



**Universidad Michoacana de San Nicolás
de Hidalgo**

**Programa Institucional de Maestría en
Ciencias Biológicas**

Facultad de biología

**Efecto en el crecimiento de *Albizia occidentalis*
en inoculación dual con hongos micorrícicos y
nanopartículas como factor de tolerancia al estrés
hídrico**

Tesis

que Presenta:

Biol. Indira Figueroa Torres

Como requisito para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Biológicas

Directora de tesis: Dra. Mariela Gómez Romero

Codirector: Dr. Javier Villegas Moreno



Morelia Michoacán, Marzo 2021

Agradecimientos

Agradezco a mi directora de Tesis la Dra. Mariela Gómez Romero. Por brindarme la oportunidad de realizar bajo su dirección mis estudios de posgrado. Su disponibilidad en los obstáculos que se presentaban y la orientación que necesitaba. Gracias por su confianza, apoyo y amistad.

A mi Co-asesor el Doctor Javier Villegas Moreno y a mi comité de sinodales conformado por el Dr. Arnulfo Blanco García, Dr. Fernando Pineda García y Dr. Dhirendra Kumar Tiwari. Por su tiempo, disponibilidad, sugerencias y comentarios a favor de mejorar este proyecto.

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas en el área temática de Ecología y Conservación perteneciente a la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por darme la oportunidad de seguir creciendo académicamente en mis estudios de Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A los encargados de los laboratorios de: Restauración Ecológica de la Facultad de Biología de la UMSNH, Laboratorio de Restauración Ambiental y al Laboratorio de Ecología Funcional ambos de la Universidad Autónoma de México (UNAM) campus Morelia. Por facilitar el préstamo de sus instalaciones y material para la realización de este estudio. Junto con los miembros de cada uno de ellos, quienes me apoyaron en diversas actividades en las que necesitaba su apoyo.

A mis amigos y familia, quienes sin tener ningún compromiso en este estudio, me apoyaron incondicionalmente brindando su ayuda en este proceso, de manera moral y activa.

Gracias por ser parte de esta travesía.

Índice de Contenido

Resumen	1
Abstract	3
I. Introducción	5
II. Hipótesis	9
III. Objetivos	9
a. Objetivo general	9
b. Objetivos particulares	9
Capitulo I.- Viabilidad de semillas de <i>Albizia occidentalis</i> a través del tiempo en condiciones de almacenamiento	11
Resumen	11
Abstract.....	12
Introducción	13
Materiales y Métodos.....	15
Colecta de semillas.....	15
Experimento de germinación	16
Análisis de datos.....	17
Resultados.....	18
Discusión	22
Conclusiones	25

Bibliografía.....	26
-------------------	----

Capítulo II.- Supervivencia de *Albizia occidentalis* como factor de tolerancia al estrés hídrico con inoculación de hongos micorrizicos y nanopartículas de carbono..... 28

Resumen	28
---------------	----

Abstract.....	29
---------------	----

Introducción	30
--------------------	----

Materiales y Métodos.....	33
---------------------------	----

Montaje de experimento	33
------------------------------	----

Monitoreo.....	36
----------------	----

Análisis de datos.....	39
------------------------	----

Resultados.....	40
-----------------	----

Supervivencia	40
---------------------	----

Crecimiento aéreo	40
-------------------------	----

Arquitectura de raíz	43
----------------------------	----

Biomasa.....	49
--------------	----

Discusión	53
-----------------	----

Conclusiones	59
--------------------	----

Bibliografía.....	60
-------------------	----

IV. Discusión general.....	65
-----------------------------------	-----------

V. Recomendaciones de manejo	70
VI. Bibliografía Complementaria	71

Índice de Figuras

Figura 1. Colecta y limpieza de semillas. A) Ejemplar de <i>A. occidentalis</i> durante la colecta de semilla; B) Vainas colectadas en una de las bolsas de transporte; C) Extracción de semillas de las vainas; D) Limpieza de semillas.	15
Figura 2. Montaje de experimento y monitoreo de germinación. A) Materiales utilizados para la preparación de réplicas; B) Acomodo de semillas en la caja de Petri; C) Réplicas depositadas en cámara de crecimiento; D) Réplica con semillas germinadas.....	17
Figura 3. Réplicas del experimento representadas en distintas etapas. A) Conjunto de todas las réplicas con semillas germinadas; B) Semillas del lote del 2014 en proceso de descomposición e invasión fúngica; C) Réplica con alta germinación.	19
Figura 4. Comparación del porcentaje de la germinación acumulada por año de colecta a los 50 y 300 días en cámara de crecimiento.....	20
Figura 5. Comparación del porcentaje de germinación total por año de colecta a los 50 y 300 días en cámara de crecimiento. Las letras representan el grupo arrojado por la prueba de Tukey.	21
Figura 6. Preparación del material para el experimento. A) Inóculo ya pesado y separado en bolsa de plástico; B) Lavado de tubetes; C) Preparación de sustrato y llenado de tubetes y D) Colocación de semillas para la germinación de plantas.	34
Figura 7. Inoculación de hongos micorrícicos. A) <i>Phisolitus tinctorius</i> B) <i>Rhizophagus intraradices</i>	35
Figura 8. Toma de medidas de crecimiento de <i>A. occidentalis</i> . A) Altura, B) Diámetro a la altura de la base y C) Cobertura.	37

Figura 9. Procedimiento para el análisis de biomasa y arquitectura de raíz. A) Lavado de raíz; B) Escaneo de raíz; C) Pesado. 38

Figura 10. Altura y cobertura de *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés. 42

Figura 11. Longitud de raíz de *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés. 45

Figura 12. Diámetro y volumen de raíz *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés. 46

Figura 13. Numero de ramificaciones y puntas de raíz de *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés. 47

Figura 14. Arquitectura de raíz de *A. occidentalis*. De acuerdo al tipo de riego. (-) Sin nanopartículas; (+) concentración media de nanopartículas; (++) concentración alta de nanopartículas. 48

Figura 15. Biomasa seca aérea y radical de *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés. 50

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de la germinación obtenida por lote de semillas.	18
Tabla 2. Tratamientos de <i>A. occidentalis</i> en condiciones de vivero para evaluar el efecto de los hongos micorrícicos y nanopartículas como factor de tolerancia al estrés hídrico.....	36
Tabla 3. Porcentaje de supervivencia de plantas de <i>A. occidentalis</i> de acuerdo al tratamiento inoculado y el tipo de riego al que fueron sometidas.	40
Tabla 4. Resultados del análisis factorial de las medidas aéreas de <i>A. occidentalis</i> en el quinto mes.	40
Tabla 5. Análisis factorial de la arquitectura de raíz de <i>A. occidentalis</i>	43
Tabla 6. Análisis factorial de biomasa aérea y radical de <i>A. occidentalis</i>	49
Tabla 7. Resumen del ANOVA en las variables de <i>A. occidentalis</i> . Alt (altura); DAB (diámetro a la altura de la base); Cob (Cobertura); BFA (Biomasa fresca aérea); BFR (Biomasa fresca raíz); BSF (Biomasa seca aérea); BSR (Biomasa seca raíz); Long R (longitud de raíz); Long RE (longitud de raíz específica); DR (Diámetro de raíz); Pun (Puntas); Ram (ramificaciones); Vol (Volumen de raíz); Den (Densidad de raíz). Tratamientos control y estrés del 1-6.	51

Resumen

Albizia occidentalis (Fabaceae) conocida como Palo blanco. Es una especie con potencial para ser utilizada en programas de restauración ecológica. Sin embargo, esta enlistada en la Nom-059-SEMARNAT-2010 (Amenazada) y en la Lista roja de especies en riesgo de la IUCN (En Peligro). Al haber poca información sobre esta especie, se desconoce el tiempo en el que puede conservar la viabilidad de sus semillas en condiciones de almacenamiento (bancos de germoplasma), información indispensable para la conservación de las especies. Por otra parte, la búsqueda de estrategias que puedan ayudar a incrementar el establecimiento de esta especie y con ello incrementar la tolerancia al estrés hídrico como el uso de hongos micorrícicos y/o nanopartículas, abren la pauta para explorar este tipo de estrategias para el establecimiento de especies nativas y en riesgo ante las nuevas condiciones que trae consigo el cambio climático. El estudio presenta dos experimentos. Primero, se enfocó en determinar el tiempo en el que las semillas de *A. occidentalis* pueden conservar la viabilidad germinativa en condiciones de almacenamiento (banco de germoplasma). Se comparó la germinación de cuatro lotes de semillas con diferentes años de almacenamiento (diez, ocho, cinco y colecta reciente); entre los lotes de semillas, el de cinco años de almacenamiento no fue conservado en las condiciones recomendadas, sirviendo como referencia del tiempo en el que se mantiene la viabilidad sin el almacenamiento adecuado. Se prepararon ocho cajas de Petri (replicas) con 50 semillas cada una por lote de semillas, con una gasa estéril como sustrato y humedecida con captan al 2%, todas las cajas. Se mantuvieron en una cámara crecimiento a temperatura constante de 25°C y a 12 hrs luz/obscuridad. Finalmente se encontró que esta especie comienza a perder la viabilidad de las semillas después de los diez años de almacenamiento, perdiendo hasta un 40% a los 50 días y un 30% a los 300 días. Mientras que las semillas de cinco años y no almacenadas adecuadamente perdieron más del 50% de la viabilidad y perdiéndose toda la semilla a los 24 días. Además, se observó que a partir de los ocho años de almacenamiento las semillas comienzan a mostrar un estado de latencia con una respuesta de germinación más lenta, en comparación con las

semillas de colecta reciente. El segundo capítulo estuvo enfocado a la tolerancia al estrés hídrico de *A. occidentalis* comparando la supervivencia y crecimiento de las plantas al ser inoculadas con los hongos micorrícicos *Pisolithus tinctorius* y *Rhizophagus intraradices* (ausencia, inoculación individual y dual) combinados con tres concentraciones de nanotubos de carbono (0 µg/mL; 20 µg/mL y 40 µg/mL). Cada tratamiento fue duplicado completando un total de 24 tratamientos, la mitad fueron sometidos a un riego control de cada tres días (capacidad de campo) y a un nivel medio de estrés cada siete días durante cinco meses. Mensualmente se tomaron las medidas de crecimiento: altura y diámetro a la altura de la base (DAB) y bimestralmente la cobertura. Al finalizar el experimento, se realizó la cosecha de cinco plantas por tratamiento, se lavaron y la parte aérea (tallos y hojas) fue separada para ser escaneada y poder analizar la arquitectura de raíz. Por método destructivo se evaluó la biomasa tomando tanto el peso fresco como el peso seco de la parte aérea de la planta y de la raíz. La supervivencia de las plantas fue alta en los tratamientos sometidos a estrés. Además, las plantas que fueron sometidas a estrés hídrico tuvieron tendencia a disminuir su crecimiento en comparación con las no estresadas. La inoculación con el hongo micorrízico *P. tinctorius* sin nanotubos de carbono y con la concentración media (20 µg/mL) presentaron el mayor crecimiento en la parte aérea de las plantas. Mientras que en la parte radical la inoculación con *R. intraradices* con la concentración alta de nanotubos (40 µg/mL) fue la que presentó mayor efecto en las variables de arquitectura de raíz y biomasa. El análisis estadístico ANOVA mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en la mayoría de las variables evaluadas, en cambio el análisis factorial en la parte aérea mostró valores de significancia ($P < 0.05$) por el factor de estrés. En la parte radical los factores que tuvieron valor de significancia en varias de las variables evaluadas fueron por el tipo de micorriza y la presencia de nanotubos. Por último se sugiere una estrategia ecofisiológica que podría funcionar en condiciones de campo para tolerar el estrés hídrico y potencializar el crecimiento de esta especie.

Palabras clave: Estrategias de restauración, especie nativa, sequía, interacción, tratamiento.

Abstract

Albizia occidentalis (Fabaceae) is well known as Palo Blanco in México. It is commonly used for ecological restoration for natural habitats. However, it is cataloged as “threatened” by the Nom-059-SEMARNAT-2010 and “Endangered” by the red list of the IUCN (International Union for Conservation of Nature). Moreover, there is few information about how long its seeds preserve their viability under storage conditions (germplasm banks), essential information for the conservation of species. In this sense, the research about the effect of mycorrhizal fungi and/or nanoparticles on the hydric stress tolerance of this tree generate information for its survival under new environmental conditions generated by climate change.

This investigation studied the time that for sets of *A. occidentalis* seeds conserve their germination viability under storage conditions (germplasm banks) of ten, eight and five years and were compared with the results obtained of a recent harvest. Among the seed sets, the five years set was conserved under incorrect storage conditions (temperature 0-5 C° and humidity 4-8%) and it was used as reference to determinate the viability time under improper storage conditions. For the experiments, fifty seeds from each of the sets were placed inside a Petri dish with a sterile gauze as substrate moistened with captan at 2%. Each Petri dish was incubated at 25 °C at 12 hour of light followed by 12 hours of darkness. All experiments were performed eight times. Results showed that this specie begin to loss viability after ten years of storage, losing up to 40 % and 30 % for 50 and 300 days, respectively. While, the seed storage for 5 year under importer conditions loosed more than the 50% of viability and after 24 days all seeds were loose. Moreover, it was observed that at eight years of storage the seed got a dormancy state with a slower germination response when compared with the recent harvest seeds.

The hydric stress of *A. occidentalis* has also been examined by comparing the growth and survival of the plants inoculated with micorrícicos fungi such as *Pisolithus tinctorius* y *Rhizophagus intraradices* mixed with carbon nanotubes (CNT) at 0, 20 and

40 µg/mL (individual and mixed inoculation) and compared with a plant without fungi inoculation. Each treatment was made by duplicate for a total of 24 treatments. The haft was watered every tree days (forest capacity) and under a middle stress every seven days for five months. Growth control were monitored by recording monthly the height, diameter at the base height (DAB) and bimonthly the cover. At the end of the experiment, five plants for treatment were studied by separating the aerial part (stem and leaves) and the root was washed to analyze its architecture using a scanner. The biomass was analyzed by weighting the fresh and dry aerial part and root. The results demonstrated a high survival of the plants under hydric stress showing a minor growth when compared to the growth of the plants without hydric stress. The inoculation with *P. tinctorius* without CNT and with CNT at 20 µg/mL showed the highest growth in the aerial part of the plants. While, the biggest biomass and root variation were obtained by the inoculation with *R. intraradices* with 40 µg/mL of CNT. The statistical analysis by ANOVA software showed significance differences ($P < 0.05$) in most of the evaluated variables. On the contrary, the factorial analysis for the aerial part showed significance differences less than 0.05 by the stress factor. Furthermore, in the radical part, the factors that presented a significance values of the variables were by the mycorrhiza type and the presence of CNT. Finally, it was suggested an ecophysiological strategy that could work at natural forest conditions to tolerate hydric stress and favor the growth of this species.

Key words: Restauration strategies, native species, drought, interaction, treatment.

I. Introducción

El cambio climático en el planeta se ha convertido en una de las problemáticas principales para la conservación de la vida silvestre. Evidencia de ello es el aumento de la temperatura ambiente; la cual en particular provoca diversos efectos secundarios en el planeta, prueba de lo anterior son las condiciones ambientales tan cambiantes y el aumento de eventos climáticos extremos (Sequías, Huracanes, Olas de calor, heladas, etc.). Los organismos al enfrentarse ante este tipo de eventos climáticos se ven afectados reduciendo las probabilidades de supervivencia (Hansen 2009; Compant *et al.* 2010; Sturrock *et al.* 2011; Hansen *et al.* 2012; Koleff *et al.* 2016; Langley *et al.* 2018).

Si sumamos a lo anterior la pérdida de ecosistemas silvestres por distintos factores antropogénicos tales como: la deforestación, cambio de uso de suelo (actividades agrícolas), introducción de especies exóticas, urbanización, incendios forestales, entre otras (Gómez-Romero *et al.* 2013; Ceccon y Martínez-Garza 2016; Tobón *et al.* 2016). Las consecuencias al medio ambiente como: la pérdida de biodiversidad, contaminación, pérdida de suelos y la pérdida de servicios ecosistémicos (filtración y producción de agua, calidad del aire, fijación de CO₂, etc.) pueden ser desastrosas (Vargas 2011; Ripple *et al.* 2019). Además, México no es la excepción ante esta problemática. A pesar de ser un país catalogado como mega diverso, desafortunadamente pierde grandes hectáreas de bosques anualmente por obra del hombre (cambio de uso de suelo y deforestación) (Jiménez *et al.* 2014; Tobón *et al.* 2016). Lo cual aumenta la necesidad de crear estrategias que puedan mitigar el impacto en el medio ambiente que esto lleva consigo.

Teniendo en cuenta la crisis actual a la que se enfrenta la vida silvestre. La restauración ecológica puede ser una alternativa para mitigar el impacto que se ha tenido sobre los ecosistemas, ya que es definida como el proceso que se emplea para recuperar las áreas naturales dañadas por actividades humanas, las cuales han sido alteradas y modificadas de manera crítica (Ceccon y Martínez-Garza 2016). Para

poder tener una restauración exitosa es importante tener en cuenta distintos aspectos; para que las especies de plantas que se planean utilizar con este fin estén adaptadas a las nuevas condiciones ambientales a las que se enfrentarán y puedan sobrevivir (Ceccon y Martínez-Garza 2016; Timpane-Padgham *et al.* 2017).

Para conservación de especies con fines de restauración es importante tener en cuenta la información sobre la biología de las especies y la formación de bancos de germoplasma para este fin (Forte *et al.* 2017). Lo cual implica la necesidad de conocer el tiempo en el que las semillas de las especies se conservan y las condiciones en las que pueden mantener la viabilidad germinativa para futuros programas de restauración (Merritt y Dixon 2011). El conocimiento sobre estos aspectos y la biología de las especies en riesgo, requiere de investigación que pueda tener impacto para su conservación.

Por otra parte, es importante la creación de estrategias que ayuden a disminuir el impacto de las condiciones ambientales derivadas del cambio climático en las plantas de interés para restauración, como la sequía (Sturrock *et al.* 2011; Burney *et al.* 2015). Las altas temperaturas y la variación de la precipitación (escasez) afectan directamente a las plantas provocando el estrés hídrico, manifestándose de manera negativa en el crecimiento (altura, tallo, raíces, follaje y biomasa) y en un estadio prolongado en que se provoca la muerte de la misma (Ruíz *et al.* 2004; Valladares 2004; Luna-Flores *et al.* 2013; Gómez-Romero *et al.* 2015). Actualmente, se han realizado estudios enfocados en desarrollar estrategias con el objetivo de incrementar el porcentaje de supervivencia, de las plantas en zonas restauradas utilizando como alternativa interacciones bióticas como lo son las micorrizas (hongos asociados a la raíz de las plantas). La inoculación con hongos micorrícicos en plántulas de especies de interés forestal, ha demostrado que en su mayoría proporcionan una mayor tasa de supervivencia, tolerancia a la sequía (estrés hídrico), así como un mejor desarrollo morfológico y fisiológico en comparación con plantas sin la interacción (Hoeksema *et al.* 2010; Gómez-Romero *et al.* 2013; Báez-Pérez *et al.* 2015; Gómez-Romero *et al.* 2015).

Mientras, el uso de las nanopartículas en plantas, es una técnica relativamente nueva y poco estudiada, en la que la inoculación de nanotubos ha demostrado que promueven la germinación y el crecimiento de las plantas (Lara-Romero *et al.* 2017), sobre todo, de aquellas con lotes donde los porcentajes de germinación son muy bajos. Las nanopartículas se han utilizado en diversas áreas tecnológicas, y en aspectos relacionados a la productividad de sistemas agrícolas. Sin embargo, su uso en aspectos forestales es relativamente nuevo. Aun cuando se ha mencionado en la literatura su probable toxicidad, el estudio de Lara-Romero y colaboradores en el 2017, sugiere la existencia de nanotubos de carbono de pared múltiple en la naturaleza, como consecuencia de los incendios forestales, desde antes de la existencia del humano en la tierra.

Por otro lado, se ha documentado que especies de la familia Fabaceae, son idóneas para la restauración ecológica, ya que, varias especies de ésta familia, son fijadoras de Nitrógeno por la asociación simbiótica con bacterias y son resistentes para establecerse en suelos perturbados (Vazquez *et al.* 2001; Ruíz-Reyes *et al.* 2009). Una especie de esta familia es *Albizia occidentalis* conocida con el nombre común de palo blanco, es un árbol que tiene una población limitada, la cual está distribuida en pequeños remanentes y sin conectividad entre ellos. Esta especie se encuentra en la categoría A (amenazada) dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Norma Oficial Mexicana), mientras que en la lista roja de especies amenazadas de la IUCN por sus siglas en inglés (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) se encuentra en la categoría EN (en peligro) (González-Espinoza 1998; Rico *et al.* 2008). A lo anterior le sumamos que es una especie nativa de México, y forma parte de la composición florística del bosque tropical caducifolio el cual se ha visto reducido hasta un 4% de su distribución original, haciéndola una especie idónea para fines de conservación y restauración (Rzendowski 2006; Arce *et al.* 2008; Rzendowski & Rzendowski 2013). Es importante conocer más sobre la biología de esta especie, ya que en un ensayo de restauración hecho por Encino-Ruíz y colaboradores en el 2013 utilizó tres especies arbóreas entre ellas *A. occidentalis*, en este estudio se demostró que esta especie tiene una baja supervivencia (26%). Por lo anterior, el desarrollo de

estrategias para incrementar la supervivencia y el establecimiento de esta especie como resultado de la interacción con microorganismos y/o nanopartículas puede ser crucial para el éxito en el establecimiento de *A. occidentalis* en campo.

Este trabajo tiene como finalidad conocer la viabilidad de germinación en las semillas de *A. occidentalis* en condiciones de almacenamiento y como esta se va reduciendo con el paso del tiempo (años). Además, ver la respuesta de plantas de esta especie al ser sometidas a estrés hídrico cuando son inoculadas dualmente con dos hongos micorrícicos *Pisolithus tinctorius* (ectomicorriza) y *Rhizophagus intraradices* (endomicorriza) y / o nanopartículas. Con el propósito de identificar una estrategia ecofisiológica que tenga un efecto positivo en la supervivencia y / o crecimiento de *A. occidentalis* (especie en la Nom-059) en sitios degradados ante la problemática de pérdida de ecosistemas y cambio climático.

II. Hipótesis

Las semillas pierden su viabilidad germinativa después de estar almacenadas durante largos períodos de tiempo. Por lo que se espera que los lotes de semillas de colectas recientes tendrán un mayor porcentaje de germinación que los de colectas de años anteriores. Por otro lado, se ha reportado que la inoculación de plántulas con micorrizas tiene un efecto positivo en la supervivencia y el crecimiento. En este sentido, *Albizia occidentalis* puede obtener una mayor supervivencia y crecimiento en plántulas inoculadas con hongos micorrícicos y nanotubos de carbono en condiciones de estrés hídrico.

III. Objetivos

a. Objetivo general

Conocer la viabilidad de las semillas de *Albizia occidentalis* a través del tiempo, así como la supervivencia y crecimiento en plantas inoculadas dualmente con los hongos micorrícicos *Pisolithus tinctorius* (ectomicorriza) y *Rhizophagus irregularis* (endomicorriza) y/o nanopartículas en condiciones de estrés hídrico.

b. Objetivos particulares

- Evaluar la velocidad y porcentaje de germinación de semillas de *A. occidentalis* a través del tiempo.
- Determinar la supervivencia y crecimiento de plántulas de *A. occidentalis* utilizando la inoculación dual de los hongos micorrícicos *Pisolithus tinctorius* (ectomicorriza) y *Rhizophagus irregularis* (endomicorriza) en condiciones de estrés hídrico.
- Determinar la supervivencia y crecimiento de plántulas de *A. occidentalis* en presencia de nanopartículas.

- Identificar la estrategia ecofisiológica que tenga efecto en la supervivencia y el crecimiento de *A. occidentalis* para la restauración ecológica de sitios degradados ante condiciones de cambio climático.

Capítulo I.- Viabilidad de semillas de *Albizia occidentalis* a través del tiempo en condiciones de almacenamiento

Resumen

La conservación ex situ de especies de plantas silvestres requiere de los bancos de semillas encargados en la conservación del germoplasma. Los cuales requieren de la información sobre la germinación y el tiempo en el que las especies pueden mantener la viabilidad germinativa. Con el deterioro en el medio ambiente ha aumentado la necesidad de generar este tipo de información para aquellas especies amenazadas y dentro de categorías de riesgo por el deterioro ambiental como *A. occidentalis*. Se comparó la germinación de cinco lotes de colecta de semillas con diferentes años de almacenamiento: 2009 (10 años), 2011 (Ocho años), 2014 (Cinco años) y 2019 (Colecta reciente). El lote colectado en el 2014 es el único que no fue almacenado en las condiciones de temperatura y humedad requeridas. Por cada lote se prepararon ocho cajas de Petri; con 50 semillas cada una. Se depositaron en cámara de crecimiento a 25°C y a 12 hrs luz/obscuridad. La germinación se monitoreó cada tercer día durante 300 días. Los resultados obtenidos demostraron que esta especie comienza a perder su viabilidad germinativa después de los 10 años de almacenamiento, con un declive del 40% a los 50 días y 30% a los 300 días. Las semillas que no fueron almacenadas adecuadamente tuvieron una pérdida mayor al 50%. Mientras que las de colecta reciente y con ocho años de almacenamiento registraron germinación mayor al 90%. Los análisis estadísticos ANOVA, GLM y de supervivencia mostraron diferencias estadísticamente significativas de $P < 0.05$ entre los grupos de semillas; complementado con la prueba de Tukey en la que se diferenciaron por grupos. Además, se encontró que esta especie entra en un estado de latencia a partir de los ocho años de almacenamiento, con una respuesta más lenta en su germinación. Concluyendo que las semillas de *A. occidentalis* pueden ser almacenadas durante 10 años en condiciones de 4°C y humedad controlada, conservando más del 50% de su viabilidad. Lo que hace a esta especie ideal para almacenar durante periodos largos de tiempo en bancos de germoplasma.

Palabras clave: Germinación, tiempo de almacenamiento, condiciones de almacenamiento, especie nativa, restauración.

Abstract

Ex-situ conservation of wild plant species requires seed banks in charge of germplasm conservation. These require information on germination and the time in which the species can maintain germination viability. The environmental deterioration supports the need to generate this kind of information, it has increased for threatened species and under risk categories due to environmental deterioration such as *A. occidentalis*. This experiment compared the germination of five seed batches with different storage years: 2009 (10 years), 2011 (eight years), 2014 (five years), and 2019 (Recent collection). The batch collected in 2014 is the only one that was not stored in the required temperature and humidity conditions (0-5°C y 4-8%). For each batch were prepared eight Petri dishes with 50 seed each one. They were placed in a growth chamber at 25°C and 12 hrs light/dark. The germination was monitored every third day for 300 days. The results obtained showed that this species begins to lose its germination viability after 10 years of storage, it declines of 40% to 30% at 50 and 300 days respectively. The seeds that were not stored properly have a loss greater than 50%. While those of recent collection and with eight years of storage registered germination greater than 90%. The statistical analyzes of ANOVA, GLM, and survival showed significant differences of $P < 0.05$ between the seed groups, complemented with Tukey test they were differentiated by groups. Also, it was found that this species enters in a dormancy state after eight years of storage, with a slower response in its germination. Concluding that the seeds of *A. occidentalis* can be stored for 10 years in conditions of 4°C and controlled humidity, conserving more than 50% of their viability. That makes this species ideal for long-term storage in germplasm banks.

Key words: Germination, storage time, storage conditions, native species, restoration.

Introducción

La semilla es conocida como el órgano de establecimiento de las plantas vasculares, cuando esta alcanza su estado de madurez, al encontrar las condiciones ambientales adecuadas (temperatura y humedad) da inicio al proceso de germinación, el cual da origen a un nuevo individuo (planta) (Baskin y Baskin 1998; Matilla 2008; Doria 2010).

Al hablar sobre la viabilidad de las semillas, se refiere al periodo de tiempo en el que las semillas mantienen su capacidad germinativa (Matilla 2008), esta puede disminuir con el paso del tiempo y las condiciones de almacenamiento en las que se encuentran (Forte *et al.* 2017). Por ejemplo, se ha documentado que, algunas especies de la Familia Fabaceae poseen un tiempo largo de viabilidad, debido a que la mayoría de las especies de esta familia presentan semillas con testas duras e impermeables, sin embargo, hay otras especies que su cubierta es más delgada y permeable (Doria 2010; González-Salvatierra *et al.* 2013) como la de *A. occidentalis*. El tiempo de viabilidad en las semillas está relacionado con la tolerancia que tiene la semilla a la desecación y en base a esto existe una clasificación: semillas recalcitrantes (se mantienen viables durante un tiempo corto) y ortodoxas (se mantienen viables durante un tiempo largo). Después de cierto tiempo de almacén las semillas pueden entrar en un estado de latencia, el cual impide la germinación de éstas a pesar de que la semilla se encuentre en condiciones óptimas para su germinación y el embrión aún sano. De acuerdo a Baskin y Baskin 2004 la latencia se puede clasificar de acuerdo a la fisiología, características físicas y morfológicas de la semilla, Sin embargo, el estado de latencia a la hora de hacer pruebas de germinación en semillas almacenadas en períodos largos de tiempo, puede presentar una baja en el porcentaje de germinación total de un lote (Godefroid *et al.* 2010).

Para que el período de viabilidad se prolongue en condiciones de almacenamiento. Las semillas deben de encontrarse bajo condiciones de temperatura y humedad controladas, de acuerdo con Doria 2010 las semillas deben contenerse en refrigeradores con temperatura constante de 4°C aproximadamente.

Los bancos de semillas son una alternativa para la conservación de especies de plantas en riesgo de forma ex-situ, esto con fines de restauración de ecosistemas a los que pertenecen que han sido degradados, ya que juegan un papel clave para el funcionamiento del mismo (Merritt *et al* 2011). Lo cual hace necesario el conocimiento de las características germinativas de las plantas, ya que esta información puede promover el entendimiento de las estrategias fisiológicas y de adaptación de estas (Baskin y Baskin 1998). Se han realizado trabajos en los que se ha demostrado que las semillas disminuyen su viabilidad con el paso de tiempo, incluso si estas se encuentran en condiciones controladas de temperatura y humedad. Sin embargo, el periodo de tiempo va a variar según la especie; este conocimiento es de suma importancia ya que en los bancos de semillas se debe tener control sobre las semillas almacenadas y que puedan ser utilizadas para fines de conservación (Doria 2010; Forte *et al.* 2017).

Es poca o prácticamente nula la información que existe sobre la viabilidad de las semillas de *A. occidentalis*, ya que no hay datos sobre el tiempo en el que estas pueden mantener su viabilidad en condiciones controladas y de almacenamiento en bancos de semillas. Lo que se ha visto sobre esta especie es que sus semillas son diferentes a las de la mayoría de las leguminosas, ya que tiene una testa más permeable y menos dura; lo que la hace más vulnerable a perder su viabilidad en un periodo de tiempo corto, aunque de acuerdo a Arce y colaboradores en el 2008 reportan que las semillas de *A. occidentalis* son del tipo ortodoxo y se pueden mantener viables durante periodos de tiempo largos a temperatura ambiente. Lo que lleva al objetivo de este capítulo generar conocimiento sobre el tiempo en el que las semillas de *A. occidentalis* pueden mantener su viabilidad en condiciones de almacenamiento a través del tiempo, con fines de almacén en bancos de germoplasma.

Materiales y Métodos

Colecta de semillas

La colecta fue en el Municipio de Copándaro Michoacán, ubicado cerca de una población grande de individuos silvestres y de la riberia del Lago de Cuitzeo el 18 de Diciembre del 2018.

Las vainas fueron colectadas con la ayuda de una garrocha (Figura 1A) y se transportaron en tela de algodón para evitar humedad (Figura 1B). Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de semillas de la vaina de manera manual (Figura 1C) y la limpieza de: basura, semillas depredadas y con infección fúngica (Figura 1D). Finalmente se almacenaron en recipientes previamente etiquetados en un banco de germoplasma a una temperatura de 4°C.



Figura 1. Colecta y limpieza de semillas. A) Ejemplar de *A. occidentalis* durante la colecta de semilla; B) Vainas colectadas en una de las bolsas de transporte; C) Extracción de semillas de las vainas; D) Limpieza de semillas.

Experimento de germinación

Para comparación de lotes de semillas de *A. occidentalis* almacenadas con distintos años de antigüedad, se utilizaron semillas almacenadas dentro del banco de germoplasma del Laboratorio de Restauración Ambiental de la Universidad Autónoma de México (UNAM) campus Morelia. Finalmente se seleccionaron cuatro fechas de colecta de los años: 2009, 2011, 2014 y 2018-2019 (medio silvestre; semi-urbano y totalmente Urbano). Por cada lote de año de colecta se hicieron ocho réplicas en cajas de Petri con 50 semillas cada uno, cubriendo lo sugerido por el ISTA y Baskin y Baskin (1998), las semillas fueron distribuidas en la caja de la manera más uniforme posible (Figura 2). En cada réplica se utilizó una gasa como sustrato humedecida con 2 ml de solución con captán (2g/l), para disminuir el riesgo de contaminación fúngica y etiquetadas con el año de colecta. Posteriormente, las réplicas fueron colocadas en cámara de crecimiento, programada con 12 horas de luz y 12 horas oscuridad con temperatura constante de 25°C.

Una vez montado el experimento, se registró la germinación acumulada cada tercer día hasta llegar al 100% de germinación, que las semillas dejaran de germinar y/o comenzaran a descomponerse (Figura 3). Se adicionó agua destilada a las cajas Petri secas o con poca humedad. Durante el experimento, se extrajeron las semillas germinadas y se registró el porcentaje de semillas con invasión por hongos.



Figura 2. Montaje de experimento y monitoreo de germinación. A) Materiales utilizados para la preparación de réplicas; B) Acomodo de semillas en la caja de Petri; C) Réplicas depositadas en cámara de crecimiento; D) Réplica con semillas germinadas.

Análisis de datos

Los datos de germinación fueron analizados mediante un análisis de supervivencia, un Modelo Lineal Generalizado (GLM) y un ANOVA para encontrar la diferencia germinativa entre los lotes de semillas. En el caso del ANOVA se tomaron dos tiempos a los 50 y 300 días en cámara de crecimiento. Como un comparativo de la velocidad de germinación. Los análisis se realizaron con los programas estadísticos R, JMP Versión 8 y S-Plus 2000 con ayuda de Excel para la captura de datos.

Resultados

Los resultados obtenidos demostraron que los lotes de semillas de *A. occidentalis* comienzan a perder la viabilidad a partir de los 10 años de almacenamiento (Figura 4), esto si excluimos el lote de semillas de año 2014; que fue un caso especial debido a que este lote no llego al 50% de germinación (Tabla 1) y esto fue a causa de que no estuvo almacenado en condiciones controladas de temperatura (4°C); teniendo como consecuencia la disminución temprana de la viabilidad de las semillas (Figura 3B). Sin embargo, los demás lotes que fueron almacenados en condiciones adecuadas para la conservación de la semilla demostraron que la viabilidad se mantiene hasta los ocho años de almacenamiento. Es importante destacar que en el caso del lote con 10 años de almacenamiento registró la pérdida de viabilidad pero también las semillas mostraron un estado de latencia en el que después de un año de monitoreo estas siguieron germinando de manera esporádica (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de la germinación obtenida por lote de semillas.

Lote Año de colecta	Años de almacén	Total semillas germinadas	Porcentaje Germinación día 50	Porcentaje Germinación día 300	Porcentaje Invasión fúngica	Última germinación (Día)
2009	10	278	58.25%	69.5%	3.5%	279
2011	8	394	87.75%	98.5%	1.5%	72
2014	5	169	42.25%	42.25%	75%	21
2019	0	377	93.5%	94.25%	29.25%	207

La velocidad de germinación de esta especie se pudo observar con la respuesta rápida del lote de colecta reciente, teniendo como una referencia a los 50 días de incubación, estas ya estaban cerca de su número máximo de germinación (Figura 5); incluso desde los primeros 20 días. Los lotes de colecta 2009 y 2011 presentaron un tipo de latencia en sus semillas, ya que estas tuvieron una velocidad de germinación más lenta (Figura 4). Sin embargo, las semillas del 2011 a pesar de presentar al inicio latencia y su respuesta fue un poco más lenta tuvo un porcentaje alto del 98.5% incluso mayor que del lote de colecta reciente (Tabla 1).



Figura 3. Réplicas del experimento representadas en distintas etapas. A) Conjunto de todas las réplicas con semillas germinadas; B) Semillas del lote del 2014 en proceso de descomposición e invasión fúngica; C) Réplica con alta germinación.

Los análisis estadísticos demostraron que si hubo una diferencia significativa entre los diferentes años de colecta. El análisis de riesgos de Cox (análisis de supervivencia) aplicado a la germinación arrojó un valor de significancia de $\chi^2=900.4643$ y $P<0.0001$ a los 50 días y a los 300 días $\chi^2=807.1777$ y $P<0.0001$ al igual en el modelo lineal generalizado ($P<0.001$). Mediante el análisis de ANOVA se obtuvieron valores con diferencias significativas de $P<0.05$ tanto a los 50 como a los 300 días (50 Días: $F=55.758$; $P<0.0001$; 300 Días: $F=114.0353$; $P<0.0001$). En la prueba de Tukey se pudieron representar tres grupos, los cuales fueron representados con la letra “A” a los que tuvieron la mayor germinación (2011 y 2019), “B” germinación media (2009) y “C” baja germinación (2014) (Figura 5).

Curvas de germinación acumulada

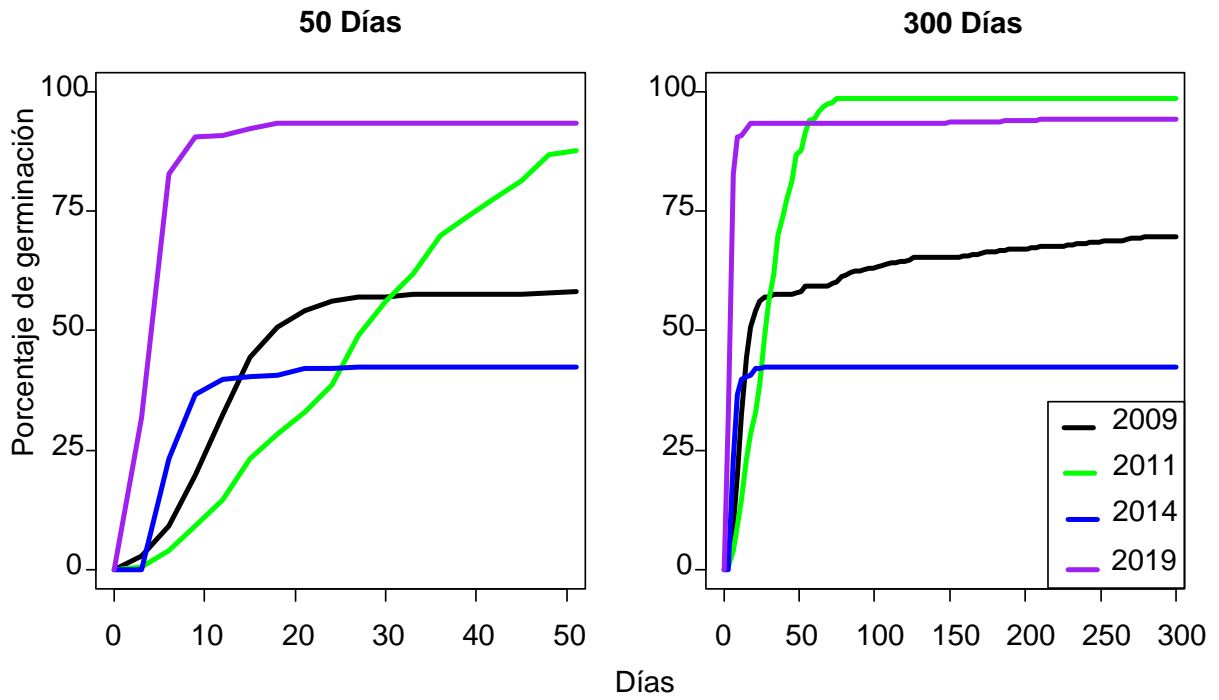


Figura 4. Comparación del porcentaje de la germinación acumulada por año de colecta a los 50 y 300 días en cámara de crecimiento.

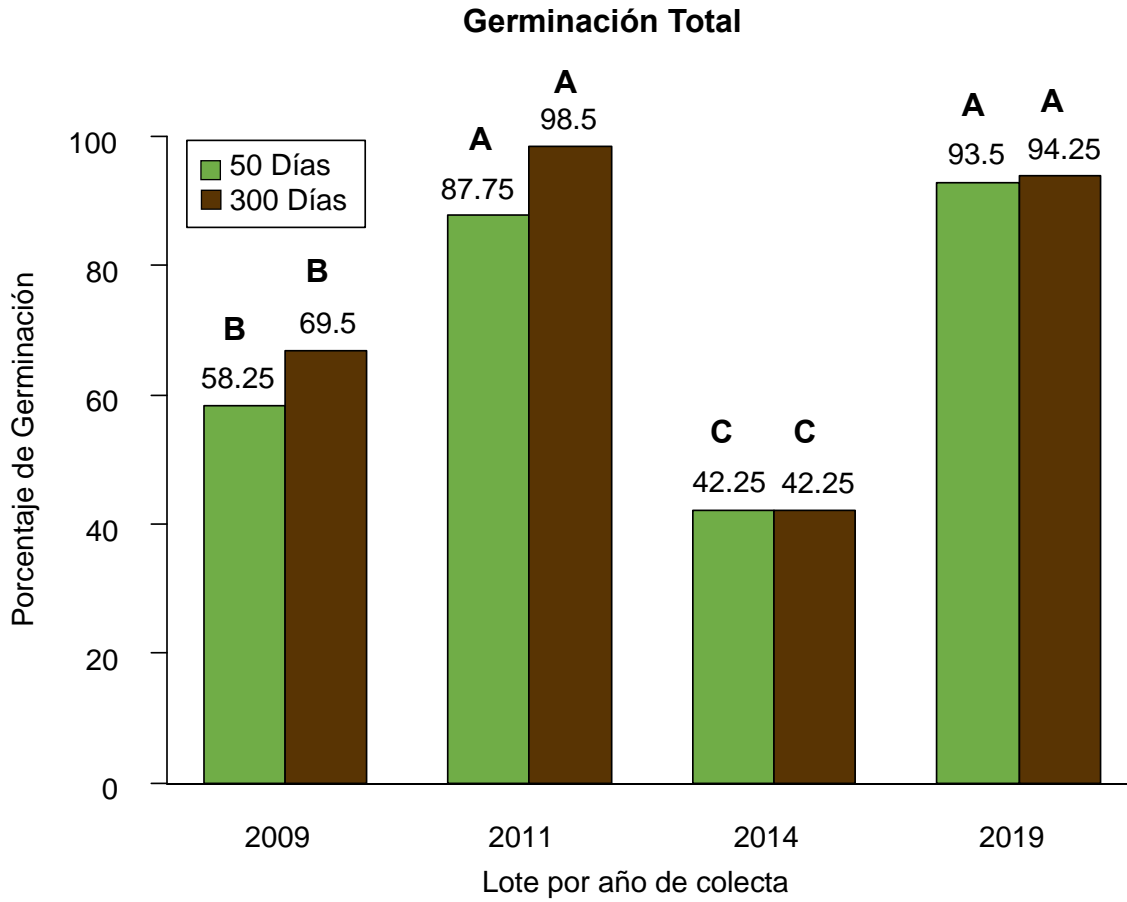


Figura 5. Comparación del porcentaje de germinación total por año de colecta a los 50 y 300 días en cámara de crecimiento. Las letras representan el grupo arrojado por la prueba de Tukey.

Discusión

La pérdida de viabilidad de las semillas con el paso del tiempo varía de acuerdo a la especie. En el caso de las semillas de *A. occidentalis* se pudo determinar que bajo condiciones adecuadas de temperatura (0-5°C) y humedad (4-8%), como lo recomienda Doria 2010, esta especie puede conservar la viabilidad prácticamente intacta después de los ocho años de almacenamiento. Mientras que después de los diez años se registra una pérdida entre el 30 y 40% dependiendo del tiempo dentro de la cámara de crecimiento.

Si comparamos el comportamiento del lote de semillas colectadas en el 2014 (cinco años de almacenamiento) con los demás, a causa de no haber sido almacenado en las condiciones recomendadas de temperatura y humedad, su viabilidad disminuyó más del 50%. En particular con este lote se puede visualizar el tiempo en el que las semillas de esta especie se pueden conservar viables cuando son almacenadas en condiciones de temperatura ambiente. Trabajos como en el de Orantes-García *et al.* 2013, quienes al explorar como iba disminuyendo la viabilidad de las semillas de tres especies de árboles nativos de la selva lacandona *Cordia alliodora*, *Terminalia amazonia* y *Bursera bipinnata* en el lapso de un año en condiciones de temperatura ambiente prácticamente la viabilidad se redujo bastante conservando del 14% a un 35% dependiendo de la especie. Así mismo Forte *et al.* 2017, reporta que las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, influyo en la reducción del tiempo de viabilidad en las semillas de diferentes especies y familias que fueron testeadas. Lo que da la pauta a la importancia de las condiciones de temperatura y humedad controladas, lo cual contribuye a la conservación de las semillas viables por periodos de tiempo más largos.

Es importante destacar que las semillas de esta especie mostraron un estado de latencia o dormición en los lotes de ocho y diez años de almacenamiento, al tener una respuesta de germinación más lenta en comparación con el de colecta reciente y una prolongación en el tiempo de germinación (hasta 300 días). El estado de latencia o dormición se ha presentado en otras especies en condiciones de almacenamiento,

como en el estudio de Goefroid *et al.* 2010 al probar la germinación de varias especies de plantas pertenecientes a diferentes familias dentro de bancos de semillas y compararon la viabilidad germinativa entre lotes de semillas colectadas en diferentes años, encontraron que parte de la baja germinación que presentaron los lotes con más tiempo de almacenamiento se debía a que las semillas entraban en un grado de latencia arrojando un porcentaje de germinación más bajo. Por otra parte, Galíndez *et al.* 2010 exploraron formas de romper este estado por medio de tratamientos pre-germinativos en dos especies: *Collaea argentina* (Fabaceae) y *Abutilon pauciflorum* (Malvaceae), destacando la importancia de conocer este tipo de técnicas para romper este estado y maximizar la tasa de germinación de semillas con un grado de antigüedad.

La capacidad germinativa de *A. occidentalis* muestra un comportamiento eficiente, ya que no requiere de un tratamiento pre-germinativo y presenta germinación a partir del día 3 de incubación en la cámara de crecimiento. Además, una velocidad relativamente alta a comparación de otras especies de Leguminosas; las cuales para poder germinar requieren de tratamientos y llegan a presentar la primera germinación en periodos de tiempo más largos. Trabajos como el de Vargas *et al.* 2003; Walters *et al.* 2005; Probert *et al.* 2009; Galíndez *et al.* 2010 y Goefroid *et al.* 2010 documentan el éxito de germinación de esta familia, así como la viabilidad por especie. Al ser una de las familias más diversas de plantas y con ello al distribuirse en diferentes tipos de ecosistemas, existe una variabilidad en la capacidad de conservar la viabilidad de las semillas a nivel Familia.

Se ha sugerido en trabajos como el de Walters *et al.* 2005 que la viabilidad de las semillas está influenciada por el área geográfica de distribución. Complementando la idea anterior en el trabajo de Probert *et al.* 2009 retoma parte de esta idea al proponer que el clima en el que crece la especie puede definir la longevidad de las semillas. Estimando que las especies de plantas que tienen una distribución en zonas con climas más secos y cálidos tienden a mantener su viabilidad germinativa por periodos de tiempo más largos, ya que al pertenecer en condiciones climáticas

estacionales estas quedan latentes en la espera de las condiciones adecuadas para la germinación en comparación con especies distribuidas en zonas templadas y húmedas las cuales pueden encontrar las condiciones adecuadas con mayor frecuencia. En el caso de *A. occidentalis* podría entrar en esta teoría ya que esta especie tiende a distribuirse en climas más cálidos como en el bosque tropical caducifolio o en vegetación secundaria derivada de los bosques tropicales perennes (Rzendowski 2006; Arce 2008) y la longevidad de las semillas es prolongada. Esto podría tener un respaldo de acuerdo a la tolerancia a la desecación de la semilla, viéndose la humedad de esta reducida el embrión no se ve afectado sobre todo en semillas de tipo ortodoxas, en cambio para las recalcitrantes son más susceptibles a la desecación (Doria 2010; Jayasuriya *et al.* 2012).

Finalmente, la generación de información con respecto a la germinación (tratamientos pre-germinativos) y la viabilidad de semillas, es una herramienta fundamental para los programas de restauración ecológica (Merrit y Dixon 2011). Ante la crisis en el medio ambiente, pérdida acelerada de los recursos naturales y la necesidad de conservar a las especies de plantas. Los bancos de germoplasma enfocados para la conservación de especies en riesgo, requieren de este tipo de información para un mejor manejo de las especies (Galíndez *et al.* 2010; Goefroid *et al.* 2010; González-Salvatierra *et al.* 2013). Sobre todo para la conservación y producción de plantas para reintroducción en el medio silvestre.

Conclusiones

La viabilidad de las semillas de *A. occidentalis* con el paso del tiempo se llega a mantener hasta ocho años, teniendo porcentajes de germinación por encima del 90%. Lo anterior siempre y cuando estas sean almacenadas en condiciones de temperatura a 4°C. De lo contrario después de los cinco años se pierde más del 50 % y la semilla presenta a los pocos días de incubación un estado de descomposición acelerado.

Teniendo en cuenta lo anterior, las semillas de esta especie se pueden clasificar como de tipo ortodoxas, información importante dentro de los bancos de semillas con fines de conservación de especies.

Los resultados obtenidos demuestran que *A. occidentalis* presenta potencial para ser utilizada en programas de restauración ecológica, al no requerir tratamientos pre-germinativos y presentar alta germinación facilita su manejo. Además, de que puede conservarse en bancos de germoplasma durante periodos de tiempo largos. Añadiendo que al tener una respuesta rápida para germinar esta es fácil de propagar, característica que se recomienda para producción de plantas con este fin.

Bibliografía

- Arce, M. de L. R., Gale, S. L., & Maxted, N. (2008). A taxonomic study of *Albizia* (Leguminosae: Mimosoideae: Ingeae) in Mexico and Central America. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 65(2).
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Elsevier.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed science research*, 14(1), 1-16.
- Doria, J. (2010). Revisión bibliográfica. Generalidades Sobre las Semillas: Su Producción, Conservación y Almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74-85.
- Forte Gil, J. A., Yabor, L., Bellido Nadal, A., Collado, F., Ferrer-Gallego, P., Vicente, O., Y Boscaiu, M. (2017). A Methodological Approach For Testing The Viability Of Seeds Stored In Short-Term Seed Banks. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(4).
- Galíndez, G., Ortega-Baes, P., Seal, C., Daws, M., Scopel, A., & Pritchard, H. (2010). Physical seed dormancy in *Collaea argentina* (Fabaceae) and *Abutilon pauciflorum* (Malvaceae). *Seed Sci. & Technol*, 38, 778-783.
- González-Salvatierra, C., Badano, E. I., Flores, J., y Rodas, J. P. (2013). Germinación, infestación y viabilidad en bellotas de *Quercus polymorpha* (Schltdl. y Cham.) tras un año de almacenamiento. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 19(3), 351-362.
- Godefroid, S., Van de Vyver, A., & Vanderborght, T. (2010). Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. *Biodiversity and Conservation*, 19(5), 1365-1383.
- Matilla, A. J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. *Fundamentos de fisiología vegetal*, (2), 549.

- Merritt, D. J., y Dixon, K. W. (2011). Restoration seed banks -a matter of scale. *Science*, 332(6028), 424-425.
- Orantes-García, C., Pérez-Farrera, M. Á., Rioja-Paradela, T. M., & Garrido-Ramírez, E. R. (2013). Viabilidad y germinación de semillas de tres especies arbóreas nativas de la selva tropical, Chiapas, México. *Polibotánica*, (36), 117-127.
- Probert, R. J., Daws, M. I., y Hay, F. R. (2009). Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of botany*, 104(1), 57-69.
- Rzedowski, J., 2006. *Vegetación de México*. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, México, 504 pp.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Sharma, N. C. & Chauhan, D. K. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 2-12.
- Vargas G, G., Werden, L. K., & Powers, J. S. (2015). Explaining Legume Success in Tropical Dry Forests Based on Seed Germination Niches. *Biotropica*, 47(3), 277-280.
- Jayasuriya, K. M. G. G., Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Fernando, M. T. R. (2012). Variation in seed dormancy and storage behavior of three liana species of *Derris* (Fabaceae, Faboideae) in Sri Lanka and ecological implications. *Research Journal of Seed Science*, 5(1), 1-18.
- Walters, C., Wheeler, L. M., & Grotenhuis, J. M. (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species. *Seed Science Research*, 15, 1-20.

Capítulo II.- Supervivencia de *Albizia occidentalis* como factor de tolerancia al estrés hídrico con inoculación de hongos micorrícicos y nanopartículas de carbono

Resumen

El cambio climático y la degradación de ecosistemas, han vuelto crucial la necesidad de encontrar estrategias que puedan asegurar el establecimiento de especies en riesgo y con potencial para restauración ecológica. Se realizó un experimento en vivero con plantas de *A. occidentalis*. Se conformaron 24 tratamientos. La mitad fue sometida a un riego control (cada tres días) y la otra mitad a estrés hídrico (cada siete días). En cada grupo de riego se inocularon los hongos *P. tinctorius* y *R. intraradices* (inoculación individual y dual) y un control (ausencia de micorrizas). Posteriormente, se adiciono una concentración de nanotubos de carbono (NTC): (0; 20 y 40 µg/mL). Las plantas fueron sometidas a estrés hídrico durante cinco meses en los que se tomaron variables de crecimiento aéreo (altura, diámetro a la altura de la base y cobertura). Al finalizar el experimento, se hizo la cosecha de cinco plantas por tratamiento; la raíz fue separada y lavada para ser escaneada. La biomasa se evaluó por método destructivo, tomando el peso fresco y seco de la parte aérea y radical. Los resultados demostraron que en las variables de crecimiento si hubo efecto entre tratamientos, como la disminución del crecimiento de plantas estresadas. Las variables de altura y cobertura mediante un análisis factorial se presentaron valores significativos de acuerdo al tipo de riego ($P < 0.005$), el ANOVA presento en la altura y cobertura ($P = 0.0002$ y $P < 0.0001$). En la parte radical el análisis factorial hubo variables que mostraron valores de significancia de acuerdo a la micorriza, respaldado con el ANOVA ($P < 0.05$). Los tratamientos inoculados con *P. tinctorius* en concentración de 0 µg/mL y 20 µg/mL de NTC, destacaron en crecimiento aéreo. Mientras, que en la parte radical fue el de *R. intraradices* con 40 µg/mL NTC. La biomasa seca de la parte aérea y radical fue mayor en los tratamientos inoculados con los hongos micorrícicos. Finalmente, el comportamiento de *A. occidentalis* en este experimento. Abre un panorama sobre los tratamientos que podrían favorecer el establecimiento de esta especie en campo.

Palabras clave: Interacción, tratamiento, especie nativa, estrategia de restauración, sequía.

Abstract

Climate change and the degradation of ecosystems have made crucial the need to find strategies that can ensure the establishment of threatened species and with potential for ecological restoration. This experiment was carried out in a nursery with *Albizia occidentalis* plants. 24 treatments were conformed, the half was subjected to irrigation control (every three days) and the other half to water stress (every seven days). In each irrigation group was a control (absence of mycorrhizae) and the fungi *Pisolithus tinctorius* and *Rhizophagus intraradices* were inoculated (individual and dual). Subsequently, a concentration of carbon nanotubes (CNT) was added (0, 20 and 40 µg/mL). The plants were subjected to water stress for five months in which air grow variables were taken (height, diameter at the height of the base and coverage). At the end of the experiment, five plants were harvested per treatment; the root was separated and washed to be scanned. The biomass was evaluated by the destructive method, taking the fresh and dry weight of the aerial and root part. The height and coverage variables through a factorial analysis showed significant values according to the type of irrigation ($P < 0.005$), the ANOVA presented significance values in the height and coverage too ($P = 0.0002$ and $P < 0.0001$). While in the radical part, factorial analysis there were variables that showed significance values according to the mycorrhiza, supported by the ANOVA ($P < 0.05$). The treatments inoculated with *P. tinctorius* without CNT concentration and 20 µg/mL, stood pout in aerial growth. Meanwhile, in the root part, it was *R. intraradices* with CNT concentration of 40 µg/mL. The dry biomass of the aerial and root part was higher in the treatments inoculated with mycorrhizal fungi. Finally, the behavior of *A. occidentalis* in this experiment. Opens an overview of the treatments that could favor the establishment of this species in the field.

Key words: Interaction, treatment, native species, restoration strategie, drought.

Introducción

El estrés hídrico también conocido como estrés por sequía, es un estado en el que las plantas al enfrentarse a altas temperaturas ambientales y con ello a la baja humedad del suelo, se ven directamente afectadas en su desarrollo morfológico (crecimiento aéreo y radicular; pérdida de hojas; falta de follaje) y fisiológico (capacidad fotosintética). Además, al tener una baja tolerancia a estas condiciones la supervivencia disminuye (Shao *et al.* 2008; Luna-Flores *et al.* 2012). Se han realizado diversos estudios sobre cómo el estrés hídrico puede afectar el crecimiento de las plantas al ser sometidas a niveles de sequía. En los cuales, se ha visto la disminución del crecimiento de las plantas sometidas a estrés, en variables morfológicas tanto en la parte aérea como radical; sumado a lo anterior incluso la biomasa se reporta con valores bajos en plantas sometidas a estrés hídrico (Prieto *et al.* 2004; Shao *et al.* 2008; Luna-Flores *et al.* 2012; Gómez-Romero *et al.* 2015).

Se ha documentado sobre la limitante que puede ser el estrés hídrico para el establecimiento de las plantas utilizadas en reforestaciones, sobre todo en sitios desprovistos de vegetación (North *et al.* 2017). Sin embargo, las plantas llegan a tener un mejor establecimiento cuando estas son inoculadas con hongos micorrícicos. (Báez-Pérez *et al.* 2015; Gómez-Romero *et al.* 2015; Neunkamp *et al.* 2017).

Al hablar de hongos micorrícicos hay que tener en cuenta que las plantas tienen diversas interacciones con microorganismos (bacterias y hongos del suelo), incluso se ha propuesto que evolutivamente han co-evolucionado asegurando la supervivencia mutua (Goltapeh *et al.* 2008). Los hongos micorrícicos hacen una relación simbiótica con las plantas, asociándose a las raíces ya sea de manera externa (ectomicorrizas) o interna (endomycorrizas). (Hoeksema *et al.* 2010; Neunkamp *et al.* 2017). De acuerdo con la revisión bibliográfica de Wu y Zou en el 2017, más del 80% de las plantas dependen de esta relación para sobrevivir, sobre todo en edades tempranas. Las micorrizas proveen varios beneficios a las plantas como la tolerancia a patógenos, fijación de nutrientes (Fosforo, Potasio y Nitrógeno), mejor nutrición, tolerancia a la sequía, un mejor desarrollo morfológico (incremento de biomasa), y un mejor

funcionamiento fisiológico de la planta (fotosíntesis) (García y Zimmerman 2014; Neukamp *et al.* 2018). Dados los beneficios que proporcionan las micorrizas, se han hecho diferentes estudios que abordan como las plantas pueden cambiar tanto en su desarrollo morfológico como fisiológico. Poniendo incluso a prueba la tolerancia a condiciones de sequía, sobre todo en especies con potencial para restauración ecológica (Gómez-Romero *et al.* 2013; Gómez-Romero *et al.* 2015; Neukamp *et al.* 2018). Lo anterior, se debe a que los hongos micorrícicos, pueden incluso desarrollar estrategias para evitar los daños que factores abióticos como la sequía, salinidad del suelo y la contaminación; factores que pueden causar estrés y limitaciones en la colonización de las raíces de las plantas (Lenoir *et al.* 2016).

Uno de los hongos micorrícicos más utilizados en estudios sobre la interacción planta-micorriza es *Pisolithus tinctorius*, este hongo ectomicorrícico tiene la ventaja de ser una especie cosmopolita y tiene un éxito de asociación alto con diversas especies (García-Rodríguez *et al.* 2006; Gómez-Romero *et al.* 2013; Gómez-Romero *et al.* 2015). De igual forma, el hongo endomicorrícico *Rhizophagus intraradices* al igual que *P. tinctorius* tiene un efecto positivo al asociarse con distintas especies de plantas, esta especie de micorriza ha sido utilizada principalmente con fines agrícolas que en plantas forestales. Aún así, se ha documentado que *R. intraradices* tiende a tolerar las condiciones de sequía y promueve la tolerancia al estrés hídrico en plantas. (Lenoir *et al.* 2016) El uso de ambos hongos en diferentes investigaciones han demostrado que ayudan a las plantas a desarrollar una mejor tolerancia al estrés hídrico, así también fomentan los cambios tanto fisiológicos como morfológicos p.ej: el aumento de pelos radicales y mayor capacidad fotosintética (Shao *et al.* 2008; Gómez-Romero *et al.* 2013; Li *et al.* 2014; Gómez-Romero *et al.* 2015; Wu y Zou 2017).

Por otra parte, el uso de materiales nanotecnológicos en plantas ha tenido un auge relativamente reciente, su aplicación en plantas ha sido enfocada más hacia fines agrícolas. Se ha documentado que las nanopartículas al ser añadidas en los cultivos: pueden promover la germinación y el crecimiento de las plantas. Su uso también ha demostrado un cambio fisiológico en las plantas, el cual se refleja en el aumento en la

producción de estas (Servin y White 2015; Lira *et al.* 2018). A pesar de los beneficios del uso de nanopartículas en plantas existe un debate sobre qué tan benéficas pueden ser, ya que representan un panorama de posible toxicidad tanto para las plantas como para los ecosistemas (Ruffini y Cremonini 2009; Medina *et al.* 2025; Tripathi *et al.* 2017). Sin embargo, esto se enfoca sobre todo en aquellas de origen sintético e inorgánico, teniendo en cuenta que el tipo de nanopartículas utilizadas en el área agrícola son mayormente de elementos inorgánicos (óxido de zinc, derivados de plata, oro, etc.) (Khan *et al.* 2019). Dando una pauta e interés en aquellas derivadas del carbono y de origen natural presentes en la naturaleza. Evidencia de ello lo reporta Lara Romero y colaboradores en el 2017 sobre la existencia de nanopartículas (nanotubos de carbono), originados a partir de las altas temperaturas que pueden generar los incendios forestales. Hecho que podría facilitar el uso de nano materiales de origen natural para el mejoramiento de plantas forestales, sin tener que añadir componentes como fertilizantes de origen químico e inorgánico que puedan afectar a los ecosistemas. El uso de este tipo de materiales para programas de restauración es nuevo y poco estudiado.

La búsqueda de estrategias enfocadas a fortalecer plantas con fines de restauración es crucial. Con ello el objetivo del capítulo es encontrar una respuesta ecofisiológica de *A. occidentalis* al ser sometida a niveles de estrés hídrico y como está puede ser favorecida al ser inoculada con hongos micorrícicos como *P. tinctorius*, *R. intraradices* o una inoculación dual de ambos hongos, así como la implementación de nanopartículas podrían ayudar a fomentar tanto la supervivencia y el crecimiento de plantas en edades tempranas.

Materiales y Métodos

Montaje de experimento

Para realizar el montaje del experimento previamente se hizo la preparación del material requerido de la siguiente manera: Los tubetes fueron lavados con cloro y jabón, remojados durante 24 hrs. El sustrato fue preparado con una proporción del 70% de fibra de coco y 30% agrolita; el cual fue esterilizado posteriormente de su preparación. Además, se hizo la preparación del inóculo de *P. tinctorius*, en el que se hizo una mezcla de esporas con turba micronizada: a 250 gr de turba se le añadieron cuatro gramos de esporas, esto porque el inóculo adquirido contenía 250 millones de esporas por gramo, asegurando 4 millones de esporas por gramo; posteriormente en una báscula semianálitica se pesaron 0.5 gramos (2 millones de esporas) de la mezcla y posteriormente depositado en bolsitas de plástico para agregar la misma cantidad a cada planta (Figura 6).

Previamente a la siembra, las semillas fueron lavadas con cloro al 10% (dejándolas un minuto) y enjuagadas con agua destilada. La semilla fue germinada en contenedores rígidos de plástico con una capacidad de 350 cm³ con el sustrato de fibra de coco al 70% y agrolita al 30% (Figura 6).



Figura 6. Preparación del material para el experimento. A) Inóculo ya pesado y separado en bolsa de plástico; B) Lavado de tubetes; C) Preparación de sustrato y llenado de tubetes y D) Colocación de semillas para la germinación de plantas.

La inoculación de hongos micorrícicos se realizó al cumplir las plantas entre 21 y 12 días. Siendo inoculados de la siguiente manera: a cada planta se le descubrió sustrato hasta encontrar las raíces. *P. tinctorius* se añadió en seco 0.5 gramos de la mezcla preparada con turba micronizada con dos millones de esporas; mientras, que *R. intraradices* como era en líquido se añadió un mililitro con la ayuda de una jeringa, el cual proporcione 100 propágulos por mililitro. Los tratamientos se identificaron por el tipo de micorriza que se adiciono: control (micorriza ausente); ectomicorriza (*P. tinctorius*); endomicorriza (*R. intraradices*); inoculación dual (*P. tinctorius* y *R. intraradices*).

Los nanotubos de carbono fueron adicionados tres semanas después de la inoculación de los hongos micorrícicos, con el fin de dar tiempo al hongo y a la planta

de realizar la interacción. Los tratamientos de hongos micorrícicos fueron subdivididos en tres grupos de acuerdo a la concentración de nanotubos: ausencia ($0\mu\text{g/mL}$), concentración media ($20\mu\text{g/mL}$) y concentración alta ($40\mu\text{g/mL}$). La inoculación se realizó con una jeringa adicionando a la planta tres mililitros de la sustancia con nanotubos de carbono sin necesidad de escarbar el sustrato. Además, para asegurar la presencia de los nanotubos mensualmente las plantas fueron re-inoculadas con la concentración requerida por tratamiento.



Figura 7. Inoculación de hongos micorrícicos. A) *Phisolitus tinctorius* B) *Rhizophagus intraradices*.

Las plantas fueron aleatorizadas y se rotaron de lugar cada dos semanas para contrarrestar efectos de diferencia de luz, humedad relativa y temperatura que se encuentren en el sitio del experimento.

El estrés hídrico se evaluó mediante un gradiente de riego cada 3 (capacidad de campo) y 7 días (estrés medio). El diseño del experimento fue ortogonal con un acomodo de bloques al azar con 24 tratamientos y 20 réplicas por cada uno (Tabla 4).

Tabla 2. Tratamientos de *A. occidentalis* en condiciones de vivero para evaluar el efecto de los hongos micorrícicos y nanopartículas como factor de tolerancia al estrés hídrico.

Tratamientos de <i>A. occidentalis</i> .	Nivel de estrés	Periodo de riego	<i>P. tinctorius</i>	<i>R. irregularis</i>	Nanotubos (µg/mL)
1.-	-	3 días	-	-	0
2.-	-	3 días	+	-	0
3.-	-	3 días	-	+	0
4.-	-	3 días	+	+	0
5.-	-	3 días	-	-	20
6.-	-	3 días	+	-	20
7.-	-	3 días	-	+	20
8.-	-	3 días	+	+	20
9.-	-	3 días	-	-	40
10.-	-	3 días	+	-	40
11.-	-	3 días	-	+	40
12.-	-	3 días	+	+	40
13.-	+	7 días	-	-	0
14.-	+	7 días	+	-	0
15.-	+	7 días	-	+	0
16.-	+	7 días	+	+	0
17.-	+	7 días	-	-	20
18.-	+	7 días	+	-	20
19.-	+	7 días	-	+	20
20.-	+	7 días	+	+	20
21.-	+	7 días	-	-	40
22.-	+	7 días	+	-	40
23.-	+	7 días	-	+	40
24.-	+	7 días	+	+	40

Monitoreo

La supervivencia de las plantas una vez iniciado el experimento se evaluó cada tercer día. Para evaluar el crecimiento de la planta se tomaron medidas de altura con la ayuda de una regla de madera y el diámetro a la altura de la base (DAB) con un vernier electrónico ambos mensualmente (Figura 8). Mientras que la cobertura fue determinada mediante dos diámetros con la fórmula de la elipse ($\pi r_1 r_2$) (Figura 8), de

forma bimestral. El experimento tuvo una duración de cinco meses a partir de que las plantas fueron sometidas a los niveles de estrés hídrico al que fueron designadas.



Figura 8. Toma de medidas de crecimiento de *A. occidentalis*. A) Altura, B) Diámetro a la altura de la base y C) Cobertura.

La evaluación del crecimiento radicular se hizo al terminar el periodo de experimentación, se tomó una muestra al azar de cinco plantas por tratamiento. Cada planta fue extraída del tubete para poder extraer la raíz del sustrato y ser limpiada (Figura 9). El tallo y las hojas fueron separados de la raíz. Una vez que las raíces fueron limpiadas, estas fueron escaneadas (Figura 9) y con la ayuda del software WinRhizo se evaluó la arquitectura de raíz mediante las variables: longitud de raíz, número de ramificaciones, número de puntas, diámetro de raíz, densidad y volumen de raíz.

La biomasa fue evaluada por método destructivo en la parte aérea y radical consistiendo en la separación de las hojas, corte de tallo y raíz para ser pesados con una balanza semianálitica en la que se tomó el peso fresco y seco (Figura 9). Para la variable de peso seco las estructuras de la planta fueron depositadas en un horno para ser secadas a una temperatura de 65°C durante 4-5 días para eliminar en su totalidad el agua (Figura 9).

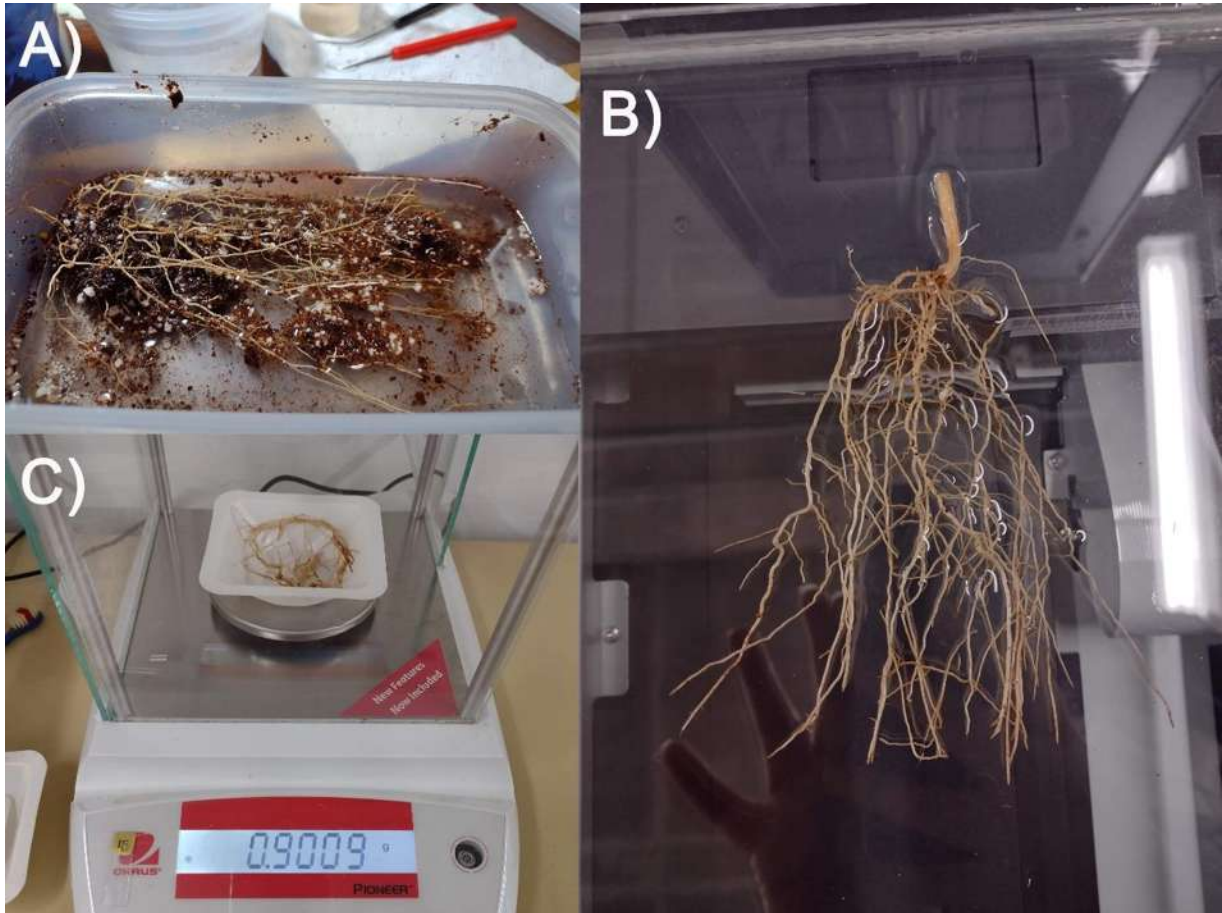


Figura 9. Procedimiento para el análisis de biomasa y arquitectura de raíz. A) Lavado de raíz; B) Escaneo de raíz; C) Pesado.

Una vez obtenidos todos los datos de biomasa y arquitectura de raíz, se calcularon las variables de longitud de raíz específica $\left(\frac{\text{Longitud de raíz}}{\text{Peso seco de raíz}}\right)$ y de ratio $\left(\frac{\text{Peso seco de raíz}}{\text{Peso seco aéreo}}\right)$.

Análisis de datos

Al finalizar el experimento, todos los datos obtenidos se capturaron en bases de datos de Excel para posteriormente ser sometidos a análisis estadísticos.

Los datos de crecimiento, biomasa y arquitectura de raíz, fueron analizados mediante un análisis factorial, análisis de varianza (ANOVA) en el que se sometieron los datos obtenidos por factores (estrés, micorriza y nanotubos) y para conocer los grupos entre los tratamientos, se realizó una prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey, con la finalidad de desglosar por grupos aquellos tratamientos que tuvieron un mayor y menor desempeño en el crecimiento por efecto de los hongos micorrícicos en los niveles de estrés planteados. Los análisis fueron realizados mediante los programas estadísticos R, JMP Versión 8 y S-Plus 2000 con ayuda de Excel para la captura de datos.

Resultados

Supervivencia

La supervivencia de *A. occidentalis* en las plantas sometidas a estrés hídrico durante cinco meses fue alta. Como se puede observar en la Tabla 3, la tasa de supervivencia entre los tratamientos sometidos a estrés hídrico fue similar a la de los tratamientos con el riego control.

Tabla 3. Porcentaje de supervivencia de plantas de *A. occidentalis* de acuerdo al tratamiento inoculado y el tipo de riego al que fueron sometidas.

Tratamiento	Control	Estrés
T01. Sin micorriza [-]	90%	85%
T02. <i>P. tinctorius</i> [-]	100%	100%
T03. <i>R. intraradices</i> [-]	100%	100%
T04. Inoculación dual [-]	90%	100%
T05. Sin micorriza [+]	90%	85%
T06. <i>P. tinctorius</i> [+]	100%	90%
T07. <i>R. intraradices</i> [+]	95%	100%
T08. Inoculación dual [+]	100%	95%
T09. Sin micorriza [++]	100%	85%
T10. <i>P. tinctorius</i> [++]	100%	90%
T11. <i>R. intraradices</i> [++]	100%	100%
T12. Inoculación dual [++]	100%	90%

Crecimiento aéreo

Con respecto a las variables de crecimiento en la parte aérea de manera general, se pudo observar que los tratamientos sometidos al riego de estrés tuvieron un menor crecimiento en comparación con los tratamientos de riego control. En el análisis factorial presento diferencia estadísticamente significativa de entre el factor de estrés en las variables de altura ($P=0.004$) y cobertura ($P<0.001$); de acuerdo al tipo de micorriza inoculada y la concentración de nanotubos de carbono no se encontraron diferencias significativas entre sí ($P>0.05$) (Tabla 4). Así mismo la variable de diámetro a la altura de la base no presento diferencias significativas ($P>0.05$) en todos los factores (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del análisis factorial de las medidas aéreas de *A. occidentalis* en el quinto mes.

Altura					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	935.55	935.55	8.38	0.004
<i>P. tinctorius</i>	1	122.65	122.65	1.10	0.30
<i>R. intraradices</i>	1	277.27	277.27	2.48	0.12
Nanotubos	2	340.46	170.23	1.52	0.22
Residuos	462	51597.68	111.68		

DAB					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	0.004	0.004	0.04	0.84
<i>P. tinctorius</i>	1	0.02	0.02	0.22	0.64
<i>R. intraradices</i>	1	0.004	0.004	0.04	0.85
Nanotubos	2	0.08	0.04	0.40	0.67
Residuos	460	47.86	0.10		
Cobertura					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	9582.06	9582.06	114.82	<0.001
<i>P. tinctorius</i>	1	0.29	0.29	0.004	0.95
<i>R. intraradices</i>	1	0.4	0.4	0.005	0.94
Nanotubos	2	223.38	111.69	1.34	0.26
Residuos	462	38555.35	83.45		

Complementando lo anterior, el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 7) presenta valores significativos para la variable de altura ($F= 2.14$, $P=0.004$) y cobertura ($F= 7.30$, $P<0.0001$). Los tratamientos inoculados con *P. tinctorius* sin y con una concentración media de nanotubos de carbono (Figura 10), tanto en el tratamiento de riego control, como en el estresado, presentaron el mayor crecimiento en comparación con los demás tanto en la variable de altura como en la cobertura (Figura 10). En el caso del DAB, al igual que con el análisis factorial no presento diferencias significativas ($F= 0.72$, $P=0.83$), mostrando un patrón de crecimiento similar entre tratamientos.

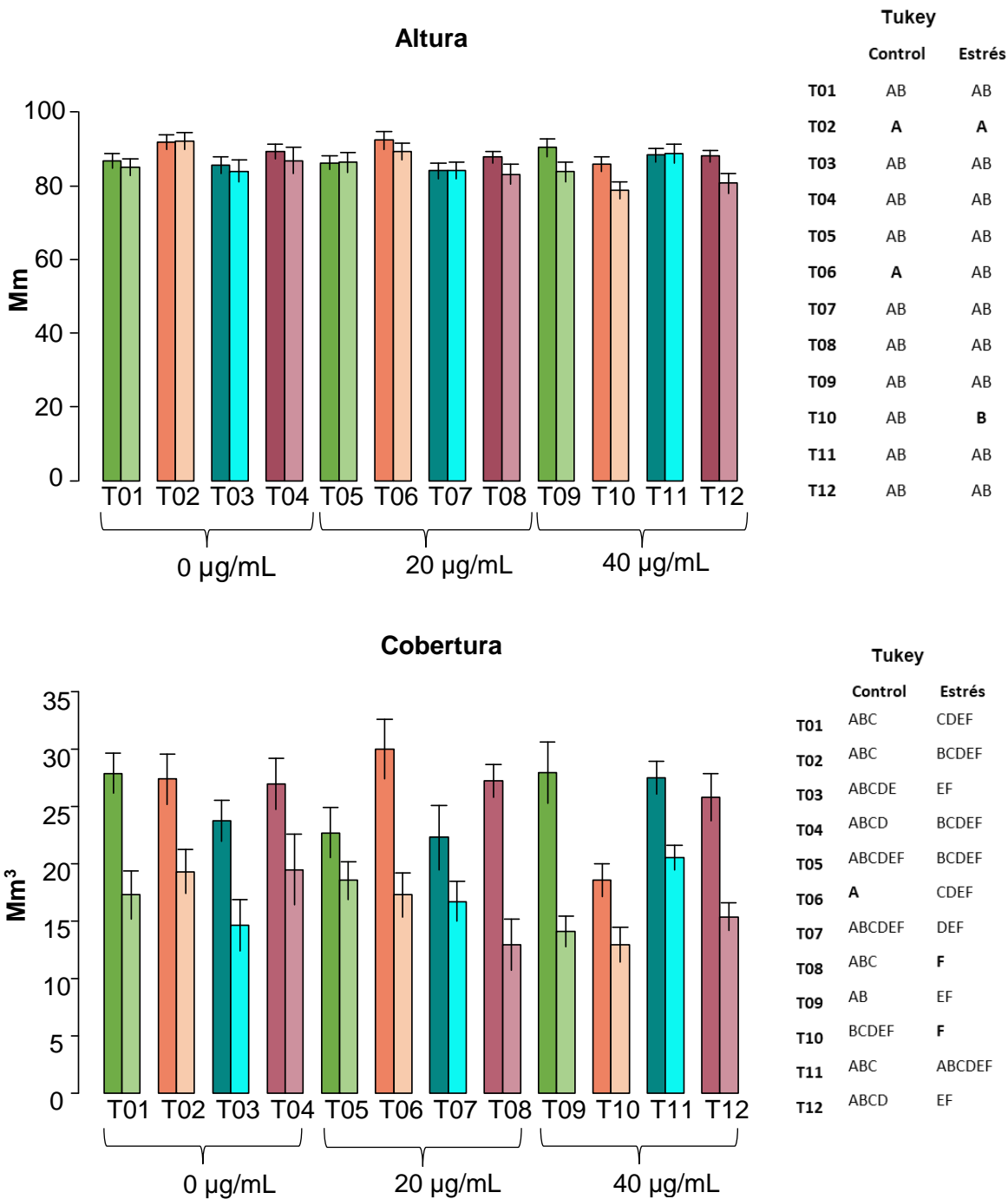


Figura 10. Altura y cobertura de *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés.

Arquitectura de raíz

En el análisis factorial se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en diferentes variables (Tabla 6). Respecto al factor de estrés hídrico la variable de diámetro de raíz tuvo diferencias significativas. En los factores del tipo de micorriza inoculada (*P. tinctorius* y *R. intraradices*) las variables que tuvieron valores de significancia fueron: longitud de raíz, diámetro de raíz, número de puntas y número de ramificaciones. Para las nanopartículas, las variables de longitud de raíz específica y número de ramificaciones presentaron valores significativos ($P < 0.001$) (Tabla 5). Mientras que r:s ratio, la densidad de raíz y el volumen de raíz no tuvieron diferencias entre tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis factorial de la arquitectura de raíz de *A. occidentalis*.

Longitud de raíz					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	1633.1	1633.07	0.20	0.65
<i>P. tinctorius</i>	1	50542.1	50542.11	6.26	0.01
<i>R. intraradices</i>	1	49036.9	49036.87	6.08	0.02
Nanopartículas	1	13645.4	13645.41	1.69	0.20
Residuos	115	927949.5	8069.13		
Longitud de raíz específica					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	4590675	4590675	0.30488	0.58
<i>P. tinctorius</i>	1	10817021	10817021	0.71838	0.3984
<i>R. intraradices</i>	1	20194997	20194997	1.34119	0.25
Nanopartículas	1	1454636342	1454636342	96.6054	<0.001
Residuos	115	1731613146	15057506		
R:S Ratio					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	0.15	0.15	2.03	0.16
<i>P. tinctorius</i>	1	0.06	0.06	0.86	0.35
<i>R. intraradices</i>	1	0.19	0.19	2.60	0.11
Nanopartículas	1	0.02	0.02	0.28	0.60
Residuos	115	8.59	0.07		
Densidad					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	0.0002	0.0002	0.01	0.91
<i>P. tinctorius</i>	1	0.03	0.03	2.67	0.10
<i>R. intraradices</i>	1	0.001	0.001	0.05	0.82
Nanopartículas	1	0.0003	0.0003	0.03	0.87
Residuos	115	1.32	0.01		
Diámetro de raíz					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	0.02	0.02	8.57	0.004
<i>P. tinctorius</i>	1	0.02	0.02	12.33	0.001
<i>R. intraradices</i>	1	0.03	0.03	15.41	0.0001
Nanopartículas	1	0.0007	0.0007	0.41	0.5252
Residuos	115	0.20	0.002		
Número de puntas					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	330	330	0.06	0.80

<i>P. tinctorius</i>	1	71296.9	71296.9	13.49	0.0004
<i>R. intraradices</i>	1	111891.7	111891.7	21.17	0.00001
Nanopartículas	1	9466.3	9466.3	1.79	0.18
Residuos	115	607804.2	5285.3		
Ramificaciones					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	11564	11564	0.25	0.62
<i>P. tinctorius</i>	1	18501	18500.8	0.40	0.53
<i>R. intraradices</i>	1	180216	180215.6	3.91	0.05
Nanopartículas	1	153327	153327.2	3.33	0.07
Residuos	115	5297716	46067.1		
Volumen de raíz					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	0.06	0.06	1.69	0.20
<i>P. tinctorius</i>	1	0.06	0.06	1.55	0.22
<i>R. intraradices</i>	1	0.01	0.01	0.20	0.66
Nanopartículas	1	0.003	0.003	0.07	0.79
Residuos	115	4.18	0.04		

En el análisis ANOVA las variables de longitud de raíz, diámetro de raíz, el número de puntas, ramificaciones y el volumen mostraron valores de significancia ($P < 0.001$) entre los tratamientos (Tabla 7). Entre los tratamientos que tuvieron el mayor crecimiento radical fueron los tratamientos inoculados con *R. intraradices* en su mayoría en la combinación con la concentración alta de nanotubos de carbono ($40\mu\text{g/mL}$) (Figura 14), seguido de los tres tratamientos de inoculación dual con las tres concentraciones inoculadas de nanotubos de carbono, en la mayoría de las variables analizadas de la arquitectura de raíz (Figuras 11, 12 y 13).

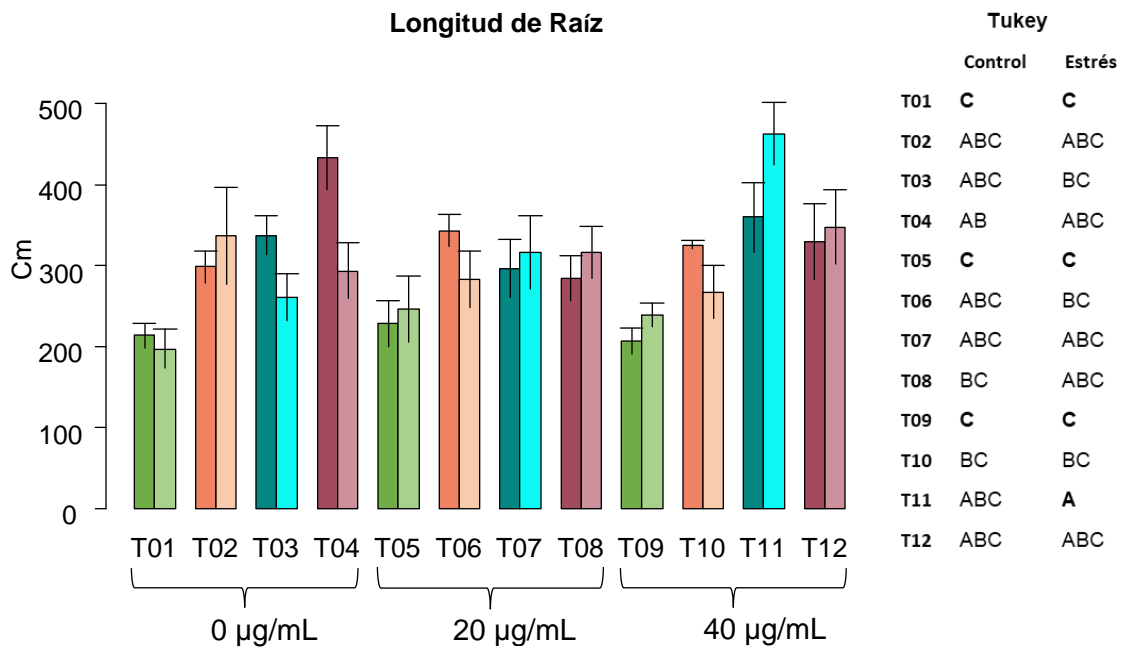


Figura 11. Longitud de raíz de *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés.

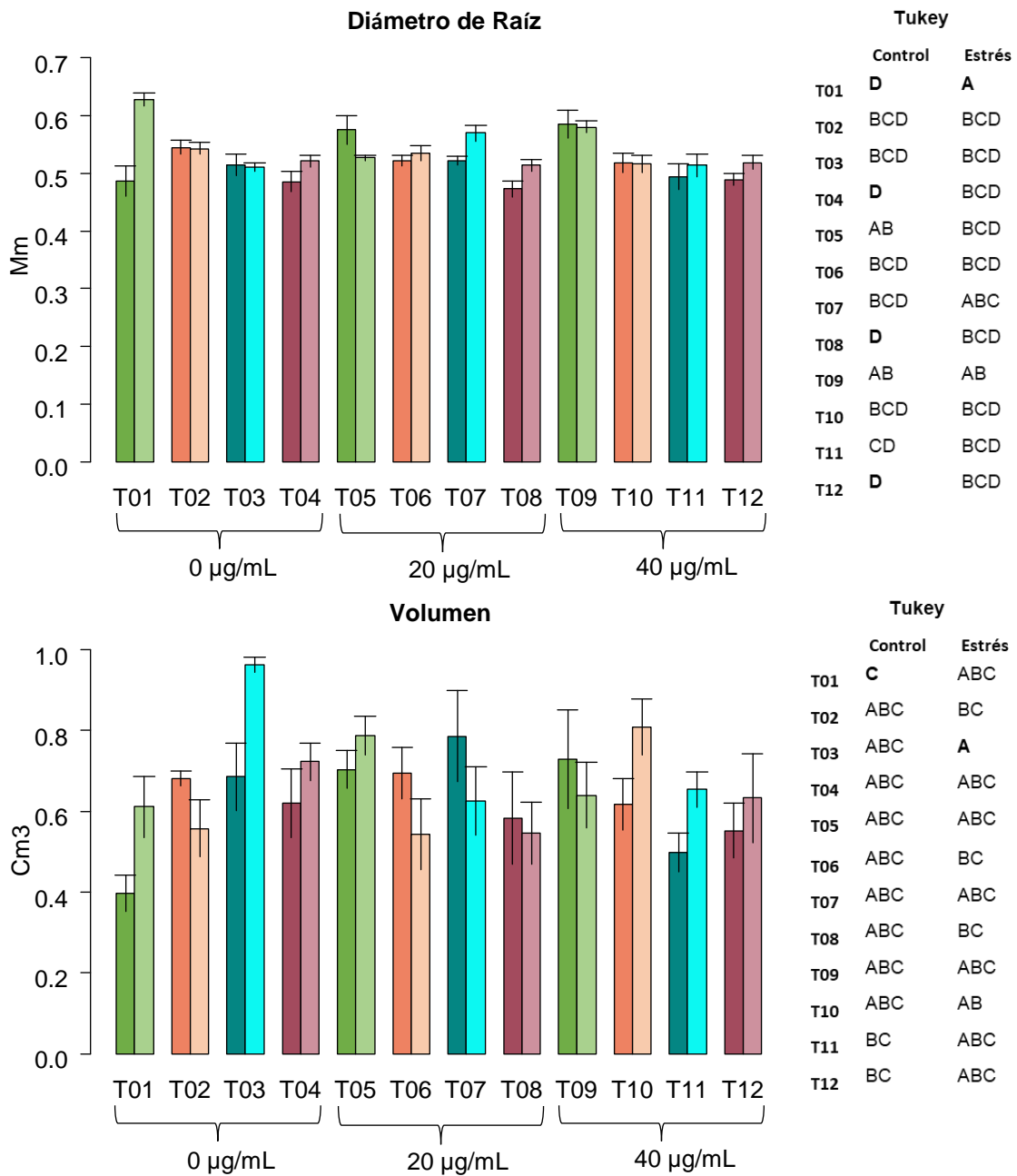


Figura 12. Diámetro y volumen de raíz *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés.

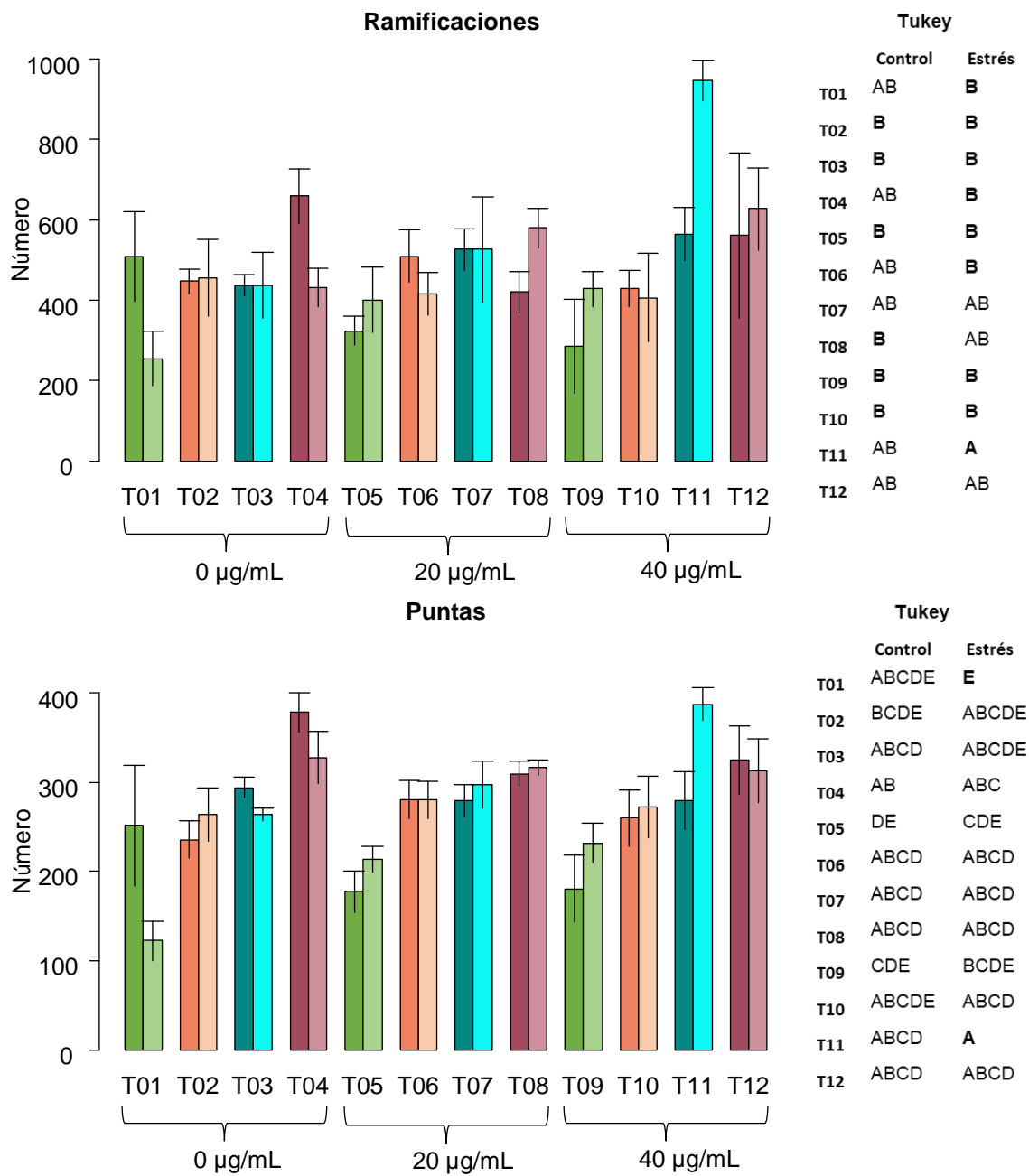


Figura 13. Numero de ramificaciones y puntas de raíz de *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés.

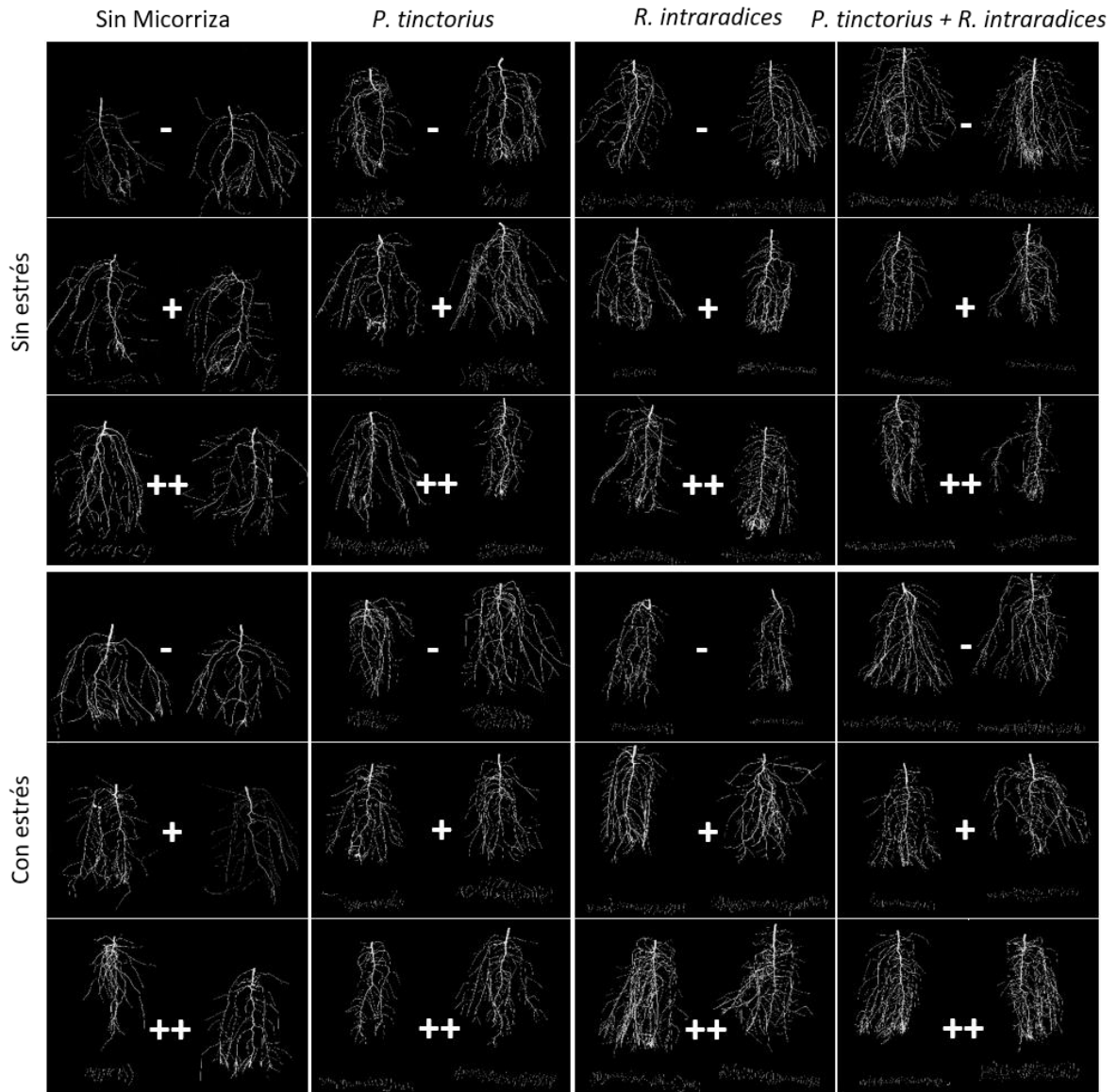


Figura 14. Arquitectura de raíz de *A. occidentalis*. De acuerdo al tipo de riego. (-) Sin nanopartículas; (+) concentración media de nanopartículas; (++) concentración alta de nanopartículas.

Biomasa

El análisis factorial de biomasa en las dos variables de peso fresco y seco, no hubo diferencias significativas entre los factores de acuerdo a los tratamientos inoculados (Tabla 6). Por otra parte, para el análisis ANOVA si se encontraron diferencias significativas en la biomasa en peso seco entre los tratamientos, tanto en la parte aérea (F= 1.96; P=0.01) como la parte radical (F= 1.84; P=0.02), en la biomasa de peso fresco se encontró en la parte aérea diferencia entre tratamientos (P=0.04) tal y como se puede observar en la Tabla 7.

Tabla 6. Análisis factorial de biomasa aérea y radical de *A. occidentalis*.

Peso fresco aéreo					
Factor	G.L	S.C	C.M	VALOR F	P
Estrés	1	0.02	0.02	1.23	0.27
<i>P. tinctorius</i>	1	0.0004	0.0004	0.02	0.87
<i>R. intraradices</i>	1	0.01	0.01	0.46	0.50
Nanopartículas	1	0.003	0.003	0.19	0.66
Residuos	115	1.87	0.01		
Peso seco aéreo					
Estrés	1	0.0002	0.0002	0.10	0.76
<i>P. tinctorius</i>	1	0.00003	0.00003	0.01	0.91
<i>R. intraradices</i>	1	0.0009	0.0009	0.40	0.53
Nanopartículas	2	0.0007	0.0007	0.29	0.59
Residuos	104	0.26	0.002		
Peso fresco radical					
Estrés	1	0.03	0.03	0.28	0.60
<i>P. tinctorius</i>	1	0.005	0.005	0.05	0.82
<i>R. intraradices</i>	1	0.03	0.03	0.32	0.57
Nanopartículas	1	0.003	0.003	0.03	0.85
Residuos	115	10.38	0.09		
Peso seco radical					
Estrés	1	0.0001	0.0001	0.06	0.81
<i>P. tinctorius</i>	1	0.0019	0.0019	0.90	0.34
<i>R. intraradices</i>	1	0.00004	0.00004	0.02	0.89
Nanopartículas	2	0.0002	0.0002	0.07	0.79
Residuos	104	0.2467	0.0021		

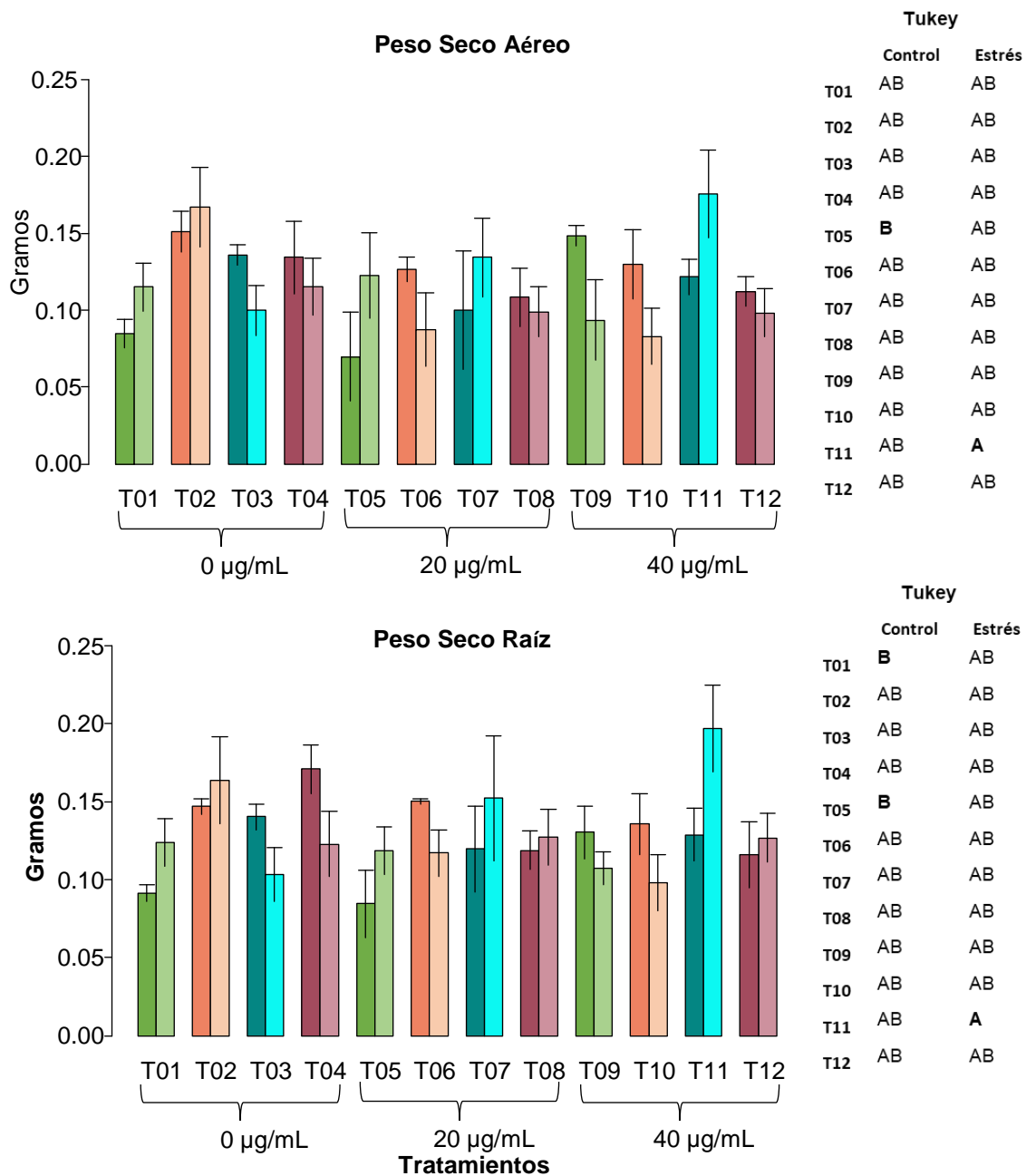


Figura 15. Biomasa seca aérea y radical de *A. occidentalis*. T01, 05 y 09 (Sin micorriza); T02, 06 y 10 (*P. tinctorius*); T03, 07 y 11 (*R. intraradices*) y T04, 08 y 12 (Inoculación dual); C: Riego control; E: Riego estrés.

Tabla 7. Resumen del ANOVA en las variables de *A. occidentalis*. Alt (altura); DAB (diámetro a la altura de la base); Cob (Cobertura); BFA (Biomasa fresca aérea); BFR (Biomasa fresca raíz); BSF (Biomasa seca aérea); BSR (Biomasa seca raíz); Long R (longitud de raíz); Long RE (longitud de raíz específica); DR (Diámetro de raíz); Pun (Puntas); Ram (ramificaciones); Vol (Volumen de raíz); Den (Densidad de raíz). Tratamientos control y estrés del 1-6.

	ANOVA	T01 C	T01 E	T02 C	T02 E	T03 C	T03 E	T04 C	T04 E	T05 C	T05 E	T06 C	T06 E	
Alt	F= 2.14 P= 0.002	\bar{x}	86.72	85.00	91.85	92.10	85.60	84.00	86.80	86.21	86.32	92.30	89.21	
		6	2.11	2.38	1.96	2.26	2.25	3.10	2.01	3.51	1.84	2.73	2.33	2.30
DAB	F= 0.72 P= 0.83	\bar{x}	2.41	2.61	2.52	2.54	2.53	2.46	2.51	2.37	2.52	2.49	2.47	
		6	0.07	0.07	0.09	0.07	0.06	0.09	0.12	0.08	0.05	0.06	0.07	0.06
Cob.	F= 7.30 P< 0.0001	\bar{x}	13.96	13.37	21.68	18.39	18.50	19.49	17.70	13.94	14.35	20.10	21.95	12.42
		6	1.76	2.81	2.08	1.73	2.19	1.43	1.93	2.24	1.79	2.71	2.25	1.30
BFA	F= 1.67 P= 0.046	\bar{x}	0.32	0.45	0.46	0.43	0.44	0.31	0.44	0.35	0.24	0.39	0.40	0.30
		6	0.06	0.20	0.12	0.24	0.05	0.10	0.20	0.08	0.07	0.09	0.14	0.09
BFR	F= 1.44 P= 0.11	\bar{x}	0.79	0.88	1.06	1.12	1.11	0.75	1.12	0.83	0.86	1.06	0.94	
		6	0.01	0.03	0.02	0.04	0.00	0.01	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01
BSA	F= 1.96 P= 0.01	\bar{x}	0.08	0.11	0.15	0.17	0.14	0.10	0.13	0.12	0.07	0.12	0.09	
		6	0.01	0.02	0.02	0.04	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01
BSR	F= 1.84 P= 0.02	\bar{x}	0.09	0.12	0.15	0.16	0.14	0.10	0.17	0.12	0.08	0.12	0.12	
		6	0.01	0.03	0.02	0.04	0.00	0.01	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01
Long R	F= 3.74 P< 0.0001	\bar{x}	213.90	197.36	298.67	337.30	337.60	260.74	433.14	293.72	228.54	246.50	342.99	282.83
		6	15.59	35.75	23.81	44.91	19.77	27.57	60.05	32.34	24.72	16.78	28.90	15.09
Long RE	F= 10.25 P< 0.0001	\bar{x}	2364.55	1660.91	2537.82	1821.68	2080.00	2563.58	1855.93	2929.82	3793.19	2297.88	1888.04	3990.45
		6	200.92	92.32	686.66	309.24	190.94	410.57	366.76	626.60	280.79	604.39	404.54	326.68
R:s ratio	F= 1.07 P= 0.39	\bar{x}	1.10	1.09	0.98	0.97	1.09	1.17	1.31	1.11	1.22	0.97	1.20	1.34
		6	0.07	0.04	0.05	0.03	0.14	0.18	0.08	0.15	0.08	0.08	0.05	0.05
DR	F= 5.73 P< 0.0001	\bar{x}	0.49	0.63	0.54	0.54	0.51	0.51	0.48	0.52	0.58	0.53	0.52	0.54
		6	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
Pun	F= 4.46 P< 0.0001	\bar{x}	251.20	122.60	235.40	264.00	294.00	263.80	378.00	327.60	177.40	213.20	280.80	280.00
		6	68.07	18.10	22.10	26.32	20.97	14.05	29.83	8.43	11.00	37.51	7.29	22.10
Ram	F= 2.72 P< 0.0001	\bar{x}	509.60	255.20	447.40	455.00	437.60	438.40	659.20	432.40	324.00	401.00	509.60	415.20
		6	112.25	51.92	66.71	130.85	30.40	51.65	96.08	49.70	27.43	116.66	82.40	43.67
Vol	F= 2.42 P= 0.0001	\bar{x}	0.40	0.61	0.68	0.56	0.69	0.96	0.62	0.72	0.70	0.79	0.70	0.54
		6	0.04	0.11	0.07	0.08	0.02	0.11	0.07	0.08	0.08	0.12	0.02	0.08
Den	F= 1.58 P= 0.06	\bar{x}	0.23	0.20	0.24	0.33	0.20	0.12	0.29	0.18	0.13	0.17	0.22	0.25
		6	0.01	0.01	0.05	0.11	0.01	0.02	0.06	0.03	0.03	0.04	0.02	0.05

Tabla 7. Continuación Tratamientos control y estrés del 7-12

	T07C	T07 E	T08 C	T08 E	T09 C	T09 E	T10 C	T10 E	T11 C	T11 E	T12 C	T12 E
Alt	\bar{x} 84.11	84.10	87.75	83.11	90.30	83.83	85.90	78.68	88.35	88.75	88.10	80.60
	6 2.18	2.24	1.56	2.62	2.39	2.67	1.96	2.35	1.91	2.58	1.59	2.64
DAB	\bar{x} 2.45	2.43	2.54	2.47	2.41	2.47	2.52	2.50	2.51	2.62	2.54	2.48
	6 0.06	0.06	0.06	0.08	0.07	0.08	0.06	0.08	0.06	0.11	0.05	0.06
Cob.	\bar{x} 14.51	15.76	14.35	12.23	21.05	13.43	20.25	12.92	20.99	19.77	20.54	11.61
	6 2.24	1.41	3.09	1.52	2.17	1.40	1.66	1.08	2.55	2.04	1.93	1.22
BFA	\bar{x} 0.34	0.41	0.34	0.32	0.44	0.29	0.44	0.27	0.41	0.50	0.41	0.35
	6 0.08	0.07	0.10	0.14	0.13	0.18	0.10	0.14	0.07	0.17	0.10	0.12
BFR	\bar{x} 0.85	1.07	0.70	0.86	0.85	0.89	0.97	0.82	0.91	1.39	0.86	1.05
	6 0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.00	0.02	0.02	0.02
BSA	\bar{x} 0.10	0.13	0.11	0.10	0.15	0.09	0.13	0.08	0.12	0.18	0.11	0.10
	6 0.01	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01
BSR	\bar{x} 0.12	0.15	0.12	0.13	0.13	0.11	0.14	0.10	0.13	0.20	0.12	0.13
	6 0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.00	0.02	0.02	0.02
Long R	\bar{x} 296.47	316.57	283.88	316.88	206.93	239.05	325.62	267.17	360.06	463.27	329.72	347.61
	6 39.82	5.32	34.85	33.17	28.25	43.04	40.53	38.14	19.86	46.71	35.53	46.23
Long RE	\bar{x} 3047.30	6406.55	9293.21	12960.11	7146.56	14876.72	14104.49	6908.86	12427.03	10932.21	10284.11	8197.65
	6 453.30	709.45	808.59	3173.54	1487.77	1549.73	2313.61	2691.61	2642.85	2062.21	1152.24	1827.99
R:s ratio	\bar{x} 1.20	1.22	1.11	1.38	0.90	1.23	1.06	1.18	1.08	1.17	1.04	1.33
	6 0.07	0.14	0.06	0.19	0.03	0.17	0.11	0.29	0.08	0.08	0.13	0.18
DR	\bar{x} 0.52	0.57	0.47	0.51	0.58	0.58	0.52	0.52	0.49	0.51	0.49	0.52
	6 0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
Pun	\bar{x} 279.40	296.80	309.00	316.60	180.20	231.60	260.00	272.40	279.00	387.20	324.60	313.00
	6 21.83	31.75	29.41	34.77	23.14	32.28	14.54	18.65	21.79	37.90	21.38	35.64
Ram	\bar{x} 527.20	526.40	420.20	579.60	286.80	428.00	430.00	406.60	565.00	947.40	561.20	628.20
	6 68.53	45.71	47.15	110.88	36.11	66.75	81.65	50.70	64.92	206.01	52.96	102.30
Vol	\bar{x} 0.79	0.63	0.58	0.55	0.73	0.64	0.62	0.81	0.50	0.65	0.55	0.63
	6 0.08	0.06	0.05	0.07	0.05	0.05	0.05	0.04	0.06	0.07	0.09	0.11
Den	\bar{x} 0.16	0.26	0.21	0.26	0.17	0.17	0.23	0.13	0.28	0.31	0.23	0.23
	6 0.02	0.05	0.04	0.07	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.07

Discusión

La respuesta en la supervivencia de *A. occidentalis* al ser sometida a un nivel de estrés hídrico, fue que no se encontraron diferencias con los grupos no estresados; teniendo como referencia los grupos control (sin micorriza y nanopartículas). Esto podría deberse a dos posibles respuestas; la primera es que los tratamientos inoculados con hongos micorrícicos y nanopartículas incrementaron un mejor rendimiento de la planta, promoviendo la tolerancia al estrés hídrico. Mientras que la segunda, respaldada por la baja mortalidad de los grupos control, puede ser que el nivel de estrés utilizado fue bajo, como para determinar si los tratamientos tenían respuesta positiva ante un escenario de estrés hídrico prolongado.

Las plantas evolutivamente han desarrollado estrategias para evitar el estrés por sequía: entre ellas están los mecanismos de tolerancia y evasión a la deshidratación (Valladares 2004). Las plantas presentan cambios en su morfología, siendo esto evidente en la disminución del crecimiento aéreo y radical (Shao *et al.* 2008). Evidencia de lo anterior, lo reporta el estudio de Luna-Flores *et al.* 2012 al someter plantas de tres especies caducifolias (*Leucaena leucocephala*, *Cordia dodecandra* y *Piscidia piscipula*) a estrés hídrico, tomando como referencia el potencial hídrico de las plantas; reportaron que las plantas al ser sometidas a niveles de estrés disminuyen la tasa de crecimiento, en este caso la cobertura disminuyó significativamente en las plantas estresadas. Comportamiento similar al que presentó *A. occidentalis* en este trabajo, ya que en la parte aérea en las medidas de altura y cobertura diferían significativamente de las no estresadas.

Se ha documentado que la inoculación de hongos micorrícicos en plantas, aumentan la tolerancia al estrés hídrico y el crecimiento, ejemplo de ello es el aumento del área radical impulsado por las hifas de los hongos (Wu y Zou 2017). Se ha reportado sobre la inoculación de *P. tinctorius* y los efectos positivos en el crecimiento de las plantas de otras especies en condiciones de vivero. El estudio de Gómez-Romero *et al.* 2015, ejemplifica el incremento de la tolerancia al estrés hídrico, en *Pinus pseudostrobus* al ser inoculado con *P. tinctorius*. El experimento en vivero consistió en

someter a las plantas a tres niveles de riego (tres, siete y 15 días); descubrieron que la tasa de supervivencia tuvo un efecto positivo en las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas, dado que en el nivel más alto encontraron que las plantas inoculadas sobrevivieron el 30% en comparación con el 0% de las no inoculadas. Además, esta asociación micorrícica favoreció el crecimiento en la parte aérea y radical de esta especie. Por otra parte, Bompadre *et al.* 2013 reporta efectos similares sobre el incremento en la tolerancia al estrés hídrico y el crecimiento en plantas de Olivo (*Olea europea*) pero inoculadas con *R. intraradices*. En el trabajo de Ponce 2019, exploraron el comportamiento en el crecimiento de *A. occidentalis* junto con *Pseudombobax ellipticum*, realizaron la inoculación con los dos hongos micorrícicos utilizados en este experimento (*P. tinctorius* y *R. intraradices*) de forma individual, dual (ambas especies de hongos) y un grupo control (micorriza ausente). Para *P. ellipticum* la inoculación con *P. tinctorius* fue favorable mientras que para *A. occidentalis* fue la inoculación dual, en este caso en las variables aéreas como en las radicales fue mayor el efecto en la inoculación de ambos hongos. Resultados que difieren con los obtenidos en este trabajo, siendo la interacción de *P. tinctorius* en ausencia y en concentración media de nanotubos de carbono (20/L) los tratamientos que más destacaron en la parte aérea. Mientras que en la parte radical, las variables obtenidas de la arquitectura de raíz el tratamiento inoculado con *R. intraradices* en combinación con una concentración alta de nanotubos de carbono (40µg/mL) tuvo un mejor desarrollo radicular, incluyendo la biomasa en peso seco, seguido de la inoculación dual (P+R) y *P. tinctorius*.

En complemento con lo anterior, trabajos como el de Hernández-Cuevas *et al* 2011 promueven el uso de los hongos micorrícicos para programas de restauración de especies nativas; quienes demostraron un alto índice en el crecimiento de las plantas inoculadas y con ello en la tasa de supervivencia. Mientras que Lenoir *et al.* 2016, en su investigación bibliográfica menciona como las poblaciones de hongos silvestres pueden verse afectadas por factores abióticos como: sequía, contaminación, salinidad y fungicidas. Al verse disminuida la diversidad de hongos, hay predominancia en los suelos afectados de hongos de la familia Glomeraceae. Estas especies se adaptan a

las nuevas condiciones se suelo con una estrategia de producción rápida de propágulos y la colonización de las raíces de las plantas. Como ejemplo menciona a *R. intraradices*, lo que puede dar a las plantas inoculadas con esta especie potencial para tolerar las condiciones de sequía, como se pudo observar en este estudio al presentar el mejor desarrollo radicular.

Por otra parte, Hoeksema *et al.* 2010, sugiere que los beneficios que aportan las micorrizas a las plantas puede variar de acuerdo a distintos factores bióticos y abióticos, sobre todo en condiciones de campo. Sugiere como un factor la disponibilidad de nutrientes en el suelo, siendo estos los que podrían influir en la respuesta favorable o no favorable de la interacción y con ello el incremento del crecimiento de las plantas. Teoría que se respalda con el trabajo de Holste y Kobe 2016, donde evaluaron el crecimiento de diferentes especies en una reforestación de un sitio tropical, encontraron que la disponibilidad de nutrientes en este sitio era el factor que influía en el crecimiento de las plantas más que la presencia de la micorriza.

No obstante, trabajos como el de Gómez-Romero *et al.* 2013 y el de Báez-Pérez *et al.* 2015 demuestran el éxito en el establecimiento de las plantas arbóreas en sitios perturbados. Las plantas en ambos experimentos al ser inoculadas con hongos micorrícicos, se observó el aumentó en la tasa de supervivencia y el crecimiento de las plantas en comparación con las no inoculadas. Cabe destacar que Báez-Peréz *et al.* 2015 utilizó un fertilizante nitrogenado en las plantas, en este caso provocó efectos negativos en las plantas. Lo cual puede sugerir que las micorrizas son las que proveen el beneficio óptimo en establecimiento y crecimiento de las plantas. Retomando en parte la idea sobre la disponibilidad de nutrientes, se ha sugerido que las micorrizas ayudan a fijar estos elementos, dejándolos a disposición para que las plantas puedan absorberlos con facilidad. Nutrientes como el nitrógeno y el fosforo son los más mencionados (Read *et al.* 2003; Vosátka y Patten 2008; Saia *et al.* 2020).

Si tomamos en cuenta a las redes de hongos ecto-micorrícicos, las cuales se sugiere que contribuyen al equilibrio de los ecosistemas, a partir de la exploración de hifas extra-radicales, quienes colonizan plantas cercanas a su hospedero principal (Wu

y Zou 2017). Estas redes de micorrizas establecen hifas en las que ocurre un intercambio de recursos y una forma de comunicación entre plantas (Egerton-Warburton *et al.* 2007; Simard 2018). Alaux *et al.* 2020 menciona que la mayoría de los hongos ecto-micorrícicos pueden formar este tipo de redes; lo cual crea una red de interacciones multitróficas, promoviendo el establecimiento de plantas, defensa, nutrición, productividad y distribución. Aunque, se sugiere tomar en cuenta este tipo de redes para la administración sustentable del suelo; no asegura del todo que las redes de micorrizas sean realmente benéficas para las plantas, esto desde un enfoque agrícola y de producción. Pero en el caso de plantas en medio silvestre, Egerton-Warburton *et al.* 2007 responde parte de la incógnita sobre la funcionalidad de este tipo de redes. En él estudió que hicieron para ver las vías de comunicación entre redes de micorrizas. Encontraron que no todas las hifas extra-radicales, son las que participan en el intercambio de nutrientes y son pocas las que cumplen esta función. Se sugiere que esto es importante ya que gran parte del intercambio de recursos fue de agua al someter a las plantas a un tipo de sequía. Lo que puede ser una respuesta del porque las plantas en campo, al ser inoculadas con micorrizas toleran más el estrés hídrico a partir de la comunicación por medio de este tipo de redes.

La inoculación de materiales nanotecnológicos en plantas es relativamente nuevo. Gran parte de la información sobre los efectos positivos en las plantas, como el incremento en el aprovechamiento de los recursos (agua y nutrientes) y el crecimiento; son estudios en el área agrícola con especies de interés comercial (Tripathi *et al.* 2017; Lira *et al.* 2018; Khan *et al.* 2019). Para *A. occidentalis* los tratamientos sin inoculación de micorrizas con las tres concentraciones utilizadas de nanotubos (0 µg/mL; 20 µg/mL y 40 µg/mL), aunque no destacaron en crecimiento en comparación con los inoculados con los hongos micorrícicos. La concentración alta tuvo el mayor crecimiento. En trabajos previos se ha documentado que las concentraciones ideales en el uso de este tipo de materiales van a variar de acuerdo a la especie. (Khan *et al.* 2019).

Por otra parte, en el trabajo de Lara-Romero y colaboradores en el 2017 quienes demostraron la formación de nanotubos de carbono a partir de los incendios forestales, en un bosque donde se distribuyen las especies de *Pinus oocarpa* y *P. pseudostrobus*. Junto con las pruebas en la quema de madera de estas especies, las cuales por los compuestos que contienen en las resinas favorecen la formación de los nanotubos de manera natural. Complementando lo anterior, Juárez-Cisneros *et al.* 2020 evaluó la respuesta en el crecimiento de *Eysenhardtia polystachya* al ser inoculada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos junto con un grupo control. Este estudio, demostró como las plantas tienen una mejor respuesta de crecimiento con los nanotubos naturales y el incremento de la biomasa seca. En comparación los nanotubos sintéticos provocaron un efecto negativo en las plantas. Al igual que con *A. occidentalis* esta especie tuvo el mejor desempeño en el crecimiento con la concentración de nanotubos de 40 µg/mL.

La combinación de los hongos micorrícicos con los nanotubos de carbono en este estudio, demuestra que ambos elementos en el caso de *A. occidentalis* es favorable. Se observó que de acuerdo a la especie de hongo también la concentración de nanotubos va a variar (*P. tinctorius* 20 µg/mL y *R. intraradices* 40µg/mL). Con el antecedente de la presencia de los nanotubos de carbono originados en la naturaleza y su respuesta favorable en la germinación y crecimiento (Lara-Romero *et al.* 2017; Juárez-Cisneros *et al.* 2020). En un escenario de un ecosistema afectado por un incendio forestal, este tipo de combinaciones con los hongos micorrícicos y los nanotubos podría darse naturalmente. Aunque, no hay evidencia que respalde teoría, se puede sugerir por la regeneración de las comunidades de hongos micorrícicos después de un incendio. De acuerdo con Duran *et al.* 2017 reportaron la regeneración de las comunidades de hongos nativos de los sitios con quemas controladas. La regeneración de las comunidades se empezaba a observar a partir de los 15 días posteriores del incendio y a los 60 días se había regenerado la comunidad de hongos por completo.

El comportamiento de *A. occidentalis*, durante los cinco meses que fue sometida a estrés hídrico. Demostró que al ser inoculada con los hongos micorrícicos en combinación con los nanotubos de carbono le resulta favorable en la supervivencia y crecimiento. Los resultados obtenidos, ayudan a visualizar los posibles tratamientos que pueden desempeñar el establecimiento exitoso a esta planta en condiciones de campo. Lo ideal sería hacer una réplica de este experimento en un ensayo de restauración, para así poder evaluar el desempeño de esta especie con los tratamientos probados en este estudio y en un periodo de tiempo mayor.

Conclusiones

El comportamiento de *A. occidentalis* al ser inoculada con hongos micorrícicos y nanotubos de carbono fue favorable. La tasa de mortalidad fue muy baja entre tratamientos sometidos a estrés hídrico en comparación con los no sometidos al estrés. El crecimiento de esta especie se vio favorecido en la parte aérea con la inoculación de *P. tinctorius* sin nanotubos de carbono y en combinación con la concentración media (20 µg/mL). Mientras que en la parte radical la inoculación de *R. intraradices* en combinación de nanotubos alta (40 µg/mL) fue la que presentó un efecto mayor en el desarrollo de la raíz. Con respecto a la biomasa tanto aérea como radical fue mayor en los tratamientos de *P. tinctorius* y *R. intraradices* sin nanotubos y con la concentración alta respectivamente. Aunque no destacaron como el mayor crecimiento la inoculación alta de nanotubos sin la micorriza favoreció el crecimiento de esta especie en comparación con la concentración media y en ausencia.

Con los resultados obtenidos se sugiere que el uso de los hongos micorrícicos *P. tinctorius* (nanotubos ausentes y concentración media) y *R. intraradices* (concentración alta de nanotubos) podrían ayudar al establecimiento de *A. occidentalis* en campo y con las nuevas condiciones que trae consigo el cambio climático. Proyectando una estrategia ecofisiológica para programas de restauración ecológica enfocados en el uso de plantas nativas en sitios perturbados.

Bibliografía

- Alaux, P. L., Zhang, Y., Gilbert, L., & Johnson, D. (2021). Can common mycorrhizal fungal networks be managed to enhance ecosystem functionality?. *Plants, People, Planet*. 1-12
- Báez-Pérez, A. L., Gómez-Romero M., Villegas, J., de la Barrera, E., Carreto-Montoya, L., y Lindig-Cisneros, R. (2015). Inoculación con hongos micorrízicos y fertilización con urea de plantas de *Fraxinus uhdei* en acrisoles provenientes de sitios degradados. *Botanical Sciences*, 93(3), 501-508.
- Bompadre, M. J., Rios De Molina, M. C., Colombo, R. P., Fernandez Bidondo, L., Silvani, V. A., Pardo, A. G., Godeas, A. M. (2013). Differential efficiency of two strains of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* on olive (*Olea europaea*) plants under two water regimes. *Symbiosis*, 61(2), 105–112.
- Duran Manual, F., Geada López, G., Martínez Becerra, L. W., Pérez Pereda, E., & Massó Matos, J. (2017). Diagnóstico de hongos ectomicorrízicos en un bosque natural de *Pinus cubensis* Griseb, afectado por el fuego. *Revista cubana de Ciencias Forestales*, 5 (2), 161-172.
- Egerton-Warburton, L. M., Querejeta, J. I., & Allen, M. F. (2007). Common mycorrhizal networks provide a potential pathway for the transfer of hydraulically lifted water between plants. *Journal of Experimental Botany*, 58(6), 1473-1483.
- García-Rodríguez, J. L., Pérez-Moreno, J., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V. M., & Vaquera-Huerta, H. (2006). Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia*, 40(5), 665-676.
- Garcia, K., y Zimmermann, S. D. (2014). The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Frontiers in Plant Science*, 5(July), 1–9.

- Goltapeh, E. M., Danesh, Y. R., Prasad, R., & Varma, A. (2008). Mycorrhizal fungi: What we know and what should we know?. In *Mycorrhiza* (pp. 3-27). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R., y Val, E. D. (2015). Efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus pseudostrobus* y *Pisolithus tinctorius*. *Botanical Sciences*, 93(4), 731-740.
- Gómez-Romero, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C., y Lindig-Cisneros, R. (2013). Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera y bosques*, 19(3), 51-63.
- Hernández-Cuevas, L., Santiago-Martínez, G., & Cuatlal-Cuahutencos, P. (2011). Propagación y micorrización de plantas nativas con potencial para restauración de suelos. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 2(7), 87-96.
- Hoeksema, J. D., Chaudhary, V. B., Gehring, C. A., Johnson, N. C., Karst, J., Koide, R. T., & Umbanhowar, J. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology letters*, 13(3), 394-407.
- Holste, E. K., & Kobe, R. K. (2017). Tree species and soil nutrients drive tropical reforestation more than associations with mycorrhizal fungi. *Plant and soil*, 410(1-2), 283-297.
- Juárez-Cisneros, G., Gómez-Romero, M., de la Cruz, H. R., Campos-García, J., & Villegas, J. (2020). Multi-walled carbon nanotubes produced after forest fires improve germination and development of *Eysenhardtia polystachya*. *PeerJ*, 8, e8634.
- Khan, M. A., Khan, T., Riaz, M. S., Ullah, N., Ali, H., & Nadhman, A. (2019). Plant cell nanomaterials interaction: Growth, physiology and secondary metabolism. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 84, pp. 23-54). Elsevier.

- Lara-Romero, J., Campos-García, J., Dasgupta-Schubert, N., Borjas-García, S., Tiwari, D. K., Paraguay-Delgado, F., y De la Cruz, H. R. (2017). Biological effects of carbon nanotubes generated in forest wildfire ecosystems rich in resinous trees on native plants. *PeerJ*, 5, e3658.
- Langley, J. A., Chapman, S. K., La Pierre, K. J., Avolio, M., Bowman, W. D., Johnson, D. S. y Knapp, A. K. (2018). Ambient changes exceed treatment effects on plant species abundance in global change experiments. *Global change biology*, 24 (12), 5668-5679.
- Lenoir, I., Fontaine, J., & Sahraoui, A. L. H. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. *Phytochemistry*, 123, 4-15.
- Li, T., Lin, G., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, S., & Chen, B. (2014). Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza*, 24(8), 595-602.
- Lira Saldivar, R. H., Méndez Argüello, B., De los Santos Villareal, G., & Vera Reyes, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria*, 28(2), 9-24
- Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J. J. M., y Pinzón-López, L. L. (2012). Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias. *Terra Latinoamericana*, 30 (4).
- Neuenkamp, L., Prober, S. M., Price, J. N., Zobel, M., & Standish, R. J. (2018). Benefits of mycorrhizal inoculation to ecological restoration depend on plant functional type, restoration context and time. *Fungal Ecology*, 40, 140-149.
- North, M. P., Stevens, J. T., Greene, D. F., Coppoletta, M., Knapp, E. E., Latimer, A. M., & Wyrsh, P. (2019). Tamm Review: Reforestation for resilience in dry western US forests. *Forest Ecology and Management*, 432, 209-224.

- Prieto, R. J., Cornejo, O. E., Calleros, D. P., Návar, C. J., Marmolejo, M. J., & Jiménez, P. J. (2004). Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero. *Forest Systems*, 13(3), 443-451.
- Ponce, J. C. 2018. Evaluación del desarrollo de *Albizia plurijuga* y *Pseudobombax ellipticum* en presencia / ausencia de hongos micorrícicos, sometidos a estrés hídrico con fines de restauración ecológica. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. (Tesis)
- Read, D. J., & Perez-Moreno, J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance?. *New phytologist*, 157 (3), 475-492.
- Ruffini Castiglione Monica & Roberto Cremonini (2009) Nanoparticles and higher plants, *Caryologia*, 62:2, 161-165.
- Saia, S., Tamayo, E., Schillaci, C., & De Vita, P. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi and nutrient cycling in cropping systems. In *Carbon and nitrogen cycling in soil*(pp. 87-115). Springer, Singapore.
- Servin, A. D., & White, J. C. (2016). Nanotechnology in agriculture: next steps for understanding engineered nanoparticle exposure and risk. *NanoImpact*, 1, 9-12.
- Simard, S. W. (2018). Mycorrhizal networks facilitate tree communication, learning, and memory. In *Memory and learning in plants* (pp. 191-213). Springer, Cham.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., & Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes rendus biologiques*, 331(3), 215-225.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Sharma, N. C., & Chauhan, D. K. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 2-12.

- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J. J., Corcuera, L., & Gil-Pelegrín, E. (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*, 2, 165-192.
- Vosátka, M., Albrechtová, J., & Patten, R. (2008). The international market development for mycorrhizal technology. In *Mycorrhiza* (pp. 419-438). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wu, Q. S., & Zou, Y. N. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and tolerance of drought stress in plants. In *Arbuscular mycorrhizas and stress tolerance of plants* (pp. 25-41). Springer, Singapore.

IV. Discusión general

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran el potencial que *Albizia occidentalis* podría tener en programas de restauración ecológica, con la perspectiva del uso de especies nativas y dentro de categorías de riesgo; para su conservación. De acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 se encuentra catalogada como “Amenazada” y en la lista roja de especies en riesgo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) “En Peligro”. Con la capacidad de almacenamiento prolongado de las semillas de esta especie y el incremento a la tolerancia al estrés hídrico con tratamientos de hongos micorrícicos (*P. tinctorius* y *R. intraradices*) y/o nanopartículas (nanotubos de carbono), podría ser una estrategia útil, visualizando las condiciones ambientales que causa el cambio climático en el medio ambiente.

La viabilidad de las semillas, puede ser una limitante para la conservación de especies de plantas silvestres; almacenadas *ex situ* en bancos de germoplasma. Esto se debe a que solamente las especies con semillas del tipo ortodoxas, se pueden mantener almacenadas durante periodos de tiempo largos (Probert *et al.* 2009; Godefroid *et al.* 2010; Merrit y Dixon 2011; Forte Gil *et al.* 2017). En el caso de *A. occidentalis*, de acuerdo a Arce *et al.* 2008 posee semillas de este tipo. Los resultados obtenidos con este experimento, se encontró que la viabilidad germinativa de las semillas de esta especie; se mantiene prácticamente intacta hasta los ocho años de almacenamiento. Siempre y cuando el almacenamiento se encuentre bajo condiciones de temperatura y humedad controladas (0-5°C; 4-8%) como lo propone Doria 2010; en este caso a partir de los 10 años esta se verá reducida un 40-30%. Mientras, en el caso de no ser almacenada en las condiciones de temperatura y humedad recomendadas; después de cinco años, pierde más del 50% de la viabilidad.

La velocidad de germinación de *A. occidentalis*, la hace ideal para propagación; la germinación inicia a partir del tercer día. Una de las características para que las especies nativas tengan un valor alto para reforestación, es la fácil propagación de

estas (Vázquez *et al.* 2001; Vanegas 2016). Cumpliendo en parte este requisito al no necesitar un tratamiento pre-germinativo y una tasa de germinación alta mayor del 90%, en comparación con otras especies.

El deterioro en el medio ambiente, por diversas prácticas antropogénicas y con ello el cambio climático presente, ha impuesto nuevo retos a las plantas para su supervivencia (Tylianakis *et al.* 2008; Jiménez-Sierra *et al.* 2014). Los programas de restauración ecológica, recomiendan utilizar especies que puedan establecerse en suelos perturbados y sean capaces de tolerar las condiciones ambientales, que enfrentarán en sitios desprovistos de vegetación. En este caso, el uso de especies pertenecientes a la familia Fabaceae son recomendadas porque tienen la capacidad de establecimiento en suelos perturbados, toleran más la sequía, ayudan a fijar nutrientes como el Nitrógeno y pueden cumplir el papel nodrizas (Vázquez *et al.* 2001; Harris *et al.* 2006; Vanegas 2016). *A. occidentalis* al ser miembro de esta familia cumple gran parte de los requerimientos. Sin embargo, su baja tolerancia al estrés hídrico limita su establecimiento en campo. Encino-Ruíz *et al.* 2013 lo demostró en su ensayo de restauración ecológica; en el que *A. occidentalis* tuvo una tasa de supervivencia baja del 26%, registrando la mayor mortalidad en la época de sequía.

Teniendo en cuenta la problemática que en la actualidad enfrentan las plantas ante las condiciones cambiantes como resultado de los efectos del cambio climático, el cual surge a partir del aumento de la temperatura ambiente, causa periodos de sequía más prolongados. Al hablar de reforestaciones, la baja tolerancia a la sequía de las plantas utilizadas en este tipo de programas; es una limitante para su establecimiento. Es por ello, que la búsqueda de estrategias que puedan ayudar a enfrentar el cambio climático es crucial. Desde la migración asistida de especies a altitudes que en un futuro alcanzaran condiciones de temperatura ideales para las plantas; de acuerdo a Sáenz-Romero *et al.* 2016, las plantas deben de elevarse 300 mts, con la perspectiva de que por década hay un aumento de la temperatura de 1.5°C y con ello cada 100 metros disminuye 0.5°C.

Por otra parte, el uso de hongos micorrícicos para incrementar la tolerancia al estrés hídrico y el crecimiento de las plantas (Compant *et al.* 2010; Gómez-Romero *et al.* 2015). En este caso, la inoculación de hongos micorrícicos en combinación con los nanotubos de carbono (NTC) causaron un efecto positivo en *A. occidentalis* en condiciones de vivero. Esto se vio reflejado más en el crecimiento, que en la supervivencia. Con respecto a la supervivencia, el nivel de estrés hídrico no presentó diferencias significativas entre tratamientos con el riego control. Probablemente, en condiciones de campo el efecto podría ser más evidente con respecto a la supervivencia como en los trabajos de Gómez-Romero *et al.* 2013; Gómez-Romero *et al.* 2015 y Báez-Pérez *et al.* 2015, donde la tasa de supervivencia fue mayor en plantas inoculadas con hongos micorrícicos, en comparación con las no inoculadas.

El crecimiento de *A. occidentalis*, con los tratamientos inoculados con *P. tinctorius* sin y 20 µg/mL de NTC fueron los tratamientos que mayor efecto presentaron en la parte aérea. Mientras que, en la parte radical, el tratamiento inoculado con *R. intraradices* con 40 µg/mL de NTC fue el que mostró mayor efecto en el crecimiento de la mayoría de las variables de arquitectura de raíz. Además, la biomasa fue mayor en las plantas con los tratamientos inoculados con los hongos micorrícicos que en los no inoculados. Esto muestra que incluso la productividad de las plantas se vio favorecida con la presencia de las micorrizas. Los resultados obtenidos en este experimento, nos muestra un panorama sobre que tratamientos podrían incrementar las posibilidades de supervivencia, establecimiento y crecimiento de esta especie en condiciones de campo.

Una de las ventajas, sobre el crecimiento de las plantas en programas de restauración; es el incremento en la parte radical tanto para anclaje de la planta como en la cobertura. Por ejemplo, Ruíz-Reyes *et al.* 2009 quien, menciona que el desarrollo radicular es importante para el establecimiento de especies en sitios perturbados, demostrando esto con *Senna hirsuta* (Fabaceae) al establecerse en un sitio perturbado y con un alto grado de erosión del suelo en comparación con *Lupinus elegans* (Fabaceae); debido a que *S. hirsuta* tiene un mejor desarrollo radical que *L. elegans*.

Efecto que promovió un mejor anclaje de la especie en el suelo y tolerancia a las condiciones ambientales del sitio degradado.

Por otra parte, aun es escasa la información en cuestión forestal sobre los efectos positivos de las nanopartículas. Sin embargo, en el área agrícola se ha reportado que las plantas inoculadas con este tipo de elementos fomentan el crecimiento y la tolerancia a la sequía (Lira *et al.* 2018; Khan *et al.* 2019). Pero a pesar de los debates que existen sobre la posible toxicidad que podrían ejercer en los ecosistemas; por el hecho de que se utilizan en sector nanopartículas de origen inorgánico, lo que podría atribuir en este sentido un efecto negativo en el medio ambiente (Ruffini y Cremonini 2009; Medina *et al.* 2015; Tripathi *et al.* 2017). Sin embargo, en el trabajo de Juárez-Cisneros *et al.* 2020, determinó que los nanotubos de carbono de origen natural ejercen un efecto positivo en el crecimiento en *Eysenhardtia polystachya* en comparación con los de origen sintético. En conjunto con Lara-Romero *et al.* 2017, quienes abren el panorama sobre la formación de nanotubos de carbono a partir de los incendios forestales y su efecto positivo en la germinación y crecimiento de las plantas inoculadas con este tipo de nano materiales. Con los resultados en este estudio en el caso de *A. occidentalis* la concentración alta (40 µg/mL) en ausencia de micorrizas, fue la que favoreció el crecimiento en comparación con la concentración media (20 µg/mL).

Ante el panorama de cambio climático, la conservación de las especies silvestres es necesaria. El conocimiento sobre la viabilidad y germinación son aspectos de la biología de las especies poco estudiados. Se detectó que las semillas de *A. occidentalis* conservan un porcentaje alto de viabilidad después de 10 años de almacenamiento, lo cual contribuiría a desarrollar planes de conservación de sus poblaciones y la haría candidato idóneo para emplearse en proyectos de restauración. En este sentido, en escenarios de perturbación y degradación de los ecosistemas, el uso de estrategias como lo son la inoculación con hongos micorrícicos y nanopartículas, podrían promuevan la restauración de estos sitios con plantas nativas

de la región, lo que contribuiría a regenerar de manera funcional, ecosistemas degradados al tolerar las condiciones de sequía y altas temperaturas.

V. Recomendaciones de manejo

Los resultados obtenidos en este trabajo proyectan el potencial que puede tener *A. occidentalis* para programas de restauración ecológica. Desde la facilidad para propagar esta especie con tasas altas de germinación y con ello la capacidad de las semillas de mantener la viabilidad de las semillas durante periodos de tiempo largos.; siempre y cuando estas sean almacenadas en condiciones adecuadas de temperatura y humedad. Información indispensable para los bancos de germoplasma.

La tolerancia al estrés hídrico con la inoculación de los hongos micorrícicos *P. tinctorius* y *R. intraradices* y/o nanotubos de carbono pueden potencializar la tolerancia de esta especie, así como fomentar su crecimiento tanto aéreo como radical. Cabe mencionar que este efecto se observó en condiciones de vivero y aún falta hacer pruebas de este tipo en condiciones de campo, donde esta especie podría tener un comportamiento distinto al que se vio en vivero. Sin embargo, con los resultados obtenidos se puede sugerir el uso del hongo *P. tinctorius* sin nanotubos o complementado con una concentración media (20 µg/mL) o en caso de *R. intraradices* en combinación de nanotubos alta (40 µg/mL), son tratamientos que incrementan el crecimiento y la tolerancia al estrés hídrico de esta especie.

VI. Bibliografía Complementaria

- Arce, M. de L. R., Gale, S. L., & Maxted, N. (2008). A taxonomic study of *Albizia* (Leguminosae: Mimosoideae: Ingeae) in Mexico and Central America. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 65(2).
- Báez-Pérez, A. L., Gómez-Romero M., Villegas, J., de la Barrera, E., Carreto-Montoya, L., y Lindig-Cisneros, R. (2015). Inoculación con hongos micorrízicos y fertilización con urea de plantas de *Fraxinus uhdei* en acrisoles provenientes de sitios degradados. *Botanical Sciences*, 93(3), 501-508.
- Burney, O., Aldrete, A., Alvarez Reyes, R., Prieto Ruíz, J. A., Sánchez Velazquez, J. R., & Mexal, J. G. (2015). México-Addressing challenges to reforestation. *Journal of Forestry*, 113(4), 404-413.
- Encino-Ruiz, L., Lindig-Cisneros, R., Gómez-Romero, M., & Blanco-García, A. (2013). Desempeño de tres especies arbóreas del bosque tropical caducifolio en un ensayo de restauración ecológica. *Botanical Sciences*, 91(1), 107-114.
- Ceccon, E., y Martínez-Garza, C. (2016). Experiencias mexicanas en la restauración de los ecosistemas. Universidad Nacional Autónoma de México, Centro Regional de Investigaciones Multidisciplinarias; Universidad Autónoma del Estado de Morelos; pp (23; 32; 36;) Ciudad de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Compant, S., Van Der Heijden, M. G., y Sessitsch, A. (2010). Climate change effects on beneficial plant–microorganism interactions. *FEMS microbiology ecology*, 73(2), 197-214.
- Forte Gil, J. A., Yabor, L., Bellido Nadal, A., Collado, F., Ferrer-Gallego, P., Vicente, O., Y Boscaiu, M. (2017). A Methodological Approach For Testing The Viability Of Seeds Stored In Short-Term Seed Banks. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(4).

- Godefroid, S., Van de Vyver, A., & Vanderborght, T. (2010). Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. *Biodiversity and Conservation*, 19(5), 1365-1383.
- Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R., y Val, E. D. (2015). Efecto de la sequía en la relación simbiótica entre *Pinus pseudostrobus* y *Pisolithus tinctorius*. *Botanical Sciences*, 93(4), 731-740.
- Gómez-Romero, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C., y Lindig-Cisneros, R. (2013). Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera y bosques*, 19(3), 51-63.
- González-Espinosa, M. 1998. *Albizia plurijuga*. The IUCN Red List of Threatened Species 1998: e.T32948A9744319.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T32948A9744319.en>. Downloaded on 22 October 2018.
- Hansen James. (2008). Tipping point Perspective of a climatologist. In *State of the Wild a Global Portrait of Wildlife, Wildlands, and Oceans*. Pp:6-15
- Hansen, J., Sato, M., & Ruedy, R. (2012). Perception of climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), E2415-E2423.
- Harris, JA, Hobbs, RJ, Higgs, E. y Aronson, J. (2006). Restauración Ecológica y Cambio Climático Global. *Restoration Ecology*, 14 (2), 170-176.
- Hoeksema, J. D., Chaudhary, V. B., Gehring, C. A., Johnson, N. C., Karst, J., Koide, R. T., & Umbanhowar, J. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology letters*, 13(3), 394-407.
- Jiménez Sierra, C. L., Sosa Ramírez, J., Cortés-Calva, P., Breceda Solís Cámara, A., Íñiguez Dávalos, L. I., y Ortega-Rubio, A. (2014). México país megadiverso y la relevancia de las áreas naturales protegidas. *Investigación y ciencia*, 22(60).

- Koleff, P., Urquiza-Haas, T. y García Méndez, G. (2016). Propuesta metodológica para identificar prioridades de restauración en México. En: Ceccon and C. Martínez-Garza, Experiencias mexicanas en la restauración de los ecosistemas, 1st ed. Cuernavaca, Morelos: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, pp.31-47.
- Langley, J. A., Chapman, S. K., La Pierre, K. J., Avolio, M., Bowman, W. D., Johnson, D. S. y Knapp, A. K. (2018). Ambient changes exceed treatment effects on plant species abundance in global change experiments. *Global change biology*, 24 (12), 5668-5679.
- Lara-Romero, J., Campos-García, J., Dasgupta-Schubert, N., Borjas-García, S., Tiwari, D. K., Paraguay-Delgado, F., & De la Cruz, H. R. (2017). Biological effects of carbon nanotubes generated in forest wildfire ecosystems rich in resinous trees on native plants. *PeerJ*, 5, e3658.
- Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J. J. M., y Pinzón-López, L. L. (2012). Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias. *Terra Latinoamericana*, 30 (4).
- Medina, M. E., Galván, L. E., & Reyes, R. E. (2015). Las nanopartículas y el medio ambiente. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 19(74), 49-58.
- Merritt, D. J., y Dixon, K. W. (2011). Restoration seed banks -a matter of scale. *Science*, 332(6028), 424-425.
- Mexicana, N. O. (2010). NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. SEMARNAT. Diario Oficial de la Federación.
- Probert, R. J., Daws, M. I., y Hay, F. R. (2009). Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of botany*, 104(1), 57-69.

- Ripple, W., Wolf, C., Newsome, T., Barnard, P., Moomaw, W., & Valeix, M. (2019). World Scientists' Warning of a Climate Emergency. *Bioscience*, 70(1), 8-12.
- Ruffini Castiglione Monica & Roberto Cremonini (2009) Nanoparticles and higher plants, *Caryologia*, 62:2, 161-165.
- Ruiz-Reyes, C., Gómez-Romero, M., y Lindig-Cisneros, R. (2009). Desempeño de *Lupinus elegans* y *Senna hirsuta* bajo condiciones de restauración ecológica. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 11(1), 9-15.
- Ruiz, J. P., Oviedo, E. C., Calleros, P. A. D., Chaidez, J. D. J. N., Moncivais, J. M., y Pérez, J. J. (2004). Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero. *Forest Systems*, 13(3), 443-451.
- Rzedowski, J., 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, México, 504 pp.
- Rzedowski, J., & Calderón de Rzedowski, G. (2013). Datos para la apreciación de la flora fanerogámica del bosque tropical caducifolio de México. *Acta Botánica Mexicana*, (102), 1-23.
- Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R. A., Joyce, D. G., Beaulieu, J., Bradley, J. St. C., & Jaquish, B. C. (2016). Assisted migration of forest populations for adapting trees to climate change. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 22(3), 303-323.
- Sturrock, R. N., Frankel, S. J., Brown, A. V., Hennon, P. E., Kliejunas, J. T., Lewis, K. J., Woods, A. J. (2011). Climate change and forest diseases. *Plant Pathology*, 60(1), 133–149.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Sharma, N. C. & Chauhan, D. K. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 2-12.

- Tobón, W., Koleff, P., Urquiza-Haas, T., & García-Méndez, G. (2016). Propuesta metodológica para identificar prioridades de restauración en México. *Experiencias mexicanas en la restauración de los ecosistemas*, 18-36.
- Tylianakis, J. M., Didham, R. K., Bascompte, J., & Wardle, D. A. (2008). Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 11(12), 1351-1363.
- Vanegas López, M. 2016. Manual de mejores prácticas de restauración de ecosistemas degradados, utilizando para reforestación solo especies nativas en zonas prioritarias. Informe final dentro del proyecto GEF 00089333 "Aumentar las capacidades de México para manejar especies exóticas invasoras a través de la implementación de la Estrategia Nacional de Especies Invasoras". CONAFOR, CONABIO, GEF-PNUD. México. 158 p.
- Vargas Ríos, Orlando (2011). Restauración ecológica: biodiversidad y conservación. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 221-246. ISSN: 0120-548X.
- Vázquez Y.C., Batis M., A. I., Alcocer, M. I., Alcocer S., M. I. y Gual. D. M. y Sánchez D. C. (2001). Árboles y arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. México DF, México: Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.