de los fitobiontes, pues aumentan su suministro de nutrientes y mejoran su absorción, mediante la ampliación del volumen del suelo accesible a los sistemas de raíces. Lo que resulta en mayor crecimiento y resistencia al estrés ambiental, entre otros beneficios no nutricionales como resistencia a patógenos, detoxificación del suelo de compuestos alelopáticos y metales pesados, así como prevención en la pérdida de nutrientes, especialmente cuando las raíces se encuentran inactivas. Todo, debido a los cambios en las relaciones de agua, los niveles de fitohormonas, la asimilación de carbono y la producción de metabolitos secundarios (Read 1991; Smith & Read 2000; Brundrett 2002, Ramesh *et al.* 2004, Fricker *et al.* 2007; Futai *et al.* 2008).

3.3.1. Implicaciones ecológicas

A diferencia de las asociaciones micorrícicas arbusculares, en las que se han propuesto categorías de dependencia micorrícica, los hospederos de hongos ectomicorrícicos son incapaces de sobrevivir hasta la edad reproductiva en ausencia de éstos (Brundrett 2002). Pues aun cuando no se ha logrado dilucidar completamente la eficiencia de los hongos ectomicorrícicos en la toma de nutrientes efectivos para sus hospederos, ni su capacidad para desdoblar compuestos complejos como la lignina o la celulosa, se considera que los sistemas miceliares producidos por hongos ectomicorrícicos en el suelo desempeñan un papel clave en el ciclo de nutrientes en muchos ecosistemas y funcionan como la principal interface

suelo-planta para sus hospederos, incluyendo muchos árboles forestales importantes (Read 1991; Pérez-Moreno & Read 1999; Smith & Read 2000; Brundrett 2002, Ramesh *et al.* 2004, Fricker *et al.* 2007).

Se ha hipotetizado que los hongos HEM juegan un papel muy importante en el acoplamiento de las plantas a la red alimentaria del suelo, pues constituyen el último paso en el ciclo de nutrientes del bosque las ectomicorrizas (Read 1991; Brundrett 2002). Además autores proponen que pueden regular las relaciones de competencia vegetal, la composición, la diversidad de especies y la dinámica sucesional de algunas comunidades vegetales (Read 1991; Brundrett 2002; Ramesh 2004; Futai *et al.* 2008).

3.3.2. Relaciones hídricas entre árboles y hongos ectomicorrícicos

Ha sido mencionado que las asociaciones ectomicorrícicas modifican las relaciones hídricas de las plantas hospederas, proporcionándoles cierta resistencia al estrés por déficit hídrico. Se ha demostrado que el micelio externo de los hongos ectomicorrícicos transporta agua a la planta huésped proporcionando una vía de baja resistencia y quizás preferida para el transporte de agua (Duddridge *et al.* 1980; Plamboeck *et al.* 2007), lo que podría explicar en parte la tolerancia al estrés hídrico y la mejora de la conductancia hidráulica de la raíz (Dixon *et al.* 1983; Muhsin & Zwiazek 2002).

La inhibición de los efectos del déficit hídrico en las plantas por parte de las ectomicorrizas ha sido documentada. Se encontró que la colonización por HEM aumentaba la tolerancia a la sequía de las plántulas de *Pseudotsuga menziesii* (Kazantseva *et al.* 2010) al reducir los efectos fisiológicos sobre el huésped,

evidenciados por una mayor tasa fotosintética, crecimiento y fijación carbono, permitiendo también una recuperación más rápida después de la sequía (Parke *et al.* 1983). En un experimento de laboratorio, plántulas de *Nothofagus dombeyi* colonizadas por *Pisolithus tinctorius* y *Descolea antarctica* mostraron mayor contenido de agua relativa, menor estrés oxidativo y mayor actividad enzimática antioxidante que las plantas no micorrízicas (Alvarez *et al.* 2009).

Así mismo, Gómez-Romero *et al.* (2015) observaron que aun cuando la sequía prolongada (riego cada 15 días) reduce el crecimiento en biomasa y longitud radical de plántulas de *Pinus pseudostrobus* inoculadas con *Pisolithus tinctorius* y sin inoculación, el 30% de las plantas inoculadas sobrevivieron a la sequía, mientras todas las no inoculadas perecieron. Lo que sugiere que las micorrizas pueden beneficiar a la planta hospedera por su capacidad de proveer al menos los requerimientos mínimos para la sobrevivencia de las plantas durante episodios de sequía y su presencia puede ser crucial y marcar la diferencia entre la supervivencia o la muerte de la planta.

Los mecanismos mediante los cuales los HEM pueden mejorar la absorción de agua en las plantas son: 1) a través de redes hifales de micelio externo que incrementa el área de exploración de la raíz y transportan agua que de otra forma no estaría disponible (Marjanovic & Nehls 2008), 2) Mantienen la estructura y aireación del suelo (Bogeat-Triboulot 2004) y 3) Modulan los requerimientos hídricos, puesto que al mejorar la nutrición reducen su demanda por transpiración (Bogeat-Triboulot 2004).

El aumento en la absorción de agua por las hifas no puede manifestarse cuando el suelo está cerca de la saturación y los poros grandes se llenan de agua, ya que las raíces también están en contacto con el agua. Pero a medida que el suelo se seca y el agua se retiene sólo en los poros a los que las hifas tienen acceso y las raíces no, la función de captación de agua de las hifas se vuelve más significativa para la supervivencia de la planta (Allen 2007). Así mismo, el contacto mejorado entre hifas y partículas del suelo aumenta el potencial de absorción de agua micorrícica (Boyd 1986).

Sin embargo, autores afirman la posibilidad de que los aumentos observados en flujo de agua de la raíz en plantas micorrizadas pudieran ser debidos a los efectos nutricionales o metabólicos de éstas asociaciones en la actividad de los canales de agua de la raíz (Muhsin & Zwiazek 2002).

En este sentido, las micorrizas favorecen cambios morfológicos en la planta, que podrían aminorar las condiciones de estrés ambiental, como la limitación de agua y nutrimentos (Davies *et al.* 1996). Según Barker *et al.* (1998) la anatomía de las raíces, tanto el alargamiento de las células corticales como las convoluciones del tejido fúngico dentro de las raíces ayuda a aumentar la superficie para la transferencia de agua y solutos. Así mismo, se ha afirmado que la geometría de las raíces influye en la entrada de agua y reduce el potencial hídrico de las hojas de plantas micorrizadas debido a que la superficie exterior es mayor en comparación con el área que cubre la banda de caspari (Sands & Theodorou 1978 En: Letho & Zwiazek 2011).

Las diferencias en la respuesta de las plantas para mejorar sus relaciones hídricas por efecto de las micorrizas, dependen de las especies de HEM asociados a sus raíces. Debido a diversas propiedades morfológicas y anatómicas particulares de cada especie de HEM afectan diferencialmente la absorción de agua en las plantas (Parke *et al.* 1983; Agerer 2001; Plamboeck *et al.* 2007). Por lo que en ocasiones, el HEM es capaz de compensar los efectos negativos del estrés hídrico debido al reconocimiento o compatibilidad que se da entre especies hospedero-huésped (Morte *et al.* 2001).

La captación de agua y la capacidad de transporte entre hongos micorrícicos y plantas huésped pueden estar relacionadas no sólo con el grado de colonización de las raíces, sino también con el desarrollo de las hifas en el suelo, es decir, con la capacidad de diferentes HEM para producir estructuras de exploración, que pueden diferir tanto estructural como funcionalmente (Agerer 2001). Estas diferencias pueden afectar la capacidad de diferentes hongos para transportar y suministrar agua a las plantas receptoras.

Agerer (2001) clasificó diversos "**tipos de exploración**" (Figura 3) de HEM de acuerdo a su distribución y diferenciación del micelio externo, cada uno de los cuales podría representar una estrategia de forrajeo distinta; **1) de contacto**, representado por ectomicorrizas con un manto liso y sólo unas cuantas hifas emanantes, donde las puntas ectomicorrícicas están en estrecho contacto con los sustratos circundantes y las hifas emanantes, presente en los géneros *Balsamia*, *Chroogomphus*, *Lactarius* pte., *Leucangium*, *Russula* p. pte, *Tomentella* p. pte. y especies de *Tuber*; **2) de corta distancia**, caracterizadas por una envoltura

voluminosa de hifas emanantes, sin rizomorfos, presente en *Cenococcum*, *Genea*, *Humaria*, *Sphaerosporella*, *Sphaerozone*, *Tricharina*, *Byssocorticium*, *Descolea*, *Hebeloma*, *Inocybe*, *Rozites*, *Tomentella* p. Pte y *Tylospora*; **3) de media distancia**; forman rizomorfos y se pueden dividir en tres subtipos con respecto a las características de sus rizomorfos: a) “*subtipo fringe*” hongos que forman rizomorfos “peludos” que se ramifican e interconectan repetidamente, forman hifas o hebras miceliares con contacto prolongado con el suelo, se presenta en los géneros *Amphinema*, *Dermocybe*, *Cortinarius*, *Entoloma*, *Lyophyllum*, *Piloderma* y *Tricholoma* p. Pte; b) “*subtipo mat*” estos hongos forman tramas de las hebras miceliares con cierta especialización que pueden ocupar grandes áreas, aunque las micorrizas individuales ocupan rangos limitados de exploración y poseen rizomorfos indiferenciados, los géneros conocidos son *Bankera*, *Boletopsis*, *Gautieria*, *Geastrum*, *Gomphus*, *Hydnellum*, *Hysterangium*, *Phellodon*, *Piloderma*, *Ramaria* y *Sarcodon* c) “*subtipo smooth*” con rizomorfos interiormente indiferenciados, o poco diferenciados, con un núcleo central de hifas gruesas y un manto bastante liso con casi ninguna o sólo unas cuantas hifas emanantes, con rizomorfos de tipo B, C, D y excepcionalmente de tipo E (según Agerer 1988), este subtipo se presenta en al menos algunas especies de *Albatrellus*, *Amanita*, *Gomphidius*, *Lactarius* p. pte., *Polyporoletus*, *Thaxterogaster*, *Thelephora*, *Tomentella* p. pte, y *Tricholoma* p. pte ; **4) de larga distancia**, se caracteriza por ectomicorrizas suaves con pocos rizomorfos muy diferenciados de tipo F (según Agerer 1991) con mayor rango de longitud, se propaga en el suelo hasta varios decímetros, se presentan los géneros *Boletus*, *Chamonixia*, *Gyrodon*, *Gyroporus*, *Leccinum*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Escleroderma*, *Suillus*, *Tricholoma* p. pte, *Tylopilus* y *Xerocomus*; y **5)**

Pick-a-back, forman ectomicorrizas típicas de exploración de contacto o exploración de distancia media y subtipo suave, este tipo de exploración es típico de la familia Gomphidiaceae, aunque las especies de *Gomphidius* y *Chroogomphus* forman ectomicorrizas típicas que pueden crecer dentro de rizomorfos y/o mantos de *Suillus* y *Rhizopogon*. Los HEM que presentan este tipo de exploración pueden formar ectendomicorrizas produciendo haustorios en las células corticales de la raíz, en asociación con otras ectomicorrizas y tienden a formar rizomorfos tipo D (según Agerer 1991).

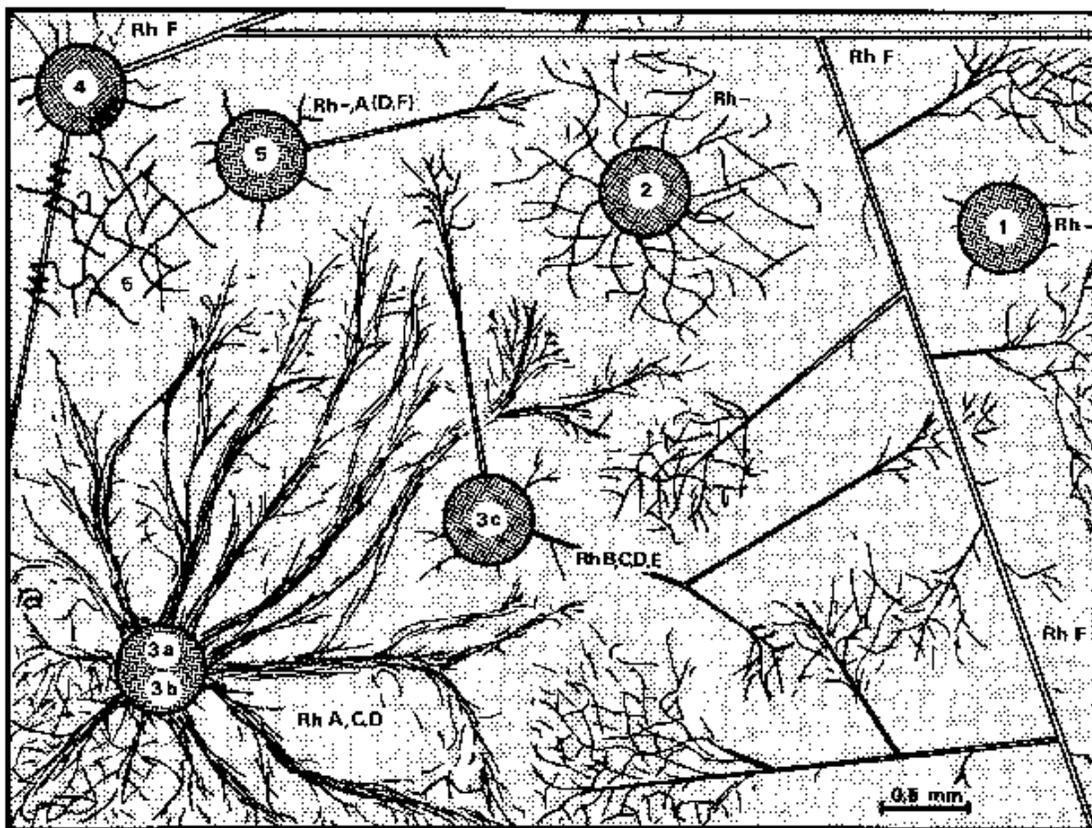


Figura. 3 Dibujos esquemáticos de diferentes estrategias de exploración, representadas por cortes transversales de ectomicorrizas y el micelio extramatricial. 1) Exploración de contacto, 2) exploraciones de corta distancia, 3) a, b exploración de franjas de media distancia y exploración de mediana distancia, exploración de 3c de media distancia, 4) exploraciones de larga distancia, 5) exploraciones de pick-a-back, mostradas como micorrizas y Como hifas del suelo en contacto e intrusión en rizomorfos y ectomicorrizas de una exploración de larga distancia tipo ectomicorriza. Todas las figuras son a escala (Rh rhizomorph, - rhizomorph que carece, A-F organización tipos de rizomorfos según Agerer 1987-1998, 1991a) (En: Agerer 2001).

Dada la amplia gama de posibles estrategias de exploración existente en ectomicorrizas, podría ser funcionalmente relevante el grado de diferenciación o especialización estructural de los micelios y rizomorfos producidos por las diversas especies de HEM asociadas a las plantas. Parece haber una relación entre la distancia y la diferenciación interna de los rizomorfos, siendo los más lejanos al manto, los más diferenciados (Raidl 1997).

En este sentido, se ha observado que algunas ectomicorrizas pueden utilizar más de una estrategia de exploración. En un extremo, la superficie del manto o algunas hifas cortas proporcionan exploración de contacto con el sustrato, mientras en otro extremo se producen rizomorfos altamente especializados de tipo F (Agerer 1988, 1991d; Brand 1989; Brownlee *et al.* 1983), constituidos de hifas que asemejan un haz vascular, con septos parcial o completamente disueltos, de manera que disminuye la resistencia al flujo de solución como en los elementos de los vasos de angiospermas, lo que podría implicar eficiencia para la exploración a larga distancia, como se ha observado en *Suillus bovinus* (Brownlee *et al.* 1983).

Independientemente del tipo de exploración utilizado por las ectomicorrizas, las hifas más alejadas son mucho más delgadas que las demás hifas miceliarias y generalmente se encuentran adheridas a las partículas de suelo (Raidl 1997), parecen ser hidrofílicas (Unestam & Sun 1995; Raidl 1997) y muy probablemente son las responsables de la toma de agua y nutrientes (Cairney & Burke 1996). Mientras que las hifas cercanas al manto y las rizomórficas son relativamente hidrófobas (Unestam & Sun 1995), por lo que los rizomorfos permiten que hifas hidrofílicas especializadas tomen el agua desde sitios más alejados.

La distribución de la biomasa de hifas es diferente en cada tipo de exploración realizado. Se ha sugerido que la toma y transporte de sustancias se realiza exclusivamente por micelio distribuido en el suelo, especialmente por las partes más lejanas de las hifas rizomórficas (Raidl 1997; Unestam & Sun 1995), mientras que el manto funciona como un bloqueo hacia el exterior dedicado únicamente al almacenamiento e intercambio entre los simbioses. En el caso de la exploración de contacto, las hifas se concentran en el manto, siendo evidente durante la formación de las ectomicorrizas, ya que todo tipo de exploración comienza su desarrollo (establecimiento) con exploración a corta distancia, (Raidl 1997; Smith & Read 2000).

Agerer *et al.* (2000) encontraron que especies de los géneros *Lactarius* y *Russula* poseen mayor capacidad para producir fenoloxidasas extracelulares. Dado que la mayoría de las especies de *Lactarius* y *Russula* exploran el sustrato por contacto con hifas hidrofílicas, la capacidad de degradar la lignina debería aumentar su acceso al Nitrógeno por degradación de sustancias fenólicas (Kuiters 1990), compensando así, su incapacidad para explorar grandes volúmenes de suelo, por el contrario, las ectomicorrizas con estrategia de exploración a larga distancia son hidrófobas en sus partes cercanas y su adquisición de nutrientes parece estar limitada a las hifas de exploración o adhesión al sustrato, compensando su incapacidad para degradar la lignina cubriendo una mayor área superficial y un mayor rango de dispersión.

El beneficio de las ectomicorrizas depende tanto de la humedad del suelo como de los gradientes de humedad que ocurren en función de la precipitación, la

evaporación, la conductividad del agua edáfica y la competencia por el recurso hídrico (Letho & Zwiazek 2010). Así mismo, la ectomicorriza puede afectar tanto la ruta del agua que se encuentra en el suelo y se dirige a la superficie de absorción de las raíces como la ruta del agua que ha entrado a la raíz micorrizada (Letho & Zwiazek 2010).

3.3.2.1. La ruta del agua en las raíces micorrizadas

Una vez que el agua ha entrado a la raíz, debe pasar por los tejidos epidérmicos y corticales antes de llegar al xilema. Este flujo radial de agua puede seguir **1) la vía apoplástica** fuera de los protoplastos, a través de las paredes celulares y los espacios intercelulares, o **2) la vía célula a célula**; el transporte de agua de célula a célula puede tener lugar a través de *a) la vía simplástica*, usando conexiones plasmodesmáticas o *b) la vía transmembranal*, a través de las membranas plasmáticas (Steudle y Peterson 1998).

El transporte de agua desde el suelo hasta la estela de la raíz puede ocurrir por cualquiera de las rutas descritas anteriormente. Tanto en hongos ectomicorrícicos y micorrizas, como en el tejido de la raíz, las vías posibles son apoplástica y célula a célula.

Duddridge *et al.* (1980) concluyeron que el transporte de agua a través del micelio ocurre por vía apoplástica, y Muhsin & Zwiazek (2002) atribuyeron el aumento de la conductancia hidráulica de las raíces de olmo americano ectomicorrizado al transporte por vía apoplástica y no a la vía célula a célula.

Se ha inferido que las propiedades hidrófobas e hidrófilas de las paredes celulares de los HEM pueden modificar las propiedades de transporte hídrico de los micelios externos (Unestam 1991, Unestam y Sun 1995) y que los hongos hidrófilos, como muchas especies de *Laccaria*, *Lactarius*, *Russula* y *Hebeloma*, pueden transportar agua en el apoplasto de la hifa. Por el contrario, los hongos hidrófobos, como *Paxillus involutus* y especies de *Suillus*, forman líneas miceliales complejas para transportar el agua en el simplasto (Letho & Zwiazek 2010).

La aportación de las rutas de transporte de agua puede variar en el cortex radical (Steudle y Peterson 1998), puesto que la conductancia del apoplasto depende en gran medida de la conductancia en las paredes celulares, y sus propiedades son modificadas por la presencia de las hifas colonizadoras en las raíces micorrizadas. Si bien, las diferencias en el grado de modificación de las paredes celulares vegetales y fúngicas dependen del tipo de la simbiosis (Smith y Read 1997), al menos en algunos casos el espacio intercelular en la red de Hartig no consiste en distintas paredes celulares vegetales y fúngicas, sino en una matriz comunal (Nylund 1987).

Teniendo en cuenta estas modificaciones, el movimiento simplástico dentro de las hifas puede proveer una ruta adicional para el movimiento del agua en el cortex de las raíces colonizadas (Reid 1979). Sin embargo, el agua debe moverse antes en el simplasto de las hifas externas individuales que absorben agua del suelo y éstas, no necesariamente son de mayor conductancia al agua que el suelo (Weatherley 1982). Por tanto, la ruta simplástica del agua a través del cortex podría presentar más resistencia en las micorrizas, ya que el agua tendría que atravesar la

membrana hifal, además de las membranas de las células corticales, puesto que no hay conexión simplástica entre células fúngicas y vegetales (Letho & Zwiazek 2010). Ésta vía de transporte sería de menor conductancia si se compara con el agua que se mueve en el apoplasto o simplasto de las células radicales.

En este sentido, Marjanović *et al.* (2005) demostraron una relación entre el aumento de la conductividad hidráulica de las raíces de plántulas de álamo híbrido ectomicorrizadas con *Amanita muscaria* y el aumento en la expresión de acuaporinas de la raíz, lo que sugiere que la función de las acuaporinas podrían modificar la permeabilidad de la membrana y las micorrizas a su vez, podrían alterar la vía célula a célula a través de los efectos sobre la expresión de las acuaporinas de la planta (Lee *et al.* 2010). Siendo más importante (al menos en algunos casos) la señalización química producida por la colonización del HEM en la planta la que incide en la conductividad hidráulica de las raíces que la penetración de las hifas en la corteza radicular (Letho & Zwiazek 2010).

3.3.3. Hongos ectomicorrícicos

Actualmente, se estima que existen al menos 5500 especies de hongos ectomicorrícicos en el mundo, de los cuales, la gran mayoría son basidiomicetes y ascomicetes (Smith & Read 2000; Brundrett 2002; Futai *et al.* 2008). Se distribuyen principalmente en bosques boreales, alpinos y templados (Read & Smith 2000; Brundrett 2002). En México, son abundantes en masas forestales de *Pinus* y *Abies* (Brundrett 2002; Rzedowski 1978).

Los hongos que forman asociaciones ectomicorrícicas son macromicetes; un grupo artificial de organismos (de los Phyla Basidiomycota y Ascomycota), cuya

característica distintiva es el desarrollo de aparatos esporíferos y/o cuerpos fructíferos macroscópicos (Jiménez 1998). Son hongos miceliares que presentan una fase somática, con potencial de crecimiento y diferenciación. El micelio coloniza el sustrato y lo degrada, absorbiendo y acumulando los nutrimentos necesarios para su crecimiento y para el posterior desarrollo de los nuevos cuerpos fructíferos (Jiménez 1988; Herrera y Ulloa 2003).

3.3.3.1. *Lactarius deliciosus* (Fr.) S. F. Gray var. *deliciosus*

Píleo de 5-14 cm de ancho, en un principio ampliamente convexo con un disco deprimido, margen muy enrollado, densamente pruinoso pero desnudo, con la edad. Píleo ampliamente infundibuliforme y el margen ondulado. Superficie viscosa cuando húmeda, carne rojiza pruina y por debajo delicadamente reticulada. De lo contrario, desnudo, los colores naranja aleonado y/o tonos vináceos de color marrón con salmón pruinoso, manchas cerca del margen, generalmente verdes, a veces fusionadas de 1 - 3 mm de ancho, en ocasiones un poco de glaseado de cuero marrón. Contexto rígido al principio, después frágil, crema-amarillo (en píleo) con un ligero olor a fruta. **Láminas** muy juntas, adnadas - decurrentes, estrechas y de color amarillo – naranja pálido, sin brillo verde en la herida. **Estípites**. 3 - 7 cm de largo X $\pm 1 - 2.5$ cm de espesor, hueco y quebradizo, micelio blanco en la base, claramente pruinoso, a menudo escrabiculado oscuro-glaseado, claramente hundido, más pálido en el ápice, verde manchado con moderación. **Esporada** de color crema brillante, en un primer momento con un tono carne. **Esporas** 7-9 X 6-7 μ , con verrugas diminutas, y las bandas que forman un retículo parcial. **Hábitat y**

distribución. En bosque de coníferas, especialmente pinos, a finales de verano y otoño, en Europa (Hesler & Smith 1979).

La taxonomía de la especie es poco clara, pues se han descrito un buen número de variedades, sin poder llegar a una descripción general, sin embargo, tanto en Europa como en Norte América se sigue nombrando como *Lactarius deliciosus* var. *deliciosus*. y/o *Lactarius deliciosus sensu lato* (Hesler & Smith 1979) (Figura 4).



Figura 4. Carpóforo de *Lactarius deliciosus*.

3.4. Nanotubos de Carbono (CNTs)

El carbono puro puede encontrarse en la naturaleza en formas distintas; las más comunes son el carbono amorfo y el carbono cristalino (Popov & Lambin 2006). En el grafito, los átomos de carbono se acomodan formando capas apiladas, en las que cada átomo está rodeado por otros tres en un arreglo en forma de panal de abejas. Una sola capa de grafito es muy estable, fuerte y flexible, pero entre capa y capa la adhesión es muy débil. (Popov & Lambin 2006; Takeuchi 2009). Por otro lado, el

arreglo molecular del carbono amorfo es muy parecida al grafito, pero no llega a adoptar una estructura cristalina perfecta.

Los nanotubos de carbono son estructuras cilíndricas de carbono cristalino, con diámetros nanométricos formadas al enrollar una lámina de grafito llamada grafeno. El grafeno es considerado el material más fuerte jamás estudiado, de manera que los nanotubos de carbono son sumamente resistentes y flexibles (Takeuchi 2009).

Actualmente, debido a las características físicas y químicas únicas de los nanotubos de carbono, se ha extendido su aplicación en diferentes campos de la industria y la ciencia; como la óptica, la electrónica, las ciencias materiales, la biología y la medicina (Trojanowicz 2006). En el ámbito biomédico, los nanotubos de carbono han sido ampliamente utilizados como biosensores, en el reconocimiento de antígenos y de reacciones enzimáticas, como vehículos de fármacos y de administración de vacunas (Trojanowicz 2006; Lui *et al.* 2013).

La expansión en su uso, ha originado un debate sobre el efecto tóxico de los nanotubos de carbono en los sistemas biológicos. Algunas investigaciones han informado de efectos tóxicos en varios tipos de células a la exposición tanto de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) como nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), mientras que otros muestran respuestas celulares bajas o insignificantes (Chen *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2008). Esta inconsistencia podría explicarse por muchos factores que pueden influir en la toxicidad de CNTs, como la carga de la superficie y la modificación, forma, longitud, aglomeración, o número de capas y la concentración (Lui *et al.* 2013).

Sin embargo, los recientes descubrimientos sobre los efectos únicos de materiales nanométricos en la célula vegetal y en toda la planta, ha promovido un aumento del uso de nanomateriales en biotecnología vegetal, manejo de cultivos, producción de plantas para uso no alimentario, y la industria de los biocombustibles (Khodakovskaya *et al.* 2013).

3.4.1. Efecto de los nanotubos de carbono en el crecimiento vegetal

Algunos autores han reportado efectos benéficos dramáticos de los CNTs en la germinación y el crecimiento vegetal.

En semillas y plantas de tomate estériles en medio MS suplementado con concentraciones de 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs, Khodakovskaya *et al.* (2009). concluyeron que los MWCNTs aceleran el proceso de germinación de la semilla y acortan significativamente el tiempo de germinación. Las semillas se crecieron en el medio a las mismas concentraciones y mostraron un dramático aumento de 2.5 veces en la biomasa, en comparación plantas cultivadas sin MWCNTs.

En el caso de semillas y plantas de mostaza (*Brassica juncea*) que se expusieron a varias concentraciones de MWCNTs en estado oxidado y no oxidado, observaron que los MWCNTs activan la maquinaria de absorción de agua en los tejidos radicales y que fomentan la germinación, la acumulación de peso seco y la longitud tanto en la raíz como en el tallo a concentraciones de O-MWCNTs 2.3×10^{-3} mg/mL y MWCNTs 23×10^{-3} mg/mL , sobre todo cuando los nanotubos se oxidaron. Además, que los MWCNTs y O-MWCNTs penetran las semillas y las células de la raíz y que pueden ser transportados a través del cilindro vascular de las plantas de mostaza (Modal *et al.* 2011).

Mientras que cultivando células de plantas de tabaco en medio MS adicionadas con diferentes concentraciones de MWCNTs (0.1, 5, 100, y 500 $\mu\text{g/ml}$) durante un mes, Khodakovskaya *et al.* (2012), observaron que el crecimiento celular y la biomasa fresca y seca de las células cultivadas con MWCNTs aumentó significativamente con respecto al control.

Asimismo, los MWCNTs mostraron efectos beneficiosos en plántulas de trigo cuando las semillas fueron germinadas en solución de O-MWCNTs. A concentraciones de 40, 80, y 160 $\mu\text{g/mL}$ los O-MWCNTs fomentan significativamente el crecimiento radical y la biomasa en plántulas de 7 días. También, la actividad de la deshidrogenasa y la elongación radical de las plántulas expuestas a 80 $\mu\text{g/mL}$ de O-MWCNTs aumentó significativamente (1.4 veces) con respecto al control (Wang *et al.* 2012).

Smirnova *et al.* (2012) estudiaron el efecto de un carbón industrial constituido por MWCNTs sobre el crecimiento de la leguminosa *Onobrychis arenaria* y concluyeron que a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ y 1,000 $\mu\text{g/mL}$ se estimula significativamente el crecimiento de raíces y tallos; incrementando en estos tejidos la actividad de la preoxidasa. También encontraron MWCNTs en los tejidos, lo que sugiere que los MWCNTs son capaces de penetrar las paredes celulares, acumularse en las raíces y translocarse a las hojas.

Khodakovskaya *et al.* (2013), también observaron efectos benéficos de los MWCNTs, sobre plantas de tomate cultivadas en suelo, así como la translocación de MWCNTs hacia otros tejidos vegetales, como flores y frutos. Las plantas adicionadas con MWCNTs a concentraciones de 50 y 200 $\mu\text{g/mL}$ tuvieron

significativamente mayor crecimiento en altura, número de flores y frutos con respecto al control sin MWCNTs.

Varios autores han demostrado experimentalmente que los nanotubos de carbono promueven el crecimiento y desarrollo vegetal, además de que pueden ser absorbidos por la raíz de las plantas y traslocados a estructuras de la parte aérea. Sin embargo, el mecanismo por el que los nanotubos promueven cambios fisiológicos en las plantas y logran penetrar paredes y membranas celulares ha sido poco estudiado. Aunque la capacidad de las nanopartículas para generar estos cambios fisiológicos y penetrar en las células vegetales ha generado interés en su uso para producción de plantas de uso no alimentario y en la posibilidad de utilizar nanopartículas como transportadores inteligentes para la entrega de tratamientos (Liu *et al.* 2009).

3.4.2. CNTs en los mecanismos celulares

Se han observado experimentalmente que tipos específicos de nanopartículas en dosis bajas son capaces de activar los procesos fisiológicos de las plantas. Por ejemplo, de mejorar el crecimiento a través de la activación de la fotosíntesis (Fengqing *et al.* 2006), promoción del crecimiento de raíces (Lin & Xing 2007) y afectar la expresión de genes que son esenciales para la división celular y el desarrollo de la planta, así como activar la expresión de acuaporinas en plántulas de tomate cultivadas en medio de agar estéril suplementado con nanotubos de carbono (Villagarcia *et al.* 2012).

El mecanismo de cómo los nanotubos pueden desencadenar la expresión de genes específicos está lejos de dilucidarse y requiere nuevas experimentaciones, teniendo

en cuenta el origen, tamaño, forma y otras propiedades de los nanotubos de carbono que pudieran modificar los efectos biológicos de tales materiales. Sin embargo, existen hipótesis sobre el mecanismo de penetración de los nanotubos de carbono en las células, su destino dentro de ellas y algunas implicaciones de su transporte y translocación a otras partes de la planta.

Liu *et al.* (2009) expusieron células intactas de *Nicotiana tabacum* cultivadas en medio de cultivo a nanotubos de carbono de pared simple menores a 500 nm y marcados con colorante FICT para probar que los nanotubos de carbono de pared simple tienen la capacidad de penetrar la pared y membrana celular. Después de incubar los cultivos celulares, observaron mediante microscopía de fuerza atómica y microscopía confocal aglomeraciones de nanotubos de carbono de pared simple en el interior de las células. Y demostraron que los nanotubos de carbono de pared simple penetran la pared celular y logran entrar por endocitosis a la célula, para posteriormente, ser distribuidos a través de la célula por las cargas de las moléculas adheridas a éstos. Sin embargo, no logran explicar cómo entran a través de la pared celular.

Posteriormente, Serag *et al.* (2011) Intentaron nuevamente explicar el mecanismo de internalización de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) e informar sobre su distribución subcelular. Para ello, utilizaron cultivos de protoplastos de *Catharanthus roseus*, a los que adicionaron MWCNTs (de entre 50 - 500 nm de longitud y 20 – 30 nm de diámetro) marcados con fluorescein isotocinato y para posteriormente incubar los protoplastos durante tres horas. Después de la incubación, observaron que la mayoría mostraban MWCNTs fluorescentes y que la

fluorescencia aumentaba conforme aumentaba la concentración de MWCNTs. Así se demostró que los MWCNTs son capaces de penetrar la membrana plasmática y entrar en los protoplastos. Para determinar el mecanismo de entrada, tiñeron la membrana endosomal con un buen marcador para endocitosis (FM4-64) y se observó que pocos endosomas mostraron agregados de MWCNTs fluorescentes, por lo que proponen que los MWCNTs entran pasivamente a través de la membrana plasmática, sin ser atrapados por los orgánulos endosomales. Por otra parte, los MWCNTs se dirigieron a vacuolas, plastidios y núcleo, por lo que no se encontraron en organelos asociados a endocitosis. En la Figura 5, se muestra el mecanismo de internalización de MWCNTs a través de la membrana plasmática y su distribución subcelular.

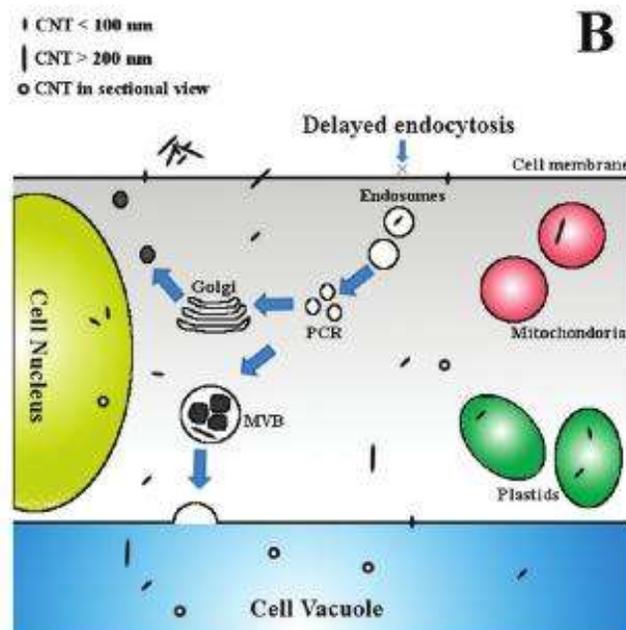


Figura 5. Modelo para la captación celular y la distribución de MWCNTs en protoplastos de *C. roseus*. La presencia de MWCNTs nanoagregados aumenta la tonicidad del medio celular. La célula responde al retrasar el ciclo de endocitosis dando una oportunidad para que los nanotubos individuales de longitudes variables penetren la membrana celular y no entren al ciclo endosomal. Tubos individuales situados en las estructuras endosomales se atribuyen a la penetración directa de sus membranas. MWCNTs < 100 nm se localizan predominantemente en el núcleo, plástidos y vacuolas, con más de tiempo de incubación, los MW-F se puede encontrar en todos los orgánulos celulares (Tomado de Serag *et al.* 2011).

En el mismo sentido, Tripathi *et al.* (2010) expusieron semillas de garbanzo a soluciones de 0, 100 y 200 μL de MWCNTs sintetizados a partir de semillas de mostaza y observaron que las semillas de garbanzo expuestas a 100 y 200 μL tuvieron mayor crecimiento y ramificación en tallo y raíz que los controles. A su vez, las plantas expuestas a MWCNTs lograron absorber mayor cantidad de agua. A partir de estos resultados, observaron mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión que los MWCNTs tienen la capacidad de penetrar la pared y membrana celular de la raíz de garbanzo.

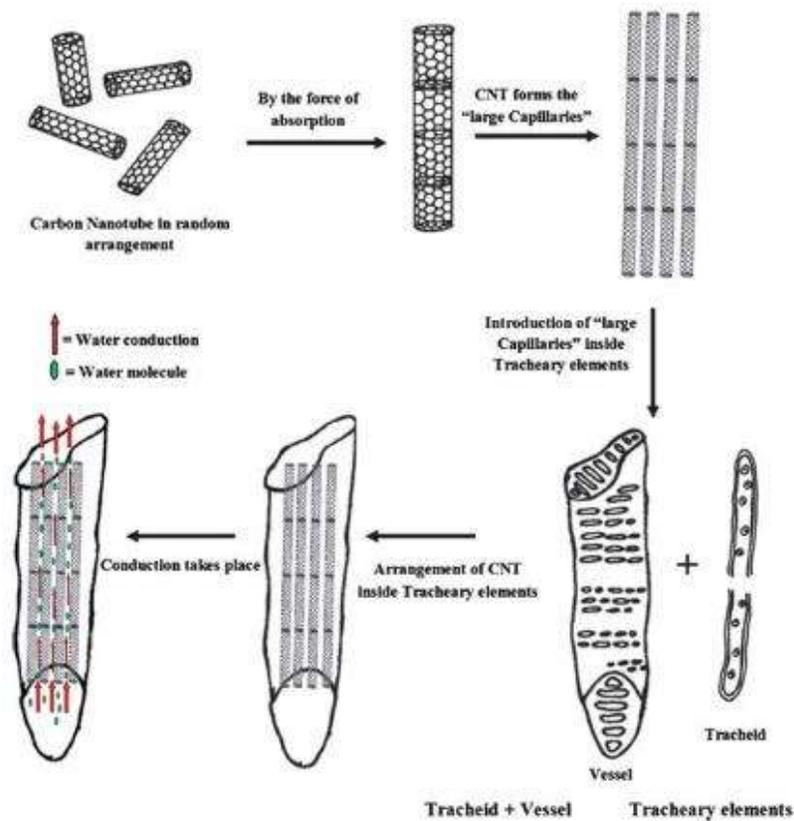


Figura 6. Diagramas esquemáticos de alineación de MWCNTs raíces en el interior. (Tomado de Tripathi *et al.* 2010).

Una vez dentro, los MWCNTs se apilan longitudinalmente uno sobre otro hasta formar tubos largos que entran en el interior del lumen, formando nuevos capilares

que aumentan la absorción de agua y el flujo natural de la planta. Concluyen, que el agua no sólo ocupa estos canales para agua, sino que podrían acelerar el transporte molecular a través del xilema. En la Figura 6, se presenta el mecanismo de alineación de los MWCNTs en la raíz.

3.4.3. MWCNTs producidos a partir de materiales vegetales

A través de varias investigaciones se han logrado sintetizar nanotubos de carbono de pared múltiple utilizando materiales vegetales, como fibra de madera y semillas de mostaza, procesada a bajas temperaturas (240 °C), así como oxidación continua y cíclica (Goodell *et al.* 2008; Tripathi *et al.* 2010) . Los nanotubos producidos a través de estos procesos fueron caracterizados y su diámetro interior fue de aproximadamente 4-5 nm, su diámetro exterior varió de 10 nm a 20 nm (Goodell *et al.* 2008; Xie *et al.* 2009; Tripathi *et al.* 2010; Lara-Romero *et al.* 2011).

4. HIPÓTESIS

Bajo condiciones de estrés hídrico, la adición de *Lactarius deliciosus* y Nanotubos de Carbono de pared múltiple (MWCNTs) a plantas de *Pinus patula* de diferentes procedencias altitudinales, presentará un efecto positivo incrementando la biomasa y sobrevivencia de las plantas expuestas a dosis alta de nanotubos de carbono y procedencias de menor altitud.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la sobrevivencia, crecimiento y biomasa en plántulas de *Pinus patula* de distintas procedencias, sometidas a estrés hídrico y adicionadas con nanotubos de

carbono de pared múltiple (MWNCTs) e inóculo de *Lactarius deliciosus*, solos y/o en interacción.

5.1. Objetivos particulares

- Evaluar la contribución de *Lactarius deliciosus* y Nanotubos de Carbono (MWCNTs), solos o en interacción sobre la supervivencia, crecimiento, biomasa y colonización en plantas de *Pinus patula* bajo condiciones de capacidad de campo y de estrés hídrico.
- Conocer el efecto de la interacción *Lactarius deliciosus* y Nanotubos de Carbono (MWCNTs) en dos concentraciones, en plantas de *Pinus patula*.
- Comparar la respuesta ecofisiológica de *Pinus patula* de tres diferentes condiciones altitudinales, inoculadas con *Lactarius deliciosus* y adicionadas con Nanotubos de Carbono.
- Determinar en plántulas de *Pinus patula* el estatus de los componentes en interacción en el sistema.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño experimental

El diseño experimental se ajustó a un modelo de bloques al azar con parcelas divididas y diseño factorial, en donde se establecieron 20 plantas por tratamiento y 12 tratamientos por procedencia. Los tratamientos consistieron en la inoculación del HEM *Lactarius deliciosus* y la adición de dos diferentes concentraciones de nanotubos de carbono, solos y en interacción. Seis de los tratamientos se mantuvieron bajo condiciones de estrés hídrico. Dos de los tratamientos se mantuvieron sin inocular y uno de ellos se utilizó como control absoluto (Tabla 1).

El ensayo permaneció 10 meses en condiciones de casa de sombra en el Centro de Investigaciones en Ecosistemas (Cieco), UNAM, campus Morelia.

Tabla 1. Combinaciones de Nanotubos de carbono, hongo ectomicorrícico y niveles de humedad para el establecimiento de los tratamientos (CC1: sin estrés hídrico, CC0: estrés hídrico).

TRATAMIENTOS		Condiciones de riego
1	<i>Pinus patula</i>	CC1
2	<i>P. patula</i> + MWCNT ₃₀	
3	<i>P. patula</i> + MWCNT ₆₀	
4	<i>P. patula</i> + <i>Lactarius deliciosus</i>	
5	<i>P. patula</i> + MWCNT ₃₀ + <i>Lactarius deliciosus</i>	
6	<i>P. patula</i> + MWCNT ₆₀ + <i>Lactarius deliciosus</i>	
7	<i>Pinus patula</i>	CC0
8	<i>P. patula</i> + MWCNT ₃₀	
9	<i>P. patula</i> + MWCNT ₆₀	
10	<i>P. patula</i> + <i>Lactarius deliciosus</i>	
11	<i>P. patula</i> + MWCNT ₃₀ + <i>Lactarius deliciosus</i>	
12	<i>P. patula</i> + MWCNT ₆₀ + <i>Lactarius deliciosus</i>	

6.2. Montaje del experimento

6.2.1. Obtención y preparación del inóculo

Los cuerpos fructíferos de la especie *Lactarius deliciosus* fueron colectados en las plantaciones forestales y bosques de Yoricostio, Mpio. de Tacámbaro, Michoacán por la Asociación de Recolectores de Hongos de Yoricostio, la Villita S. C. de R. L.

Con base en que la mayor concentración de esporas se encuentra en las láminas, se cortó el estípite de los carpóforos y se conservaron exclusivamente los píleos,

los cuáles se refrigeraron a 4° C. Los píelos se colocaron en un deshidratador eléctrico para su deshidratación a 35° C, ya que a mayor temperatura las esporas pierden su viabilidad (Brundrett *et al.* 1996). Finalmente, los píelos deshidratados de cada especie se molieron en un molino para tejidos vegetales Thomas Scientific Modelo 800-345.2100 y el inóculo final obtenido se almacenó en tubos falcon de 80 mL a una temperatura de 4° C (Figura 7).



Figura 7. Deshidratación, molido y almacenamiento de carpóforos de *Lactarius deliciosus*.

Para determinar la concentración de esporas del inóculo, se diluyó 1g de inóculo en 1 L de agua destilada. Posteriormente, se cuantificó el número de esporas presentes en 20µL, por medio de un lente de 40x de un microscopio LEICA DM750. El porcentaje de viabilidad de esporas se determinó mediante la técnica de Levitz y Diamond. (1985), con sales de tetrazolium. De esta manera, se estableció la dilución necesaria para la inoculación de las plantas con esporas viables (Figura 8).

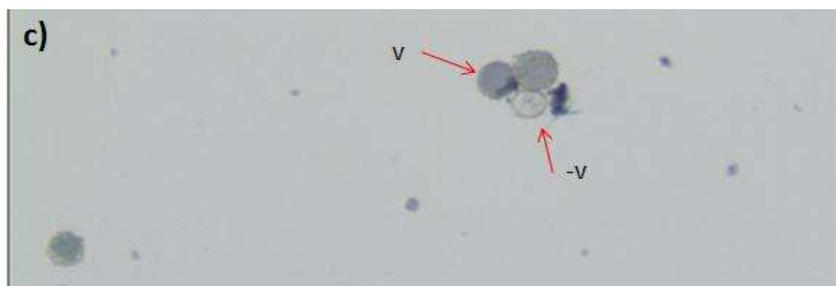


Figura 8. Esporas de *Lactarius deliciosus* teñidas con sales de tetrazolium. (v) viables e (-v) no viables.

6.2.2. Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de *Pinus patula* colectadas en el estado de Oaxaca, México. Fueron desinfectadas en una solución de Hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% durante 30 minutos en agitación, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril durante 10 minutos y se colocaron en cajas de Petri sobre papel filtro húmedo para su estratificación durante 15 días a 4°C (Viveros 2009). Pasados los 15 días de estratificación, las cajas de Petri con las semillas fueron trasladadas a una cámara de crecimiento Lumistell ICP-18, para su germinación. Se mantuvieron a 22 ± 1 °C con un fotoperiodo de 12 hr luz/12 hr oscuridad. Las semillas pre-germinadas fueron sembradas en semilleros con sustrato estéril de turba y agrolita en proporción 1:1. Se mantuvieron en los semilleros hasta el montaje del experimento (Figura 9)

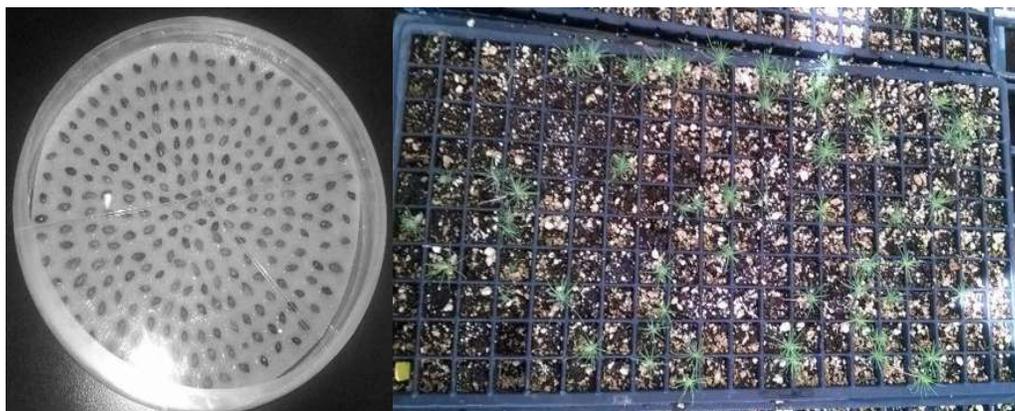


Figura 9. Semillas de *Pinus patula* en pregerminación en caja de Petri, para su posterior trasplante a semilleros de polietileno en sustrato turba-agrolita 1:1.

6.2.3. Siembra e inoculación

Las plántulas fueron trasplantadas a tubetes de polietileno con capacidad para 1L de suelo de polvilla regado a capacidad de campo (Figura 10). Las plantas se inocularon 30 días después del trasplante directamente sobre la raíz y a manera de

riego, se inocularon con 1×10^6 esporas por planta. Las plantas permanecieron en condiciones de casa de sombra durante 10 meses posteriores a la inoculación y fueron cosechadas para su evaluación durante el mes de diciembre del 2015.



Figura 10. Trasplante y montaje del experimento.

6.2.4. Adición de MWCNTs

Quince días después de la siembra se adicionaron los nanotubos de carbono de pared múltiple a los 8 tratamientos planteados en el diseño experimental con dos diferentes concentraciones; 30 y 60 μg por planta a manera de riego.

6.3. Riego necesario para inducir estrés por déficit hídrico

Para determinar el riego necesario que provoca estrés hídrico en las plántulas de *Pinus patula*, se planteó un experimento con 12 repeticiones. Se midió un litro de suelo de polvilla, se pesó y depositó en un tubete de polietileno negro. Posteriormente, se regó el suelo con 500 mL de agua y fue pesado nuevamente. El agua no retenida fue almacenada para su medición. Por último, se sembró una

plántula de *Pinus patula* en cada tubete. Los tubetes fueron pesados diariamente para determinar el peso del agua perdida por tubete y se observaron y fotografiaron las plantas a fin de determinar la cantidad de agua que debe evaporarse para que la plántula comience a mostrar signos de estrés hídrico.

La cantidad de riego a aplicar para los tratamientos con estrés hídrico será de 150 mL por planta y fue determinada por la siguiente ecuación, utilizando los datos obtenidos a partir del experimento de estrés hídrico.

$$H_2O \text{ retenida por el suelo (mL)} - \text{Volumen de } H_2O \text{ perdido (mL)}$$

6.4. Variables evaluadas

Las variables de crecimiento, altura, cobertura y diámetro a la altura de la base se evaluaron cada mes. Pasados 10 meses de crecimiento, se cosechó el experimento y se analizaron las siguientes variables para cada planta: altura, cobertura, diámetro a la altura de la base, biomasa, longitud y volumen radical, porcentaje de colonización, cantidad de micelio externo/gramo de suelo.

6.4.1. Altura y diámetro del tallo a la altura de la base

Se midió mensualmente por medio de un vernier. La parte aérea de la planta comprende desde la base del tallo hasta el ápice.

6.4.2. Cobertura del follaje

Por medio de un vernier se midieron mensualmente los diámetros del follaje, para determinar la cobertura mediante la fórmula de la elipse. En la que a y b son los dos semiejes de la elipse.

$$\text{Área} = \pi \cdot \text{semieje } a \cdot \text{semieje } b$$

6.4.3. Biomasa

El peso fresco se determinó por medio de una balanza analítica. Para evaluar el peso fresco de las plantas se dividirán en parte aérea y parte radical. El corte se realizará en la base del tallo, de manera que de la base del tallo hacia el ápice se tomó como parte aérea, mientras que la parte radical comprendió desde la base del tallo hasta la raíz más larga. El peso seco se determinó de igual manera, con el material previamente deshidratado en un horno marca SHELIAB a 40°C durante 48 hrs.

6.4.4. Longitud y volumen radical

Se separó la raíz de la parte aérea, a partir de la primer raíz originada. Para eliminar el suelo del sistema radical, éste se remojó durante 30 min y posteriormente fue lavado cuidadosamente con agua corriente. Una vez que el sistema de raíces estuvo libre de suelo, se procedió a escanearla, utilizando el software WinRhizo.

6.4.5. Porcentaje de colonización

El porcentaje de colonización se determinó por la técnica propuesta por Newman (1966), Tennant (1975), Giovannetti & Mosse (1980) modificada por Brundrett (2000). Las raíces se cortaron en segmentos de 1 cm de longitud y dispersados aleatoriamente en una caja de Petri de 9 cm de diámetro con cuadrícula de 1 cm². Utilizando un estereoscopio, se cuantificaron las intersecciones entre las líneas de cuadrícula y las raíces, colonizadas y no colonizadas. La colonización, determinó mediante la presencia o ausencia de puntas engrosadas y bifurcadas.

6.4.6. Extracción de micelio externo

El micelio externo en el suelo de la rizósfera se determinó con base en la técnica utilizada por Thomson *et al.* (1993) y modificada por Báez (2011), la cual se desarrolla siguiendo los siguientes pasos (Figura 11):

- 1) Se toma una muestra de suelo de la rizósfera de 2.0 g de suelo.
- 2) Se mezcla con 50 ml de agua desionizada por 20 s en licuadora.
- 3) Esta solución se pasa por un tamiz de 0.5 mm de abertura y se deja reposar por 60 s y se decanta.
- 4) Se toma la alícuota del sobrenadante y se filtra por succión en una malla de 41 μ .
- 5) El micelio retenido en la malla se tiñe con azul de tripano al 0.5% por 24 hrs y posteriormente se retiró el exceso de colorante con agua destilada.
- 6) El micelio teñido se observa y fotografía con una cámara Leica DFC 295 (versión 7.0.10), para su posterior cuantificación.

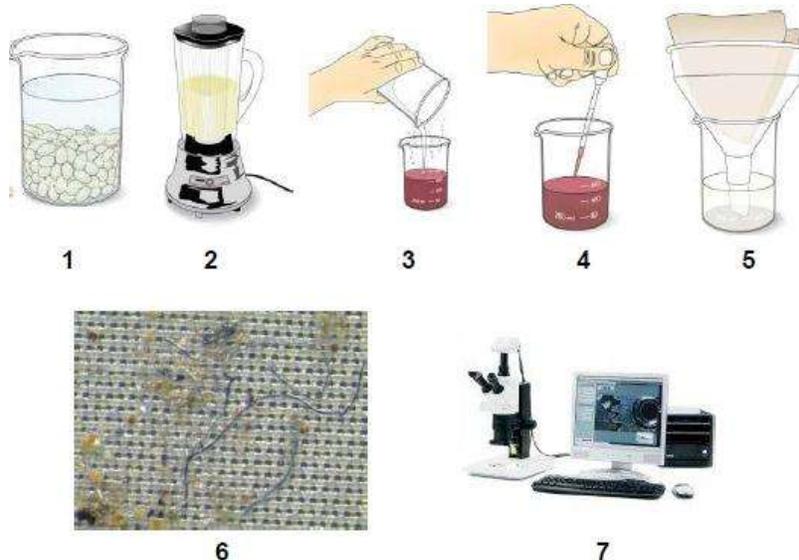


Figura 11. Esquemización de la técnica para extracción de micelio externo y sus etapas (Modificado de Baez 2011).

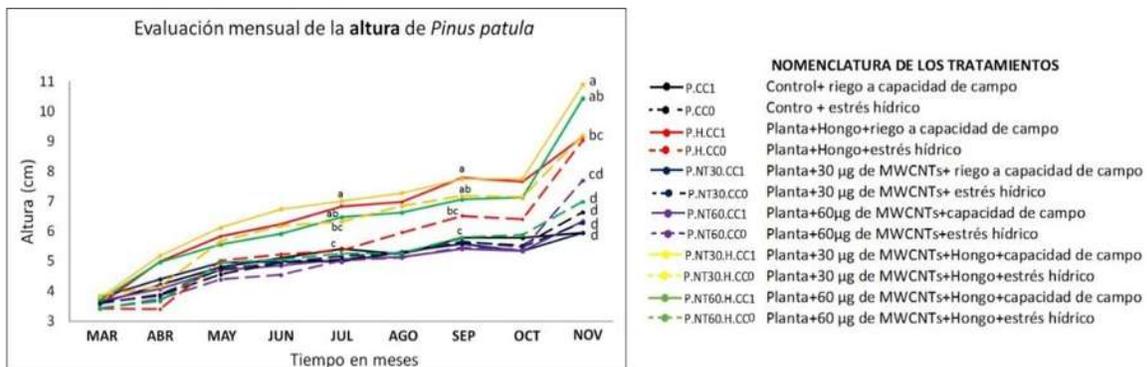
6.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis factorial y una prueba de comparación de medias LSD, para cada una de las variables evaluadas. Los paquetes estadísticos que se utilizaron fueron JMP y S-PLUS.

7. RESULTADOS

7.1. Altura

En los resultados obtenidos durante el mes de Marzo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo para el mes de Abril, se observó que los tratamientos en estrés hídrico presentaron los menores valores en altura, siendo el menor de éstos, el tratamiento inoculado con el HEM *Lactarius deliciosus* con 3.402 cm. Los valores significativamente mayores, se presentaron en los dos tratamientos regados a capacidad de campo inoculados con el HEM *Lactarius deliciosus* y adicionados con 30 y 60 µg de MWCNTs, con 5.13 y 4.98 cm respectivamente ($\alpha=0.005$) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Crecimiento en altura de *Pinus patula* durante los meses Marzo-Noviembre de 2015. Los tratamientos regados a capacidad de campo se muestran en líneas continuas y los expuestos a estrés hídrico, en líneas punteadas. Niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Del mes de Abril al mes de Mayo, se observó un crecimiento importante en plantas de todos los tratamientos inoculados con el HEM *Lactarius deliciosus*,

independientemente del riego al que fueron sometidas. Sin embargo, solamente fueron significativamente mayores al control absoluto ($\alpha=0.005$), las plantas de los dos tratamientos con riego a capacidad de campo inoculados con el HEM *Lactarius deliciosus* y adicionados con 0 y 30 μg de MWCNTs respectivamente.

A partir del mes de Agosto y hasta Octubre, se observó que los tratamientos inoculados y adicionados con 30 y 60 μg de MWCNTs, solos y en interacción produjeron los mayores valores en las plantas regadas a capacidad de campo, mientras que las sometidas a estrés hídrico, respondieron mejor a los tratamientos con inoculación y adición 30 μg de MWCNTs solos y en interacción, puesto que no fueron significativamente diferentes a las plantas que presentaron mayor crecimiento en altura regadas a capacidad de campo (Gráfica 1).

En noviembre se observó que las expuestas a estrés hídrico e inoculadas con el HEM *Lactarius delicicosus* y adicionadas con 0 y 30 μg de MWCNTs son significativamente más altas que las utilizadas como control absoluto y las adicionadas con MWCNTs sin inoculación. Por lo tanto, se observa que tanto la inoculación con el HEM como la adición de 30 μg de MWCNTs están revirtiendo el efecto negativo del estrés hídrico en las plantas de *Pinus patula* (Gráfica 1).

En la Tabla 2. Se observa que tanto la inoculación del HEM como la adición de MWCNTs afectan directamente la altura de las plantas de *Pinus patula*.

Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) aplicado a la altura de *Pinus patula* evaluado a los tres meses de aplicado el tratamiento. Considerando los factores hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* (HONGO), dos diferentes condiciones de riego (RIEGO), tres diferentes concentraciones Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple (MWCNTs) y tres distintas procedencias altitudinales de la semilla.

****Análisis de Varianza****

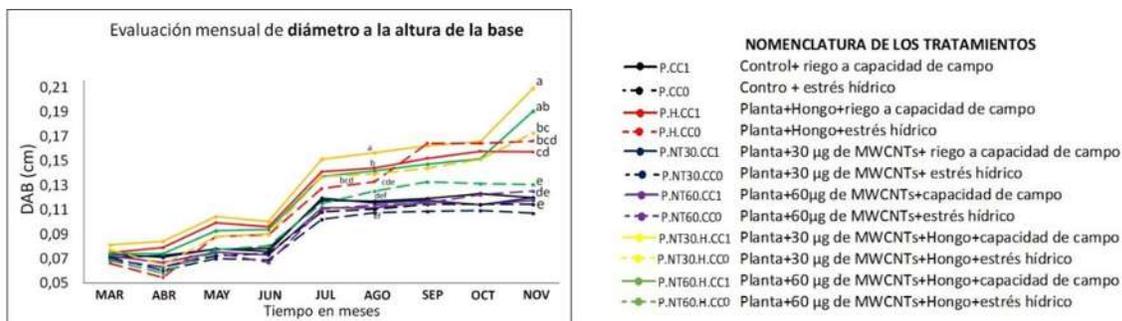
	GL	SC	Valor F	Pr (F)
HONGO	1	384.708	61.5174	0.0000
RIEGO	1	18.356	2.9354	0.0275
MWCNTs	2	2.479	0.1982	0.5160
HONGO*RIEGO	1	71.803	11.4819	0.0008
HONGO*CNTs	2	48.443	3.8732	0.0336
RIEGO*CNTs	2	8.411	0.6727	0.3431

7.2. Diámetro del tallo a la altura de la base

Desde el mes de Marzo y hasta Noviembre, se observó que los tratamientos inoculados con el HEM *Lactarius deliciosus* adicionados con 30 µg de MWCNTs con riego a capacidad de campo y en estrés hídrico, fomentaron significativamente ($\alpha=0.005$) el engrosamiento del tallo con respecto al control absoluto y los demás tratamientos sometidos a estrés hídrico (Gráfica 2).

Mientras que en el mes de Abril, se observó un evidente efecto del estrés hídrico sobre todas las plantas sometidas a éste, pues las medias de todos los tratamientos en estrés hídrico decrecieron, efecto que podría deberse tanto a la pérdida de turgencia, como a la mortandad de plantas con tallos más gruesos (Gráfica 2).

En las plantas regadas a capacidad de campo no se observaron efectos negativos y el tratamiento que fomentó significativamente el crecimiento del tallo a la altura de la base con respecto al control absoluto (0.0722 cm), fue el tratamiento inoculado con el HEM *Lactarius deliciosus* adicionado con 30 µg de MWCNTs (0.0918 cm) ($\alpha=0.005$), seguido del tratamiento inoculados con el HEM *Lactarius deliciosus* adicionado 60 µg de MWCNTs regados también a capacidad de campo (Gráfica 2).



Gráfica 2. Crecimiento en diámetro a la altura de la base del tallo de *Pinus patula* durante los meses Marzo-Noviembre de 2015. Los tratamientos regados a capacidad de campo se muestran en líneas continuas y los expuestos a estrés hídrico, en líneas punteadas. Niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

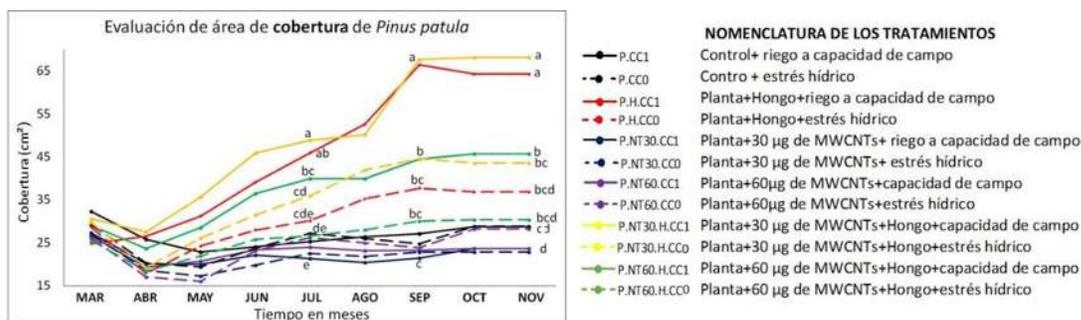
A los 10 meses de aplicado el tratamiento, en el mes de Noviembre, se observó que entre los tratamientos regados a capacidad de campo, los inoculados con el HEM *Lactarius deliciosus* en interacción con MWCNTs, independientemente de la concentración de MWCNTs fomentan significativamente el engrosamiento del tallo con respecto a los tratamientos sin inoculación (Gráfica 2).

En cuanto a las plantas sometidas a estrés hídrico, se observó que las inoculadas con el HEM *Lactarius deliciosus* con 0 y 30 µg de MWCNTs, presentaron mayores alturas con respecto a las utilizadas como controles ($\alpha=0.005$), aun cuando sus valores no fueron significativos se empatan con las de mayor desempeño (fueron significativamente menores que la interacción con 30 µg de MWCNTs. Mientras que entre los tratamientos únicamente adicionados con 30 y 60 µg MWCNTs con y sin estrés hídrico, se observa que el grosor del tallo es significativamente menor que cualquiera de los dos tratamientos inoculados y adicionados con MWCNTs no sometidos a estrés hídrico ($\alpha=0.005$). Por tanto, el HEM podría ser más eficaz revertiendo el efecto negativo del estrés hídrico en las plantas de *Pinus patula* que la adición de 30 µg de MWCNTs (Gráfica 2).

Sin embargo, cuando las plantas de *Pinus patula* son regadas a capacidad de campo, la interacción *Lactarius deliciosus*-30µg de MWCNTs fomenta significativamente el engrosamiento del tallo con respecto al control absoluto y al tratamiento únicamente inoculado con el HEM (Gráfica 2).

7.3. Cobertura del follaje

En el mes de marzo, los tratamientos que produjeron mayores coberturas fueron el control absoluto, seguido del inoculado con el HEM *Lactarius deliciosus* adicionado con 30 µg de MWCNTs y riego a capacidad de campo. Para el mes de Abril, se observó un decremento importante en la cobertura de todas las plantas tratadas, a excepción de las plantas inoculadas con el HEM y riego a capacidad de campo. Así mismo, el decremento fue más marcado en todos los tratamientos sometidos a condiciones de estrés hídrico. El decremento en cobertura podría deberse a la pérdida de hojas embrionarias (Gráfica 3).



Gráfica 3. Crecimiento en superficie de cobertura del follaje de *Pinus patula* durante los meses Marzo-Noviembre de 2015. Los tratamientos regados a capacidad de campo se muestran en líneas continuas y los expuestos a estrés hídrico, en líneas punteadas. Niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

A partir del mes de Mayo durante todo el experimento, se observó que los tratamientos inoculados y adicionados con 30 y 60 µg de MWCNTs, solos y en interacción produjeron los mayores valores en las plantas regadas a capacidad de campo, mientras que las sometidas a estrés hídrico, respondieron mejor a los

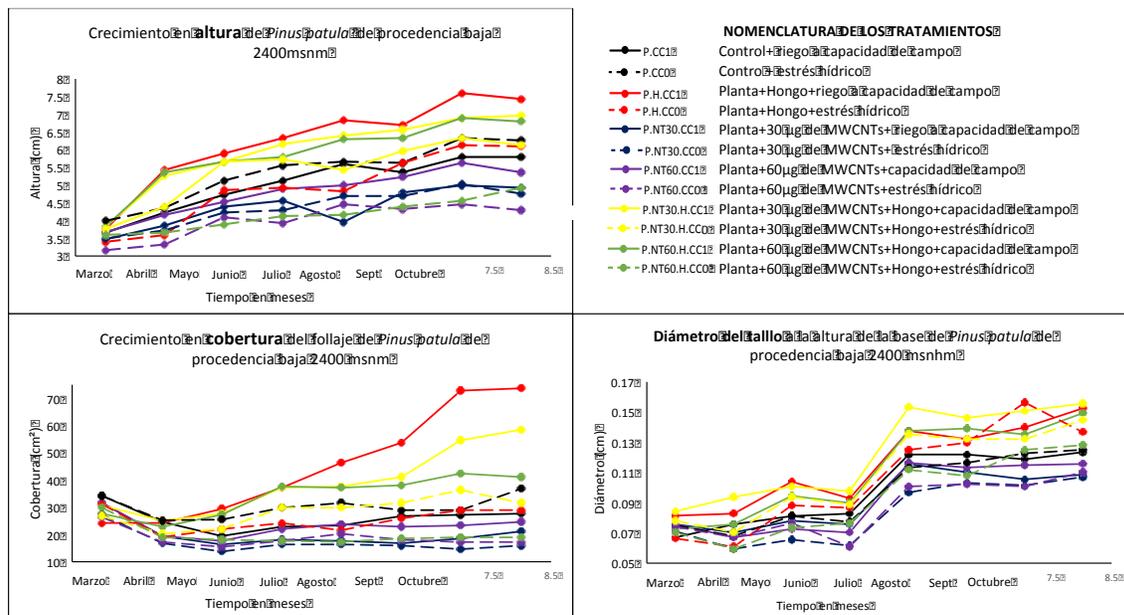
tratamientos con inoculación y adición de 30 µg de MWCNTs solos y en interacción (Gráfica 3).

En la última evaluación, se observó que la interacción del HEM y la concentración de 30 µg de MWCNTs bajo condiciones de capacidad de campo produjo mayor área de cobertura en las plantas de *Pinus patula*, seguido por la inoculación individual, siendo la aplicación de estos dos tratamientos la que promueve el crecimiento en área de cobertura ($\alpha=0.005$) con respecto a todos los demás tratamientos regados a capacidad de campo y expuestos a estrés hídrico. De las plantas que se sometieron a estrés hídrico, se observó que tanto el tratamiento de inoculación individual como la interacción del HEM y la dosis de 30 µg de MWCNTs tendieron a aumentar el crecimiento en cobertura y aun cuando no presentaron diferencias significativas entre ellos, la interacción HEM - 30 µg de MWCNTs presentó mayores valores, aumentando hasta en cinco unidades el área de cobertura de las plantas con respecto a la inoculación individual. Por lo que el tratamiento donde interactúan el HEM y la dosis de 30 µg de MWCNTs podría ser más efectiva que la inoculación individual para revertir los efectos del estrés hídrico en las plantas de *Pinus patula* (Gráfica 3).

7.4. Crecimiento mensual según procedencias

En las plantas que se mantuvieron bajo condiciones de capacidad de campo, la presencia del HEM se hace evidente en el crecimiento en altura, diámetro a la altura de la base y cobertura en sinergia con los nanotubos de carbono independientemente de la procedencia de la semilla, observándose un patrón de mayor crecimiento con la concentración de 30µg de nanotubos (Gráficas 4, 5 y 6).

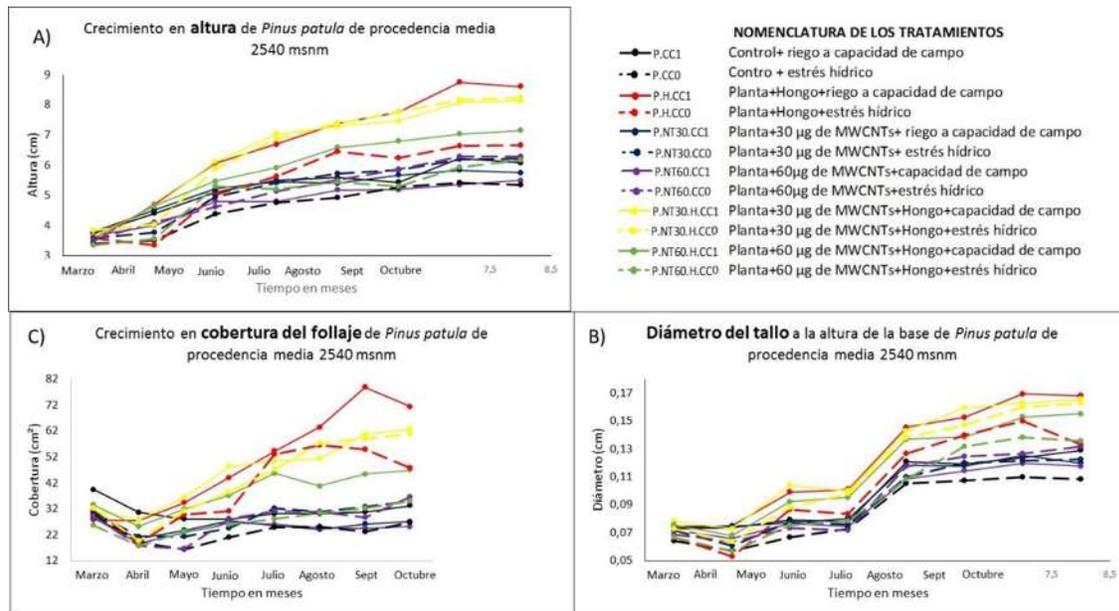
Aun cuando no se mantienen diferencias significativas entre procedencias en presencia de la interacción HEM-30 μ g de nanotubos, sí se observa una tendencia de mayor crecimiento en plantas provenientes de mayores altitudes, seguido de las procedencias de altitudes medias, mientras que el menor desempeño en crecimiento lo muestran las plantas de procedencias de bajas altitudes (Gráficas 4, 5 y 6).



Gráfica 4. Efecto de nanotubos de carbono y *Lactarius deliciosus* solos y en interacción sobre el crecimiento en altura, diámetro del tallo a la altura de la base y cobertura del follaje de *Pinus patula* de la procedencia de 2400 msnm durante los meses Marzo-Septiembre de 2015. Tratamientos regados a capacidad de campo se muestran en líneas continuas y tratamientos expuestos a estrés hídrico se muestran en líneas punteadas. Niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

La procedencia de mayor altitud (2870 msnm) presenta mayores valores en las variables mencionadas en presencia de los tratamientos en interacción, siendo significativamente diferente al resto de los tratamientos en la variable cobertura ($\alpha=0.005$) sólo con cuando el HEM interactúa con la concentración de 30 μ g de nanotubos (Gráfica 7A, B y C). La interacción con 30 μ g de nanotubos produce mayores alturas ($\alpha=0.005$) en las plantas de procedencias de mayor altitud con respecto a las de menor altitud (Gráficas 6A y 4A).

Mientras que en ausencia del HEM, la concentración de 30µg de nanotubos produce mayor crecimiento en altura sólo sobre las plantas procedentes de altitudes medias (Gráfica 5 A, B y C).

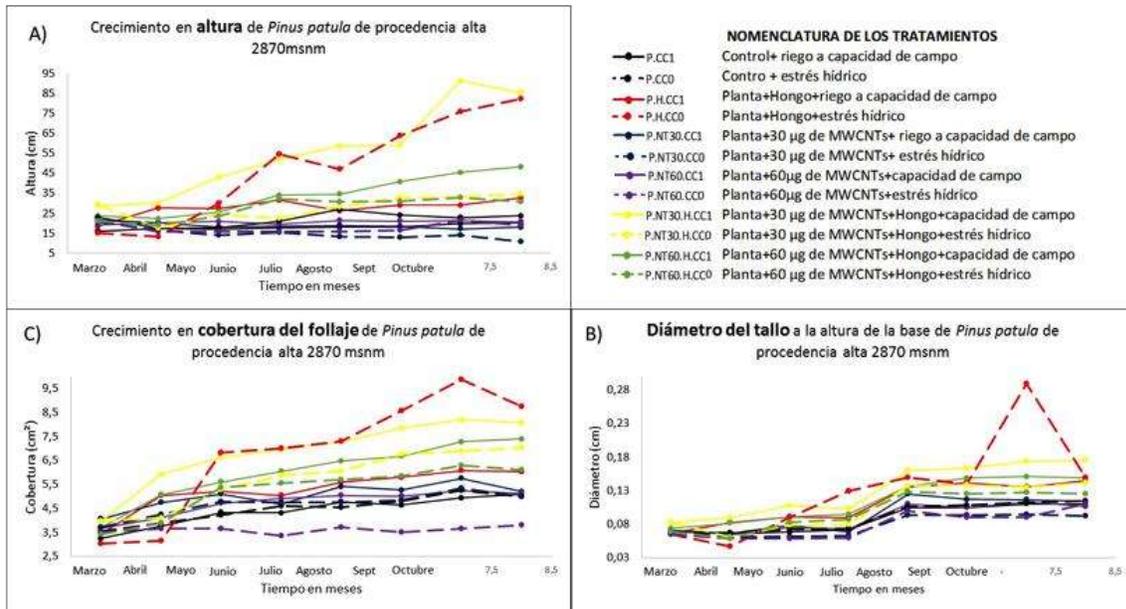


Gráfica 5. Efecto de nanotubos de carbono y *Lactarius deliciosus* solos y en interacción sobre el crecimiento en A) altura, B) diámetro del tallo a la altura de la base y C) cobertura del follaje de *Pinus patula* de la procedencia de 2540 msnm durante los meses Marzo-Septiembre de 2015. Tratamientos regados a capacidad de campo se muestran en líneas continuas y tratamientos expuestos a estrés hídrico se muestran en líneas punteadas. Niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

Cuando las plantas fueron sometidas a condiciones de estrés hídrico el mayor crecimiento tanto en diámetro a la altura de la base como en altura y cobertura del follaje se presenta en plantas inoculadas con el HEM sólo o en interacción la concentración de 30µg de nanotubos de carbono, en comparación con el control y la interacción HEM-60µg de nanotubos de carbono, aun cuando no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Gráficas 4, 5 y 6).

Si bien, no se mantienen las diferencias significativas entre procedencias en presencia del HEM, sí se observa una tendencia de mayor desempeño en el crecimiento de plantas procedentes de mayores altitudes, seguido por las de

procedencia media y el menor desempeño se observó en las plantas de procedencia de menor altitud (Gráficas 4, 5 y 6).



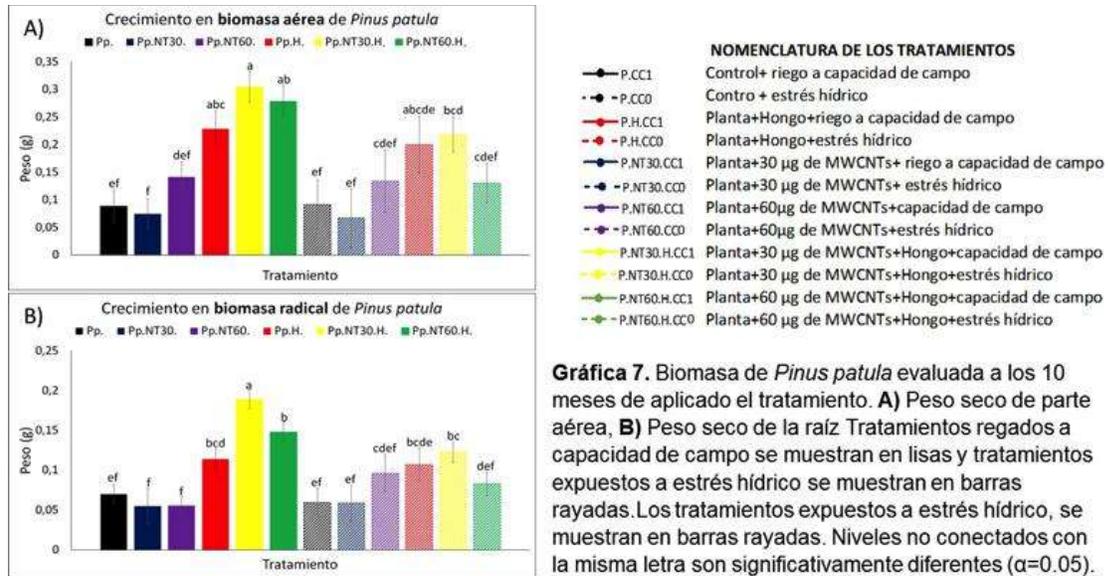
Gráfica 6. Efecto de nanotubos de carbono y *Lactarius deliciosus* solos y en interacción sobre el crecimiento en A) altura, B) diámetro del tallo a la altura de la base y C) cobertura del follaje de *Pinus patula* de la procedencia de 2870 msnm durante los meses Marzo-Septiembre de 2015. Tratamientos regados a capacidad de campo se muestran en líneas continuas y tratamientos expuestos a estrés hídrico se muestran en líneas punteadas. Niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)

7.5. Biomasa

Los mayores valores los presentaron las plantas inoculadas con el HEM, independientemente de las concentraciones de MWCNTs o de la cantidad de riego proporcionada (Gráfica 7).

En las plantas regadas a capacidad de campo se observó que todos los tratamientos con inoculación del HEM *Lactarius deliciosus* fomentaron significativamente la biomasa de la parte aérea, con respecto al tratamiento control, siendo el tratamiento inoculado con el HEM adicionado con 30 µg de MWCNTs el que presentó mayores valores, seguido del tratamiento inoculado con el HEM adicionado 60 µg de MWCNTs. Sin embargo, se observó que la adición individual de MWCNTs si bien,

no produce un decremento en la biomasa de las plantas, tampoco lo fomenta, bajo ninguna de las concentraciones utilizadas (Gráfica 7A y B).

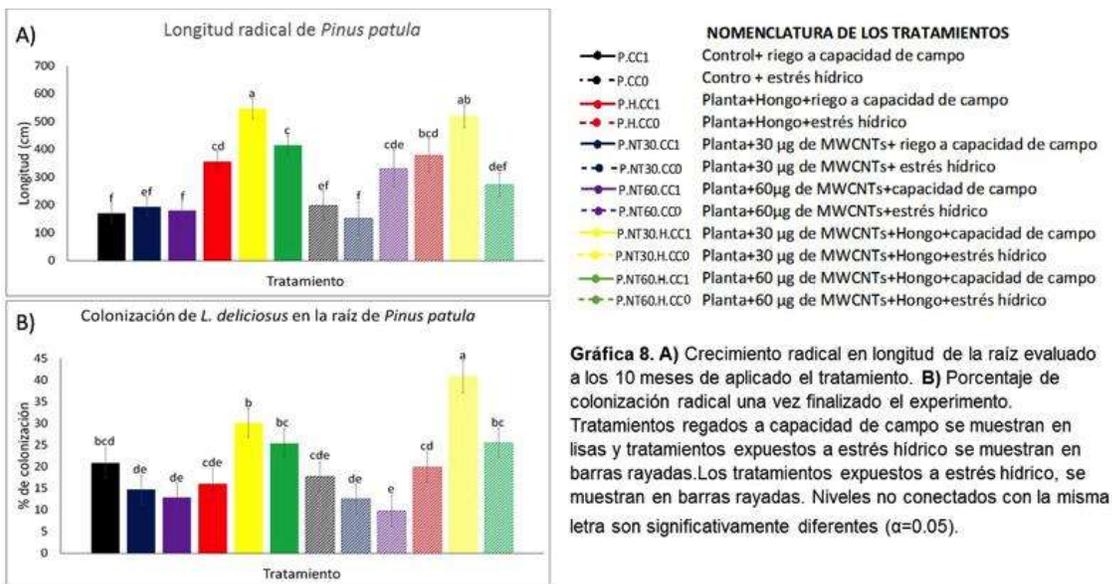


Gráfica 7. Biomasa de *Pinus patula* evaluada a los 10 meses de aplicado el tratamiento. **A)** Peso seco de parte aérea, **B)** Peso seco de la raíz. Tratamientos regados a capacidad de campo se muestran en lisas y tratamientos expuestos a estrés hídrico se muestran en barras rayadas. Los tratamientos expuestos a estrés hídrico, se muestran en barras rayadas. Niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

En cuanto a los tratamientos sometidos a estrés hídrico, se observó que tanto la inoculación individual, como la adición conjunta del HEM *Lactarius deliciosus* y 30 µg de MWCNTs fomentaron el peso seco de parte aérea con respecto al control (Gráfica 6A). Mientras que a nivel de raíz, sólo la interacción del HEM y la dosis de 30 µg de MWCNTs fomentó significativamente la biomasa con respecto al control. Entre los tratamientos únicamente adicionados con 30 y 60 µg MWCNTs no se observan diferencias significativas con respecto al control (Gráfica 7B). La interacción HEM - 30 µg de MWCNTs podría ser eficaz generando biomasa en las plantas de *Pinus patula*, bajo condiciones de capacidad de campo y estrés hídrico, puesto que se observa claramente un efecto sinérgico.

7.6. Crecimiento de la raíz y porcentaje de colonización

El estrés hídrico no afecta significativamente la longitud radical de las plantas de *Pinus patula*, pues las plantas inoculadas presentaron los mayores valores independientemente del tipo de riego al que se expusieron, siendo en los dos casos muy evidente que la adición conjunta del HEM y 30 μg de MWCNTs promueve significativamente la longitud radical con respecto al tratamiento control, siendo más evidente este efecto en presencia de humedad. Mientras que la adición individual de MWCNTs si bien, no produce un decremento significativo con respecto al control en la longitud radical de las plantas, tampoco lo fomenta, bajo ninguna de las concentraciones utilizadas (Gráfica 8A).



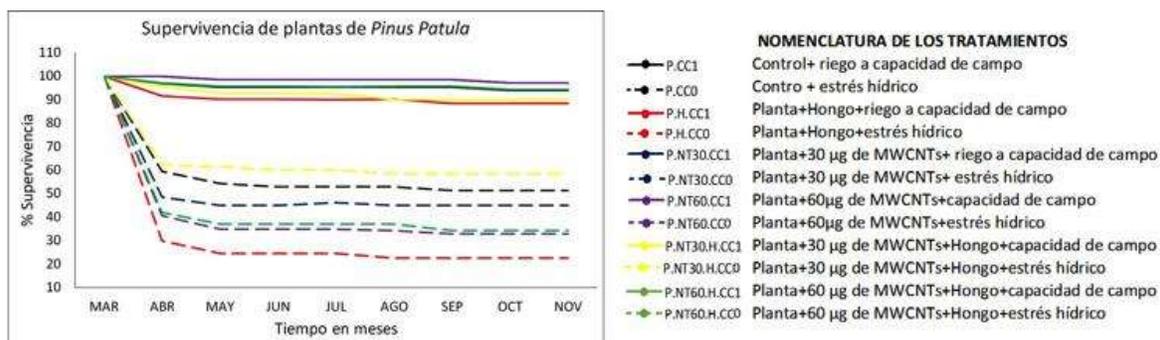
Se observa un marcado aumento de la colonización radical en las plantas sometidas a estrés hídrico, con respecto a las que fueron regadas a capacidad de campo. El HEM *Lactarius deliciosus* colonizó 20 por ciento más las raíces a las que se aplicó el tratamiento dual HEM-30 μg de MWCNTs que las únicamente inoculadas, lo que expone que la dosis de 30 μg de MWCNTs podría producir efectos directos sobre

el hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* y efectos sinérgicos indirectos en la planta (Gráfica 8B).

7.7. Supervivencia

El factor de mayor influencia en la supervivencia de las plantas fue el riego. Las plantas sometidas a estrés hídrico, presentaron menor porcentaje de supervivencia con respecto a las plantas regadas a capacidad de campo (Gráfica 9).

De los tratamientos sometidos a estrés hídrico, el más afectado y por tanto el que presentó menor porcentaje de supervivencia fue el tratamiento sin adición de MWCNTs pero inoculado con el HEM *Lactarius deliciosus* (21%), mientras que el tratamiento menos afectado, fue el tratamiento inoculado con el HEM *Lactarius deliciosus*, y adicionado con 30 µg de MWCNTs (61%), pues triplica al tratamiento sin MWCNTs. Por lo tanto, se observa que a pesar de que el HEM *Lactarius deliciosus* logra revertir los efectos de estrés hídrico en el crecimiento de las plantas, la adición de 30 µg de MWCNTs están teniendo un efecto positivo en la supervivencia de las plantas (Gráfica 9).



Gráfica 9. Supervivencia de *Pinus patula* durante los meses Marzo-Noviembre de 2015. Los tratamientos regados a capacidad de campo se muestran en líneas continuas y los expuestos a estrés hídrico, en líneas punteadas. Niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Tabla 3. Porcentaje de supervivencia de plantas de *Pinus patula* inoculadas con *Lactarius deliciosus*, adicionadas con MWCNTs con distintos regímenes de riego. (P=*Pinus patula*, H=*Lactarius deliciosus*, NT30=30 µg de Nanotubos de Carbono, NT60=60 µg de Nanotubos de Carbono, CC1=Capacidad de campo, CC0=Estrés hídrico).

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA
P.CC1	98.44
P.H.CC1	93.33
P.NT30.CC1	98.57
P.NT60.CC1	98.57
P.NT30.H.CC1	95.52
P.NT60.H.CC1	95.71
P.CC0	52.86
P.H.CC0	21.66
P.NT30.CC0	44.93
P.NT60.CC0	31.43
P.NT30.H.CC0	61.43
P.NT60.H.CC0	42.03

□

8. DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos, el HEM *Lactarius deliciosus* promueve el crecimiento en altura, diámetro a la altura de la base, biomasa radical y longitud radical de las plántulas de *Pinus patula* cuando existe agua disponible en el sustrato, de manera similar que *Pisolithus tinctorius* y *Sclerodema sp.* produjeron mayor cantidad de biomasa en *P. devoniana* y *P. pseudostrobus* (Valdés et al. 2010), *Laccaria* y *Hebeloma* fomentaron el crecimiento en peso seco de parte aérea y radical de plántulas de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* (Carrasco 2010), *Laccaria*

sp., *Rhizopogon sp.*, *Suillus bovinus* y *Pisolithus sp.* promovieron 1,5 veces más el crecimiento en altura del tallo de plantones de *P. pinaster* (Franco *et al.* 2014), así como *Laccaria laccata*, *Boletus edulis*, *Suillus grevillei* y *Suillus luteus* fomentaron el crecimiento de *P. tabulaeformis* en altura, biomasa y número de raíces laterales (Lu *et al.* 2016).

Por otro lado, se ha reportado que los nanotubos de carbono producen efectos sobre el crecimiento de plantas de interés agrícola como el tomate que cultivado in vitro en medio adicionado con 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs aumentó su crecimiento en biomasa 2.5 veces (Khodakovskaya *et al.* 2009) y cultivado en suelo, expuesto a 50 y 200 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs presentó mayor crecimiento en altura, con respecto al control sin MWCNTs (Khodakovskaya *et al.* 2013). Asimismo, en plantas de mostaza se observó que las concentraciones 2.3×10^{-3} mg/mL O-MWCNTs y MWCNTs 23×10^{-3} mg/mL produjeron mayor acumulación de peso seco y longitud radical (Modal *et al.* 2011) al igual que las concentraciones de 40, 80, y 160 $\mu\text{g/mL}$ de O-MWCNTs en plantas de trigo (Wang *et al.* 2012). También Tripathi *et al.* (2010) reportan que adicionando 100 y 200 μL de solución de MWCNTs al agua en donde se creció garbanzo se promovió la altura, ramificación de tallo y raíz de las plantas. Sin embargo, los reportes no coinciden con los resultados que arrojó esta investigación, pues en el presente ensayo no se observó que los MWCNTs que se adicionaron individualmente en dosis de 30 y 60 μg promovieran el crecimiento de las plantas de *Pinus patula* con respecto a las plantas sin adición de MWCNTs bajo ninguna de las situaciones de riego inducidas.

Aunque los MWCNTs tampoco produjeron efectos adversos que indiquen toxicidad para las plántulas de *Pinus patula*, como reportan Stampoulis *et al.* (2009) en calabacín (*Cucurbita pepo*), que tras una exposición de 15 días a 1000 mg/L de MWCNTs bajo condiciones hidropónicas observaron una reducción del 60% en la biomasa en comparación con el control o Mondal *et al.* (2011) que expusieron semillas y plantas de mostaza a varias dosis de MWCNTs, siendo 46 mg/L la más alta y la que produjo reducción en la biomasa seca de la planta y en el porcentaje de germinación de la semilla, en comparación con la concentración más baja.

A diferencia de los resultados obtenidos por Stampoulis *et al.* (2009) y Mondal *et al.* (2011), en el presente ensayo no se observaron decrementos significativos en ninguna de las variables evaluadas para *P. patula* por efecto de los MWCNTs adicionados individualmente, independientemente de la dosis agregada (30 y 60 µg), aún por efecto de la dosis más alta. Esto, probablemente se deba a que los MWCNTs se adicionaron a la solución del suelo y nuestra planta se creció en un sistema hidropónico.

Excepcionalmente, se observó que cuando las plantas de *P. patula* fueron regadas a capacidad de campo, el crecimiento en altura, biomasa radical, diámetro a la altura de la base y longitud radical se incrementan significativamente por efecto de la adición conjunta del HEM *L. deliciosus* y la dosis de 30 µg de MWCNTs con respecto a las plantas utilizadas como control e incluso las que únicamente fueron inoculadas con el HEM. Lo que muestra un efecto sinérgico de la dosis de 30 µg de MWCNTs y la inoculación del HEM *L. deliciosus*.

En contraste con los incrementos en el crecimiento de *P. patula* por la sinergia entre el HEM y los MWCNTs, el factor de mayor influencia en la supervivencia de las plantas fue el riego, siendo el estrés hídrico el que generó la muerte del 48% de las plantas utilizadas como control y sólo el 38% de las plantas adicionadas con la interacción HEM-30µg de MWCNTs, lo que podría sugerir que la sinergia entre estos dos factores, también ocurre cuando se encuentra bajo condiciones de estrés hídrico, pues reduce 10% la mortalidad. Esto es consistente con lo observado en la inoculación de *P. pseudostrobilus* con el HEM *P. tinctorius* que redujo en un 20% la mortalidad de plantas sometidas a sequía prolongada (15 días), con respecto a las plantas sin inoculación (Gómez-Romero *et al.* 2015). Dado que las ectomicorrizas modifican las relaciones hídricas de las plantas hospedadoras, proporcionándoles cierta resistencia al estrés por déficit hídrico, pueden mejorar el estado fisiológico de las plantas produciendo resistencia al estrés ambiental (Read 1991; Smith & Read 2000; Brundrett 2002) y por tanto mayores posibilidades de supervivencia.

Uno de los mecanismos por los que los HEM pueden mejorar la absorción de agua en las plantas es a través de redes hifales de micelio externo que incrementa el área de exploración de la raíz, transportando agua que no era accesible a la raíz (Marjanovic & Nehls 2008). A menor disponibilidad de agua en el suelo, la función de captación de agua de las hifas se vuelve más significativa para la supervivencia de la planta (Allen 2007).

El beneficio de las ectomicorrizas, depende de la capacidad de los micobiontes para explorar el suelo y generar estructuras funcionales. Agerer 2001 propuso que las

especies del género *Lactarius* realizan exploración de contacto o de media distancia. Sin embargo, se ha observado que algunas ectomicorrizas pueden utilizar más de una estrategia de exploración; en un extremo, algunas hifas cortas, individuales e hidrofílicas proporcionan exploración de contacto con el sustrato, siendo éstas muy probablemente las responsables de la toma de agua y nutrientes (Cairney & Burke 1996), mientras en otro extremo se producen rizomorfos con un núcleo central de hifas gruesas (Brand 1989; Brownlee *et al.* 1983; Agerer 2001) que transportan el agua por vía simplástica.

Agerer *et al.* (2000) encontraron que especies de los géneros *Lactarius* y *Russula* poseen mayor capacidad para producir fenoloxidasas extracelulares. Dado que la mayoría de las especies de *Lactarius* y *Russula* exploran el sustrato por contacto con hifas hidrofílicas, la capacidad de degradar la lignina debería aumentar su acceso al Nitrógeno por degradación de sustancias fenólicas (Kuiters 1990), compensando así, su incapacidad para explorar grandes volúmenes de suelo.

La ectomicorriza puede alterar las rutas de agua hacia y en la raíz micorrizada. **1) hacia la planta**, a través del micelio por el apoplasto de la hifa en hongos hidrófilos como muchas especies de *Laccaria*, *Lactarius*, *Russula* y *Hebeloma* (Duddridge *et al.* 1980; Unestam 1991; Unestam y Sun 1995; Muhsin & Zwiazek 2002); sin embargo, el agua que se mueve por rizomorfos, generalmente hidrofóbicos es transportada a través del simplasto (Letho & Zwiazek 2010) y **2) en la raíz micorrizada**, debido que la conductancia del apoplasto depende en gran medida de la conductancia en las paredes celulares, y sus propiedades son modificadas por

los cambios morfológicos que produce la formación del manto y la red de Hartig (Letho & Zwiazek 2010).

En tanto la ruta apoplástica puede realizarla la planta, el flujo apoplástico a través de la ECM no constituye una ruta adicional para la entrada de agua, sólo una extensión de la raíz, mientras que el movimiento simplástico dentro de las hifas internas puede proveer una ruta adicional y más directa para el movimiento de agua en el cortex de las raíces (Reid 1979). Sin embargo, el agua debe moverse a través del simplasto de las hifas extraradicales que absorben agua del suelo que no necesariamente son de mayor conductancia al agua que el suelo (Weatherley 1982), lo que podría presentar más resistencia en las micorrizas, ya que el agua tendría que atravesar la membrana hifal, además de las membranas de las células corticales, puesto que no hay conexión simplástica entre células fúngicas y vegetales (Letho & Zwiazek 2010). Ésta vía de transporte sería de menor conductancia si se compara con el agua que se mueve en el apoplasto o simplasto de las células radicales.

Sin embargo, autores afirman la posibilidad de que los aumentos observados en flujo de agua de la raíz en plantas micorrizadas pudieran ser debidos a los efectos nutricionales o metabólicos de éstas asociaciones en la actividad de los canales de agua de la raíz (Muhsin & Zwiazek 2002).

En este sentido, Marjanović *et al.* (2005) demostraron una relación entre el aumento de la conductividad hidráulica de las raíces de plántulas de álamo híbrido ectomicorrizadas con *Amanita muscaria* y el aumento en la expresión de acuaporinas de la raíz, lo que sugiere que la función de las acuaporinas podrían

modificar la permeabilidad de la membrana y las micorrizas a su vez, podrían alterar la vía célula a célula a través de los efectos sobre la expresión de las acuaporinas de la planta (Lee *et al.* 2010). Siendo más importante (al menos en algunos casos) la señalización química producida por la colonización del HEM en la planta la que incide en la conductividad hidráulica de las raíces que la penetración de las hifas en la corteza radicular (Letho & Zwiazek 2010). El mantenimiento del transporte de agua de la raíz mediada por aquaporina puede ser especialmente importante para las plantas que crecen bajo condiciones de estrés que afectan la velocidad del transporte de agua, tales como sequía moderada, estrés salino o baja temperatura del suelo (Lee *et al.*, 2008; Sadeet *et al.*, 2009).

Por otro lado, varios autores relacionan los efectos benéficos de los CNTs con modificaciones en las relaciones hídricas, desde la promoción de la germinación hasta la mayor absorción de agua de las plantas (Khodakovskaya *et al.* 2009; Tripathi *et al.* 2010; Tiwari *et al.* 2013), así mismo, han demostrado experimentalmente que los nanotubos de carbono activan la sobreexpresión de acuaporinas, como en el caso de plántulas de tomate (Villagarcia *et al.* 2012).

Los CNTs podrían modificar la señalización y promover la activación de ciertas familias de genes implicados en la actividad metabólica que fomenten la expresión de acuaporinas e incrementen el flujo de agua y solutos en conjunto con los HEM. Los HEM reducen la resistencia del flujo de agua ya sea por vía apoplástica o simplástica, y a su vez los CNTs podrían producir la sobreexpresión de acuaporinas para crear una interface funcional para el intercambio de agua hifa interna-célula

En este estudio se hace evidente el efecto de la interacción de la dosis de 30 μ de MWCNTs y *Lactarius deliciosus* y a pesar de que no se comprende el mecanismo por el que la interacción HEM-CNTs promueve el crecimiento de *P. patula*, se observó que los efectos perduran a largo plazo, por lo que resulta importante seguir estudiando estos sistemas para dilucidar los mecanismos que afectan o promueven las ventajas con la triple interacción. Dado que los efectos podrían mantenerse a largo plazo tienen implicaciones ecológicas para las plantas en campo.

Resulta importante estudiar la interacción molecular en el establecimiento del HEM en la planta, pues podría dar la pauta para conocer el mecanismo de la respuesta sinérgica entre CNTs, plantas y hongos.

En cuanto a la respuesta de la procedencia altitudinal de la semilla de *P. patula*, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre procedencias cuando se analizó sólo el factor procedencia, sin embargo al incluirse los factores hongo, nanotubos y régimen de riego se observó que las plantas de mayor altitud tuvieron mayor crecimiento en presencia de la interacción HEM-CNTs, aunque, no se observa un patrón bien definido. Lo que no concuerda con los resultados de Salazar-García *et al.* (1999), Dvorak *et al.* (2000), Velázquez-Martínez *et al.* (2004) (En Sáenz-Romero 2011), que concluyeron que las poblaciones de *P. patula* establecidas a mayores altitudes son menos productivas que las poblaciones de sitios menos elevados.

Teniendo en cuenta los efectos sinérgicos de la interacción MWCNTs y *Lactarius deliciosus* sobre el crecimiento de *P. patula* observados en esta investigación, la interacción MWCNTs y *Lactarius deliciosus* podría modificar el potencial de

crecimiento adaptativo de la planta proporcionando cierta resistencia a las condiciones ambientales extremas.

Teniendo en cuenta que la selección apropiada de una procedencia como fuente de semillas para producción de planta en vivero destinada a plantación, repoblación o revegetalización de un determinado lugar, podría incrementar sustancialmente la supervivencia, establecimiento y crecimiento de las plantas, resulta importante generar condiciones edáficas que apoyen la plasticidad fenotípica de las plantas para su establecimiento en campo.

9. CONCLUSIONES

- El déficit hídrico afecta la supervivencia de las plantas de *Pinus patula*, y es compensado por el efecto sinérgico de hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* y la dosis de 30 µg de Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple.
- Los tratamientos inoculados con el hongo ectomicorrícico y adicionados con 30 µg/mL de Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple fomentan el crecimiento vegetal en las plantas de *Pinus patula* con riego a capacidad de campo, mientras que en las plantas de *Pinus patula* bajo condiciones de déficit hídrico, revierten y/o amortiguan los efectos adversos de éste.
- Los tratamientos inoculados con el hongo ectomicorrícico y adicionados con 30 µg de Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple fomentan el crecimiento de las plantas de *Pinus patula* con riego a capacidad de campo, mientras que en las plantas bajo condiciones de déficit hídrico, revierten y/o amortiguan los efectos negativos adversos de éste.

- Los Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple muestran efecto en el crecimiento de *P. patula*, sólo en interacción con el hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* y no de manera individual.
- La presencia de humedad edáfica es importante para la producción de efectos de los Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple sobre plantas de *Pinus patula*.
- El efecto más significativo de la sinergia entre los Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple y el hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* sobre las plantas de *Pinus patula*, se presenta en la biomasa radical.
- El efecto de los Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple en interacción con el hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* sobre las plantas de *Pinus patula* puede mantenerse a largo plazo.

10. LITERATURA CITADA

Agerer, R. 1991. **Characterization of ectomycorrhizal** En: Norris, J., R., Read, D., J. & A., K., Varma (eds) Techniques for the study of mycorrhiza. Academic London. Vol. 23: 25–73 pp.

Agerer, R. 2011. **Exploration types of ectomycorrhizae: A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance.** *Mycorrhiza*, 11:107–114.

Agerer, R. 1988. **Studies on ectomycorrhizae. XVII. The ontogeny of the ectomycorrhizal rhizomorphs of *Paxillus involutus* and *Thelephora terrestris* (Basidiomycetes).** *Nova Hedwigia Kryptogamenkd*, 47:311-334.

Aguilar-Aguilar S., Pérez-Moreno J., Ferrera-Cerrato R., Grimaldo-Juárez O., Cervantes Díaz L. & González-Mendoza D. 2009. **Hongos ectomicorrícicos y la tolerancia a la salinidad en plantas.** *Revista Chilena de Historia Natural*, (82): 163-168.

Ajayan, P. M., & O. Z., Zhou. 2001. **Applications of carbon nanotubes.** In Carbon nanotubes. Springer Berlin Heidelberg. 391-425 pp.

Allen, C. D., Macalady, A. K., Chenchouni, H., Bachelet D., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D., Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J., Allard G., Running, S., Semerci, A., McDowell, N., Hogg, H. & N., Cobb. 2010. **A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests.** *Forest Ecology and Management*, 259(4):660–684.

Allen, F., M. 2007. **Mycorrhizal Fungi: Highways for Water and Nutrients in Arid Soils.** *Vadose Zone Journal*, 6(2): 291-297.

- Allen, M. F. 1991. **The Ecology of Mycorrhizae**. Cambridge University Press, New York, 184 pp.
- Allen, M. F. 2007. **Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils**. *Vadose Zone J*, 6:291–297.
- Aloni, R. 1987. **Diferentiation of vascular tissues**. *Annual Review of Plant Physiology*, 38(1): 179-204.
- Alvarez, M., Huygens, D., Fernandez, C., Gacitua, Y., Olivares, E., Saavedra, Ambríz, E., Báez-Pérez A. L., Moutoglís P. & Villegas H. J. 2010. **Fraxinus-Glomus-Pisolithus** simbiosis: Plant growth and soil aggregation effects. *Pedobiología*, (53):369-373.
- Assmann S. M., Snyder J. A. & Lee Y. 2000 **ABA-deficient (aba1) and ABA-insensitive (abi1-1, abi2-1) mutants of Arabidopsis have a wild-type stomatal response to humidity**. *Plant Cell Environ*, (23):387–395
- Azcón-Bieto J. & Talón, M. 2008. **Fundamentos de Fisiología Vegetal**. 2a. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 651 p
- Báez-Pérez Ana L., Sánchez-Yáñez J. M. & Villegas H. J. 2010. **Efecto de la simbiosis Pisolithus tinctorius-Fraxinus uhdei, bajo tres fuentes de N (NO₃⁻, NH₄⁺ Y UREA)**. *Ciencia Nicolaita*, Número especial 1-7.
- Bárzana, G., Aroca R., Paz J. A., Chaumont F., Martines-Ballesta M.C., Carvajal M. & J. M. Ruiz-Lozano. 2012. **Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions**. *Annals of Botany*, 109:1009-1017.
- Beckhoff, B., Kanngiebler B., Langhoff N., Wedell R. & H. Wolff (Eds). 2006. **Handbook of practical X – Ray Fluorescence Analysis**. Springer-Verlag.

- Bidwell, R. G. S. 1990. **Fisiología Vegetal**. AGT Editor, S.A. México. 784 p.
- Bogeat-Triboulot, M.,B., Bartoli, F., Garbaye, J., Marmeisse, R. & D., Tagu. 2004. **Fungal ectomycorrhizal community affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings**. *Plant Soil*, 267:213–223
- Boyd, R., Furbank, R., T. & D., J., Read. 1986. **Ectomycorrhiza and the water relations of trees**. En: Gianinazzi-Pearson, V. & S., Gianinazzi (eds). Physiological and genetic aspects of mycorrhizae. INRA, Paris, pp 689–694
- Bremner, L.M. & C.S. Mulvaney. 1982. **Total nitrogen**. En: Page, R., H. Miller and D.R. Keeney (eds): Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. ASA, S.S.A. Madison, Wisconsin, USA. Pp. 595-634.
- Brownlee, C., Duddridge, J., Malibari, A. & D., J. Read. 1983. **The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in assimilate and water transport**. *Plant Soil*, 71: 433-443.
- Brundrett, C. M. 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 and Soil* 3(20): 37-77.
- Brundrett, M. C. 2002. **Ectomycorrhizas in plant communities**. En: Sivasitamparam, K., K. W. Dixon & R. L. Barret. (eds). Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity. Kluwer Academic Publishers. pp. 105-150.
- Cairney, J. & R., Burke. 1996. **Physiological heterogeneity within fungal mycelia: an important concept for a functional understanding of the ectomycorrhizal symbiosis**. *New Phytologist*, 134:685-695.

Cairney, J., W. & R., M., Burke. 1996. **Physiological heterogeneity within fungal mycelia: an important concept for a functional understanding of the ectomycorrhizal symbiosis.** *New Phytologist*, 134: 685-695.

Carrasco, H. V., J. Pérez-Moreno, V. H. Espinosa, J. J. S. Almaraz, R. L. Quintero y M. A. Torres. 2010. **Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México.** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4(1):567-577.

Chaumont F., Tyerman S. D. 2014. **Aquaporins: Highly regulated channels controlling plant water relations.** *Plant Physiology*, 164:1600-1618.

Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C. & Zhao Y. 2007. **Toxicological and Biological Effects of Nanomaterials.** *Int. J. Nanotechnol*, (4):179–196.

Danon, A., K. Apel & C. Laloi. 2004. **Reactive oxygen signalling: the latest news.** *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7: 323-328.

Davies, F., T., Svenson, S., E., Cole, J., C., Phavaphutanon, L., Duray, S., A., Dixon, R., K., Pallardy, S., K., Garrett, H., E., Cox, G., S. & I., L., Sander. 1983. **Comparative water relations of container-grown and bare-root ectomycorrhizal and nonmycorrhizal *Quercus velutina* seedlings.** *Can J Bot*, 61: 1559-1565.

Domingo, C. & G. Santoro. 2007. **Espectroscopía Raman de Nanotubos de Carbono.** *Óptica Pura y Aplicada*, 40(2): 175-186.

Duan B. & C. Yin. 2005. **Responses of confers to drought stress.** *Chin. J. Appl. Environ. Biol*, 11:115-122.

Duddridge, J., A., Malibari, A. & D., J., Read. 1980. **Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport.**

Nature 287:834–836.

Dvorak W. S., Hodge G. R., Kietzka J. E., Malan F., Osorio L. F. & Stanger T. K. 2000. ***Pinus patula*** En: Conservation & Testing of Subtropical & Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative College of Natural Resources, NCSU.

Raleigh. pp: 149-173.

Eguiluz, P. T. 1988. **Distribución natural de los Pinos en México. Nota Tec. No. 1.** Centro de Genética Forestal, A.C. Chapingo, México. 6 p.

Fengqing, G., Fashui, H., Chao, L., Lei, Z., Mingyusu, X., W., FanYang, C., W. & Y., Ping. 2006. **Mechanism of Nano-anafase TiO₂ on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach.** *Biological Trance Element Research*, 3(1-3):239-253.

Franco, R., Sousa, R., Ramos, A., Oliveira, S. & M., Castro. 2014. **Diversity and persistence of ectomycorrhizal fungi and their effect on nursery-inoculated *Pinus pinaster* in a post-fire plantation in northern Portugal.** *Microbial Ecology*, 68(4): 761-772.

Fricker M., L. Boddy y D. Bebber. 2007. Network organisation of mycelial fungi. En: **Biology of the fungal cell.** 2^a ed. Springer. Berlin Heidelberg. 341 p.

Furlan A., Llanes A., Luna V., & S. Castro. 2012. **Physiological and biochemical responses to drought stress and subsequent rehydration in the symbiotic association peanut-*Bradyrhizobium sp.*** ISRN Agronomy 318083.

Futai, K., T. Taniguchi & R. Kataoka. 2008. **Ectomycorrhizae and their importance in forest ecosystems.** En: Siddiqui, Z. A., Akhtar M. S. & K. Futai (eds). 2008. **Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry.** Springer. 359 p.

Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R. & E., Del Val. 2015. **Efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus pseudostrobus* y *Pisolithus tinctorius*.** *Botanical Sciences*, 93(4): 731-740.

Goodell, B., Xie, X., Quian, Y., Daniel, G., Peterson, M. & J. Jellison. 2008. **Carbon Nanotubes produced from Natural Cellulosic Materials.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 1(5):2472-2473.

Gracia, C. En preparación. **Ecología Forestal: Estructura, funcionamiento y producción de las masas forestales.** Un curso teórico-práctico sobre modelización del crecimiento de los bosques y su respuesta a la gestión y al cambio climático.

Herrera, T. y M., Ulloa. 1998. **El reino de los hongos. Micología básica y aplicada.** 2a ed. Fondo de Cultura Económica. Universidad Autónoma de México, México, D. F. 552 pp.

Hesler, L. R. y A. H. Smith. 1979. **North American species of *Lactarius*.** The University of Michigan Press. Ann Arbor, MI. USA. 600 p.

Hopkins, W. G. & Hüner N. P. 2009. **Introduction to Plant Physiology.** 4a edición. 528 pp. ISBN : 978-0-470-24766-2.

I., Alberdi, M. & E., Valenzuela. 2009. **Effect of ectomycorrhizal colonization and drought on reactive oxygen species metabolism of *Nothofagus dombeyi* roots.** *Tree Physiologist*, 29:1047–1057.

Jaleel C., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Somasundaram R. & Panneerselvam R. 2009. **Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition.** *Int J Agric Biol*, (11):100-105

Jiménez O. J. 1988. **Introducción a la Micología Moderna**. Editorial Limusa, S. A. de C. V. 350pp.

Jung, J. H. & Mo Park, C. 2007. **Vascular Development in Plants: Specification of Xylem and Phloem Tissues**. *Journal of Plant Biology*, 50(3):301-305

Khodakovskaya M., De Silva K., Biris A., Dervishi E. & Villagarcia H. 2012. **Carbon Nanotubes Induce Growth Enhancement of Tobacco Cells**. *American Chemical Society ACS NANO*, 6(3):2128-2135

Khodakovskaya M., Watanabe M., Dervishi E., Biris A. S., Mahmood M. & Xu Y. 2009. **Carbon Nanotubes Are Able To Penetrate Plant Seed Coat and Dramatically Affect Seed Germination and Plant Growth**. *American Chemical Society ACS NANO*, (3)10: 3221-3227.

Khodakovskaya, M., Bong-Soo, K., Jong, N. K., Alimohammadi, M., Enkeleda, D., Thikra, M. & C. E., Cermigla. 2013. **Carbon Nanotubes as Plant Growth Regulators: Effects on Tomato Growth, Reproductive System, and Soil Microbial Community**. *Small*, 9(1):115-123.

Kozlowski T., T. 1999. **Water deficit and plant growth**. Vol. 1. Academic Press, Nueva York, EUA.

Kozlowski, T. T. & S. G., Pallardy. 2002. **Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses**. *The Botanical Review*, 68(2): 270–334.

Kramer, P. J. & J. S., Boyer. 1995. **Water relations of plants and soils**. Academic Press, Inc. 495 Pp.

Kreuzwieser J. & Gessler G .2010. **Global climate change and tree nutrition: influence of water availability.** *Tree Physiology*, (30): 1221–1234.

Kreuzwieser, J. & A., Gessler. 2010. **Global climate change and tree nutrition: influence of water availability.** *Tree Physiology*, 30(9), 1221-34.

Kuiters, A. 1990. **Role of phenolic substances from decomposing forest litter in plant-soil interaction.** *Acta Bot Neerl*, 39:329-348.

Landmeyer, J. E. 2013. **Fundamentals of Plant Anatomy and Physiology Related to Water Use** En: Introduction to Phytoremediation of Contaminated Ground Water. Historical Foundation, Hydrologic Control and Contaminated Remediation. Springer Science+Business Media B. V. 415 p

Lara-Romero, J. C., Calva-Yañez, López-Tinoco, J., Alonso-Núñez, G., Jiménez-Sandoval, S. & F. Paraguay-Delgado. 2011. **Temperature effect on the synthesis of Multi-Walled Carbon Nanotubes by spray pyrolysis of Botanical Carbon Fedstocks: Turpentine, α -pinene and β -pinene.** *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 19(6):483-496.

Larcher, W. 1995. **Physiological plant ecology.** 3a. Ed. Springer, Berlin, Alemania. 48–55 pp

Larson, P. R. 1994. **The vascular cambium; development and structure.** Springer-Verlag. 725 p.

Le Maitre, D. C. 1998. **Pines in cultivation: a global view.** In M. D. Richardson (ed). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University, Press. Cambridge, UK. 407-431 pp.

- Lee, S., Calvo-Polanco, M., Chung, G. & J., Zwiazek. 2010. **Cell water flow properties in root cortex of ectomycorrhizal (*Pinus banksiana*) seedlings.** *Plant Cell Environ*, 33: 769-780.
- Lin, D. & B., Xing. 2007. **Phytotoxicity of Nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth.** *Environmental Pollution*, 150(2):243-250.
- Liu Y., Zhao Y., Sun B. & Chen C. 2013. **Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes.** *Accounts of Chemical*, 46(3):702-713
- Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J. & Fang, X. 2009. **Carbon Nanotubes as Molecular Transporters for Walled Plant Cells.** *Nano letters*. 9(3):1007-1010.
- Lu, N., Yu, M., Cui, M., Luo, Z., Feng, F., Cao, S., Sun, Y. & Y., Li. 2016. **Effects of different ectomycorrhizal fungal inoculates on the growth of *Pinus tabulaeformis* seedlings under greenhouse conditions.** *Forests*, 7(12), 316.
- Lucas W. J., Groover A., Lichtenberger R., Furuta K., Yadav S., Helariutta Y., He X., Fukuda H., Kang J., Brady S., Patrick J., Sperry J. and Kachroo P. 2013. **The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions.** *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(4):294-388
- Mantri N., Patade V., Penna S. & Ford R. 2012. **Abiotic Stress Responses in Plants: Present and Future** En: *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. Springer Science+Business Media L. L. C. 473 p
- Marjanovic, Z., & U., Nehls. 2008. **Ectomycorrhiza and Water Transport.** Mycorrhiza. In: A Varna Heidelberg (ed). Springer-Verlag Berlin. pp: 149-159.
- Marjanovic, Ž., Uehlein, N., Kaldenhoff, R., Zwiazek, J., Weiß, M., Hampp,

- Marjanović, Ž. & U., Nehls. 2008. **Ectomycorrhizal and Water Transport** En: Vampa, A. (ed) Mycorrhiza. Springer Berlin Heidelberg. 149-159 pp.
- Marschner, H. 1995. **Mineral Nutrition of higher plants**. 2^a ed. Academic Press. London. 889 p.
- Martínez-Trinidad, T., Vargas-Hernández, J., López-Upton, J. & A., Muñoz-Orozco. 2002. **Respuesta al deficit hidrico en *Pinus leiophylla*: acumulación de biomasa, desarrollo de hojas secundarias y mortandad de plántulas**. *Agrociencia*, 20(3): 365-376.
- Martínez-Trinidad, T., Vargas-Hernández, J., López-Upton, J. & A., Muñoz-Orozco. 2002. **Respuesta al deficit hidrico en *Pinus leiophylla*: consumo de agua y crecimiento en plántulas de diferentes poblaciones**. *Agrociencia*, 36(3): 365-376.
- Martiñón-Martínez J. R., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton J., Gómez-Guerrero, A. & H., Vaquera-Huerta. 2010. **Response of *Pinus picea* Gordon to drought and high temperatura stress**. *Rev. Fitotec. Mex.* 33(3):239-248.
- Matías L. 2012. **Cambios en los límites de distribución de especies arbóreas como consecuencia de las variaciones climáticas**. *Ecosistemas*, 21(3): 91-96.
- Mondal A., Nandy P., Basu R. & Das S. (2011) **Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: an agricultural prospect**. *J Nanopart Res*, (13):4519–4528
- Morte, A., Díaz, G., Rodríguez, P., Alarcón, J. & M., Sánchez-Blanco. 2001. **Growth and water relations in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought**. *Biologia Plantarum*, 44:263-267.

Morte, A., Lovisolo, C. & A., Schubert. 2000. **Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense-Terfezia claveryi***. *Mycorrhiza*, 10: 115-119.

Muhsin, T. M. & J. J., Zwiazek. 2002. **Ectomycorrhizas increase apoplastic water transport and hydraulic conductivity in *Ulmus americana***. *New Phytologist*, 153 : 153 –158.

Muhsin, T. M. & J. J., Zwiazek. 2002a. **Ectomycorrhizae increase water conductance and protect white spruce (*Picea glauca*) seedlings against salt stress**. *Plant Soil*, 238:217–225.

Nilsen, E.T. & D.M., Orcutt. 1996. **Physiology of plants under stress. Abiotic factors**. John Wiley and Sons (eds). New York, NY. 704 pp.

Nylund, J., E. 1987. **The ectomycorrhizal infection zone and its relation to acid polysaccharides of cortical cell walls**. *New Phytologist*, 106: 505-516.

Olalde-Portugal, V., Meier, C., E. & S., H., Bo. 1996. **Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought**. *Tree Physiologist*, 16:985–993.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2010. **Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales (FRA)**. Informe Nacional México. Roma.

Panelles, G., R., Villar, S., P., Oliet, P, J. & A., M., López. 2004. **Effects of three water stress hardening levels and two conditioning periods in some plant functional quality attributes and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex* L.) seedlings**. *Cuad. Soc. Esp. Cien. For.*, 17: 81-85.

Parke, J., L., Linderman, R., G. & C., H., Black. 1983. **The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas-fir seedlings.** *New Phytologist*, 95:83–95.

Pérez-Moreno, J. y D. J. Read. 2000. **Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants.** *New Phytology*, (145): 301-309.

Perry Jr, J. P. 1991. **The pines of Mexico and Central America.** Timber Press, Inc. 231 pp.

Plamboeck, A., H., Dawson, E., T., Egerton-Warburton, M., L., North, M., Bruns, D., T. & J., I., Querejeta. 2007. **Water transfer via ectomycorrhizal fungal hyphae to conifer seedlings.** *Mycorrhiza*, 17:439–447

Popov, V. N. & P. Lambin (eds). 2006. **Carbon Nanotubes: From Basic Research to Nanotechnology.** Springer. Netherlands. 253 p

Prieto Ruiz, J. A., Cornejo Oviedo, E. H., Domínguez Calleros, P. A., Návar Chaidez, J. G., Marmolejo Moncivais, J. G. & J., Jiménez Pérez. 2004. **Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero.** *Invest Agrar: Sist Recur For.*, 13(3) 443-451.

R. & U., Nehls. 2005. **Aquaporins in poplar: what a difference a symbiont makes.** *Planta*, 222: 258-268.

Raidl, S. 1997. **Studien zur Ontogenie an Rhizomorphen von Ektomykorrhizen.** *Brbl Mycol*, 169: 1-184.

Ramesh, C. K., D. Manohar, K. Tripathi y A. Singh. 2004. **Diversity and functions of soil microflora in development of plants.** En: Varma, A., L. Abbott, D. Werner y R. Hampp (eds.). *Plant Surface Microbiology.* Springer. Berlin, Heidelberg. 628 p.

Ramírez, G. E. 2000. **Variación de semillas y plántulas de tres procedencias de *Pinus teocote* Schl. & Cham.** Tesis de Maestría. Instituto de Genética Forestal. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz. 78 pp.

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

Read, D. J. 1991. **Mycorrhizas in ecosystems.** *Experientia* (47):376-391.

Redondo-Gómez, S. 2013. **Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants** En: *Molecular Stress Physiology of plants*. Springer Science+Business Media. India. 440 p

Reid, C., P. 1979. **Mycorrhizae and water stress.** En: Riedacker, A. & J., Gagnaire-Michard (eds) *Root physiology and symbiosis*. Proceedings of the IUFRO symposium. Nancy, France, 392-409 pp.

Rzedowski, G. C. y J. Rzedowski. 2005. **Flora fanerogámica del Valle de México.** 2ª ed. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán. 1406 p.

Rzedowski, J. 1978. **Vegetación de México.** Limusa, México, D. F. México. pp. 283–313.

Sáenz R. T., J. Muñoz y A. Rueda. 2011. **Especies promisorias de clima templado para plantaciones forestales comerciales en Michoacán.** Libro Técnico Num. 10. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Uruapan, Michoacán.

Sáenz-Romero C., Beaulieu J. & Rehfeldt G. E. 2011. **Variación genética altitudinal entre poblaciones de *Pinus patula* de Oaxaca, México, en cámaras**

de crecimiento simulando temperaturas de calentamiento global. *Agrociencia*, (45): 399-411.

Sáenz-Romero, C. **Guía técnica para la planeación de la reforestación adaptada al cambio climático.** Comisión Nacional Forestal. 72 pp.

Sáenz-Romero, C., Rehfeldt, G., Crookston, N., Duval, P. & J., Beaulieu. 2012. **Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Michoacán state, México. Impacts on the vegetation.** *Rev. Fitotec. Mex.*, 35(4):333-345

Saenz-Romero, C., Rehfeldt, G., Crookston, N., Duval, P., St-Amant, R., Beaulieu, J., & B., Richardson. 2010. **Spline models of contemporary, 2030, 2060, and 2090 climates for Mexico and their use in understanding climate-change impacts on the vegetation.** *Climatic Change*, 102: 595-623.

Salaya-Domínguez J. M., López-Upton J. & Vargas-Hernández J. 2012. **Variación genética y ambiental en dos ensayos de progenies de *Pinus patula*.** *Agrociencia*, (46):519-534

Salazar, G., Vargas, H., Jasso, M., Molina, G., Ramírez, H. & J., López-Upton. 1999. **Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas.** *Madera y Bosques*, 5(2): 19-34.

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

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

Secchi F. & M. A. Zwieniecki. 2014. **Down-regulation of plasma intrinsic protein aquaporin in poplar trees is detrimental to recovery from embolism.** *Plant Physiology*, 164:1789-1799.

SEMARNAP. 2011. **Recursos Forestales. Extensión de los bosques y otras tierras boscosas.**

http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/approot/dgeia_mce/html/mce_index.html

(Accesada el 29 de Julio de 2014).

Serag, M., F., Kaji, N., Gaillard, C., Okamoto, Y., Terasaka, K., Jabasini, M., Toeshi, M., Mizukami, H., Bianco, A. & Y., Baba. 2011. **Trafficking and Subcellular Localization of Multiwalled Carbon Nanotubes in Plant Cells.** *AcsNANO*, 5(1):493-499.

Shinozaki, K. & K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. **Gene networks involved in drought stress response and tolerance.** *J. Exp. Bot.*, 58(2): 221-227.

Shvaleva A. L., Silva C. E., Breia E., Jouve L., Hausman J. F., Almeida M. H., Maroco J. P., Rodrigues M. L., Pereira J. S. & M. M. Chaves. 2005. **Metabolic responses to water deficit in two Eucalyptus globulus clones with contrasting drought sensitivity.** *Tree Physiology*, 26:239-248.

Smirnova E., Gusev A., Zaytseva O., Sheina O., Tkachev A., Kuznetsova E., Lazareva E., Onishchenko G., Feofanov A. & Kirpichnikov F. 2012. **Uptake and accumulation of multi-walled carbon nanotubes change the morphometric and biochemical characteristics of *Onobrychis arenaria* seedlings.** *Front. Chem. Sci. Eng.*, 6(2): 132–138

Smith SE, Smith FA (1990) **Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport.** *New Phytologist*, (114): 1-38.

Smith, E. S. y D. J. Read. 2000. **Mycorrhizal Symbiosis.** 2ª. Ed. Academic press, San Diego, California, USA. 589 p.

Stampoulis, D., Saion, Sinha K., & J., White. 2009. **Assay-Dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants.** *Environ. Sci. Technol.*, 43 (24): 9473-9479.

Steudle, E. & C., Peterson. 1998. **How does water get through roots?** *J Exp Bot*, 49: 775-788.

Taiz L. & E. Zeiger. 2006. **Fisiología vegetal.** Vol. I Y II. Universitat Jaume, Castellón de la Plana.

Takeuchi, N. 2009. **Nanociencia y Nanotecnología: la construcción de un mundo mayor átomo por átomo.** Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Autónoma de México. 1° Ed. Fondo de Cultura Económica. México. 142 p.

Tiwari, D., Dasgupta-Schubert, N., Villaseñor-Cendejas, L., Carreto-Montoya, L., Villegas, J. & S., Borjas-Garcia. 2013. **Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (Zea mays) and implications for nanoagriculture.** *Appl Nanosci*, DOI 10.1007/s13204-013-0236-7.

Tripathi, S., Kumar, S. S., & S., Sarkar. 2011. **Growth stimulation of gram (Cicer arietinum) plant by water soluble carbon nanotubes.** *Nanoscale*, 3:1176-1181.

Trojanowicz, M. 2006. **Analytical applications of Carbon Nanotubes: a review.** *Trends in Analytical Chemistry*, 25(5):480-489

Unestam, T. & Y., P., Sun. 1995. **Extramatrix structures of hydrophobic and hydrophilic ectomycorrhizal fungi.** *Mycorrhiza*, 5: 301-311.

Unestam, T. 1991. **Water repellency, mat formation and leaf stimulated growth of some ectomycorrhizal fungi.** *Mycorrhiza*, 1:13–20.

Valdés, R. M., E. P. Ambriz, A. V. Camacho y A. G. Fierros. 2010. **Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza.** *Rev. Mex. Cien. For.* 2(1): 53-64.

Van Zonneveld, M., Jarvis A., Dvorak W., Lema G. & Leibing C. 2009. **Climate change impact predictions on *Pinus patula* and *Pinus tecunumanii* populations in Mexico and Central America.** *Forest Ecology and Management.* FORECO-11450. Pp. 1-11.

Villagarcia, H., Dervishi, E., De Silva, K., Biris, A. & M., Khodakovskaya. 2012. **Surface Chemistry of Carbon Nanotubes Impacts the Growth and Expression of Water Channel Protein in Tomato Plants.** *Small*, 8(15): 2328-2334.

Wang H. & A. Yamauchi. 2006. **Growth and function of roots under abiotic stress in soils.** En: Castelán M. N. 2014. Fisiología de plántulas de *Pinus leiophylla* sometidas a estrés hídrico. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Pp. 80

Wang X., Gu X., Han H., Chen K., Liu X. & Lu D. 2012. **Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants.** *J Nanopart Res.*, (14):841

Weatherley, P., E. 1982. **Water uptake and flow in roots** En: Lange, O., Nobel, P., Osmond, C., H., Ziegler (eds) *Physiological plant ecology II.* Encyclopedia of plant physiology, Springer, New York, pp 79–108.

Weatherley, P., E. 1982. **Water uptake and flow in roots.** In: Lange, O., Nobel, P., Osmond, C. & H., Ziegler (eds) *Physiological plant ecology II.* Encyclopedia of plant physiology, new ser vol 12B. Springer, New York, pp 79–108.

Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., & R.K.H. Kinne. 2003. **Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction.**

Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 148: 1-80.

Wormald, P. J. 1975. ***Pinus patula*. Tropical Forestry Paper No.7.** Tropical Forestry Institute. Commonwealth Forestry Institute. Oxford, England. 172 p.

Wright J. A., Osorio L. F. & Dvorak W. S. 1995. **Recent developments in a tree improvement program with *Pinus patula* in Colombia.** *For. Ecol. Manage.*, (72): 229-234.

Zhao Y., Xing G. & Chai Z. 2008. **Nanotoxicology: Are Carbon Nanotubes safe?** *Nat. N*