



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FES ZARAGOZA

Crecimiento de toronjil (*Dracocephalum moldavica*
L.) micorrizado, en condiciones de invernadero

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

RICARDO MAR RODRÍGUEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ROSALVA GARCÍA SÁNCHEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX. 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma De México

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Al Programa de Investigación Sierra Nevada y a Guardianes de los Volcanes por la asesoría en el Parque Estatal "Cerro el Faro"

A los miembros del jurado:

Dra. Rosalva García Sánchez

Dr. Arcadio Monroy Alta

Dra. Esther Matiana García Amador

M. en C. Balbina Vázquez Benítez

Biól. Marco Antonio Hernández Muñoz

A Iván Hernández Ortiz y Omar Bladimir Cuevas Arzate †

Y al escuadrón suicida por demostrarnos que no importa cuán malvado seas siempre podrás ser un héroe.

Dedicatoria

A mis Padres:

María Ysabel Rodríguez Díaz

(M & M)

Cupertino Mar Castellanos

A mis Hermanos:

Luis Enrique Mar Rodríguez

(Pig Brother)

Carlos Mar Rodríguez

(Chanchito)

To My lovely Wife:

Stacy Hernández Millán

(Stacy Malibú)

A mis hijos:

Víctor Ricardo Mar Hernández

(El Mijo)

Katalina Ysabel Mar Hernández

(La Chicharita Jägermeister)

Erick Emilio Mar Hernández

(El Quiquín)

*Al Chico malo, al Maestro efectivo, a chela, al tío Bo, al Lazarillo de
Tormes, al Jerry Rice y todos los que me faltaron y no cupieron.*

ÍNDICE

	Pág.
1. Resumen	7
2. Introducción	8
3. Antecedentes	11
3.1 Toronjil azul (<i>Dracocephalum moldavica</i> L.)	11
3.1.1 Etnobotánica y Antropología	11
3.1.2 Botánica y Ecología	12
3.1.3 Potencial químico	13
3.2 Los Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA)	16
3.3 Germinación y establecimiento vegetal	19
3.3.1 Temperatura	20
3.3.2 Luz	21
3.4 Dormancia	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivo general	24
5.1 Objetivos específicos	24
6. Métodos	25
6.1 Caracterización del germoplasma	25
6.2 Viabilidad de las semillas	26
6.3 Prueba de germinación de semillas	26
6.4 Preparación del sustrato y siembra	27
6.5 Biomasa seca	27
6.6 Crecimiento	28
6.6.1 Tasa de crecimiento relativo	28
6.7 Área foliar	28
6.8 Tinción de raíces	28

6.9 Determinación de % de colonización en raíces	30
6.10 Eficiencia de la simbiosis micorrízica (ESM)	31
6.11 Análisis estadístico	31
7. Resultados y discusión	32
7.1 Caracterización del germoplasma	32
7.2 Viabilidad de las semillas	33
7.3 Prueba de germinación	34
7.4 Montaje del experimento	36
7.4.1 Emergencia	36
7.4.2 Crecimiento y supervivencia	38
7.4.3 Tasa relativa de crecimiento	41
7.4.4 Número de hojas	42
7.4.5 Área foliar	43
7.4.6 Determinación del % de colonización en raíces	44
7.4.7 Eficiencia de la simbiosis micorrízica (ESM)	46
8. Conclusiones	48
9. Bibliografía	49

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.

Figura	Pag.
Figura 1. Efecto anticonvulsivo de los tres toronjiles y su mezcla (Chavarría-Ramírez y Rivas-Falcón, 2012).	14
Figura 2. Tinción de raíces: a) lavado de raíces, b) raíces obtenidas, c) raíces con KOH al 10%, d) adición de azul de tripano.	29
Figura 3. Montaje de laminillas para observación en microscopio.	31
Figura 4. Prueba de germinación de semillas con arilo y sin arilo.	34
Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas con arilo y sin arilo.	35
Figura 6. Plántulas emergidas de <i>Dracocephalum moldavica</i> : a) sin micorrizas, b) con micorrizas.	36
Figura 7. Grafica del porcentaje de emergencia de plántulas de <i>D. moldavica</i> en cada tratamiento.	37
Figura 8. Plantas de toronjil azul de 10 semanas: a) sin micorrizas, b) con micorrizas.	38
Figura 9. Altura de las plantas de <i>D. moldavica</i> por tratamiento durante 10 semanas.	39
Figura 10. Porcentaje de supervivencia de plantas con micorrizas y sin micorrizas después de 10 semanas.	40
Figura 11. Número de hojas de las plantas con micorrizas y sin micorrizas al cabo de 10 semanas.	43
Figura 12. Área foliar del toronjil en tratamiento con micorrizas (M+) y sin micorrizas (M-).	44

Figura 13. Porcentaje de colonización de hongos micorrizógenos arbusculares.	45
Figura 14. Corte de raíz de <i>Dracocephalum moldavica</i> a 40x: a) raíz de plantas sin micorrizas, b) raíz de plantas micorrizadas con la presencia de hifas y vesículas.	46
Cuadro 1. Tasa de crecimiento relativo de los dos tratamientos.	41
Cuadro 2. Pesos secos totales de ambos tratamientos (M+ y M-) para el cálculo de la eficiencia en la simbiosis micorrízica (ESM).	47

1. RESUMEN

La micorriza arbuscular (MA) está presente en la mayoría de los ecosistemas terrestres y coloniza las raíces del 90% de las plantas, la MA favorece la nutrición mineral proporcionándole al fitobionte fósforo, nitrógeno y otros minerales que de otra manera no estarían disponibles, además, mejoran la calidad de suelo y la circulación del agua por la formación de agregados, estas funciones se traducen en un incremento de la biomasa dependiendo de la eficiencia de la simbiosis. En los bosques templados, existen especies herbáceas útiles que son recursos secundarios como son las plantas medicinales. En el bosque del Parque Ecológico Cerro del Faro existen especies como *Dracocephalum moldavica* (toronjil morado), especie colectada, con fines de valorar su posible propagación se realizó un ensayo en condiciones de invernadero, la finalidad fue evaluar el efecto de la micorriza en el establecimiento y crecimiento de *D. moldavica*. Se estableció un cultivo a partir de semilla colectada en el bosque, con suelo natural usado como inoculo micorrízico, 30 u.e. con micorriza y 30 testigos. Se mantuvo el experimento durante 10 semanas con riego a capacidad de campo. Los resultados mostraron que la semilla silvestre germinó un 40 %, la micorrización fue del 73.92 % un valor alto que se reflejó en un mayor establecimiento (87.1 vs 15.8 %), también favoreció significativamente el crecimiento en todas sus variables altura (18.89 vs 10.34 cm), hojas (71 vs 20) y área foliar (96.35 vs 15.69 cm²), resultado de la eficiencia micorrízica que fue del 76 %. Estos resultados sugieren que la micorriza favorece el cultivo de *D. moldavica* lo que podría utilizarse para propagar esta especie en vivero y satisfacer su demanda.

2. INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que, desde tiempos inmemorables, el ser humano ha utilizado todo tipo de recursos que encuentra en la naturaleza para sanar sus males, entre estos las plantas han jugado un papel muy importante, por medio de acierto y error, lograron distinguir entre especies beneficiosas y dañinas. En nuestro país, el uso de plantas aromáticas y medicinales ha formado parte de las costumbres desde la época prehispánica, ya sea en la cocina tradicional o para combatir todo tipo de enfermedades. Hasta el siglo XIX, tanto plantas como algunos productos de origen animal y mineral eran los únicos medicamentos empleados por el hombre occidental, incluso hoy en día existen varias zonas del mundo en donde las plantas son la única fuente de tratamiento utilizada (Reyes-Mireles, 2010; Juárez-Rosete *et al.*, 2013). Por esta razón, el estudio de la herbolaria medicinal debe ser objeto de estudio por parte de científicos sociales en colaboración con biólogos, químicos, médicos y farmacéuticos a fin de tener conocimiento conciso de sus propiedades y así proporcionar formas alternativas y eficaces para resolver problemas de salud (Madaleno, 2007).

En el mundo existen unas 250 000 especies vegetales, de las cuales sólo se tiene conocimiento científico de alrededor del 10%, considerando como medicinal unas 12 000 especies a la fecha. En México existe una gran variedad de especies psicoactivas, tratándose de hierbas que históricamente se usan para curar diversos males, así como problemas nerviosos. Plantas como la *Passiflora incarnata* (pasiflora), *Valeriana mexicana* (valeriana), *Matricaria recutita* (manzanilla), *Ruta chalepensis* (ruda), *Tilia mexicana* (tila) y *Agastache mexicana* (toronjil) entre muchas otras son ampliamente utilizadas por sus propiedades, ya que han demostrado actividad hipotensora y analgésica en pruebas farmacológicas (Reyes-Mireles, 2010). Sin embargo, de una gran parte de las mismas no se

cuenta con información suficiente. En el caso de las plantas medicinales, existen dos líneas principales de información, la primera, de carácter académico y científico, que desafortunadamente está muy restringida a revistas y textos especializados que van dirigidas a un público muy limitado. La segunda línea, se encuentra por el contrario, dirigido al público en general, en publicaciones de carácter popular en la mayoría de los casos, de veracidad y confiabilidad dudosa.

El toronjil azul (*Dracocephalum moldavica* L.) es una especie que, a pesar de no ser originaria de México, se ha arraigado fuertemente en nuestra cultura, siendo nativa de las zonas templadas de Asia central ha sido introducida al país desde la llegada de los Europeos y muchas veces descrita solo como toronjil, sin hacer diferencia alguna por el color. Es difícil saber hace cuánto tiempo fue incluida en la herbolaria al país, pero sin duda su uso se ha extendido a través de largo tiempo, ya sea solo o mezclado con el toronjil blanco y morado. En México existen muy pocos estudios de la especie, sin embargo, en Europa y Asia, los estudios realizados han comprobado sus efectos relajantes, antioxidantes y antibacterianos.

Una de las razones por la que en la actualidad, en muchos sitios del país se siguen utilizando las plantas medicinales, ya sea solas o en combinación con medicinas de patente, es su bajo costo debido a que la mayoría de las plantas son recolectadas en los sitios aledaños a los poblados, lo que tiene como consecuencia una disminución en la abundancia de las mismas, que inclusive puede llegar a la pérdida del recurso de manera local. Este es el caso de toronjil azul en el Parque estatal "Cerro el Faro y Cerro de los Monos" en el Estado de México. Una alternativa es poder propagarla de manera controlada en los sitios de colecta. De ahí la importancia de estudiar más a fondo este tipo de plantas. El primer paso para estudiar dichas plantas, es conocer sus características, como la

morfología de las semillas, el proceso de germinación y condiciones para su establecimiento o cultivo, lo cual permitirá facilitar su producción en nuestro país y por lo tanto, hacerla más accesible para su uso.

Asimismo, se sabe que alrededor del 80% de las angiospermas forman asociaciones micorrízicas (Taiz y Zeiger, 2006; Alvarado *et al.*, 2011; Reyes-Jaramillo, 2011). El uso de hongos micorrizógenos arbusculares en varios estudios ha demostrado brindar diversas ventajas competitivas a las plantas, por lo que se sugiere que en el caso de toronjil azul, la micorriza pueda favorecer significativamente su establecimiento en la etapa de plántula, que suele ser cuando la planta se encuentra más vulnerable y esa ventaja la conserve durante su crecimiento.

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar las características del germoplasma de *Dracocephalum moldavica* (toronjil azul) colectado en el Parque estatal "Cerro el Faro y Cerro de los Monos", así como inducir la micorrización en etapas tempranas del desarrollo de la planta para valorar las ventajas de la micorriza en la fase establecimiento y crecimiento en condiciones de invernadero.

3. ANTECEDENTES

3.1 Toronjil azul (*Dracocephalum moldavica* L.)

3.1.1 Etnobotánica y antropología

El toronjil azul ha sido ampliamente usado, desde épocas muy antiguas en Asia y Europa, posteriormente, se ha extendido su uso por prácticamente todo el mundo, ya sea como ingrediente en alimentos, o para curar algún padecimiento. En la medicina tradicional, el toronjil se usa frecuentemente para tratar el “espanto o susto”, aunque en ocasiones se emplea en el tratamiento de dolor de estómago, aire, tos, bilis, enfriamiento, vómito y nervios, así como problemas de riñones y desordenes del hígado. La forma más común de utilizarlo es haciendo una infusión con las hojas, por lo general usando indistintamente el toronjil morado (*Agastache mexicana*), el blanco (*Agastache mexicana* spp. *xolocotziana*) y el toronjil azul (*Dracocephalum moldavica*), mezclándolos entre sí o con otras plantas. En la mayoría de los casos el té es ingerido pero en ciertas situaciones se prepara la infusión y con este preparado se baña al enfermo (Linares *et al.*, 1996; Santillán-Ramírez *et al.*, 2008; Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, 2015).

En algunas comunidades también se emplea en la curación de “el mal de ojo”, provocado principalmente por la “mirada pesada” de las personas que afecta a los niños. Además entre mixes, zapotecos y totonacos, se le utiliza para resolver la “caída de mollera”, de la cual se dice que afecta a niños y adultos a consecuencia de golpes en el cráneo, por cargar objetos pesados en la cabeza o por caídas (Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, 2015).

3.1.2 Botánica y ecología

Dentro de la familia *Lamiaceae*, el género *Dracocephalum* se conforma por 50 especies. *D. moldavica* L. es una planta aromática, nativa de las zonas templadas de Asia Central en la zona entre Rusia y Azerbaiyán, y ampliamente naturalizada en Europa, así como en otros lugares del continente Americano. Es ampliamente buscada por sus aceites esenciales. Conocida comúnmente como bálsamo de Moldavia, cabeza de dragón o dragón azul, melisa de Moldavia, planta de abeja y en México como toronjil azul o toronjil extranjero (Popova *et al.*, 2008). Es una hierba anual de 30 hasta 80 cm de altura. Tallos erizados con cortos pelos glandulares erectos, cuadrangulares, generalmente ramificados desde cerca de la base. Hojas de 1.2 a 2.5 cm de largo, 0.7 a 1.5 cm de ancho, oblongo-ovadas, en forma de cuña dentada y base plana, con glándulas a ambos lados que producen aceites esenciales. Flores en verticilos de 6, de 2 cm de largo, azul-violeta brillante, externamente velludas. Brácteas oblongas, con barbas largas. Sépalos tubulares de 0.8 a 1 cm de largo, densamente cubiertas de pelos glandulares muy cortos y glándulas de aceite esencial disperso, Dos labios prominentes en los senos, el labio superior tiene 3 dientes puntiagudos casi iguales y ovados, el labio inferior tiene 2 dientes puntiagudos en forma de lanza. Frutos en núculas de 2.5x1.2 mm oblongas, marrón, ápice truncado con un prominente cicatriz en forma de V. Su cultivo se favorece porque es una planta que genera gran cantidad de semillas, crece rápidamente y no requiere condiciones específicas de cultivo. Se siembra durante la primavera y florece desde julio hasta finales de septiembre (Martínez, 1979; Ramírez-Munguía, 2006; Flowers of India, 2015). Incluso se sabe que es capaz de crecer en suelos recién recuperados, bajo estrés por salinidad y alta alcalinidad asociada con los suelos áridos (Aziz *et al.*, 2013).

3.1.3 Potencial químico

A pesar de que la mayoría de sus usos se tratan de síndromes de filiación cultural (SFC), los cuales se refieren a padecimientos que además de incluir aspectos físicos, expresan elementos propios de su cultura y de los cuales su curación se vincula con la fe y la intervención de terapeutas tradicionales, tal es el caso de el “susto” o “espanto”, diversos estudios químicos realizados sobre los toronjiles, han conducido al aislamiento de diversos metabolitos secundarios con actividad biológica que en cierta medida corresponde con los usos tradicionales que se le han dado a la planta (Santiago *et al.*, 2005) por lo cual se incrementa la importancia de su estudio.

El aceite esencial del toronjil azul es procedente de la parte aérea de la planta que ha sido ampliamente estudiado para determinar su composición. Se han detectado más de 90 componentes, de los cuales, 44 comprenden el 97.18% del total del aceite. Los principales componentes son el ácido linoleico, acetato de geranil, geranial, geraniol, nerol, acetato de neril, neral, y linalol, además de 1,8 Cineol, 4-terpineol y α -terpineol (Domokos-ay *et al.*, 1994; Hussein *et al.*, 2006; El-Baky y El-Baroty, 2008; Chu *et al.*, 2011; Aziz *et al.*, 2013). Mientras que también se han encontrado distintos tipos de monoterpenos, triterpenos, flavones, flavonoides, flavonas, iridoides, taninos y ácidos carboxílicos en mayor cantidad (Graf *et al.*, 2005; Dastmalchi *et al.*, 2007; Popova *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2014; Martínez-Vázquez, 2014), así como el ácido rosmarínico en abundancia (Dastmalchi *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2014). Se sabe que la concentración de metabolitos en este tipo de plantas depende principalmente de la época del año en que estas son recolectadas, y que se halla mayoritariamente en flores, hojas y frutos.

Precisamente, el efecto ansiolítico mostrado en los toronjiles puede deberse a los triterpenos y flavonoides que contiene, ya que se sabe de su acción depresora del sistema nervioso central; igualmente, a los triterpenos se les atribuye un efecto anticonvulsivo (Chavarría-Ramírez y Rivas-Falcón, 2012; Saki *et al.*, 2014). Así como los flavonoides y flavonas se asocian con un efecto activo en la prevención de algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas (Graf *et al.*, 2005; Martínez-Vázquez *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014; Estrada-Reyes *et al.*, 2014).

Estudios han demostrado que a pesar de los beneficios que presentan los toronjiles por separado, la mezcla de los tres (azul, blanco y morado), es la que presenta el mayor efecto farmacológico, incluso cercano a algunos fármacos como el Diazepam (Reyes-Mireles, 2010). Para el efecto anticonvulsivo se observa que la mezcla de los tres presenta una disminución en los efectos terapéuticos con respecto a los toronjiles usados de manera independiente. Los efectos obtenidos son semejantes a los presentes al usar clonazepam como se muestra en la figura 1 (Chavarría-Ramírez y Rivas-Falcón, 2012).

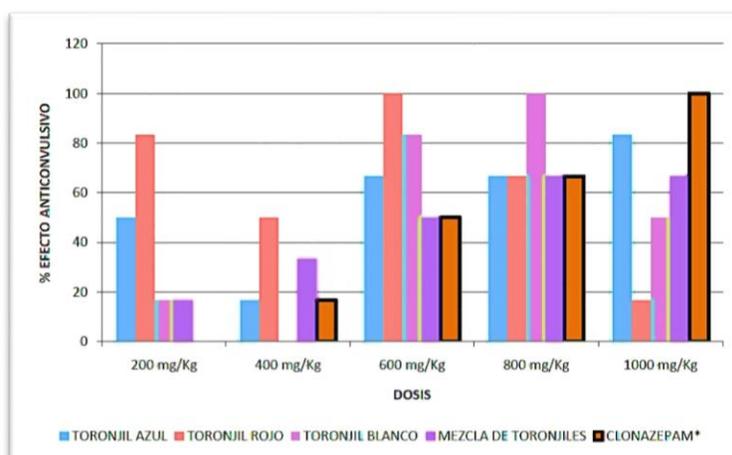


Figura 1. Efecto anticonvulsivo de los tres toronjiles y su mezcla (Chavarría-Ramírez y Rivas-Falcón, 2012)

Por otro lado, el aceite esencial exhibe actividad antibacterial, fungicida e insecticida, presentando fuerte acción contra *Sitophilus zeamais* y *Tribolium castaneum* así como en contra de envenenamiento por alimentos y organismos dañinos, como *Streptococo aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, y organismos de origen fecal como *Enterococcus faecalis* y el hongo *Aspergillus niger*, por lo que es una potente herramienta en el control de organismos patógenos, en la industria alimentaria y farmacéutica, además poseen la ventaja sobre los fumigantes convencionales en términos de baja toxicidad para los mamíferos, la degradación rápida y mayor disponibilidad (El-Baky y El-Baroty, 2008; Popova, 2008; Chu *et al.*, 2011).

De igual forma el aceite esencial de *D. moldavica* tiene una considerable actividad antioxidante. Los antioxidantes reducen el estrés oxidativo en las células y por lo tanto son útiles en el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades inflamatorias. Antioxidantes sintéticos tales como el butilhidroxitolueno (BHT) y Butilhidroxianisol (BHA) se utiliza actualmente como aditivos alimentarios y recientemente se ha revelado que estos antioxidantes se encuentran de forma natural en plantas como *D. moldavica*, lo que representa una alternativa libre de efectos potencialmente adversos al lado de los antioxidantes sintéticos para su uso en el procesamiento de alimentos y para el uso en la medicina preventiva (Dastmalchi *et al.*, 2006; Dastmalchi *et al.*, 2007; Krishnaiah *et al.*, 2011).

3.2 Los Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA)

Los HMA establecen una asociación mutualista con las raíces de las plantas formando las micorrizas arbusculares (gr. mykes, hongo y rhiza, raíz) (MA). En esta asociación el hongo ofrece un beneficio a su huésped a cambio de recibir otro, es decir, hay un beneficio mutuo producto de un intercambio bidireccional "hongo-planta": la planta suministra al hongo fuentes de carbono procedentes de la fotosíntesis (proceso que el hongo no puede realizar) y le brinda protección; mientras que el hongo le facilita a la planta la absorción de agua y nutrientes, principalmente fosfatos (Douglas, 1998), recursos del suelo que en condiciones extremas la planta difícilmente obtendría eficientemente sin la ayuda del hongo. Las micorrizas arbusculares tienen el potencial de hacer que un cultivo pueda tener éxito en suelos con niveles bajos de fósforo, mediante una explotación más efectiva del que se encuentre presente en el sustrato (Kahiluoto y Vestberg, 2000).

Los HMA bien podrían representar el segundo componente en biomasa en muchos ecosistemas terrestres; así mismo, se ha encontrado que los HMA asociados a las plantas reciben entre el 15 y el 20% de fotosintatos ricos en carbono resultado de la fotosíntesis del fitobionte, pudiendo ser un sumidero importante del carbono de la comunidad (Montaño *et al.*, 2007).

La micorriza arbuscular (MA) se caracteriza porque el hongo que coloniza la raíz desarrolla una estructura en forma de un diminuto arbolillo en las células del parénquima radical, estructura llamada arbusculo que es el sitio de intercambio entre la planta y el hongo (Taiz y Zeiger, 2006). Además, el sistema micorrízico está formado por un conjunto de hifas (micelio) que están conectadas con el tejido de la raíz y que salen de ella ramificándose en el suelo. El micelio que se encuentra en el suelo forma una

red de hifas capaces de interconectar a las raíces de plantas y de permitir el flujo de agua y nutrimentos entre las raíces de éstas (Montaño *et al.*, 2007).

Actualmente, se conocen con cierta precisión los servicios que brindan los HMA en los ecosistemas y en la agricultura, tales como la formación de suelo (disolución de rocas, enlace de partículas, etc.), fertilización del sustrato, estructuración de la comunidad vegetal (interacción planta-planta), producción secundaria (como fuente de alimento; e.g. esporas consumidas por nematodos), almacenamiento de carbono mediante glomalinas (proteína sintetizadas por los HMA) (González-Chávez *et al.*, 2004). Además, hay evidencias que muestran que el micelio externo de los HMA participa en el mecanismo de atrapar y enlazar las partículas primarias tales como Kaolinita-Calcio-Acido Húmico (Kaolinita-Ca-AH), Illita-Calcio-AcidoHúmico (Illita-Ca-AH) y Montmorillonita-Calcio-Acido Húmico (Montm-Ca-AH). Estas han sido estudiadas por Varadachari, Mondal y Gosh (Soil Science, Marzo 1995) para el desarrollo de agregados y su estabilidad. Esto debido a que la asociación HMA-raíces contribuye a la agregación del suelo (González-Chávez *et al.*, 2004).

Por otro lado, se conoce que los HMA ofrecen un atractivo mecanismo de fitorremediación, debido a que durante la interacción simbiótica, el sistema radical de las plantas micorrizadas se incrementa y con esto se aumenta el potencial para absorber el plomo (Alvarado *et al.*, 2011). Por su efecto sobre las plantas de interés agrícola o forestal, y la resistencia que brindan a las plantas en condiciones de vivero, los HMA se usan como inoculantes de aplicación práctica en la agricultura y en programas de reforestación de los bosques. Al respecto, se ha documentado que las plantas micorrizadas resisten mejor las condiciones adversas en el suelo, el ataque de microorganismos fitopatógenos e incluso, pueden proteger a sus

hospederos de efectos nocivos producidos por contaminantes tóxicos (Olivera-Morales *et al.*, 2011; Rivera-Espinosa *et al.*, 2011).

Los HMA estimulan en las plantas hospederas mayor tamaño y producción de semillas, a través de la incorporación de fósforo y de otros nutrientes, pero también favorece la resistencia a plagas y a la sequía. (Montaño *et al.*, 2007). Por ejemplo, los árboles tropicales inoculados con HMA han demostrado un mayor crecimiento y un incremento en la absorción de nutrientes, además de tolerar en mayor grado el estrés del trasplante, así como la supervivencia de las plantas, aunque las prácticas de manejo en vivero varían de un lugar a otro y afectan la colonización de las micorrizas, la variación puede ser atribuida a los tipos de suelo utilizados para sembrar las semillas y también a las técnicas de manejo de cada vivero (Michelson y Rosendahl, 1990; Monroy-Ata *et al.*, 2007; Pindi, 2011). Además, se presenta una mayor resistencia y sobrevivencia a las condiciones hostiles como sequías (Michelson y Rosendahl, 1990).

Se sabe que la eficiencia de la simbiosis micorrízica está directamente relacionada con el genotipo de la planta huésped, es decir, que existen diferencias en la respuesta funcional basadas en la relación HMA-planta. Sin embargo, la mayoría de las plantas en la naturaleza, presentan colonización de múltiples especies de hongos e incluso en algunos casos de micorrizas (Douglas, 1998; Montaño *et al.*, 2007). Incluso, se han encontrado hongos asociados a raíces presentes en zonas árticas, con especies muy diversas (Fujimura *et al.*, 2008).

En hábitats con condiciones extremas, las micorrizas brindan ciertas ventajas a la planta frente a los factores adversos. Las especies de gramíneas nativas de hábitats costeros y geotermales requieren una simbiosis con hongos endófitos tolerantes a la sal y el calor, respectivamente.

La tolerancia al estrés conferida simbióticamente es un fenómeno específico del hábitat con endófitos geotérmicos aplicando calor, pero no es tolerante a la sal y los endófitos costeros proporcionan tolerancia a la sal, pero no al calor. Las mismas especies fúngicas aisladas de plantas en hábitats carentes de sal o el estrés por calor no confiere estas tolerancias de estrés. Los hongos también confieren tolerancia a la sequía a las plantas, independientemente del hábitat de origen. La capacidad de los hongos endófitos a conferir tolerancia al estrés a las plantas puede proporcionar una nueva estrategia para la mitigación del impacto ambiental a nivel mundial y el cambio climático en las comunidades de plantas agrícolas y nativas (Rodríguez *et al.*, 2007).

3.3 Germinación y establecimiento vegetal

La germinación es el proceso de reactivación de la maquinaria metabólica de la semilla y la emergencia de la radícula (raíz) y del epicótilo, conducentes a la producción de una plántula. Incorpora aquellos eventos que se inician con la absorción de agua por la semilla seca (imbibición), continúa con un rápido incremento en la respiración, síntesis de proteínas y movilización de reservas de nutrientes y terminan con la elongación del eje embrionario. El proceso concluye cuando la radícula penetra y atraviesa las estructuras que rodean al embrión, lo que frecuentemente se conoce como "germinación visible" (Hartman y Kester, 1995; Desai *et al.*, 1997; Fenner y Thompson, 2005; Herrera *et al.*, 2006).

La germinación de las semillas comprende tres etapas sucesivas que se superponen parcialmente: 1) la absorción de agua por imbibición, causando su hinchamiento y la ruptura final de la testa; 2) el inicio de la actividad enzimática y del metabolismo respiratorio, translocación y asimilación de las reservas alimentarias en las regiones en crecimiento del

embrión, y 3) el crecimiento y división celular que provoca la emergencia de la radícula y posteriormente de la plúmula (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Entre los principales factores que afectan la germinación de las semillas está el contenido de agua, ya que con menos del 40-60% de agua algunas semillas no efectúan la germinación, la temperatura que no solo regula la germinación, sino que también controla el crecimiento subsecuente de la planta y la aeración, básica para una germinación rápida y uniforme (Hartman y Kester, 1995).

3.3.1 Temperatura

Independientemente del ya documentado efecto de la temperatura en el rompimiento de la dormancia de las semillas, este factor también tiene importantes efectos en la germinación. Este puede dividirse arbitrariamente en efectos de temperaturas constantes e intermitentes. En climas estacionales, la temperatura es por supuesto un buen indicador de la época del año que determina fuertemente la época de germinación.

Whasitani y Masuda (1990) ensayaron diferentes tipos de tratamientos térmicos en *Glycine soja*, *Miscanthus sacchariflorus*, *Alopecuroides pennisetum*, *Phragmites australis* y *Vigna angularis* var. *nipponensis* y observaron una enorme variedad de respuestas entre las especies, especialmente en la capacidad de germinación y la respuesta inmediata al almacenamiento húmedo con enfriamiento. El grado de requerimiento de frío para la ruptura de la dormancia primaria se correlacionó en gran medida con el momento de la dispersión de semillas, dispersores de primavera-verano que tienden a tener un requerimiento de frío más grande. Por otro lado, la fenología de emergencia de las plántulas de la especie estaba estrechamente relacionada con la temperatura. También

encontraron que la temperatura a la cual germinan las semillas cuando son objeto de un incremento gradual en las temperaturas en un programa estandarizado, esta cercanamente ligado a la observada durante la época del año de la germinación en campo. El límite de temperatura inferior para la germinación es desconocido, pero en muchas especies, puede ser impedido sólo por congelación.

Según García (2004), el clima presente en el Cerro el Faro y Cerro de los Monos es del tipo templado húmedo con régimen de lluvias dominantes durante el verano $Cb'(w_2)(w)k'ig$ que de acuerdo con el mismo autor significa que en la zona la precipitación invernal equivale a una cantidad menor al 5% respecto del total de precipitación anual, el verano es fresco y largo, la variación u oscilación de temperatura entre el mes más frío y el más caliente del año es menor a 5°C y que la mayor temperatura en el año se presenta antes del solsticio de verano.

Entre los meses de noviembre y febrero se presentan numerosas heladas. La temperatura media anual es de 13.2 °C; el mes más frío es enero con temperatura de 10.9°C y el más cálido es abril a octubre y donde febrero es el mes más seco con 8.6 mm y julio el más lluvioso con 228.8 mm (Chávez y Trigo, 1996)

3.3.2 Luz

Semillas no dormantes de muchas especies germinan igualmente bien en luz o en oscuridad, algunas otras germinan en alto porcentaje en luz más que en oscuridad, mientras que un grupo relativamente pequeño tienen un mayor porcentaje de germinación en la oscuridad que en la luz (Baskin y Baskin, 2001). Semillas de muchas especies con requerimientos de luz para

la germinación, germinan en la primavera, después de haber sido expuestas a las bajas temperaturas del invierno. Otras germinan en el otoño, después de que fueron expuestas a las altas temperaturas del verano.

Uno de los factores más obvios asociados con el entorno de entierro de las semillas es la oscuridad. La luz penetra solo unos pocos milímetros por encima del suelo y la profundidad depende de las partículas de suelo, contenido de humedad, y color. La transmisión de luz a través de suelos de colores claros es mayor con un incremento en el tamaño de partículas, y en los suelos secos en vez de los franco-limosos.

3.4 Dormancia

Hay tres tipos fundamentales de dormancia en las semillas, esos tipos son morfológica, física y fisiológica. En la dormancia morfológica, la semilla es inmadura cuando es liberada de la planta y requiere de un periodo de crecimiento y/o diferenciación antes de que la germinación tenga lugar. Las semillas con dormancia física tienen testas o pericarpios impermeables; el embrión está por lo tanto seco hasta que la cubierta es rota y el agua entra. La dormancia fisiológica previene la germinación hasta que un cambio químico tiene lugar en la semilla. Los tipos de dormancia pueden estar combinados en la semilla (una combinación de morfológica y fisiológica –morfofisiológica– es muy común. Pero física y fisiológica raramente. La combinación de física y morfológica es, imposible. Nótese la crucial distinción entre dormancia fisiológica, la cual es reversible y los otros dos tipos, que no lo son. La dormancia fisiológica permite una respuesta flexible ante factores ambientales los otros dos tipos generalmente no. La dormancia fisiológica parece ser el tipo más primitivo (Fenner y Thompson, 2005).

4. HIPÓTESIS

Los hongos micorrizógenos arbusculares nativos del bosque del “Cerro del Faro” formaran la micorriza con plantas de *Dracocephalum moldavica* obtenidas a partir de semilla silvestre lo que favorecerá su establecimiento, incrementando su porcentaje de supervivencia y crecimiento y esto aumentará significativamente su tasa relativa de crecimiento.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las principales características del germoplasma silvestre, y el periodo de emergencia y crecimiento de *Dracocephalum moldavica* bajo el efecto de la micorriza arbuscular, en condiciones de invernadero.

5.1 Objetivos específicos

- a. Describir las características físicas y biológicas de las semillas silvestres de *Dracocephalum moldavica*.
- b. Definir el porcentaje de germinación de la semilla silvestre de esta especie.
- c. Evaluar el porcentaje de supervivencia de las plántulas de *Dracocephalum moldavica* bajo el efecto de la micorriza arbuscular.
- d. Determinar el efecto de la inoculación con HMA sobre el crecimiento de *D. moldavica* en condiciones de invernadero.
- e. Evaluar el porcentaje de micorrización de las plantas de *Dracocephalum moldavica*.

6. METODOS

Para este trabajo, se utilizó un lote de semillas proveniente del Parque estatal “Cerro el Faro y Cerro de los Monos”, ubicado en Tlalmanalco, y que forma parte de la Reserva Ecológica de la Sierra Nevada. El “Cerro el Faro” cuenta con un área de 405, 102.86 m² en tanto que el “Cerro de los Monos” cuenta con un área de 43, 522.21 m². El “Cerro el Faro” colinda al Norte con el Ejido de Tlalmanalco, al Este y al Sur con la población de San Rafael y al Oeste con el ejido de San Juan Atzacualoya. El “Cerro de los Monos” se encuentra enclavado en la porción noreste de la localidad de San Rafael (Moctezuma y González, 2007). En esta localidad se ha detectado la colecta reincidente del toronjil azul, por lo que la abundancia de estas plantas se ha visto muy disminuida (Cuevas-Alzate com. pers.).

6.1 Caracterización del germoplasma

Se evaluó el porcentaje de semillas sanas (sin daño aparente) y dañadas posiblemente por algún insecto (con algún daño físico como rotas o perforadas), para ello se empleó una muestra de 100 semillas elegidas al azar de un lote de 2500 semillas de *Dracocephalum moldavica* colectado en el año 2012 en el parque estatal “Cerro del faro”. De un lote de 100 semillas, se procedió a separar y contar de forma manual las semillas sanas de las dañadas por insectos.

Para caracterizar el germoplasma con el que se trabajó, se decidió medir el tamaño de las semillas (largo y ancho) en una muestra de 100 semillas sanas, para esto se utilizó un vernier electrónico.

Como parte de la caracterización del germoplasma, se determinó el peso promedio de las semillas tomando una muestra de 100 semillas, las cuales se pesaron en lotes de 20 semillas debido su pequeño tamaño, en una balanza

analítica (precisión ± 0.1 mg), posteriormente el valor obtenido se dividió entre 20 para obtener un peso estimado por semilla.

Se obtuvo el porcentaje de humedad utilizando un lote de 100 semillas, mediante el "método de secado en estufa a temperatura baja y constante" descrito por Willan (1991), donde:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{\text{Peso original} - \text{Peso tras secado en estufa}}{\text{Peso original}} \times 100$$

6.2 Viabilidad de las semillas. Se determinó por medio de la prueba de viabilidad con sales de tetrazolio, para lo cual se utilizó una solución al 1% de cloruro de tetrazolio.

Se cortaron longitudinalmente 100 semillas sanas y se sumergieron directamente en la solución de tetrazolio. Las semillas se revisaron después de 2 horas, a las 12 horas y a las 24 horas de sumergidas. Finalmente, las semillas se colocaron de acuerdo con la coloración presentada. Las de color rosado se consideraron como semillas viables, las de color carmín intenso como semillas no viables, al igual que las que no se tiñeron (Jiménez, 1990).

6.3 Prueba de germinación de semillas. Se realizó una prueba de germinación tomando un lote de 100 semillas, de las cuales, a 10 semillas se les retiró el arilo (cubierta mucilaginoso) de forma manual mediante lavado. Estas fueron colocadas en cajas Petri con agar-agar. Un segundo lote de 10 semillas fue colocado para germinación en cajas Petri con la diferencia de que a éstas no les fue retirada la cubierta mucilaginoso, se realizaron cinco repeticiones de 10 semillas c/u. La germinación se evaluó diariamente durante 9 días, después de ese día ya no germinó ninguna semilla. Se determinó el porcentaje de germinación de acuerdo con la fórmula de Hartman *et al.* (2002) para semillas con arilo y semillas sin arilo con el fin de

determinar si esta estructura tiene alguna influencia directa en la germinación:

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

6.4 Preparación de sustrato y siembra. Se preparó el sustrato mezclando agrolita y musgo peet-moss en relación 1:1 (vol. /vol.). Este sustrato fue esterilizado durante 1 h a 15 lb de presión, en autoclave. Se llenaron 60 macetas de ½ kilo de capacidad con el sustrato preparado y fueron colocadas en un bancal del invernadero de la FES Zaragoza, a 30 de ellas se les colocó 100 g de suelo natural con esporas de HMA colectado en el Cerro del Faro, este suelo fue considerado el inóculo micorrízico, mismo que contenía 134 esporas en 100g de suelo seco y 10 morfotipos de HMA (Flores datos sin publicar), este fue el tratamiento M+, mientras que las otras 30 no tuvieron inóculo, y fueron consideradas como el tratamiento testigo M-. Las macetas se colocaron al azar en el bancal del invernadero. En cada maceta fueron sembradas 5 semillas de *Dracocephalum moldavica* casi al ras de la superficie. El riego se realizó diariamente manteniendo las macetas al 80 % de su capacidad de campo. Los riegos posteriores fueron semanales con agua destilada.

6.5 Biomasa seca. Cuando *D. moldavica* inició la floración, se suspendió el riego y se procedió a cortar el vástago (parte aérea de la planta), la cual fue puesta en una bolsa de papel y se colocó en una estufa a 60 °C hasta peso constante. La raíz se extrajo de la maceta, se pesó y se colocó en una bolsa de papel, fue secada en una estufa a 60 °C hasta peso constante.

6.6 Crecimiento. Se evaluó el crecimiento de las plántulas, midiendo la parte aérea de las mismas, tomando como variable de respuesta la altura de la

planta semanalmente, así mismo se evaluó la supervivencia de plántulas en cada lote, cada semana, esto durante 10 semanas.

6.6.1 Tasa Relativa de Crecimiento. La tasa de crecimiento relativo (TRC) es un concepto general referido a un valor promedio de biomasa o altura entre dos momentos consecutivos y es, por ende menos variable que otros indicadores (Rodríguez y Leihner, 2006). Por este motivo se utilizó para cuantificar el crecimiento de las plántulas en este estudio. El crecimiento se cuantifico de acuerdo con los conceptos de Bonner en términos de diferencia de tamaños (altura), mediante la fórmula (Hunt, 1982):

$$TRC = \frac{\ln(A_2) - \ln(A_1)}{t_2 - t_1}$$

Dónde: A_2 = Altura final

A_1 = Altura inicial

$t_2 - t_1$ = Tiempo transcurrido en días

6.7 Área foliar. Se tomó directamente con un medidor de área foliar CI-202, CID, colocando en el mismo el total de hojas obtenido por maceta, tanto de las plantas micorrizadas como de las no micorrizadas.

6.8 Tinción de raíces.

Una parte de raíz seca fue colocada en agua destilada (rehidratada) para evaluar el porcentaje de micorrización.

Se utilizó el método de tinción con azul de tripano, descrito por Phillips y Hayman (1970). Se tomaron las raíces de 20 individuos del tratamiento con micorrizas (M+) y 10 individuos del tratamiento sin micorrizas (M-), esto debido

a que en el tratamiento sin micorrizas la supervivencia fue menor. Las raíces se lavaron con abundante agua y se cubrieron con una solución de KOH al 10%. Se retiraron de la solución y se enjuagaron con abundante agua destilada utilizando un tamiz adecuado para evitar pérdidas. Se colocaron durante 3 minutos en H_2O_2 al 10% para eliminar algún rastro de KOH. Las raíces se acidificaron con una solución de HCl al 10% durante tres minutos y se decantaron sin lavar. A continuación se adicionó el Azul de tripano en lactofenol al 0.05% colocando las raíces en baño María durante 5 minutos (figura 2).



Figura 2. Tinción de raíces: a) lavado de raíces, b) raíces obtenidas, c) raíces con KOH al 10%, d) adición de azul de tripano.

6.9 Determinación del porcentaje de colonización en raíces. Se cortaron 20 fragmentos de raíz de 1 cm de longitud aproximadamente de cada una de las muestras M+. En un portaobjetos, se montaron las raíces, se colocaron 3 gotas de PVLG (alcohol polivinílico lactoglicerol) y se colocó un cubreobjetos, ejerciendo presión suave y uniforme para aplastar las raíces. Para cada laminilla se realizó un duplicado. Una vez montadas las laminillas, se observaron al microscopio a 40x y 100x; se realizaron tres pasajes equidistantes por cada laminilla de forma ortogonal a los segmentos para buscar las estructuras principales de la micorriza, hifas, vesículas y arbusculos, se revisaron un total de 60 campos en cada una de las laminillas, dando un total de 120 campos por muestra. Para las muestras M- se colocaron únicamente 10 segmentos por laminilla porque la cantidad de raíces fue muy poca, igualmente con un duplicado para cada una, con un total de 60 campos de observación por muestra (figura 3). Los porcentajes de colonización se obtuvieron mediante las siguientes formulas:

$$\text{Colonización total (\%)} = \frac{\text{No. de segmentos colonizados}}{\text{No. de segmentos totales}} \times 100$$

$$\text{Colonización por hifas (\%)} = \frac{\text{No. de segmentos con hifas}}{\text{No. de segmentos totales}} \times 100$$

$$\text{Colonización por vesiculas (\%)} = \frac{\text{No. de segmentos con vesiculas}}{\text{No. de segmentos totales}} \times 100$$

$$\text{Colonización por arbusculos (\%)} = \frac{\text{No. de segmentos con arbusculos}}{\text{No. de segmentos totales}} \times 100$$



Figura 3. Montaje de laminillas para observación en microscopio.

6.10 Eficiencia de la simbiosis micorrízica (ESM). Se calculó mediante la relación entre el peso seco de las plantas micorrizadas y las no micorrizadas, para lo cual se consideró la biomasa total. La eficiencia micorrízica se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$ESM = \frac{(PSmic^{+} - PSmic^{-}) \times 100}{PSmic^{+}}$$

Dónde: $PSmic^{+}$ = peso seco de las plantas micorrizadas

$PSmic^{-}$ = peso seco de las plantas no micorrizadas

6.11 Análisis estadístico. Se aplicó la prueba para determinar la normalidad de los datos, para posteriormente aplicar una prueba t para determinar la significancia de los resultados obtenidos con $p \leq 0.05$, utilizando el programa Infostat Statistical Software ver. 5.13.1.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización del germoplasma

El lote de semillas utilizado de *Dracocephalum moldavica* presentó un porcentaje de 99% de semillas sanas, considerándose así por su apariencia de semillas llenas, de forma oblonga y color marrón, como se describen para la especie, brillantes y con superficie lisa, sin rastros aparentes de daño en la testa por patógenos o depredación y sin malformaciones. El tamaño promedio fue de 1.63 mm de ancho por 3.09 mm de largo, en comparación con los 1.2 x 2.5 mm reportados para la esta especie (Encyclopedia of life, 2015), esta situación puede deberse a las condiciones ambientales favorables al momento de formarse las semillas, tales como la disponibilidad de agua y nutrientes, lo cual repercute en el aumento en el tamaño de la semilla, o bien, que pueda considerarse como algún tipo de adaptación de la planta para asegurar su permanencia en este ambiente ya que no es una especie nativa de la zona, y aunque se desconoce el tiempo preciso de su introducción, se sabe de su uso por los pobladores de la zona desde hace varias generaciones, provocando diferencias en el tamaño de la semillas con respecto a los reportados en la bibliografía para la especie. El peso fresco promedio fue de 0.0021 mg y el peso seco fue de 0.0019 mg. A pesar de que las características de peso no han sido reportadas con anterioridad para esta especie, es importante considerar que la caracterización de las semillas representa una primera aproximación para conocer la especie vegetal, ya que la variación en el tamaño y peso de las semillas tiene consecuencias directas en la dispersión, viabilidad, germinación, emergencia y supervivencia en general de las plántulas (Ayala-Cordero *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 1970) pues como ha sido reportado por Banovetz y

Scheiver (1994), las semillas más grandes tienen la tendencia a aumentar su viabilidad, germinación y velocidad de emergencia.

Las semillas presentaron un contenido de humedad de 15.23 %. Debido a que las semillas se encontraron con una humedad menor al 20% se considera que dicho germoplasma es de características ortodoxas (Roberts, 1972), ello implica que puede ser colectado, almacenado y usado posteriormente debido a que el bajo contenido de humedad favorece su longevidad sin afectar su viabilidad o supervivencia.

7.2 Viabilidad de las semillas

Se determinó un 82% de semillas viables, encontrándose un 18 % de semillas no viables. Se consideraron semillas viables aquellas que presentaron una coloración rosada uniforme e intensa, sin aparentes daños o marcas extrañas. Las semillas que se determinaron como no viables presentaron daños como manchas sin teñir, o pérdida de uniformidad en la coloración encontrándose zonas muy coloreadas en contraposición con otras de coloración apenas perceptible, lo que indica la presencia de áreas de tejidos muertos que afectan la germinación, así como las que no presentaron coloración alguna o la coloración era levemente visible (Jiménez, 1990, Pérez-García y Pita-Villamil, 2001). La viabilidad puede verse afectada por diversos factores intrínsecos de la semilla a pesar de presentarse condiciones ambientales favorables, o bien, por situaciones como el transporte y almacenamiento.

En este caso, el lote de semillas fue colectado en 2012, por lo que permaneció almacenado un periodo de dos años, en recipiente sellado y refrigeración, lo que disminuye la probabilidad de que se pierda la viabilidad. Si bien, la longevidad de las semillas varía en cada especie, en

promedio se sitúa entre 5 y 25 años (Pérez-García y Pita-Villamil, 2001), por lo cual dicho lote se consideró apto para el estudio.

Por otro lado, tomando como referencia las respuestas de las semillas de distintas especies al tratamiento de almacenaje, se considera que por encima de 80% de viabilidad es un valor aceptable para usar un lote en cualquier estudio (Willan, 1991), por lo cual se procedió con una prueba de germinación para obtener valores más precisos de la viabilidad de dicho lote de semillas.

7.3 Prueba de germinación

El porcentaje de germinación de semillas sin arilo fue del 40%, mientras que el porcentaje de germinación de semillas con arilo fue del 24%. El seguimiento se realizó durante nueve días, al cabo de los cuales ya no hubo germinación de semillas en ninguno de los lotes (figura 4).

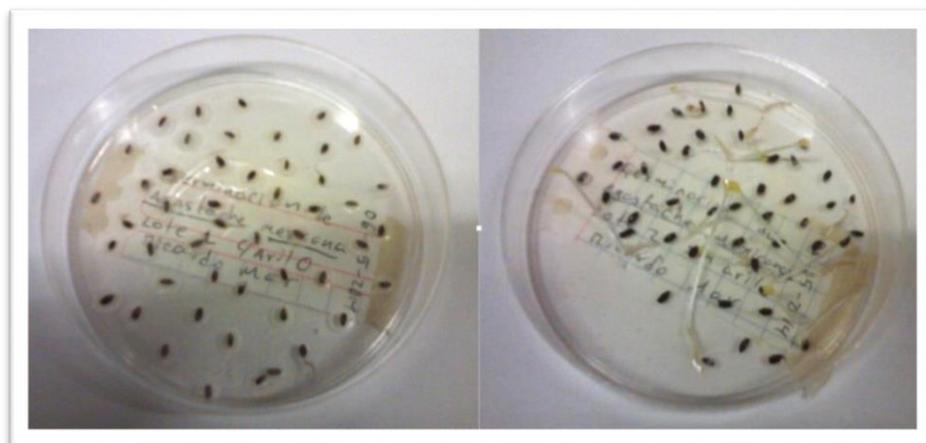


Figura 4. Prueba de germinación de semillas con arilo y sin arilo.

A pesar de que existió una diferencia numérica entre los tratamientos, esta no fue significativa ($p \geq 0.05$), sin embargo, se tomó la decisión de retirar el arilo de las semillas al momento de montar el experimento para favorecer la germinación, tanto en el tratamiento micorrizado como en el no micorrizado, pues aunque la diferencia no fue significativa en algunos casos puede representar una barrera que impida o retrase la germinación y afecte la posterior emergencia de las plántulas, o bien que contribuyan a una falta de uniformidad en la germinación y emergencia de las mismas (Fernandes-Osipi *et al.*, 2011; Chinaea *et al.*, 2010). Es posible que la presencia de arilo en estas semillas sea únicamente como medio para asegurar su dispersión, ya que este suele llamar la atención de ciertos animales por su olor o sabor, lo que contribuye a su diseminación. Si bien se ha observado que el arilo en algunas especies favorece la dehiscencia del fruto. En la figura 5 se muestra la curva acumulativa de germinación de las semillas con y sin arilo mostrando que el efecto del arilo puede disminuir la germinación para *D moldavica*.

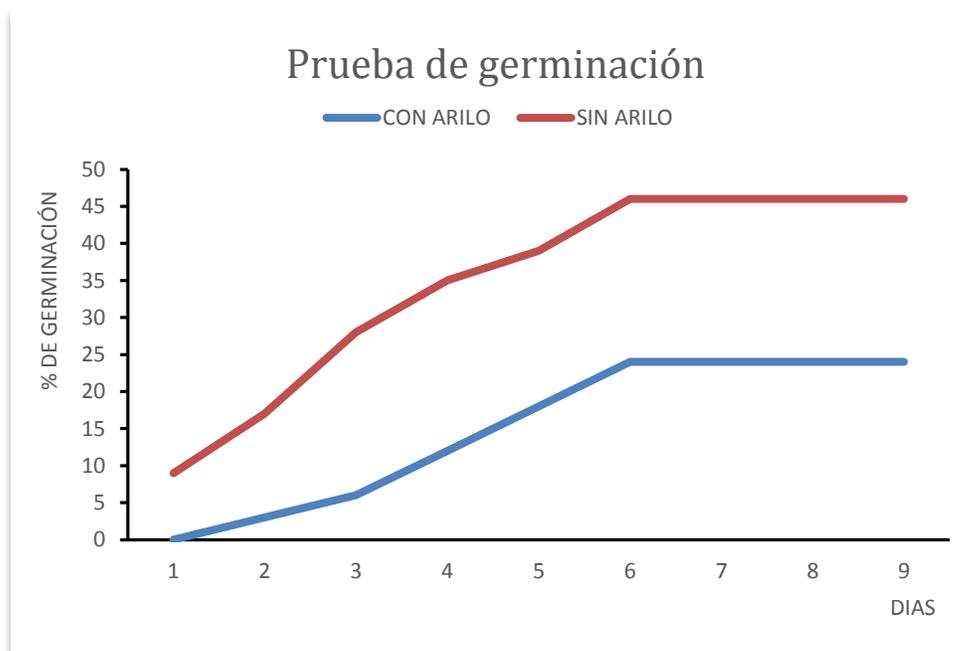


Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas con arilo y sin arilo.

7.4 Montaje del experimento

7.4.1 Emergencia

De las 150 semillas que se usaron por tratamiento al momento de establecer el experimento (5 semillas por maceta x 30 macetas), se tuvo para las plantas sin micorriza un porcentaje de emergencia de 21.33%, equivalente a 32 plántulas emergidas, teniendo en promedio una plántula por maceta. Por otro lado, en el tratamiento con micorrizas, el porcentaje de emergencia fue de 67.33% equivalente a 101 semillas, con un promedio de tres plántulas por maceta (figura 6 y 7).



Figura 6. Plántulas emergidas de *Dracocephalum moldavica*: a) sin micorrizas, b) con micorrizas.

La influencia de los hongos micorrizógenos arbusculares en la emergencia de plántulas no es tan conocida como en el caso de etapas posteriores de crecimiento y establecimiento. En un estudio realizado por Olivera-Morales *et al.* (2011) para *Quercus rugosa* se notó que la colonización micorrízica comenzó en etapas tempranas, observándose desde la primera semana una diferencia con las plantas no micorrizadas y aumentando significativamente en el primer mes, lo que repercute

favorablemente en la supervivencia de las plántulas desde que inicia el establecimiento. Para el caso de *D. moldavica* existió una diferencia importante entre la cantidad de semillas emergidas para cada tratamiento desde las primeras semanas, lo que sugiere que la micorriza pudo establecerse en esta temprana fase y favorecer la emergencia de las mismas, haciendo que tanto el agua como los nutrientes estuvieran más disponibles, como se observa claramente en la figura 7. Esta situación fue también sugerida por Noda y Castañeda (2012) en estudios realizados en *Jatropha curca*, con diferencias en los tratamientos con y sin micorrizas presentes desde el cuarto día.

La rápida velocidad en la colonización resulta ser de gran importancia ya que puede ayudar a las plántulas a superar situaciones de estrés que son más dañinas cuando la planta es pequeña, tales como la sequía o la competencia con otras especies cuando esta se encuentra en campo, así como la depredación o la infección por patógenos.

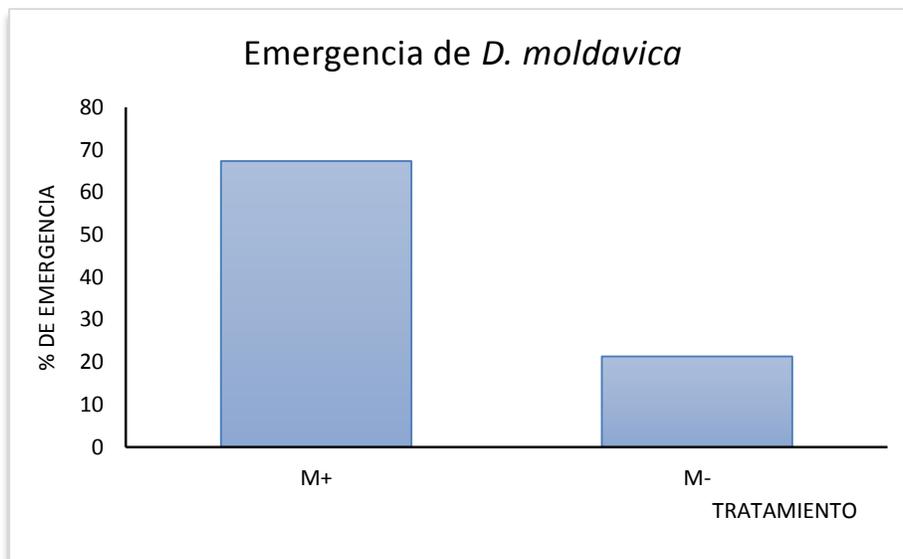


Figura 7. Grafica del porcentaje de emergencia de plántulas de *D. moldavica* en cada tratamiento.

7.4.2 Crecimiento y supervivencia

El crecimiento fue evaluado durante 10 semanas en las cuales las plantas de toronjil llegaron hasta la etapa de floración en ambos tratamientos.

Con respecto a las plantas no micorrizadas, estas presentaron un promedio de 2.77 cm en la primera semana mientras que al cabo de diez semanas alcanzaron una altura promedio 10.34 cm. Las plantas micorrizadas, presentaron en la primera semana una altura promedio de 4.4 cm, en tanto que a la décima semana la altura alcanzada en promedio fue de 18.89 cm siendo evidente la diferencia en altura final, como puede observarse en la figura 8.



Figura 8. Plantas de toronjil azul de 10 semanas: a) sin micorrizas, b) con micorrizas.

Existen diferencias significativas en el crecimiento de las plantas ($p \leq 0.05$), por lo que es posible afirmar que la presencia de hongos micorrizógenos arbusculares ayuda a incrementar las tasas de crecimiento en contraposición con las que no presentan la simbiosis tal como ha sido

reportado por autores como Alarcón y Ferrera-Cerrato (2000) y Gutiérrez-Oliva *et al.*, (2009). En la figura 9 se observa que la diferencia en el crecimiento se fue acentuando conforme avanzaron las semanas, aunque el crecimiento en las plantas micorrizadas es mayor desde el primer momento, es en la cuarta semana cuando la diferencia entre tratamientos comienza a incrementarse y hacerse más evidente con la micorrización, lo que hace pensar que para *D. moldavica* el efecto positivo de la simbiosis micorrízica es más evidente al sobrepasar la etapa de establecimiento, cuando la planta tiene un mayor crecimiento antes de iniciar la floración, en este caso, entre la quinta y decima semana.

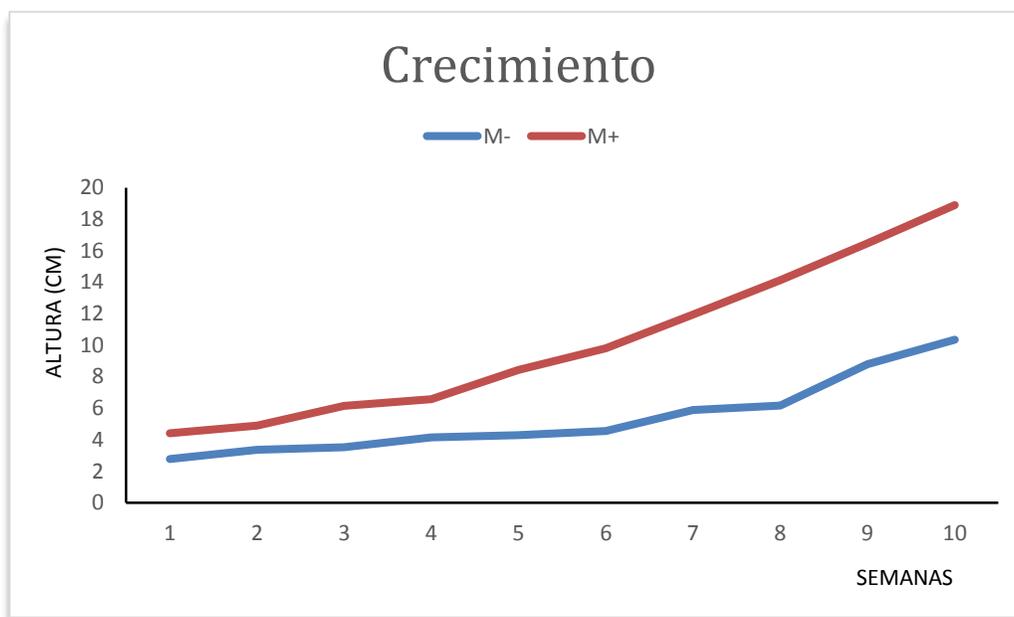


Figura 9. Altura de las plantas de *D. moldavica* por tratamiento durante 10 semanas.

El porcentaje de supervivencia en los dos tratamientos fue contabilizado semana a semana. En el tratamiento M+, la supervivencia se mantuvo elevada y constante, iniciando con un 99% en las primeras semanas, hasta la sexta semana en que algunas plantas micorrizadas comenzaron a marchitarse, probablemente a consecuencia de las elevadas temperaturas

ocurridas en el invernadero en esa semana, lo que provocó una disminución en la supervivencia hasta el 87% para la décima semana. Por otro lado, el tratamiento M- mantuvo una supervivencia constante, pero muy baja desde la primer semana, siendo inicialmente de 29%, hasta la octava semana a partir de la cual comenzó una caída en la conservación de las plantas llegando al 16%, lo cual representa una supervivencia muy baja en comparación con las plantas micorrizadas, como se hace evidente en la figura 10, por lo que es posible afirmar, que los hongos micorrizógenos arbusculares favorecen la supervivencia de las plantas inoculadas de *D. moldavica*, no solo en etapas tempranas, si no durante todo su ciclo de vida, al observar que las diferencias son significativas ($p \leq 0.05$) entre los dos tratamientos.

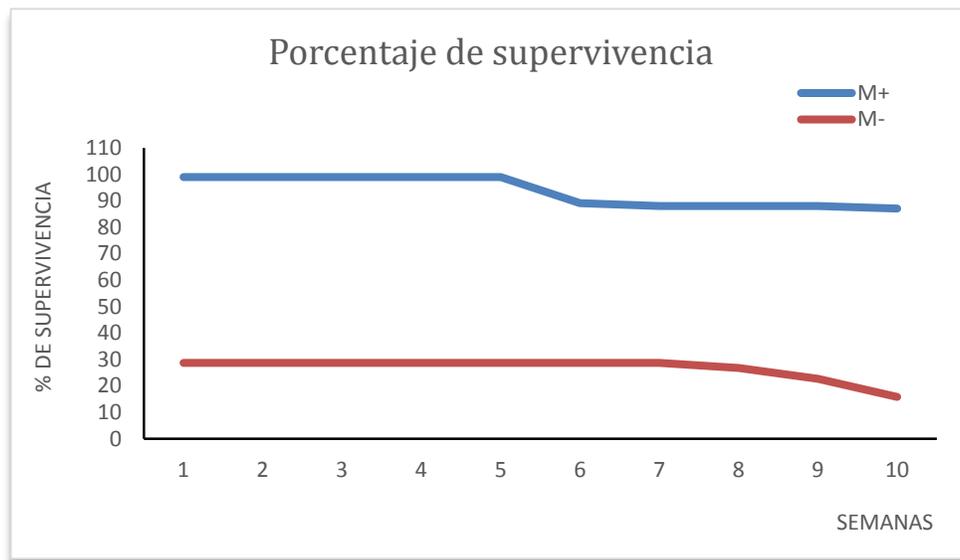


Figura 10. Porcentaje de supervivencia de plantas con micorrizas y sin micorrizas después de 10 semanas.

El aumento en la supervivencia de las plantas de *D. moldavica* micorrizadas es correspondiente con los resultados reportados en otros estudios, tanto en condiciones de invernadero, como en campo (Monroy-Ata *et al.* 2007,

Gómez-Romero *et al.* 2013) en donde la inoculación con HMA ha favorecido la supervivencia de diferentes especies, incluso en casos con presencia de metales pesados como el plomo y el cromo (Alvarado *et al.*, 2011, Carreón-Abud *et al.*, 2013).

7.4.3 Tasa de crecimiento relativo

La tasa de crecimiento relativo de las plantas micorrizadas para el lapso de 10 semanas fue de 0.1618, mientras que el valor de crecimiento de las plantas no micorrizadas fue de 0.1463 para el mismo intervalo de tiempo, no encontrándose una diferencia significativa entre los tratamientos con ($p \geq 0.05$), a pesar de que las alturas de los mismos presentan diferencias importantes (cuadro 1).

Cuadro 1. Tasa de crecimiento relativo de los dos tratamientos.

Tratamiento	Altura inicial (cm)	Altura final (cm)	TCR (cm /cm día)
M+	4.4	18.8	0.1618
M-	2.7	10.3	0.1463

Entre los factores que afectan directamente este valor, se encuentra de manera importante la variable área foliar ya que está estrecha y positivamente asociada con las tasas relativas de crecimiento, explicando hasta un 80% de la variación de la misma (Villar *et al.*, 2008). Por esta razón era de esperarse que el valor de crecimiento relativo de las plantas micorrizadas fuera mayor que las no micorrizadas, al analizar la diferencia en el área foliar de ambos tratamientos. Sin embargo, se ha visto en otros estudios en donde las tasas relativas de crecimiento son diferentes, que el mayor efecto de la micorrización ocurre a un tiempo determinado de

crecimiento, por lo que es posible que esta aumentara posteriormente a las diez semanas que cubrió el estudio (Fragoso-Iñiguez, 2001; Barragán-Valdez, 2003).

7.4.4 Número de hojas

En cuanto al número de hojas, las plantas no micorrizadas presentaron el promedio 20 hojas al cabo de las diez semanas de observación. Por otro lado, las plantas micorrizadas alcanzaron en promedio 72 hojas en las mismas diez semanas (figura 11).

En este caso, la diferencia encontrada en número de hojas entre tratamientos fue significativa ($p \leq 0.05$), Otros autores han mostrado que esta variables es notoriamente afectada por la micorriza como lo reporta Rivera-Espinosa *et al.* (2011) Para el caso de portainjertos de aguacate, o Rivas (2012) para *Prosopis laevigata*, este aumento en el número de hojas puede ser atribuido directamente al efecto favorable de la simbiosis micorrízica para facilitar la absorción de fósforo a la planta, el fósforo es un factor que influye directamente en la formación de biomasa lo que se refleja en el número de hojas (Gutiérrez-Oliva *et al.*, 2009).



Figura 11. Número de hojas de las plantas con micorrizas y sin micorrizas al cabo de 10 semanas.

7.4.5 Área foliar

El área foliar obteniendo para las plantas sin micorrizas fue en promedio de 15.69 cm² en tanto que en las plantas micorrizadas el área foliar calculada fue de 96.35 cm² en promedio, la diferencia es de seis veces más en el tratamiento micorrizado con respecto al no micorrizado, esta diferencia fue significativa ($p \leq 0.05$), y se relaciona directamente con el número de hojas, en este caso el área foliar muestra que no solo había más hojas, sino que estas fueron más grandes (figura 12), esto además se va a reflejar en los demás factores relacionados con el crecimiento, y seguramente con la supervivencia de las plantas ya que al aumentar el área foliar, se tiene mayor tasa fotosintética y se puede solventar los requerimientos del micosimbionte; haciendo más eficiente a las plantas micorrizadas, de manera similar a como se ha reportado en otros estudios en donde la micorrización tiene un efecto positivo en el área foliar (Fernández *et al.*, 1992; Manjarrez-Martínez *et al.*, 1999; Roveda *et al.*, 2007), este beneficio se reflejó

en la salud general de las plantas micorrizadas, quienes tienen un mejor desarrollo y por ello inician la floración rápidamente mostrando más plantas en floración (aunque este parámetro ya no se evaluó).

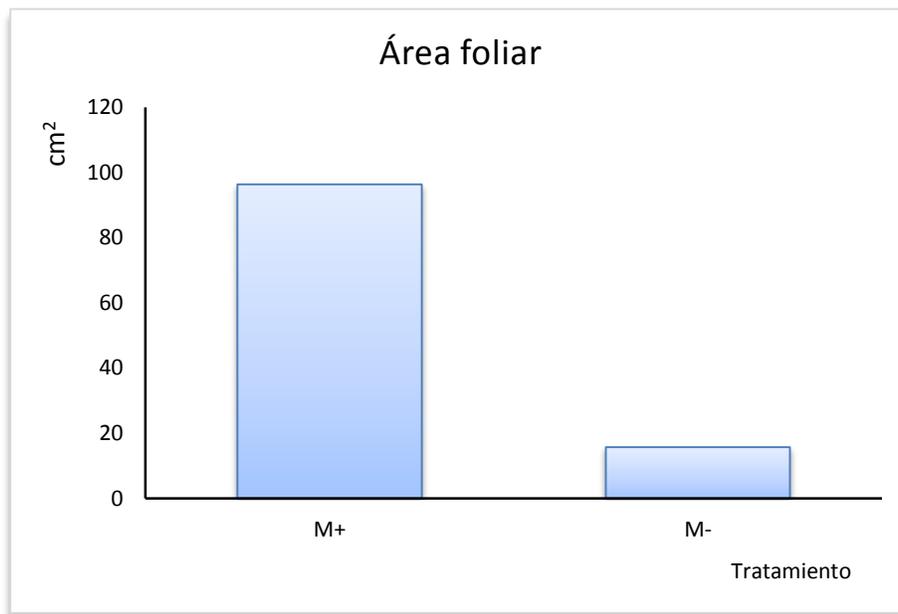


Figura 12. Área foliar de *D. moldavica* en tratamiento con micorrizas (M+) y sin micorrizas (M-)

7.4.6 Determinación del porcentaje de colonización en raíces

En cuanto a la colonización de raíces se notó la presencia de hifas y vesículas, no se encontraron arbuscúlos debido a que el experimento llegó a la etapa de floración, que es cuando las micorrizas forman vesículas que es un paso previo para salir de la raíz y formar nuevas esporas (figura 13).

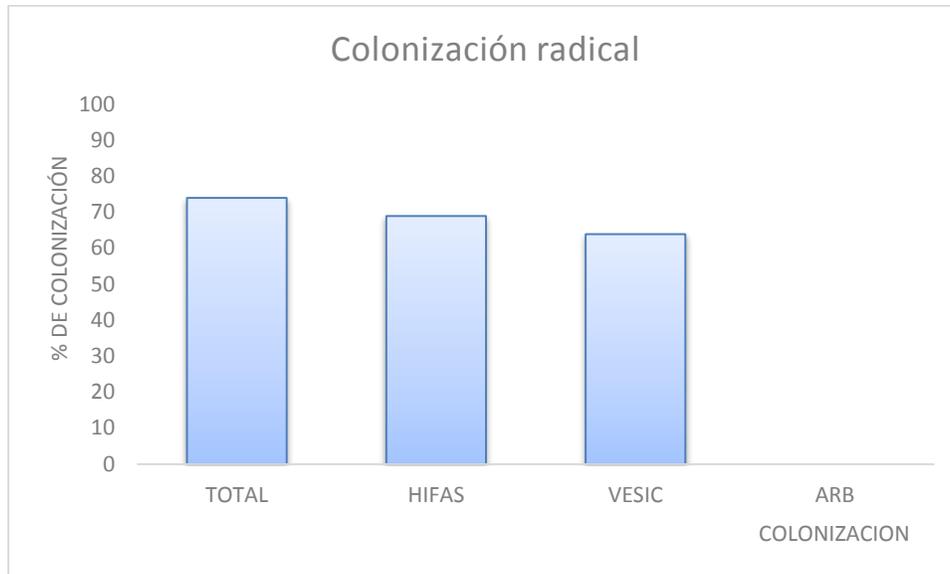


Figura 13. Porcentaje de colonización radical por hongos micorrizógenos arbusculares

En promedio se observó un porcentaje total de colonización de 73.92%, con un 68.92 de colonización por hifas y un 63.92% de colonización por vesículas para las plantas micorrizadas, en las plantas no micorrizadas no se encontró ninguna estructura (0%) micorrízica mostrando que no hubo contaminación durante el experimento (figura 14).

La presencia de arbusculos es un indicador de que la micorriza se encuentra en su fase de intercambio, en este caso no se detectaron arbusculos, sin embargo, en este caso se sugiere que la ausencia de esta estructura se debe a que las plantas ya habían alcanzado la etapa de floración por lo que la energía de la planta se dirige a esta función. Al observar las diferencias existentes en el crecimiento, altura y área foliar del tratamiento micorrizado se puede decir que el mayor efecto de la micorrización ocurrió en la fase de establecimiento del toronjil y seguramente en algún momento se formaron los arbusculos aunque no se hayan detectado al igual que ocurre en otras especies como lo reporta Ordinola (2005) en leguminosas.

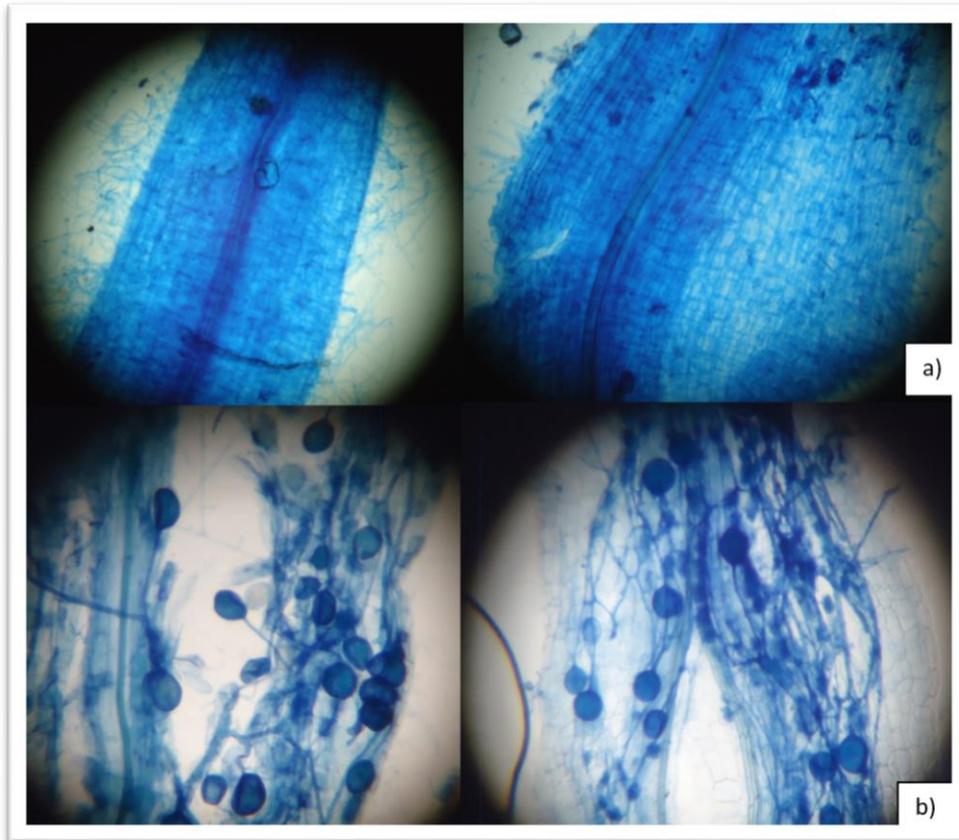


Figura 14. Corte de raíz de *Dracocephalum moldavica* a 40x: a) raíz de plantas sin micorrizas, b) raíz de plantas micorrizadas con la presencia de hifas y vesículas.

7.4.7 Eficiencia de la simbiosis micorrízica (ESM)

Se obtuvieron los pesos secos de hojas, tallos y flores (vástago), así como de la raíz. Con estos valores se calculó el peso seco total y la eficiencia de la simbiosis micorrízica (cuadro 2).

Cuadro 2. Pesos secos totales de ambos tratamientos (M+ y M-) para el cálculo de la eficiencia en la simbiosis micorrízica (ESM)

VASTAGO						
	HOJA	TALLO	FLOR	VASTAGO	RAIZ	PESO SECO TOTAL
M+	0.29	0.23	0.54	1.05	0.27	1.32
M-	0.03	0.06	0.07	0.16	0.16	0.32

Así, con el peso seco total de las plantas con micorriza y sin micorriza, se obtuvo una eficiencia en la simbiosis micorrízica de 76.00%.

$$ESM = \frac{(1.32 - 0.32) \times 100}{1.32} = 76.00$$

Los resultados obtenidos en la prueba estadística para peso seco total mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos inoculados y no inoculados, esto se puede explicar fácilmente por el hecho de que la estrecha relación entre los hongos micorrícicos arbusculares y el desarrollo de la planta resultado de la transferencia de fósforo y otros nutrientes del sustrato hacia la planta, como lo propuso y evaluó en mezquite Barragán-Valdez (2003). La ventaja de la micorriza se traduce en la eficiencia micorrízica que resultó alta en este caso.

8. CONCLUSIONES

- ✦ El germoplasma silvestre de toronjil azul (*Dracocephalum moldavica*) proveniente del Parque Estatal “Cerro del Faro” se caracterizó por presentar semillas grandes, sanas y viables pero con bajo porcentaje de germinación.
- ✦ Los hongos micorrizógenos arbusculares silvestres micorrizaron tempranamente a *D. moldavica* lo que favoreció la emergencia de plántulas y su supervivencia a lo largo de las 10 semanas que duro el experimento.
- ✦ El crecimiento en altura, hojas, área foliar y biomasa de las plantas de toronjil azul se favoreció significativamente con la formación de la micorriza.
- ✦ La colonización total (73.92 %) y por estructuras (hifas y vesículas) alcanzada en invernadero fue alta, mostrando la simbiosis que existe entre el toronjil azul y hongos provenientes de la misma zona, lo que se refleja en el valor obtenido de eficiencia de la simbiosis micorrízica (76%).

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón A. y Ferrera-Cerrato R. 2000. Manejo de la micorriza arbuscular en sistema de propagación de plantas frutícolas. *Terra* Vol. 17 No. 3, 179-191.
- Alvarado C.J., Dasgupta-Schubert N., Ambriz E., Sánchez-Yáñez J. M. y Villegas J. 2011. Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27 (4) 357-364.
- Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Toronjil. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana.
<<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=toronjil&id=7433>> Consultada el 7 de agosto de 2015.
- Ayala-Cordero G., Terrazas T., López-Mata L. y Trejo C. 2004. Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. *Interciencia* 29(12) 692-697.
- Aziz E.E., Hussein M.S., Wahba H.E. y Razin A.M. 2013. Essential oil constituents of *Dracocephalum moldavica* L. Grown under salt stress and different sources of soil amendment. *Middle-East Journal of Scientific Research* 16(5) 706-713.
- Banovetz J.S. y Scheiver S.M. 1994. The effects of seed mass on the seed ecology of *Coreopsis lanceolata*. *Am. Midl. Nat.* 131 65-74.
- Baskin C.C. y Baskin J.M. 2000. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego, CA.
- Barragán-Valdez E.A. 2003. Inoculación micorrízica de *Prosopis laevis* L. (Mezquite) en condiciones de invernadero y su efecto al trasplante a condiciones de campo. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. México.
- Carreón-Abud Y., Beltrán-Nambo M.A. y Martínez-Trujillo M. 2013. Efecto protector de los hongos micorrízicos arbusculares en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) expuestas a Cr (VI). *Argentina*. 82:127-134
- Chavarría-Ramírez J.C. y Rivas-Falcón J.A. 2012. Evaluación del efecto anticonvulsivo del extracto hidroalcohólico de *Agastache mexicana* (Kunth) Lint & Epling ssp. Xolocotzi (toronjil blanco), *Dracocephalum*

moldavica L. (toronjil azul), *Agastache mexicana* (Kunth) Lint & Epling (toronjil morado) y de su mezcla. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores Cuautitlán.

Chávez J.M. y Trigo N. 1996. Programa de manejo para el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl. Colección Ecología y Planeación. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. 273 pp.

China E., Mora J.L. y Perez-Galdona R. 2010. Evaluación de diferentes métodos de escarificación en semillas de leguminosas arbustivas forrajeras. En: Calleja-Suarez A., García-Navarro R., Ruiz-Mantecón A. y Peláez-Suarez R. (Coordinadores). Pastos: Fuente natural de energía. Reunión Ibérica de pastos y forrajes. Zamora. Michoacán.

Chu S.S., Liu S.L., Liu Q.Z., Liu Z.L. y Du S.S. 2011. Composition and toxicity of Chinese *Dracocephalum moldavica* (Labiatae) essential oil against two grain storage insects. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(21) 5262-5267.

Dastmalchi K., Dorman H.J.D., Laakso I. y Hiltunen R. 2006. Chemical composition and antioxidative activity of moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. *LWT* 40. 1655-1663

Dastmalchi K., Dorman H.J.D., Kosar M. y Hiltunen R. 2007. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *LWT* 40. 239-248

Desai B.B., Kotecha P. M. y Salunkhe D.K. 1997. *Seeds Handbook. Biology, production, processing and storage.* Marcel Dekker, INC, New York, USA, 627 pp.

Domokos-ay J., Peredi-b J. y Halasz-Zelnik-ayb K. 1994. Characterization of seed oils of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) and catnip (*Nepeta cataria* var. *Citriodora* Balb.). *Industrial Crops and Products* 3, 91-94

Douglas A.E. 1998. Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis. *Heredity* 81: 599-603

El-Baky H.H. y El-Baroty G.S. 2008. Chemical and biological evaluation of the essential oil of Egyptian moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.). *International Journal of Integrative Biology. IJIB.* Vol. 3, No. 3, 202

- Encyclopedia of life, 2015. Recuperado En:
<http://www.eol.org/pages/579594/details>
Consultado el 4 de septiembre de 2015.
- Estrada-Reyes R., López-Rubalcava C., Ferreyra-Cruz O.A., Dorantes-Barrón A.M., Heinze G., Moreno-Aguilar J. y Martínez-Vázquez M. 2014. Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 153. 98–110
- Fenner M. y Thompson K. 2005. *The ecology of seeds*. Cambridge University Press. United Kingdom. 250 pp.
- Fernandes-Osipi E.A., Batista de Lima C. y Aparecida-Cossa C. 2011. Influência de métodos de remoção do arilo na qualidade fisiológica de sementes de *Passiflora alata* Curtis. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal, SP, Vol Especial, E 680-685*
- Fernandez F., Cañizares E.G., Rivera R. y Herrera R.A. 1992. Efectividad de tres hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) y una cepa de bacteria solubilizadora de fósforo (BSF) sobre el crecimiento de posturas de cafeto (*Coffea arabica* L.). *Cultivos Trópicos* 13(1) Cuba. 23-27
- Flowers of India, 2015. Recuperado en:
<http://www.flowersofindia.net/catalog/slides/Moldavian%20Dragonhead.html> Consultado el 20 de agosto de 2015.
- Fragoso-Iñiguez S. 2001. Generación de un inoculo MA nativo de Santiago de Anaya, Hgo. y su potencialidad en la inoculación de *Acacia farnesiana* y *Bouteloua curtipendula*. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. México. 68 pp.
- Fujimura K.E., Egger K.N. y Henry G.H.R. 2008. The effect of experimental warming on the root-associated fungal community of *Salix arctica*. *The ISME Journal*. Vol 2, 105–114
- García E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Serie Libros, Núm. 6. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 90 pp.
- Graf B.A., Milbury P.E. y Blumberg J.B. 2005. Flavonols, flavones, flavanones and human health: epidemiological evidence. *J. Med Food*. Fall; 8(3):281-90.

- 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-Chavez M.C.A, Gutiérrez-Castorena M.C. y Wright S. 2004. Hongos micorrízica arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad. *TERRA Latinoamérica*, Vol. 22, Núm. 4, 507-514.
- Gutiérrez-Oliva V.F., Abud-Archila M., Flores-Pérez A., Alvarez-Solis J.D. y Gutiérrez-Miceli F.A. 2009. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of pineapple vitro plantlet (*Ananas comosus* (L.) Merr.) with different phosphorus levels. *Gayana Botanica*. 66(1)1-9.
- Harper J.L., Lovell P.H. y Moore K.G. 1970. The shapes and sizes of seeds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1 327-356
- Hartman H.T. y Kester D.E. 1995. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 2ª Ed. Compañía editorial Continental S.A. de C.V. México, 760 pp.
- Hartman H.T., Kester D.E., Davies T.F. y Geneve L.R. 2002. Plant propagation: Principles and practices. Prentice Hall, New Jersey. 770 pp.
- Herrera J., Alizaga R., Guevara E. y Jiménez V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. En: Villalobos- Rodríguez E, Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. Vol. 4. Editorial Universidad de Costa Rica. 113 pp.
- Hunt R. 1982. Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis. London. Edward Arnold. 248 pp.
- Hussein M.S., El-Sherbeny S.E., Khalil M.Y., Naguib N.Y. y Aly S.M. 2006. Growth characters and chemical constituents of *Dracocephalum moldavica* L. plants in relation to compost fertilizer and planting distance. *Scientia Horticulturae* 108. 322–331
- Jiménez A. 1990. Semillas forrajeras para siembra: análisis de su calidad, estándares y densidades. Universidad Autónoma Chapingo, Dirección de Patronato Universitario. 84 pp.
- Juárez-Rosete C.R., Aguilar-Castillo J.A., Juárez-Rosete M.E., Bugarín-Montoya R., Juárez-López P. y Cruz-Crespo E. 2013. Hierbas aromáticas

y medicinales en México: Tradición e innovación. Revista Bio Ciencias 2(3): 119-129

Kahiluoto H. y Vestberg M. 2000. Utilization of arbuscular mycorrhiza by system management. Proceedings 13th International ICOM Scientific Conference, Basel, Switzerland.

Krishnaiah D., Sarbatly R. y Nithyanandam R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and bioproducts processing 8(9). 217–233

Linares E., Flores B. y Bye R. 1996. Selección de plantas medicinales de México. Editorial Limusa. Grupo Noriega Editores, México, 125 pp.

Madaleno I.M. 2007. Etno-Farmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. Cuadernos Geográficos. Universidad de Granada. 41:61-95

Manjarrez-Martínez M.J., Ferrera-Cerrato R. y González-Chávez M.C. 1999. Efecto de la vermicomposta y la micorriza arbuscular en el desarrollo y tasa fotosintética de chile serrano. TERRA Vol. 17 Núm. 1

Martínez M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México.

Martínez-Vázquez M., Estrada-Reyes R., Martínez-Laurrabaquio A., López-Rubalcava C. y Heinze G. 2012. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. Journal of Ethnopharmacology 141. 908– 917

Martínez-Vázquez M. 2014. Descubren efecto sedante en el toronjil. Boletín UNAM-DGCS-009. Ciudad universitaria.

Michelson A. y Rosendahl S. 1990. The effect of VA mycorrhizal fungi, phosphorus and drought stress on the growth of *Acacia nilotica* and *Leucaena leucocephala* seedlings. Plant and Soil 124: 7–13

Moctezuma P. y González M. (coordinadores) Ayala-Carrillo Y. A. y Caltempa-García C.A. (eds.). 2007. Programa de conservación y manejo del área natural protegida con categoría de Parque Estatal "Cerro el Faro" y "Cerro de los monos". San Rafael, municipio de Tlalmanalco de Velásquez, Estado de México. Universidad Autónoma Metropolitana. 107 pp.

- Monroy-Ata A., Estévez-Torres J., García-Sánchez R. y Ríos-Gómez R. 2007. Establecimiento de plantas mediante el uso de micorrizas y de islas de recursos en un matorral xerófilo deteriorado. Bol. Soc. Bot. Méx. 80 (Suplemento): 49-57
- Montaño N.M., Camargo-Ricalde S.L, García-Sánchez R. y Monroy A. (eds.) 2007. Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa SA de CV, UAM Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. Distrito Federal, México. 460 pp.
- Noda Y. y Castañeda L. 2012. Efecto del EcoMic® en la emergencia de plántulas de *Jatropha curcas* (Nota Técnica). Pastos y forrajes, Vol. 35, No. 4, 401-406
- Olivera-Morales D., Castillo-Argüero S., Guadarrama P., Ramos-Zapata J, Álvarez-Sánchez J. y Hernández-Cuevas L. 2011. Establecimiento de plántulas de *Quercus rugosa* Née inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares en un bosque templado de México. Bol.Soc.Bot.Méx. 89: 115-121
- Ordinola-Angulo M.I.S, 2005. Germinación y establecimiento de cuatro especies de leguminosas, bajo el efecto de micorrizas arbusculares, en condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
- Pérez-García F. y Pita-Villamil J.M. 2001. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Phillips J.M. y Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society Vol. 55 No. 1:158-161
- Pindi P.K. 2011. Mycorrhizal association of some agroforestry tree species in two social forestry nurseries. African Journal of Biotechnology Vol.10 51:10425-10430
- Popova O.I, Nikitina, A.S. y Markova O.M. 2008. Studies of iridoids from *Dracocephalum moldavica* cultivated in the Stavropol Region. Pharmaceutical Chemistry Journal, Vol. 42, Issue 6, 351-353

- Ramírez-Munguía V. 2006. Estudio fitoquímico y evaluación de las actividades ansiolítica, sedante y anticonvulsiva de *Dracocephalum moldavica* L. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- Reyes-Jaramillo I. 2011. La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizosfera: comunidad microbiológica dinámica del suelo. *Contactos* 81, 17-23
- Reyes-Mireles J. 2010. Comparación del efecto ansiolítico de las plantas medicinales *Dracocephalum moldavica* L., *Agastache mexicana* (Kunth) Lint & Epling y *Agastache mexicana* (Kunth) Lint & Epling spp *Xolocotziana* (Lamiaceae) y el Fitofarmaco Dalay. Tesis, Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM, México.
- Rivas-Saavedra M.D. 2012. Translocación de fósforo y nitrógeno en dos leguminosas inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), bajo condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Rivera-Espinosa R.A., Martín-Cárdenas J.V., Calderón-Puig A. y Torres-Hernández A. 2011. Utilización de cepas eficientes de hongos micorrizicos arbusculares en el desarrollo de portainjertos de aguacate en un sustrato suelo-cachaza. *Cultrop*, vol.32, n.2, 172-183 pp.
- Roberts E.H. 1972. *Viability of Seeds*. Syracuse University Press 1972. 448 pp.
- Rodríguez W. y Leihner D. 2006. Análisis del crecimiento vegetal. Vol. 7 de la Serie: Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 37 pp.
- Rodríguez R.J., Henson J., Van Volkenburgh E., Hoy M., Wright L., Beckwith F., Kim Y-O y Redman R.S. 2007. Stress tolerance in plants via hábitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal*. 2, 404-416
- Roveda G., Cabra L., Ramírez M.M. y Peñaranda A. 2007. Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*). *Revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8(1), 28-36
- Saki K., Bahmani M. y Kopaei M.R. 2014. The effect of most important medicina plants on two important psychiatric disorders (anxiety and depression) – a review. *Asian Pac J Trop Med*; 7(Suppl 1): S34-S42

- Santiago R., Rojas I., Arvizu G., Muñoz D., Pérez D. y Sucilla M. 2005. Caracterización del potencial fitotóxico de *Agastache mexicana* (kunth.) Lint et Epling. Investigación Universitaria Multidisciplinaria. Año 4 No. 4:14-20
- Santillán-Ramírez M.A., López-Villafranco M.E., Aguilar-Rodríguez S. 2008. Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *Xolocotziana*. Revista Mexicana de Biodiversidad 79:513-524
- Taiz L. y Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal Vol. 1 Publicacions de la Universitat Jaume I, Castelló de la Plana, 583 pp.
- Vázquez-Yanes C. 1997. Cómo viven las plantas, 2ª Ed. La ciencia para todos. Fondo de cultura económica, México. 108 pp.
- Villar R., Ruíz-Robleto J., Quero J.L., Poorter J.L., Valladares F. y Marañón T. 2008. Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. Cap. 7. En: Valladares (ed.). Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante 2ª Ed. 193-230. Ministerio de Medio Ambiente. EGRAF, S. A.
- Washitani I. y Masuda M. 1990. A comparative study of the germination characteristics of seeds from a moist tall grassland community. Func. Ecol. 4 : 543-557.
- Willan R.L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales. FAO-DANIDA, Roma. 502 pp.
- Yang L.N., Xing J.G., He CH y Wu T. 2014. The phenolic compounds from *Dracocephalum moldavica* L. Biochemical Systematics and Ecology 54.19-22