



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA  
SOBRE EL CRECIMIENTO Y METABOLITOS SECUNDARIOS EN  
*Dracocephalum moldavica* L. (LAMIACEAE) EN CONDICIONES DE  
INVERNADERO

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGA**

PRESENTA:

**GABRIELA JANET FLORES RAMÍREZ**

---

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSALVA GARCÍA SÁNCHEZ  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ECOLOGÍA VEGETAL



Ciudad de México noviembre 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.

*“El conocimiento habla, pero la sabiduría escucha”.*

Jimi Hendrix

*“Lo que nos hace sabios no es recordar el pasado, si no ser responsables de nuestro futuro”.*

George Bernard Shaw

*“Lo que te hace sentir bien, no te puede causar ningún daño”.*

Janis Joplin

*“Sueña y serás libre en espíritu, lucha y serás libre en vida”.*

Ernesto “Che” Guevara de la Serna

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Francisco Espinosa, gracias por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Ecología Química del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia; así como la Mtra. Yolanda García Rodríguez por el tiempo, la hospitalidad y su apoyo para realizar el análisis químico de la tesis.

† Al pasante de Biología Omar Bladimir Cuevas Arzate y al pasante de Biología Iván Hernández Ortiz, gracias por proporcionar las semillas para el proyecto, el tiempo que me regalaron y la amabilidad con la que me trataron durante la visita al Parque Estatal "El Faro".

Al M. en C. Eduardo Chimal agradezco la ayuda, paciencia y tiempo que me brindó en la determinación de las esporas.

M. en C. José Luis Bortolini Rosales de la Facultad de Ciencias, por su amistad, observaciones, tiempo y dedicación que me brindó para darle forma y presentación a mi escrito.

Al biólogo Ricardo Mar Rodríguez y a la pasante en Biología Cecilia Chávez Hernández por el apoyo en el laboratorio Investigación Vegetal del Invernadero de la FES Zaragoza.

A mis sinodales

Dra. Rosalva García Sánchez

Dr. Arcadio Monroy Ata

M. en C. Balbina Vázquez Benítez

Dra. María Socorro Orozco Almanza

M. en C. Claudia Janette De la Rosa Mera

Agradezco su tiempo invertido en cada revisión del escrito, su conocimiento regalado en cada una de las pláticas que tuvimos, por sus sabias sugerencias, observaciones y aportaciones al mismo, para así obtener una mejor presentación de mi trabajo.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **FLORES RAMÍREZ GABRIELA JANET**, con número de cuenta **411008936**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **08 de noviembre de 2016** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dr. ARCADIO MONROY ATA
- VOCAL** Dra. ROSALVA GARCÍA SÁNCHEZ
- SECRETARIO** M. en C. BALBINA VÁZQUEZ BENÍTEZ
- SUPLENTE** Dra. MARÍA SOCORRO OROZCO ALMANZA
- SUPLENTE** M. en C. CLAUDIA JANETTE DE LA ROSA MERA

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de la simbiosis micorrízica sobre el crecimiento y concentración de metabolitos secundarios en *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) en condiciones de invernadero.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad de México, a 02 de septiembre de 2016  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" DIRECCIÓN  
DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ  
DIRECTOR



RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>III. MARCO TEÓRICO</b> .....	5
3.1 Plantas medicinales .....	5
3.2 Metabolitos secundarios .....	6
3.3 Micorrizas .....	7
3.4 Tipos de micorrizas.....	8
3.5 Hongos micorrizógenos arbusculares .....	9
3.6 Descripción .....	11
3.7 Técnicas metabolitos secundarios .....	13
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	19
6.1 General.....	19
6.2 Específicos .....	19
<b>VII. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	20
7.1 Procedencia y preparación de las semillas .....	20
7.2 Prueba de germinación.....	20
7.3 Preparación del sustrato .....	21
7.4 Preparación del inóculo.....	21
7.5 Diseño experimental .....	21
7.6 Medición de variables durante el cultivo.....	22
7.7 Medición de variables al final del cultivo .....	22
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	26
8.1 Supervivencia .....	26
8.2 Crecimiento.....	28
8.3 Número de hojas.....	29
8.4 Biomasa seca .....	31
8.5 Cociente raíz / vástago (R/V) .....	32
8.6 Tasa de crecimiento relativo (TCR).....	32
8.7 Fenología de <i>Dracocephalum moldavica</i> (L.).....	33
8.8 Riqueza de hongos micorrízicos arbusculares .....	34
8.9 Porcentaje de colonización total y fraccionada.....	38

8. 10	Contenidos de metabolitos secundarios en tejido de <i>Dracocephalum moldavica</i> .....	39
<b>IX.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	42
<b>XI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	49
<b>XII.</b>	<b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol representativo del phylum Glomeromycota.....	10
<b>Figura 2.</b> <i>Dracocephalum moldavica</i> . A) Ejemplar reproductivo de <i>Dracocephalum moldavica</i> L.; B) semillas; C) hoja; D) flor.....	13
<b>Figura 3.</b> Cromatógrafo de gases Agilent (HP6890) equipado con un detector de masas (HP5973).....	25
<b>Figura 4.</b> Germinación de <i>Dracocephalum moldavica</i> (L.), durante 15 días.....	26
<b>Figura 5.</b> Curva de la supervivencia en <i>Dracocephalum moldavica</i> (L.), micorrizada (M+) y no micorrizada (M-) durante 13 semanas.....	27
<b>Figura 6.</b> Porcentaje final de supervivencia en las plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-) a lo largo de 13 semanas de experimentación.....	27
<b>Figura 7.</b> Curva del crecimiento de <i>Dracocephalum moldavica</i> (L.), micorrizada (M+) y no micorrizada (M-) y su comportamiento a lo largo de 13 semanas de experimentación.....	28
<b>Figura 8.</b> Promedio del crecimiento final de las plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-) a lo largo de 13 semanas de experimentación.....	29
<b>Figura 9.</b> Número promedio de hojas contabilizadas semana a semana en plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-).....	30
<b>Figura 10.</b> Número máximo de hojas contabilizadas al final del período de experimentación.....	30
<b>Figura 11.</b> Peso promedio de tallos, hojas y flores de plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-).....	31
<b>Figura 12.</b> Valor del cociente raíz/vástago en plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-).....	32
<b>Figura 13.</b> Tasa de crecimiento relativo (TCR) en plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-).....	33
<b>Figura 14.</b> Cronología promedio de los eventos importantes en el desarrollo de <i>Dracocephalum moldavica</i> (L.), en plantas micorrizadas (M+).....	34
<b>Figura 15.</b> Riqueza de hongos micorrízicos arbusculares del Parque Estatal “El Faro”; A) <i>Acaulospora denticulata</i> ; B) <i>Acaulospora laevis</i> ; C) <i>Acaulospora mellea</i> ; D) <i>Acaulospora spinosa</i> ; E) <i>Ambispora</i> sp.; F) <i>Diversispora</i> sp.; G) <i>Racocetra fulgida</i> ; H) <i>Acaulospora scrobiculata</i> .....	35
<b>Figura 16.</b> A) <i>Entrophospora báltica</i> ; B) <i>Entrophospora infrequens</i> ; C) <i>Funneliformis mosseae</i> ; D) <i>Gigaspora margarita</i> ; E) <i>Glomus</i> sp.; F) <i>Racocetra</i> sp.....	37
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de colonización radical de hongos micorrizógenos arbusculares.....	38
<b>Figura 18.</b> Corte de la raíz de la planta <i>Dracocephalum moldavica</i> ; A) B) (16x) y C) (10x), raíz micorrizada con presencia de hifas y vesículas; D) E) y F) (10x), raíz sin presencia de micorrízica.....	39
<b>Figura 19.</b> Nombre y estructura química de los compuestos del análisis químico en tejidos de <i>Dracocephalum moldavica</i> (L.).....	41



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Concentración relativa porcentual de compuestos volátiles de <i>Dracocephalum moldavica</i> (L.), con en plantas micorrizada (M+) y no micorrizada (M-). R.T. (Tiempo de Retención). .....	39
---	----

## I. RESUMEN

En México existe una arraigada cultura sobre la medicina tradicional basada en las plantas medicinales, muchas de las cuales son especies silvestres que se colectan en los diferentes ecosistemas naturales. Asimismo, se estima que aproximadamente el 90% de las especies vegetales conocidas, forman simbiosis con los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), lo cual le confiere a la planta varios beneficios. Recientemente se han publicado los efectos que tienen los HMA en incrementar la concentración de metabolitos secundarios (MS) presentes en plantas con interés medicinal. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los HMA en el crecimiento y contenido de MS en plantas de *Dracocephalum moldavica*. Para este estudio se utilizaron semillas de *D. moldavica*, recolectadas en campo. Las semillas previamente desinfectadas fueron sembradas en macetas que contenían 1 kg de sustrato constituido por turba, previamente esterilizado (121 °C durante 2 hrs). La inoculación se realizó al momento de la siembra aplicando 40 g de inóculo (134 esporas). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, incluyendo dos tratamientos con 25 repeticiones cada uno, y se consideraron los siguientes tratamientos: plantas inoculadas y plantas sin inocular. Después de 91 días de haber aplicado los tratamientos, las plantas fueron cosechadas para evaluar la altura y el número de hojas y las raíces fueron teñidas utilizando la técnica de Phillips y Hayman (1970) y se determinó el porcentaje de colonización radical. Por maceración continua se extrajeron los MS, utilizando como soluciones extractoras de hexano y metanol. Posteriormente, para cuantificar la concentración de MS en plantas de *D. moldavica*, la tintura obtenida fue analizada por cromatografía de gases. Los resultados mostraron mayor crecimiento en las variables: altura y número de hojas en plantas que fueron inoculadas en comparación con aquellas que no lo fueron ( $p > 0.05$ ). El porcentaje de colonización en plantas micorrizadas fue de 85.55%. Se obtuvieron nueve compuestos químicos, de los cuales el 50% expresaron mayor concentración cuando las plantas fueron micorrizadas. Concluyendo que la inoculación por HMA incrementa el crecimiento en plantas de *D. moldavica*. Así mismo, estimula la concentración de sus MS. Por lo que los HMA pueden ser una estrategia biotecnológica en la obtención de mayor cantidad de MS con interés farmacéutica.

## II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un interés en la medicina alternativa para la cura de numerosos padecimientos y enfermedades que afectan a los seres humanos, por lo que las investigaciones que tienen como objetivo el cultivo, estudio y procesamiento de plantas medicinales con fines terapéuticos se consideran estratégicas (Soto *et al.*, 2002). En las comunidades carentes de servicios médicos, las parteras, los "yerberos" y los curanderos son los responsables de la salud de los pobladores, incluso en lugares donde hay servicios médicos, los recursos de la medicina tradicional son utilizados por la comunidad; en las áreas marginadas existen grupos indígenas con grandes conocimientos de la herbolaria medicinal y del ecosistema donde se desarrollan estas plantas, tales conocimientos acumulados por muchas generaciones constituyen la base de la biodiversidad cultural global y del uso sustentable de estos recursos (Caballero y Cortés, 2001; Leonti *et al.*, 2003; Canales *et al.*, 2006).

El conocimiento tradicional involucrado en el uso y el manejo de los recursos naturales ha mostrado su potencial para aprovechar y conservar los recursos en los sistemas agrícolas, agroforestales y forestales. Así mismo, existen diferentes publicaciones donde constan los numerosos satisfactores que los pueblos campesinos e indígenas obtienen de su ambiente; algunos de estos han sido transformados en mercancías cuya participación en el mercado internacional es notable, tal es el caso de las plantas medicinales las cuales alcanzaron un valor aproximado en el año 2000 de 30 mil millones de dólares (Monroy-Ortiz y Monroy, 2006). Durante las últimas décadas, la etnobotánica ha contribuido a unificar su campo teórico y resaltar el papel de éste en la conservación de la biodiversidad y en el desarrollo de las comunidades locales (Prance, 1991; Alexaidis, 1996; Martín, 2001).

Actualmente, gran parte del uso de plantas medicinales, al igual como ha sido a lo largo del tiempo, se realiza de manera empírica, las personas de las zonas rurales y periurbanas, las recolectan y las prueban como parte de su conocimiento tradicional y de esta manera las van validando dentro de su herbolaria medicinal; sin embargo hay plantas que aún no han sido validadas desde el punto de vista terapéutico y que es necesario hacerlo, en función de la presencia de principios activos y su relación con la cura de

ciertos padecimientos, ya que las personas las consumen solo por la identificación de calmar algunos malestares; sin embargo las plantas pueden presentar principios activos tóxicos que pueden causar daños fisiológicos graves, por ello es necesario realizar estudios fotoquímicos en ellas y, proponer así su mejor uso, propiciando los mayores beneficios posibles para la conservación de la salud humana. Un caso específico es la planta *Dracocephalum moldavica*, mejor conocida como toronjil azul o toronjil extranjero la cual se recolecta por los lugareños de las comunidades de Tlalmanalco y San Rafael en el Estado de México, donde crece esta planta de manera silvestre, la recolecta se realiza debido a que cura malestares estomacales similares a los que alivia el toronjil (*Agastache mexicana*), por lo que los lugareños así la llaman, sin embargo esta planta es otra especie (*Dracocephalum moldavica*), la cual no está reportada en la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional mexicana (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>).

Por otro lado, se estima que aproximadamente el 90% de las especies vegetales conocidas establecen de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo (Hernández-Cuevas *et al.*, 2003). La arquitectura, morfología y fisiología de la raíz es un factor clave en la productividad de las plantas, por lo cual en asociación simbiótica con los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), benefician la nutrición de la planta cuando el fósforo y nitrógeno en el suelo se encuentran en formas poco solubles, o en pocas cantidades (Fitter y Hay, 2002).

La micorriza es una condición común en la mayoría de las plantas terrestres incluyendo las cultivadas. Esta simbiosis mutualista está ampliamente distribuida entre las familias vegetales y parece haberse dispersado y evolucionado junto con las primeras plantas terrestres (Allen, 1991). Se trata de una relación prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales (López, 2007). La formación de principios activos en las plantas, es un proceso evolutivo que las plantas han desarrollado como una forma de defensa hacia sus depredadores o a factores de estrés ambiental y nutricional, por lo que se considera importante analizar la relación entre la inoculación micorrízica y la formación de principios activos en *D. moldavica*, así como su variante en la concentración.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue inducir la simbiosis entre hongos micorrizógenos arbusculares y la planta medicinal *Dracocephalum moldavica* en condiciones de invernadero para evaluar el efecto en su crecimiento y en la producción y concentración de metabolitos secundarios.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Plantas medicinales

El uso de las plantas medicinales es una fuente de remedios que se remonta a los inicios del ser humano como especie, e incluso antes. Existe evidencia que los primeros Neandertales, los cuales desaparecieron en algún punto hace 24 y 30 mil años, contaban con tal grado de conocimiento de su medio natural, que tenían la habilidad de usar ciertas plantas con fines medicinales (Hardy, *et al.*, 2012). Hasta comienzos del siglo XIX, por ensayo y error, el hombre utilizó los elementos que la naturaleza le brindaba para curar sus enfermedades y las de sus animales. Todas las culturas han adquirido un conocimiento de las plantas o de los órganos vegetales usados en medicina (Firenzuoli y Gori, 2007). Los más antiguos documentos escritos, con aproximadamente 6000 años de antigüedad, incluyen descripciones de plantas utilizadas como medicinales en esa época (Fonnegra y Jiménez, 2007); definiendo a la planta medicinal como cualquier planta que en uno o más de sus órganos, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con alguna finalidad terapéutica (Vidal, 2003).

En algunos países de África, la medicina tradicional es utilizada por un 80% de la población para atender sus necesidades sanitarias, mientras que en China representa un 40% de la atención médica. En Latinoamérica la medicina tradicional se sigue utilizando por una gran parte de la población e incluso en países desarrollados la medicina complementaria y alternativa está cobrando auge, con un creciente porcentaje de la población que la utiliza (OMS, 2002).

México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral en donde se redactó el Códice De la Cruz-Badiano, el cual es una recopilación gráfica de las plantas medicinales usadas en la Nueva España del siglo XVI (Guerrero y Dávila, 2004); y la riqueza en el uso de la herbolaria medicinal, donde se registran poco más de 3,000 especies de plantas que se emplean en remedios naturales. No obstante, son pocas las investigaciones en el uso y manejo de las plantas medicinales, y, por tanto, escasa información etnobotánica en el tema (Linares *et al.*, 1999; Casas *et al.*, 2001; Dávila *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2005).

En las comunidades rurales, las plantas medicinales se usan en el tratamiento de diferentes malestares, uso que está asociado con curanderos, muchos de los cuales poseen un amplio conocimiento de esta herbolaria (Casas *et al.*, 2001; Canales *et al.*, 2006; Monroy y Castillo, 2007).

### **3.2 Metabolitos secundarios**

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en los procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Las plantas medicinales, sintetizan metabolitos primarios y secundarios; los principios activos también conocidos como metabolitos secundarios, no tienen un papel esencial en los procesos vitales en la planta; sus estructuras químicas son muy diversas, pudiendo tratarse de compuestos bien definidos (alcaloides, flavonoides, etc.) o de mezclas de más de uno de estos compuestos. Su utilidad primordial es como medicamento que alivie el malestar y restablezca la salud (Villarino, 1999; Muñoz, 2002); mediante rutas biosintéticas mixtas como es el caso de compuestos fenólicos conteniendo unidades terpénicas en su estructura los cuales provienen de la ruta del ácido shikímico y de la ruta del ácido mevalónico, respectivamente. Este es también el caso de compuestos como hidroquinonas y benzoquinonas preniladas, algunos ácidos benzoicos prenilados, y benzociclododecadienos, entre otros (Mann, 1987).

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico, para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, como parte de la protección química, utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios (MS) con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000), tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de MS se induce cuando las plantas son

expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda-Jiménez, *et al.*, 2003). Se sabe que a un microorganismo patógeno o a insectos y vertebrados herbívoros, les resulta más difícil infectar o alimentarse de una población de plantas que individualmente contienen mezclas diferentes de MS, que de una población con una mezcla homogénea de MS (Castellanos y Espinoza-García, 1997); el aumento de los niveles de MS, es importante para la supervivencia de las plantas, ya que cuando se presenta una herida que fue producida por la depredación por insectos como por el daño mecánico inducido por factores físicos, son condiciones que se traducen en una respuesta de defensa de la planta, la cual involucra la activación transcripcional de diversos genes de proteínas necesarias para la cicatrización de la herida y la prevención de la invasión de microorganismos patógenos (Peña-Cortés y Willmitzer, 1995). La mayoría de los MS que se encuentran en una planta son o han sido adaptativos (Espinoza-García, 2001).

### **3.3 Micorrizas**

Las micorrizas (del griego *myces*, hongo y *rhiza*, raíz) representan la asociación entre algunos hongos (micobiontes) y las raíces de las plantas (fitobiontes); este término, fue acuñado por Albert Bernard Frank, patólogo forestal alemán en 1877 (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012). Existen evidencias fósiles y estudios moleculares que sugieren que la asociación micorrízica se originó hace unos 462 millones de años, desde entonces ha contribuido a la evolución de las plantas en los ecosistemas terrestres. Así, los hongos micorrízicos constituyen uno de los principales componentes microbianos que intervienen en la estabilización de las comunidades vegetales integrantes de un ecosistema, natural o artificial (Ferrera y Alarcón, 2001; Camargo-Ricalde, 2012).

Los hongos micorrízicos se encuentran en más de 90% de las plantas vasculares, incluyendo la mayoría de los cultivos agrícolas (Smith y Read, 2010); los HMA ofrecen resistencia al estrés hídrico de las plantas ya que al incrementar el volumen de suelo explorado por la raíz a través de las hifas del hongo simbiote promueve una mayor



absorción de agua (Jakobsen *et al.*, 1994), les facilitan la absorción de nutrimentos como fósforo y nitrógeno (Álvarez-Sánchez y Naranjo, 2003), aumentan la tolerancia al déficit de agua a través de las hifas externas (Hildebrandt *et al.*, 2007); ayudan a la planta hospedera con un mejor crecimiento, así como un efecto favorable en su reproducción (Lu y Koide, 1994), finalmente dan resistencia a las plantas contra patógenos (Cervantes, 2002); en esta asociación, la planta le proporciona al hongo carbohidratos (azúcares, a partir del proceso de fotosíntesis) y un microhábitat para completar su ciclo de vida (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

### 3.4 Tipos de micorrizas

Las micorrizas se dividen en tres grupos principales: ectomicorriza, ectendomicorriza y endomicorriza (Hernández-Cuevas *et al.*, 2003).

**Ectomicorriza:** (del griego *ecto*: del exterior), se caracteriza por una modificación de la raíz, que pierde sus pelos absorbentes; el hongo rodea la raíz con un manto de filamentos o micelio. De este manto parte una red micelar externa más o menos desarrollada, que se extiende por el suelo y una red micelar interna que penetra a la raíz, pero no penetra al interior de las células. Se han descrito unas 6 000 especies de hongos ectomicorrízicos de los phylum Ascomycota y Basidiomycota (Tedersoo *et al.*, 2010).

**Ectendomicorriza:** presenta manto fúngico laxo, red de Hartig y se observa una penetración intracelular escasa (Peterson y Farquhar, 1994). Existen subdivisiones:

- a) Arbutoide: el hongo forma un manto fúngico, red de Hartig e hifas intra e intercelulares. Estos hongos pertenecen a los Ascomycetes y Basidiomycetes y colonizan miembros del orden Ericales.
- b) Monotropoide: el hongo forma un manto fúngico, hifas intra e intercelulares y haustorios. Estos, pertenecen a los Ascomycetes y Basidiomycetes y colonizan al género *Monotropa*.

**Endomicorriza:** (del griego *endo*: del interior), el micelio invade la raíz; inicialmente es intercelular, pero luego penetra las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales. Generalmente no se observa un crecimiento denso de hifas

en la superficie de la raíz y no existe un manto. Sin embargo, presenta una red micelar interna. A su vez las endomicorrizas se subdividen en tres tipos:

- a) Orquideoide: el hongo penetra de forma intra e intercelular y forma enrollamientos hifales. Estos hongos pertenecen a los Basidiomicetes y Deuteromicetes y colonizan a la Familia Orchidaceae.
- b) Ericoide: el hongo penetra de forma intra e intercelular y forma enrollamientos hifales. Estos hongos pertenecen a los Ascomicetes y Basidiomicetes y colonizan a miembros del Orden Ericales.
- c) Arbuscular: el hongo penetra de forma intra e intercelular y forma arbuscúlos. Estos hongos pertenecen al phylum Glomeromycota (Smith y Read, 2010).

### **3.5 Hongos micorrizógenos arbusculares**

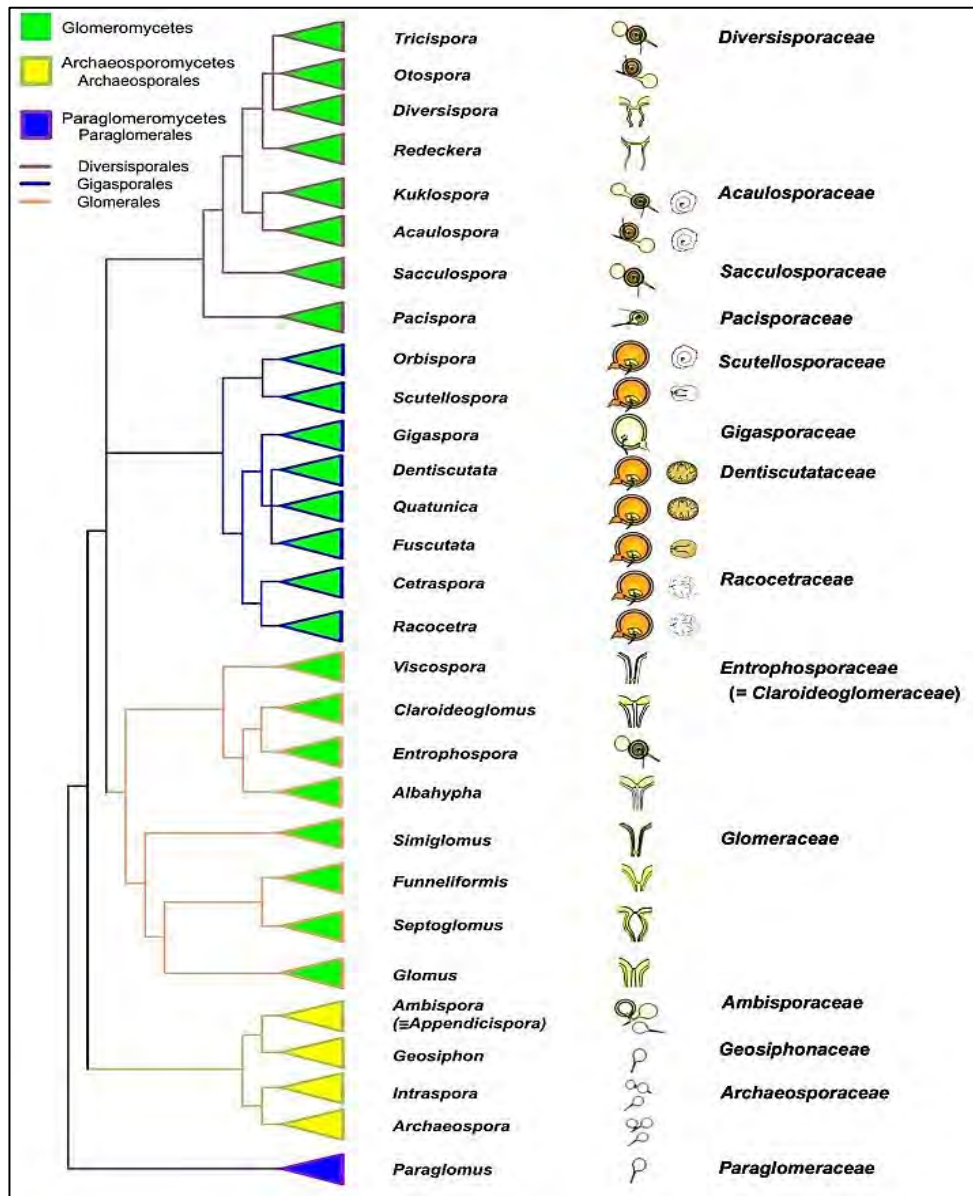
El hongo penetra en las células corticales de las raíces formando estructuras llamadas arbuscúlos. Los arbuscúlos son estructuras hifales, ramificadas en la parte final, y proporcionan una transferencia nutrimental entre la planta y el hongo, principalmente de carbono y fosfato (Harrison, 2005; Sekhara *et al.*, 2007).

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), son parte integral del sistema suelo; la rizosfera se compone del suelo cercano a las raíces de las plantas y es afectada por la actividad de estas. La micorrizosfera es la zona del suelo afectada por la asociación micorrízica, la cual tiene dos componentes, la capa de suelo alrededor de las raíces micorrizadas y la otra es el suelo alrededor de las hifas del hongo micorrízico (HMA) o micelio externo que compone la hifósfera o micósfera. Las interacciones del HMA son múltiples e involucran microorganismos y microfauna en la micorrizosfera. Entre los organismos que interactúan con los HMA están los microorganismos solubilizadores de fósforo, productores de hormonas de crecimiento y quitinasa, saprofitos, patógenos de plantas, depredadores y parásitos.

El phylum Glomeromycota contiene cerca de 200 especies clasificados en cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales; 11 familias y 17 géneros, algunos géneros que se pueden mencionar son: *Glomus* (Glomaceae), *Acaulospora* y *Entrophospora* (Acaulosporaceae), *Gigaspora*, *Scutellospora*

(Gigasporaceae); el grupo más grande y mejor investigado de HMA, es el género *Glomus*, que contiene unas 79 especies (Schüßler y Walker, 2010; NCBI, 2010).

En la figura 1 se observa un árbol representativo del phylum Glomeromycota está basado en bases moleculares y en los análisis morfológicos de las esporas (Oehl *et al.*, 2008, 2011a-d). Las figuras de las columnas centrales muestran los tipos formación de esporas de los géneros, y los escudos de germinación típicos para aquellos géneros que forman escudos persistentes durante la formación de esporas.



**Figura 1.** Árbol representativo del phylum Glomeromycota estructurado a partir de bases moleculares (Oehl *et al.*, 2008; 2011a-d).

Los HMA habitan tanto en bosques boreales como en desiertos; desde altas montañas hasta en llanuras inundables, así como en dunas costeras y humedales (Fernández, 2008).

Algunos estudios han resaltado la importancia de las comunidades de microorganismos del suelo para el establecimiento y crecimiento exitoso de las plantas y el desarrollo de sus comunidades (Van der Heijden *et al.*, 1998).

De la Rosa-Mera (2011), menciona que al inocular con HMA a *Catharanthus roseus*, se produjeron efectos significativos en el crecimiento, en la actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y en los contenidos de los alcaloides vinblastina y vincristina; y Zeng *et al.* (2013), hicieron un trabajo bibliográfico, concluyendo que las micorrizas son favorables para las plantas medicinales para su producción y la acumulación de metabolitos secundarios importantes (terpenos, fenoles y alcaloides).

### 3.6 Descripción

*Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae).

Es una hierba anual de 20 hasta 50 cm de altura. Tallos erizados con cortos pelos glandulares erectos, cuadrangulares, generalmente ramificadas 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. Sépalos tubulares de 0.8 a 1 cm de largo, densamente cubiertas de pelos glandulares muy cortos y glándulas de aceite esencial disperso. Flores bilaterales, azules a púrpura con tonalidades blanquecinas (Figura 2), (Xiwen y Hedge, 1994; Martínez-Vázquez *et al.*, 2012)

Kakasy *et al.*, (2006), analizaron los componentes no volátiles en diferentes especies del género *Dracocephalum*, con distintos métodos como Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC) y Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), y obtuvieron para *D. moldavica* los compuestos: apigenina, ácido rosmarínico, luteolina, y acacetin – glucósido.

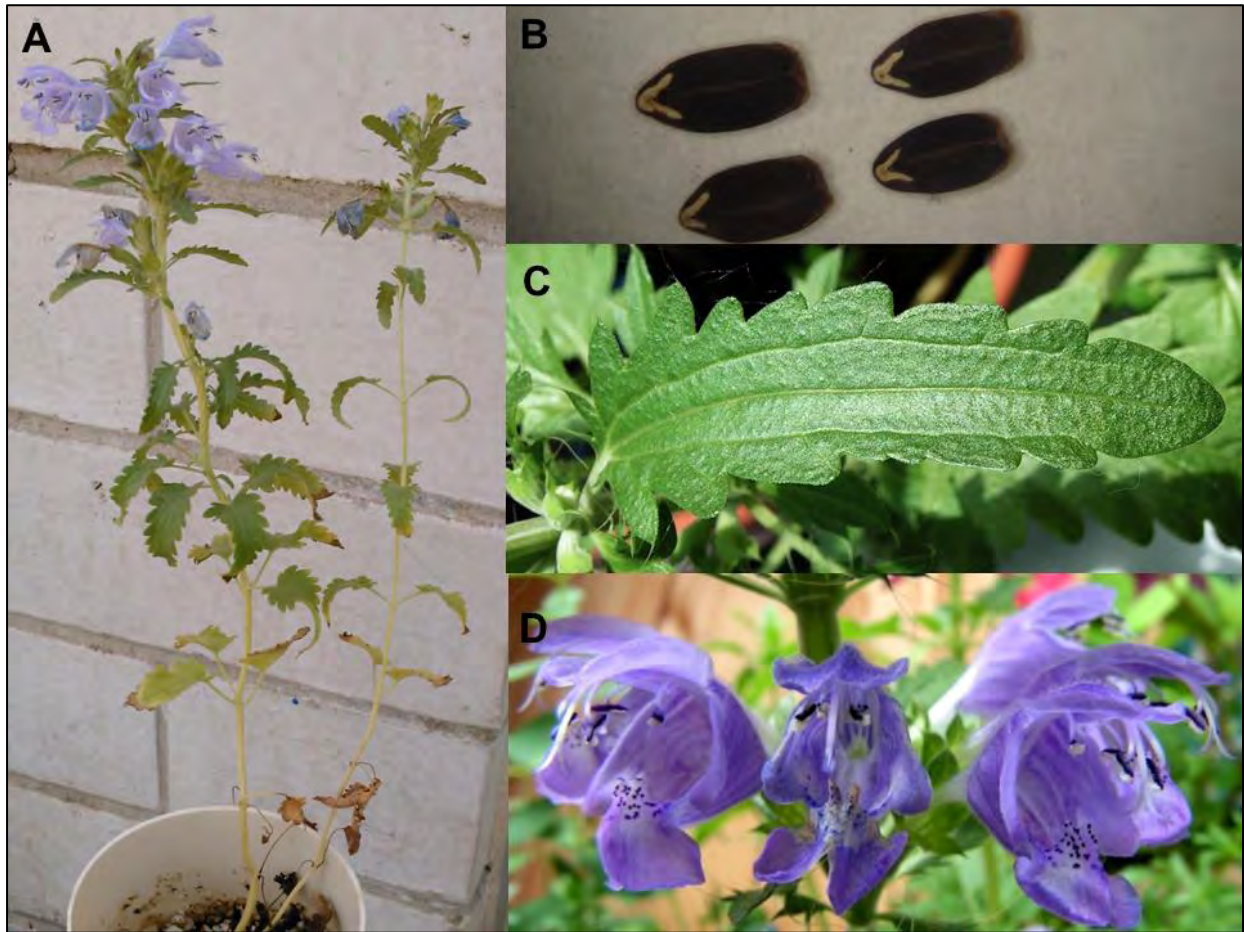
Dastmalchi *et al.*, (2007) señalaron la presencia de fenol, antioxidante de hierro y un quelato de los radicales provenientes de un extracto acuoso de partes aéreas de *D.*

*Moldavica*. Así mismo, indicaron que estos compuestos tienen propiedades antioxidantes porque están relacionados con el ácido hidroxicinámico, flavonoides, ácido cafeíco, el ácido ferúlico, ácido rosmarínico, luteolina, luteolina-7-O glucósido y aspigenina.

Martínez-Vázquez *et al.* (2012), mencionan que el empleo en México de *D. moldavica* no es consistente pues se basa en el folklore europeo y asiático, esto aunado a que no se cuenta con pruebas científicas de su eficacia y no existen datos precisos sobre su actividad; ellos realizaron un estudio de neurofarmacológico en México de *D. moldavica* sobre efecto sedante y análisis químico de un extracto acuoso, encontrando en la planta, metabolitos secundarios como flavona y glucósidos, que atribuyen a los efectos de sedante y por otro lado, no hay trabajos reportados actualmente sobre el efecto de simbiosis micorrízica sobre el crecimiento en *D. moldavica*.

Yang *et al.* (2013), reportan el aislamiento de 17 compuestos químicos de las partes aéreas de *D. moldavica* de los cuales 16 se han identificado como: 9 flavonoides, 2 lignanos, 4 triterpenoides y 1 monoterpenoide mentano y un nuevo compuesto que fue reportado como flavonoide glucósido, llamado ácido malónico.





**Figura 2.** *Dracocephalum moldavica*. A) Ejemplar reproductivo de *Dracocephalum moldavica* L.; B) semillas; C) hoja; D) flor. (C, <http://img.botanicayjardines.com/dracocephalum-moldavica-2397/05-dracocephalum-moldavica-hoja-medium.jpg>; D, <http://img.botanicayjardines.com/dracocephalum-moldavica-2397/03-dracocephalum-moldavica-flor-medium.jpg>).

### 3.7 Técnicas para obtener metabolitos secundarios

Los principales metabolitos secundarios contenidos en las plantas pueden ser extraídos mediante diversas técnicas. Para su aislamiento se emplea agua u otros disolventes de diferentes polaridades como acetato de etilo, metanólicos o hexánicos (Díaz y Gamazo, 1995). La selectividad del solvente a utilizar, es decir si se quiere obtener un extracto cuya constitución química contenga la mayor parte de los componentes químicos de la planta o sólo componentes químicos con una determinada característica o de un sólo grupo químico.

Existen diferentes métodos extractivos los cuales se describen a continuación de forma detallada:

- a) Extracción con solventes. El proceso extractivo consiste en poner en contacto el tejido vegetal seco en el solvente para reconstituir el estado de la célula ya que el solvente penetra en la célula y despiden el aire contenido en el citoplasma con lo que inicia el proceso extractivo (Sharapin, 2000).
- b) Extracción con disolventes. En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra seca y triturada, se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan y extraen sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleoresina o un extracto impuro (Reyes-Jurado *et al.*, 2012).
- c) Extracción con fluidos supercríticos. El material vegetal cortado en trozos pequeños se tritura, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo, bióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. El solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo, el equipo requerido es costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Kerrola y Kallio, 1993).

Dentro de los varios métodos físicos y/o químicos por los cuales se puede llevar a cabo la separación y aislamiento de los componentes de las plantas, se encuentran los no cromatográficos (sublimación, destilación y cristalización) y los métodos cromatográficos (Kuklinski, 2000).

Los métodos cromatográficos son utilizados en la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas (Skoog *et al.*, 1997). El término cromatográfico, se ha aplicado a varios sistemas y técnicas, sin embargo, no

todos los métodos tienen en común el uso de una fase estacionaria que es la sustancia que está fija en una posición durante la cromatografía y una fase móvil que es la porción que se mueve en una dirección definida. Esta sustancia puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, y la muestra que está siendo separada/analizada (formada de analitos y el disolvente) se inyecta en la fase móvil que se mueve a través de la columna. Los componentes de una mezcla son transportados a través de una fase estacionaria por el flujo de una fase móvil, y las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los distintos componentes de las mezclas. Los métodos cromatográficos permiten la separación de los componentes de una mezcla homogénea, debido a que el tiempo de retención cromatográfico es característico de cada componente (Kuklinski, 2000).

La cromatografía de gases. En este caso la fase móvil es un gas inerte (helio o nitrógeno) y la fase estacionario es un sólido o un líquido “sostenido” por un sólido inerte. Este tipo de cromatografía siempre es en columna, ya que es la única manera de que la fase móvil gaseosa estacionaria, en forma semejante a la cromatografía líquida, o bien la fase estacionaria puede depositarse sobre las paredes de un tubo muy delgado (0.25 mm de diámetro) y largo (hasta 100 cm). Este tipo de columnas se conocen como columnas capilares y proporcionan la mayor capacidad de separación (Noa *et al.*, 2005).

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es una de las técnicas más empleadas en la actualidad la cual permite trabajar en régimen de alta presión. Es una técnica sensible con fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, es idónea para la separación de especies químicas no volátiles o termolábiles, y se aplica a sustancias que son de interés en la industrial, por ejemplo, proteínas, oligosacáridos, triglicéridos, vitaminas, fármacos, muestras medioambientales, entre otras (loset *et al.*, 2003; Koh, 2006).

#### Métodos no cromatográficos

- a) Sublimación: método para separar los componentes de una mezcla heterogénea constituida por dos sólidos. Para llevar a cabo este proceso es imprescindible que una de las dos sustancias sublime; es decir, se convierta de sólido en gas, sin pasar por el estado líquido (Cuevas y Brambila, 2003).



- b) Destilación: consiste en separar dos o más componentes de una mezcla líquida aprovechando las diferencias en sus presiones de vapor. La mezcla líquida a su punto de ebullición desprenderá vapores más ricos en componentes volátiles que el líquido. Los vapores se condensarán a parte constituyendo el destilado. Cuando la mezcla a destilar contiene sólo dos componentes se habla de destilación binaria, y si contiene más recibe el nombre de destilación multicomponente (Costa *et al.*, 2004).
- c) Cristalización: es un método de separación y purificación de una muestra sólida, en el cual se disuelve la muestra en el disolvente caliente para formar una disolución saturada, se filtra para eliminar impurezas insolubles y se deja enfriar lentamente para favorecer la cristalización (González *et al.*, 2014).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

En el Parque Estatal “Cerro de los Monos” y “El Faro” ubicado en el Estado de México predomina un bosque templado con presencia de *Pinus* y *Quercus*. En este ambiente se distribuye *Dracocephalum moldavica*, una especie exótica que es frecuentemente confundida con *Agastache mexicana* (toronjil morado), una especie mexicana. Ambas especies se emplean indistintamente como plantas medicinales, sin conocer, si poseen los mismos principios activos. Estas especies son ampliamente utilizadas por los pobladores de las comunidades de Tlalmanalco y San Rafael, quienes recolectan este recurso para su uso personal o para venta en los mercados regionales, dado que las plantas medicinales recolectadas son un recurso natural y un servicio ambiental del bosque y ante el hecho de que la recolecta de la planta *in situ* provoca que la abundancia de esta especie disminuya año con año, es importante conocer más de su biología y promover su cultivo en viveros o invernaderos. Sin embargo, habrá que asegurar que las plantas no pierdan su valor medicinal.

Se sabe que las plantas medicinales al formar simbiosis con los hongos micorrizógenos arbusculares, además de incrementar la captación de nutrimentos del suelo (Pandey y Banik, 2009), también se ven favorecidas en su crecimiento y podrán aumentar la síntesis de sus metabolitos secundarios, así como su concentración (De la Rosa *et al.*, 2011), sin embargo, existen pocos trabajos que aborden la asociación micorrízica en plantas medicinales en cultivo y su relación con el contenido de metabolitos secundarios, es por ello que en este trabajo se plantean las siguientes preguntas de investigación

¿Las plantas de *D. moldavica* cultivadas en condiciones de invernadero tienen un mayor crecimiento micorrizadas que no micorrizadas?

¿Hay un efecto significativo de la micorriza sobre los metabolitos secundarios de *D. moldavica* detectados mediante cromatografía gases, cultivada en condiciones de invernadero?

## V. HIPÓTESIS

La formación de micorriza arbuscular en la planta de *Dracocephalum moldavica* L. favorecerá su crecimiento en altura, número de hojas y un incremento en contenido de metabolitos secundarios, ya que forma una red fúngica que se extiende hacia su entorno, fuera de los límites naturales de exploración radical, entonces así incrementan la provisión de recursos en comparación con las plantas no micorrizadas, al crecer en condiciones de invernadero.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1 General

Evaluar el efecto de la inoculación con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) sobre el crecimiento y los metabolitos secundarios de *Dracocephalum moldavica* L.

### 6.2 Específicos

- Evaluar la germinación de semilla de *Dracocephalum moldavica* recolectada en el Parque Estatal “El Faro”, Estado de México.
- Evaluar el efecto de los hongos micorrizógenos arbusculares en el crecimiento de *Dracocephalum moldavica*.
- Registrar la riqueza de hongos micorrízicos arbusculares presentes en el suelo proveniente del Parque Estatal “El Faro”, Estado de México.
- Evaluar el efecto de la inoculación micorrízica en la concentración de los metabolitos secundarios de *Dracocephalum moldavica*.

## **VII. MATERIAL Y MÉTODOS**

El sitio de trabajo fue el Invernadero de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z), Campus II de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Que se encuentra ubicado al Oriente de la Ciudad de México. Las condiciones que prevalecen en el invernadero son semicontroladas.

### **7.1 Procedencia y preparación de las semillas**

Las semillas de *Dracocephalum moldavica* fueron donadas por el personal del Parque estatal “El Faro” en el Estado de México, y por comentarios personales con ellos, se sabe que fue recolectada *in situ* sin ningún registro botánico. El lote de semillas fue mayor a 1000 semillas, en apariencia con color y tamaño homogéneos. Los datos cuantitativos de estas características de este lote de semillas quedaron plasmados en la tesis de Mar-Rodríguez (2016). Para los fines de este trabajo se eligieron 310 semillas similares en tamaño promedio de 1.63 mm de ancho por 3.09 mm de largo y de color marrón; de este sublote se eligieron 60 semillas a las que se les realizó una prueba de germinación.

### **7.2 Prueba de germinación**

Se utilizaron 60 semillas, se lavaron con agua de la llave y se colocaron un minuto en agua e hipoclorito de sodio en una concentración 1:1, proceso realizado para su desinfección; se colocaron tres lotes de 20 semillas cada uno en cajas Petri con algodón y papel filtro humedecidos, dejándolas a temperatura ambiente, se revisaron cada tercer día anotando el número de semillas germinadas, se consideró la semilla germinada cuando a radícula había emergido; se evaluó el porcentaje de germinación al término de 15 días, se realizaron dos observaciones más, sin embargo, después de esta fecha ya no se encontraron más semillas germinadas. Esta prueba fue solo para tener la certeza de que las semillas podían germinar y tener un estimado del tiempo que podían tardar en este proceso. En el experimento establecido la siembra fue directa.

### **7.3 Preparación del sustrato**

Se elaboró un sustrato para que creciera *Dracocephalum moldavica*; utilizando una mezcla de agrolita y peatmoss en una proporción 1:1; una vez hecha la mezcla; el sustrato se esterilizó dos veces, durante una hora por cada vez, mediante calor húmedo, a una temperatura de 110-120 °C y a una presión de 1.2-1.4 libras/pulgada<sup>2</sup> en un autoclave (Álvarez-Sánchez y Monroy-Ata, 2008).

### **7.4 Preparación del inóculo**

El inóculo de HMA consistió en suelo natural que contenía esporas, fracciones de hifa y raíces previamente colonizadas, para ello se recolectó suelo en el Parque Estatal “El Faro”, se tomaron tres muestras compuestas de suelo natural con aproximadamente 1 kg cada una; cada muestra fue resultado de la recolecta de cinco puntos de suelo asociado a las poblaciones de *D. moldavica* en el Parque Estatal “El Faro”. Estas muestras de suelo fueron trasladadas en hielera al invernadero de la FES- Z. En el laboratorio se mezclaron, tamizaron y guardaron en refrigeración hasta su uso.

### **7.5 Diseño experimental**

Se prepararon 50 macetas de policloruro de vinilo (PVC) de 24 cm de alto y 7.5 cm de diámetro. Cada una de estas macetas se selló en la base con una tapa de acetato y se reforzaron con cinta canela, para evitar la pérdida de agua.

A las 50 macetas se le colocó el sustrato preparado 1:1 de agrolita y peatmoss ocupando  $\frac{3}{4}$  de la maceta, se pesaron y agregaron 40 g del suelo natural que sirvió como inóculo, con un promedio de 134 esporas; este tratamiento se aplicó en las 25 macetas y se humedeció el sustrato en su totalidad; posteriormente se colocaron 5 semillas de *D. moldavica* en cada maceta, se cubrieron con una capa muy delgada del mismo sustrato y se taparon con bolsas de plástico para no perder humedad los primeros días y hasta la emergencia de las plántulas. Se siguió el mismo procedimiento en las 25 macetas restantes con el mismo número de semillas a las cuales no se les adicionó inóculo y fueron consideradas el lote testigo. Las macetas fueron etiquetadas con el tratamiento correspondiente y se colocaron al azar en el bancal del invernadero.

## 7.6 Medición de variables durante el cultivo

Las siguientes variables fueron medidas después de la emergencia de las plántulas, se registraron cada semana, hasta que la planta inició su floración.

- Crecimiento vegetal en altura y número de hojas. Para la toma de estos datos se utilizó un vernier electrónico (inicialmente) y regla graduada en cm cuando ya no fue suficiente el vernier.
- Supervivencia. Ésta, se registró semanalmente desde la emergencia de las plántulas hasta el término del experimento y se calculó con la siguiente fórmula:  
$$\% \text{ supervivencia} = \text{Número de plantas iniciales} / \text{Número de plantas finales} \times 100.$$

## 7.7 Medición de variables al final del cultivo

- Biomasa húmeda y seca. Al finalizar el ciclo de vida de las plantas de los dos lotes: tratamiento y testigos, fueron extraídas de la maceta y se pesaron. La biomasa fresca fue considerada como el peso fresco de la planta, después la planta fue separada de la raíz mediante un corte con tijeras, al igual se separaron las hojas y flores del tallo, estas estructuras se pusieron a secar en estufa a 75 °C durante 24 hrs. hasta obtener un peso constante como lo recomienda Hunt *et al.*, (2002) y Rodríguez-Calderón (2011), estos pesos fueron considerados como la biomasa seca. Para cuantificar el peso se utilizó una balanza analítica.
- Cociente raíz/vástago (R/V). Este cociente fue calculado de acuerdo con Cuartero y Fernández-Muñoz (1999) y con base en la biomasa seca.
- Tasa de crecimiento relativo (TCR). La tasa de crecimiento relativo es una variable para evaluar el desempeño de una especie ante cualquier condición ambiental que pueda afectar su crecimiento (Villar *et al.*, 2008). La TCR, se obtuvo con base en el crecimiento de la altura promedio de cada tratamiento, aplicando la siguiente fórmula:

- $$TCR = [\ln(L2) - \ln(L1)] / t2 - t1$$

Dónde: L2= altura final, L1= altura inicial, t= días.

- Colonización radical. La colonización micorrízica arbuscular total se evaluó mediante la técnica de tinción de raíces con azul de tripano al 0.05%. Una vez obtenidas las raíces se lavaron y se colocaron en KOH al 10% en baño maría para aclararlas, se enjuagaron y colocaron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% por 5-10 min para blanquear; posterior a esto, las raíces enjuagadas se acidificaron por espacio de 5-10 min en HCL al 10%, subsecuentemente, las raíces sin enjuagar se colocaron en azul de tripano al 0.05% en baño maría, fracciones de 1 cm de raíz teñida son colocadas en portaobjetos para su observación y evaluación al microscopio óptico (Phillips y Hayman, 1970).
- Extracción de esporas. Para contabilizar el número de esporas presentes en el suelo usado como inóculo se empleó la técnica de tamizado húmedo y decantación propuesta por Gerdemann y Nicolson (1963), seguida de una centrifugación en sacarosa. La técnica consiste en pesar 50 g de suelo seco, colocar en un vaso de precipitado de 1 L, agregar agua y agitar vigorosamente. Dejar reposar 10-15 seg y pasar el sobrenadante en tamices de 125 y 40 µm. Se recolecta el contenido de cada tamiz y coloca en tubos para centrifuga, agregar agua a los tubos para equilibrar los pesos y centrifugar por 5 min a 2,000 rpm. Al retirar de la centrifuga, desechar el sobrenadante de los tubos, y el precipitado agregar sacarosa al 60%, volver a centrifugar a 2,000 rpm por 5 min, pasar el sobrenadante por el tamiz de menor apertura, enjuagar y colocarlos en cajas de Petri, para su observación y recuento bajo un microscopio estereoscópico, posteriormente se extrajeron las esporas con ayuda de una pipeta Pasteur, y las esporas fueron montadas en portaobjetos y fijadas con PVLG (alcohol polivinílico, ácido láctico, glicerol) para su observación e identificación al microscopio óptico. La identificación de las especies de HMA se realizó con ayuda de claves taxonómicas de Schüßler y Walker (2010).



- Análisis químico del extracto de *Dracocephalum moldavica*. La planta seca (hojas, tallo y flor) fue molida y se maceró con dos disolventes por separado (hexano y metanol), agregando 10 mL por cada gramo de muestra. Se colocaron 18 g de planta con inóculo y 6 g sin inóculo en frascos ámbar de boca ancha, etiquetados previamente, finalmente se dejaron reposar durante 8 días. La muestra se agitó con vortex durante unos minutos y posteriormente se filtró con papel filtro cualitativo que contenía dos cucharadas de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), para su secado. Se inyectó 1  $\mu\text{l}$  de muestra de *D. moldavica* en un cromatógrafo de gases Agilent (HP6890) equipado con un detector de masas (HP5973) (Figura 3). El cromatógrafo se operó usando helio como gas acarreador con un flujo de 1ml/min, con inyección dividida (split 60.3:1) a una temperatura de 220 °C, en una columna capilar no polar HP5MS (25m x 25mm x 25m), usando el siguiente programa de temperatura en el horno: una temperatura inicial de 50 °C, seguida de un incremento de 5 °C/min para llegar a una temperatura de 280 °C por un tiempo 1 min, otro incremento de 25 °C/min para llegar a una temperatura final de 380 °C, durante 3 min. El espectrómetro de masas se operó a una velocidad de flujo de 1ml/min, con un voltaje de ionización a 70eV, a una temperatura de la interfase de 280 °C, en modo SCAN y en un rango de masas de 50-500m/z. La identificación de compuestos se realizó por comparación manual de espectros de masas. Se revisó la pureza de cada pico de los cromatogramas y se revisó la comparación de espectros de masas con el software Data Analysis con los de la biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST02). Sólo se aceptó los picos con pureza de pico de uno y la identificación de espectros con concordancia por arriba del 90%. La cuantificación de compuestos se hizo por el **método** de área para obtener el porcentaje de los compuestos, eliminando previamente los picos de las impurezas identificadas. Estas concentraciones relativas se reportaron en porcentajes. El análisis químico se realizó con la asesoría y apoyo del Laboratorio de Ecología Química a cargo del Dr. Francisco Espinosa y directamente con la Mtra Yolanda García Rodríguez ambos del

Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES) Campus Morelia.

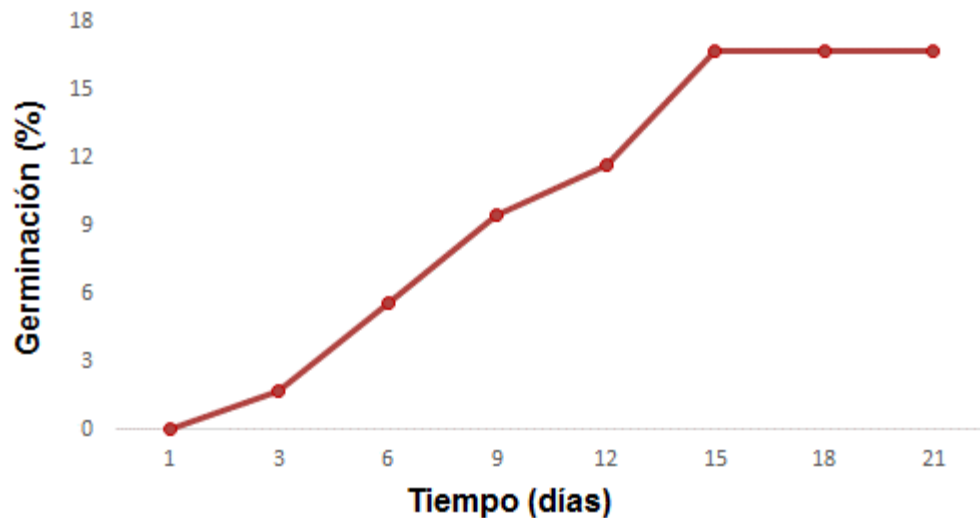
- Análisis estadístico. Se realizó una prueba de t-student cuando los datos cumplieron con la condición de normalidad para comparar el crecimiento en altura, número de hojas y biomasa seca, se empleó en el software estadístico Infostat de acceso libre.



**Figura 3.** Cromatógrafo de gases Agilent (HP6890) equipado con un detector de masas (HP5973).

## VIII. RESULTADOS

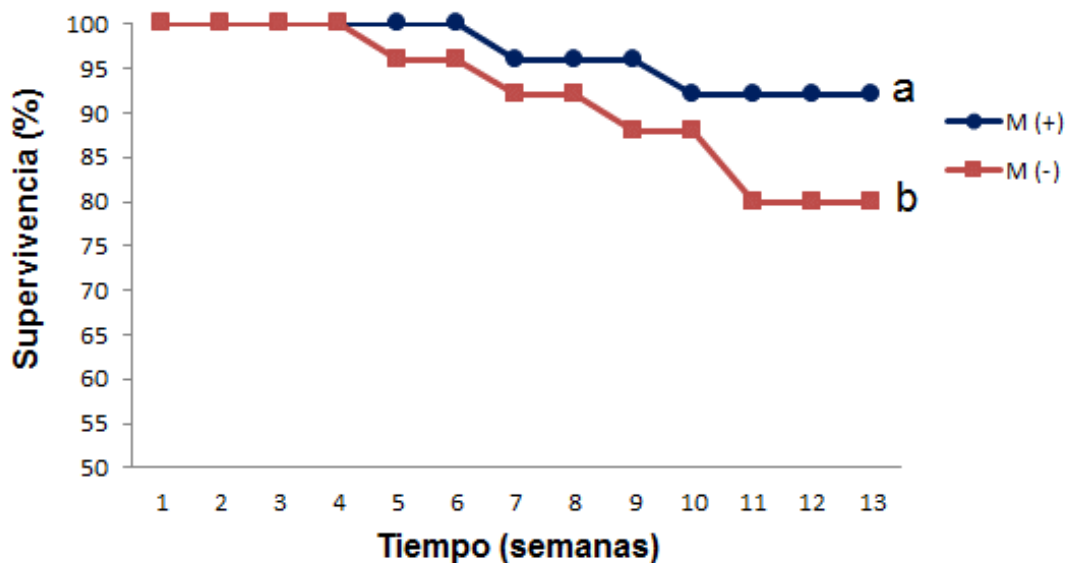
En la figura 4 se muestra el comportamiento de la germinación de las semillas de *Dracocephalum moldavica* se obtuvo el 16.66% de germinación.



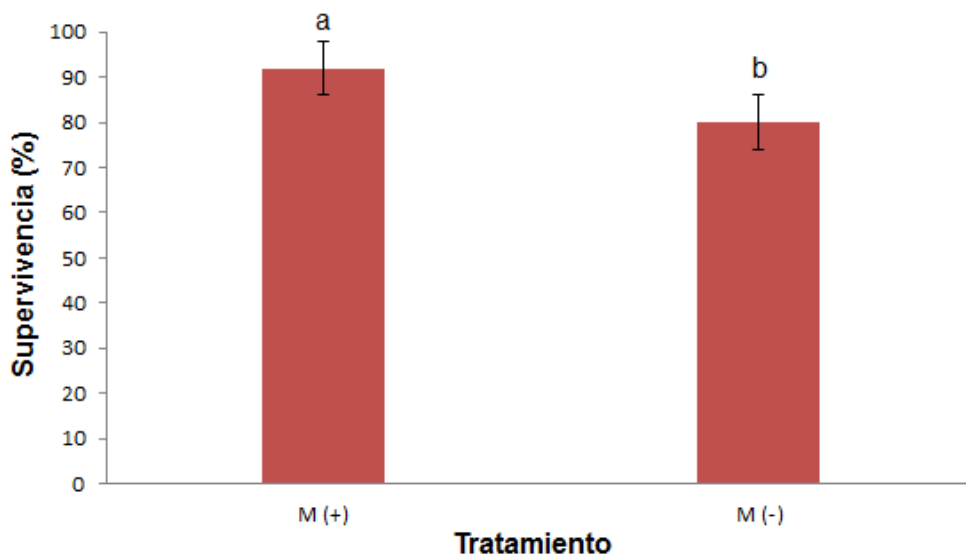
**Figura 4.** Germinación de *Dracocephalum moldavica* (L.), durante 21 días.

### 8.1 Supervivencia

El desarrollo plantular fue epigeo. Los porcentajes de supervivencia al final del experimento (13 semanas) fueron del 92% en plantas micorrizadas (M+) y el 80% en las no micorrizadas (M-), la mayor mortalidad se presentó en la semana 10. Los tratamientos M+ y M-, fueron diferentes estadísticamente en la semana 13 con una  $p < 0.001$  (Figura 5 y 6).



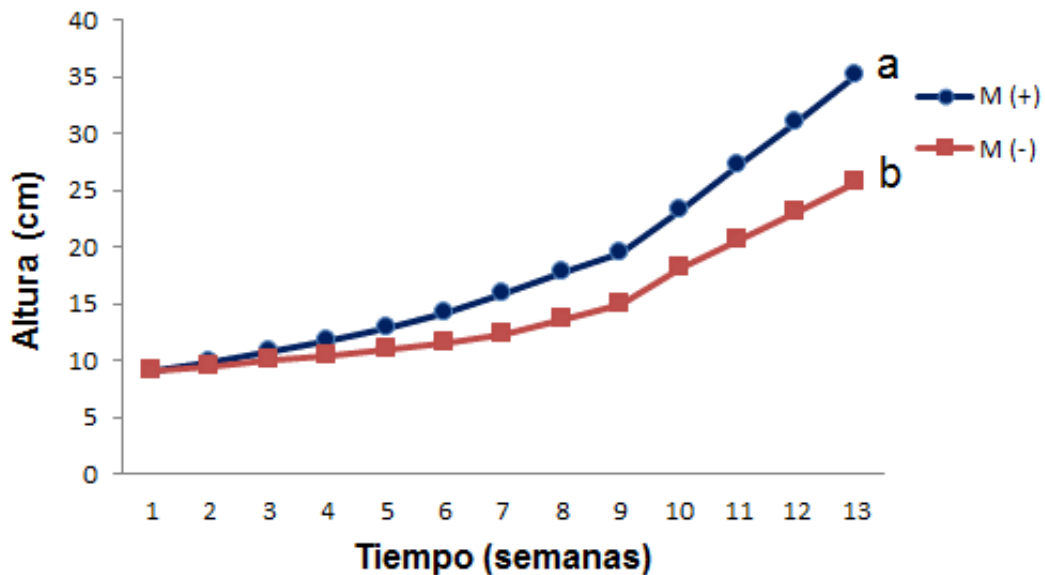
**Figura 5.** Curva de la supervivencia en *Dracocephalum moldavica* (L.), micorrizada (M+) y no micorrizada (M-) durante 13 semanas. Las letras distintas representan diferencias significativas.



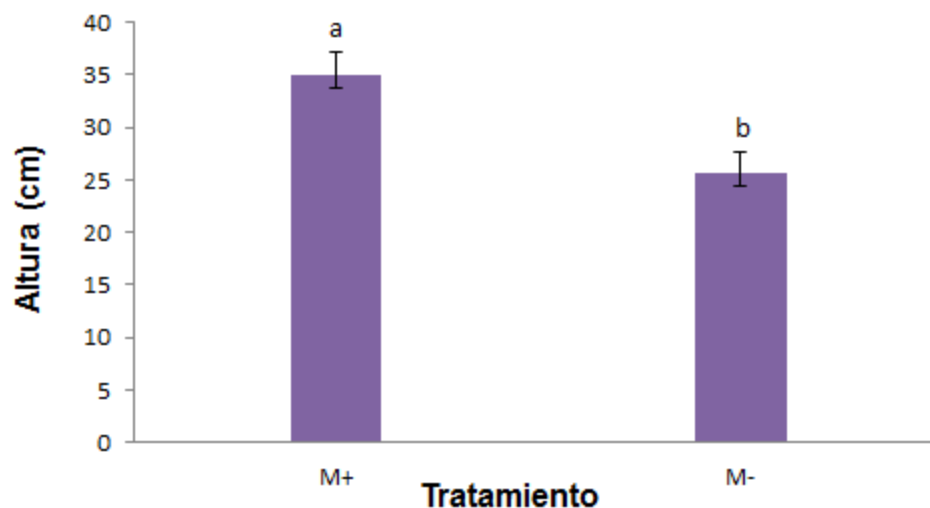
**Figura 6.** Porcentaje final de supervivencia en las plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-) a lo largo de 13 semanas de experimentación. Las letras distintas representan diferencias significativas, las líneas sobre las barras representan el error estándar.

## 8.2 Crecimiento

El crecimiento de *Dracocephalum moldavica* fue evaluado tomando dos parámetros: altura (cm) y número de hojas. En la figura 7, se observa la curva de crecimiento en altura de *D. moldavica* de los datos registrados semanalmente. La altura final del crecimiento se muestra en la figura 8, en el cual se obtuvo diferencias significativas ( $p \leq 0.0001$ ), donde las plantas M+ alcanzan mayores valores de crecimiento obteniendo finalmente una altura de 35.05 cm, en comparación con plantas M- que midieron 25.66 cm.



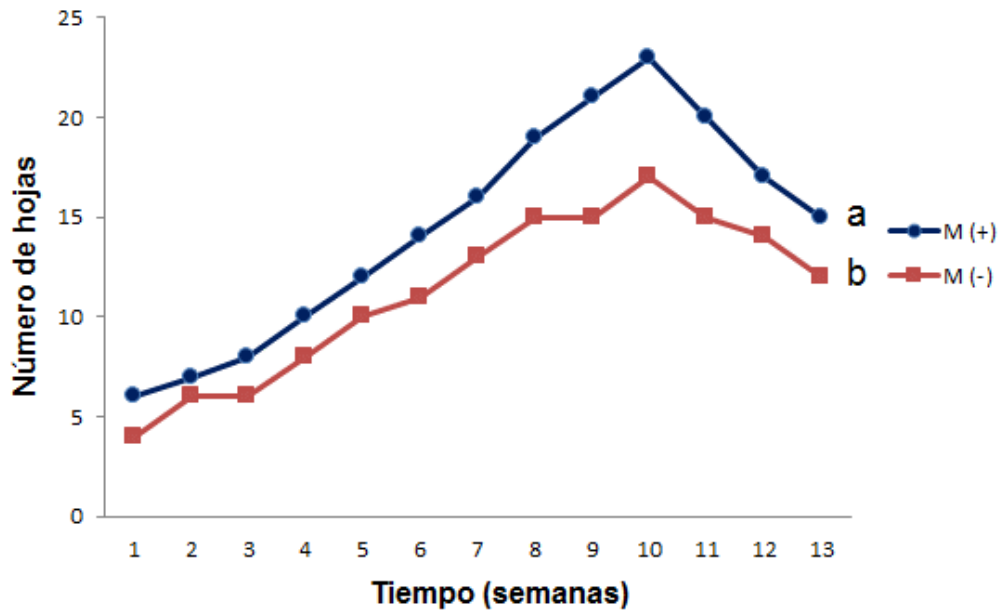
**Figura 7.** Curva del crecimiento de *Dracocephalum moldavica* (L.), micorrizada (M+) y no micorrizada (M-) y su comportamiento a lo largo de 13 semanas de experimentación. Las letras distintas representan diferencias significativas.



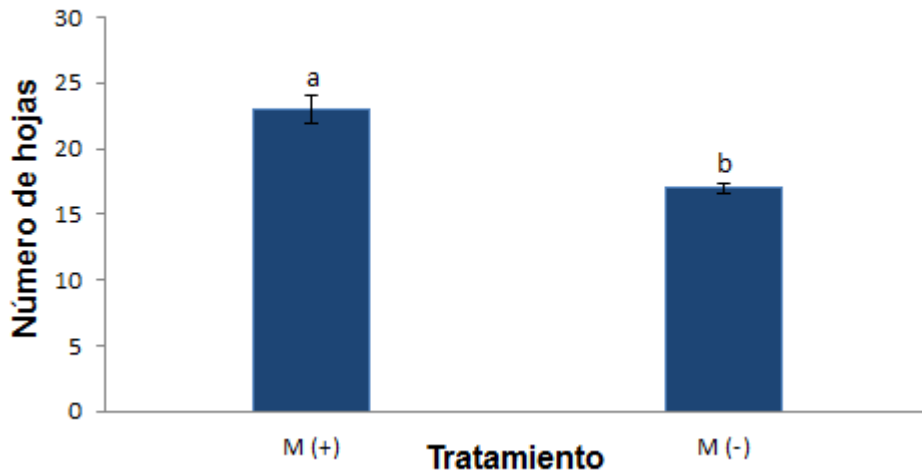
**Figura 8.** Promedio del crecimiento final de las plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-) a lo largo de 13 semanas de experimentación. Las letras distintas representan diferencias significativas, las líneas sobre las barras representan el error estándar.

### 8.3 Número de hojas

En la variable de número de hojas, se observó que en las plantas de *Dracocephalum moldavica* inoculado (M+) con HMA incrementó su producción en comparación con las plantas no inoculadas (M-). Las hojas que se consideraron para el conteo, fueron las que presentaban un color verde, que no estuvieran enfermas, marchitas o que ya se habían caído. En la figura 9, se muestra el número contabilizado por cada semana; en la figura 10, se observa el número máximo de hojas, en donde M+ fue de 23 hojas y M- de 17 y se obtuvieron diferencias significativas ( $p \leq 0.0001$ ).



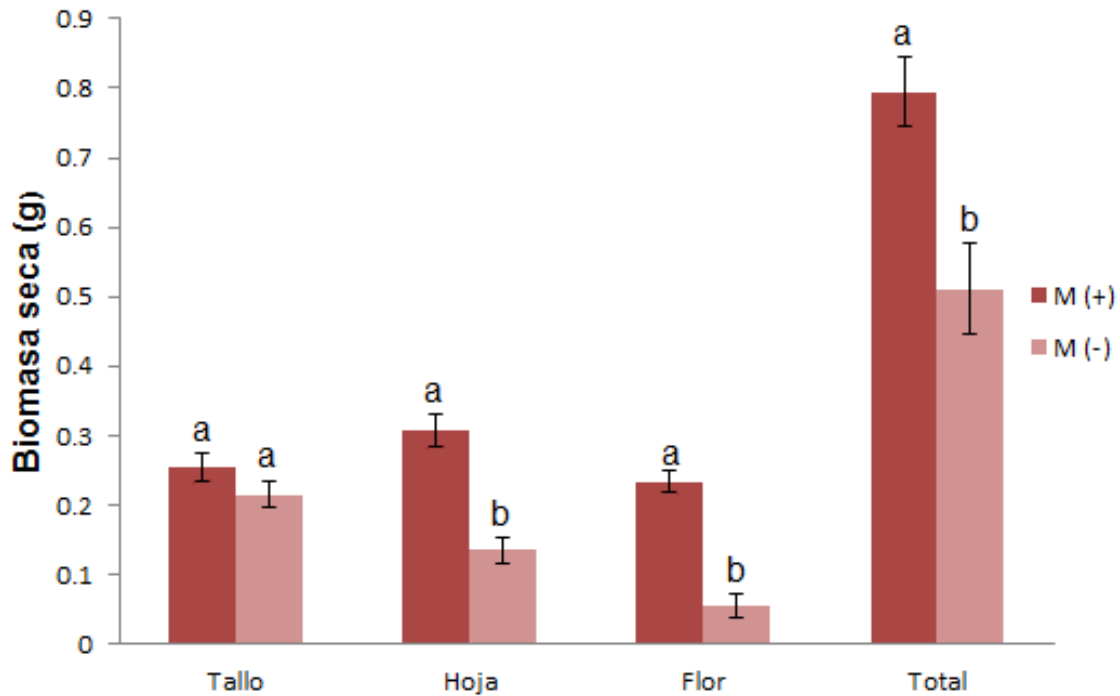
**Figura 9.** Número promedio de hojas contabilizadas semana a semana en plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-). Las letras distintas representan diferencias significativas.



**Figura 10.** Número máximo de hojas contabilizadas al final del período de experimentación. Las letras distintas representan diferencias significativas, las líneas sobre las barras representan el error estándar.

## 8.4 Biomasa seca

Una vez concluido el período de crecimiento en invernadero, las estructuras de las plantas fueron deshidratadas y pesadas. Como se muestra en la figura 11, las plantas M+ tienen en los tres casos, un peso promedio superior en tallo de 0.2542 g, en hojas de 0.3072 g y flor de 0.2335 g; las plantas M- presentaron en peso de tallo de 0.2147 g, en hoja de 0.1343 g y en flor de 0.0550 g. Presentando una diferencia significativa en la biomasa de hoja, flor y la biomasa total (hoja, tallo y flor) ( $p \leq 0.0001$ ), pero no presenta una diferencia significativa en tallo ( $p = 0.1572$ ).

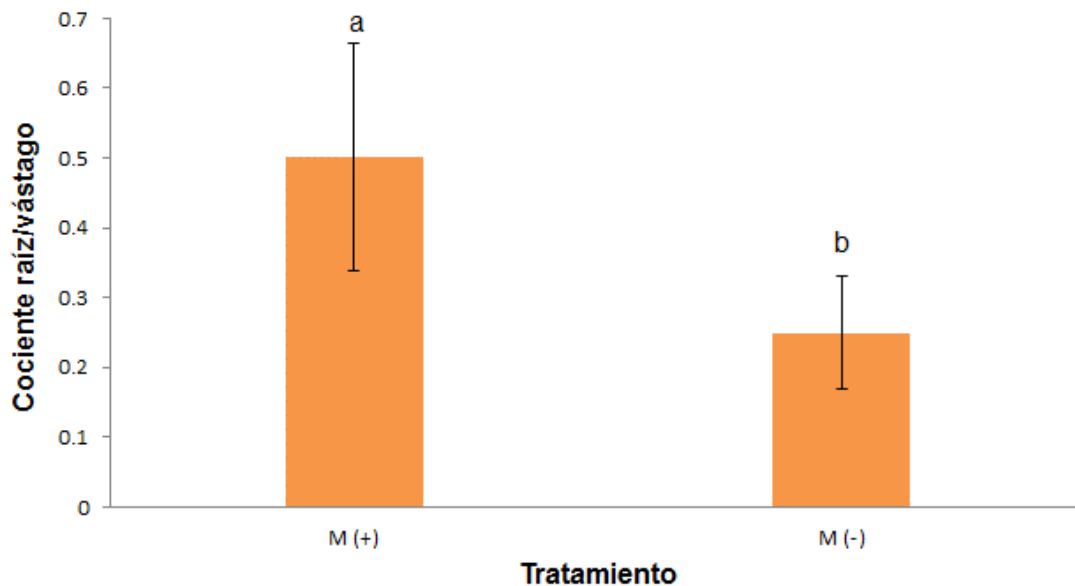


**Figura 11.** Peso promedio de tallos, hojas y flores de plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-). Las letras distintas representan diferencias significativas, y las letras iguales no presentan diferencias estadísticas, las líneas sobre las barras representan el error estándar.



### 8.5 Cociente raíz / vástago (R/V)

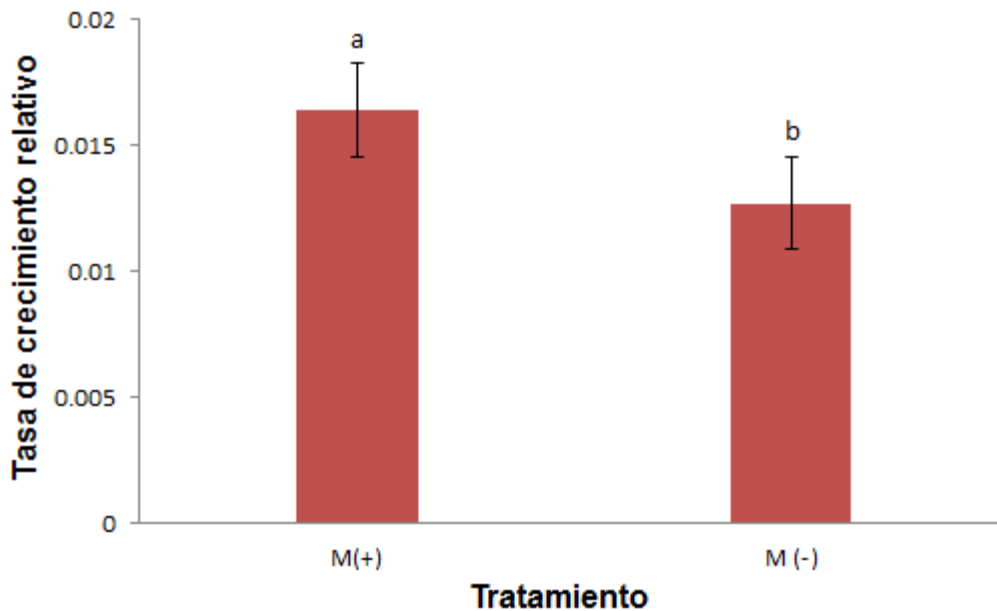
En la figura 12, se observa que el coeficiente es mayor en las plantas M+ teniendo un valor de 0.5080 que en las plantas M- su valor es de 0.2499, presentando una diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 12.** Valor del cociente raíz/vástago en plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-). Las letras distintas representan diferencias significativas, las líneas sobre las barras representan el error estándar.

### 8.6 Tasa de crecimiento relativo (TCR)

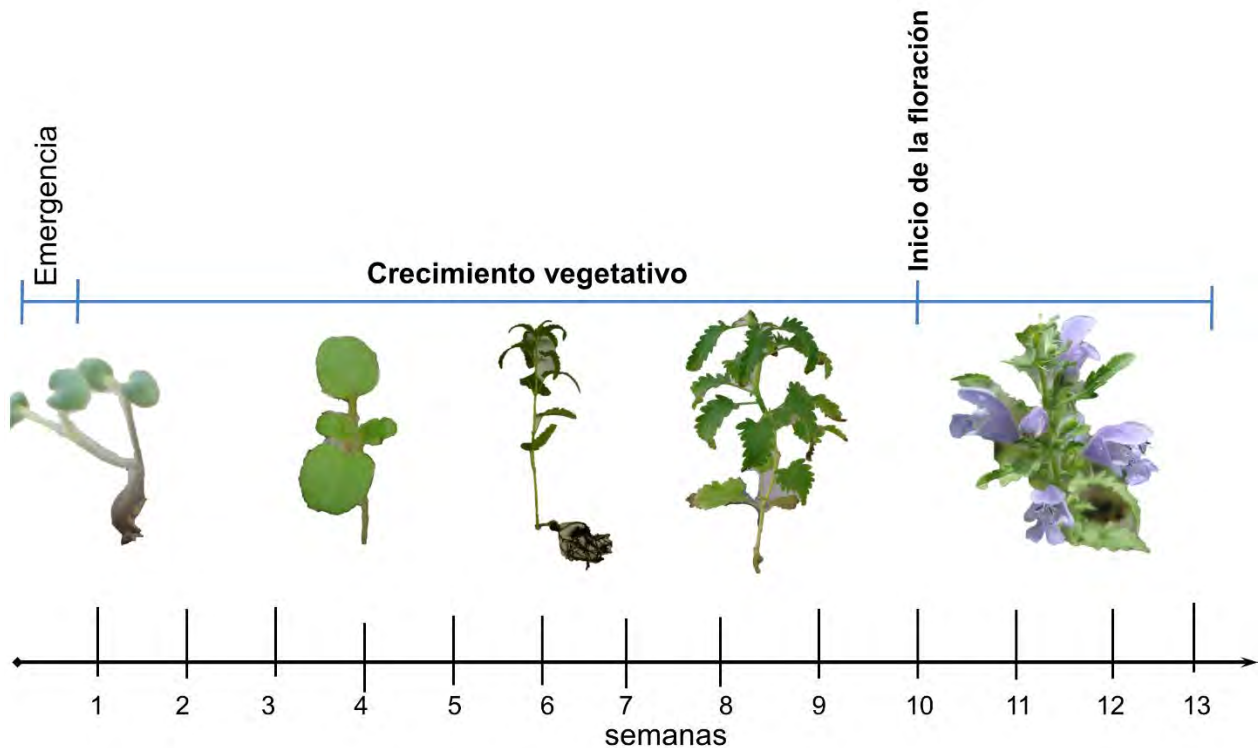
Para evaluar el crecimiento de los organismos tratados, se aplicó la fórmula de TCR. En la figura 13, se observa la diferencia entre los valores de M+ y M-. El valor mayor se obtuvo en el tratamiento M+ con 0.01643 y M- con 0.01271.



**Figura 13.** Tasa de crecimiento relativo (TCR) en plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-). Las letras distintas representan diferencias significativas y las líneas sobre las barras representan el error estándar.

### 8.7 Fenología de *Dracocephalum moldavica* (L.)

La línea de tiempo fenológico en *Dracocephalum moldavica* la cual se observa en la figura 14, muestra que en promedio las plantas micorrizadas (M+) y no micorrizadas (M-), emergieron a las 1.5 semanas posterior a la colocación de la semilla en el sustrato; durante la segunda semana, se observó a las plántulas desarrolladas; para la semana cuatro, aparecieron las primeras hojas y continuaron desarrollándose tanto en altura como en número de hojas hasta la semana diez, comienza la floración en plantas micorrizadas y en las no micorrizadas inicia la floración a la semana 11; finalmente, en la semana 13 se sacrifican las plantas para su registro en peso húmedo.

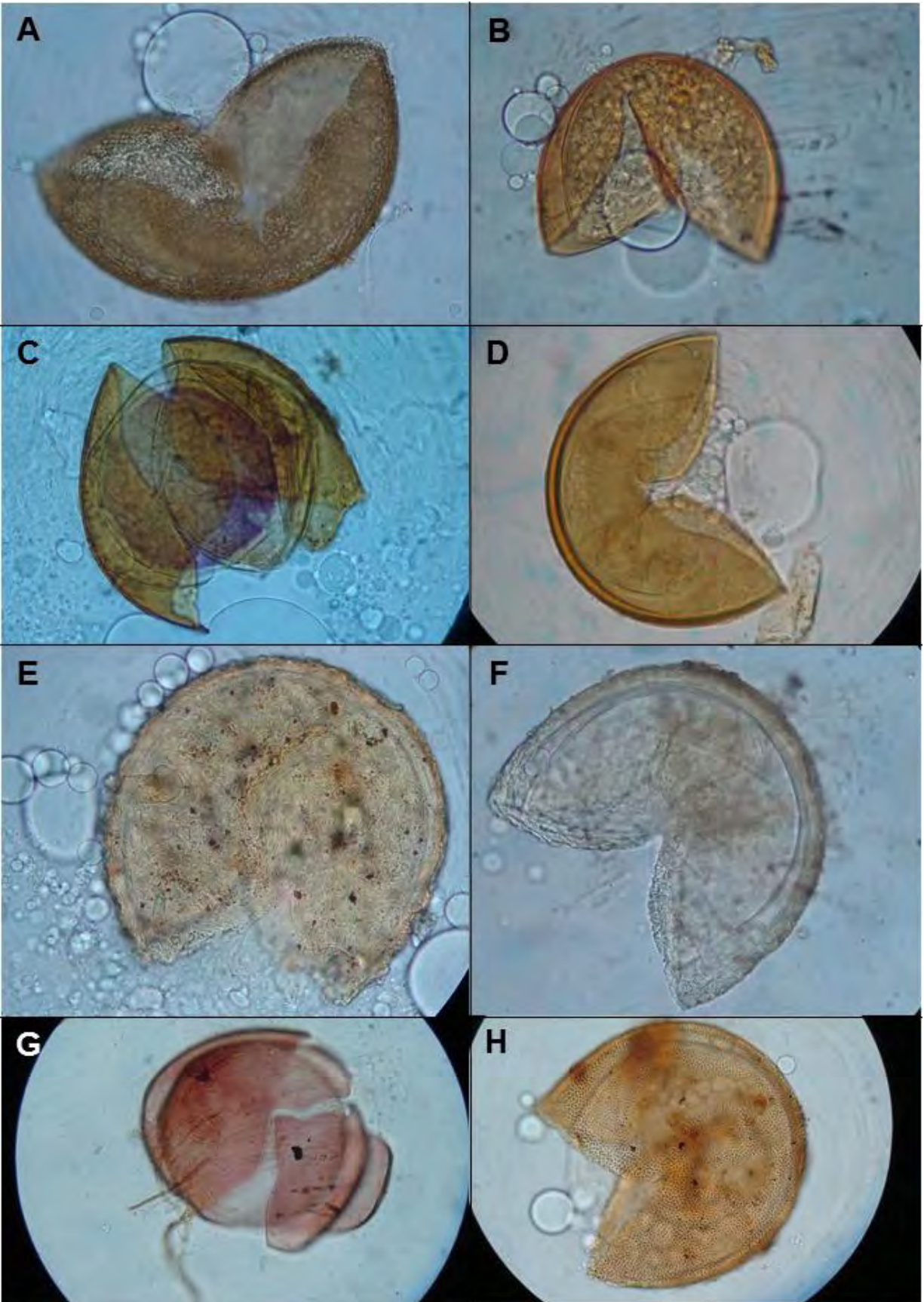


**Figura 14.** Cronología promedio de los eventos importantes en el desarrollo de *Dracocephalum moldavica* (L.), en plantas micorrizadas (M+).

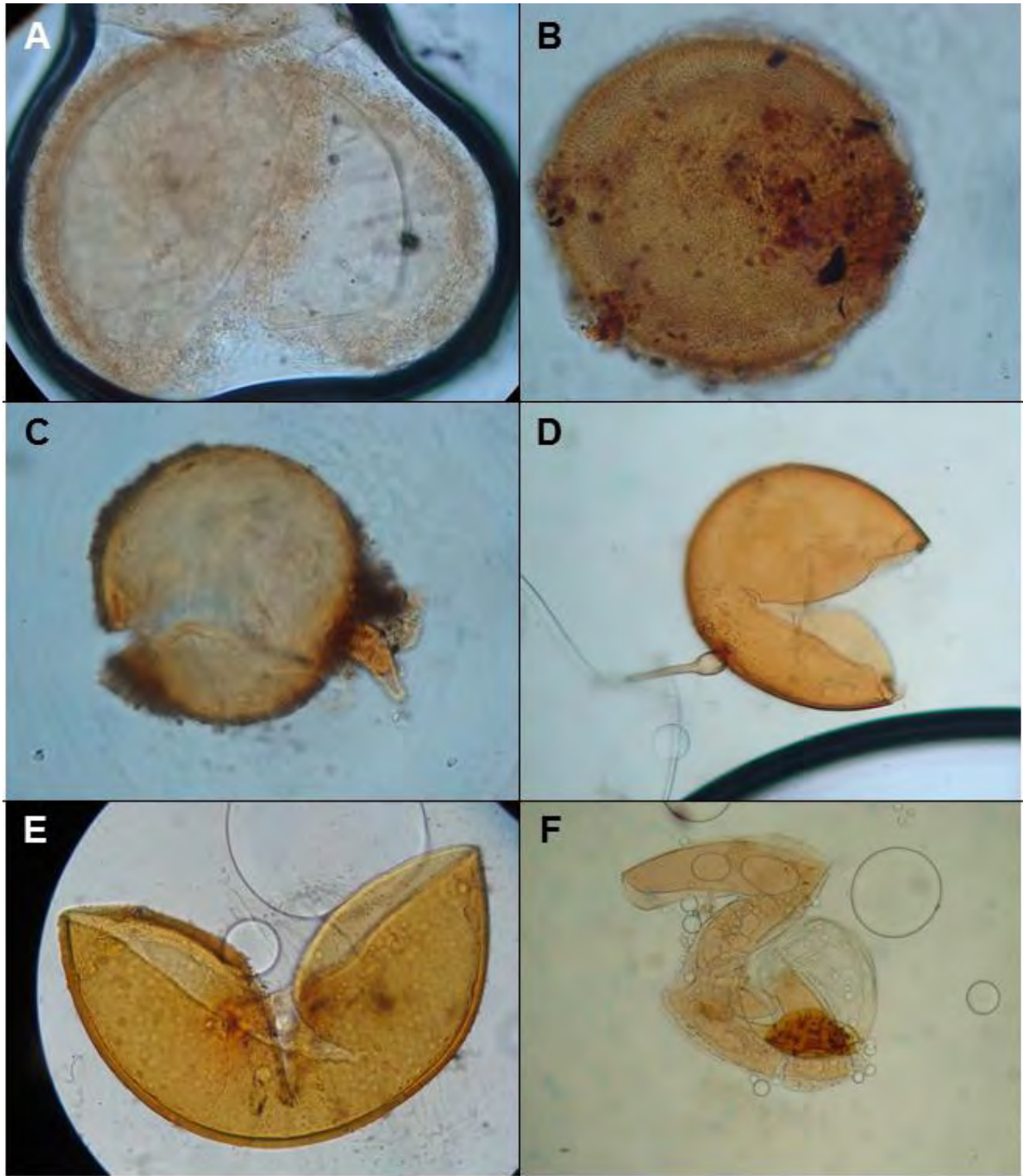
### 8.8 Riqueza de hongos micorrízicos arbusculares

En las figuras 15 y 16, se pueden observar los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), encontrados en las muestras compuestas de suelo proveniente del Parque Estatal “El Faro”, que fue utilizado como inóculo, se encontraron ocho géneros y diez especies HMA.

**Figura 15.** Riqueza de hongos micorrízicos arbusculares del Parque Estatal “El Faro”; A) *Acaulospora denticulata*; B) *Acaulospora laevis*; C) *Acaulospora mellea*; D) *Acaulospora spinosa*; E) *Ambispora* sp.; F) *Diversispora* sp.; G) *Racocetra fulgida*; H) *Acaulospora scrobiculata*.



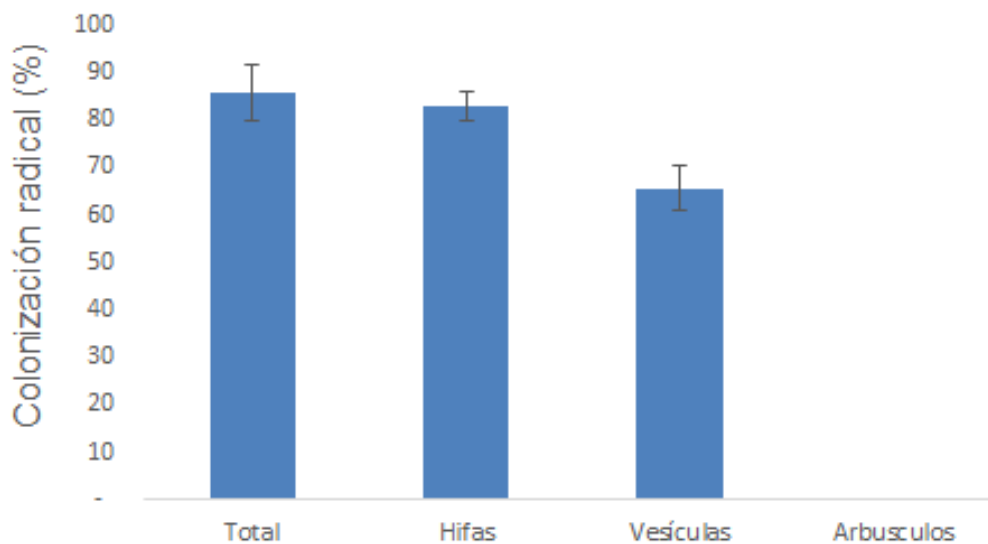




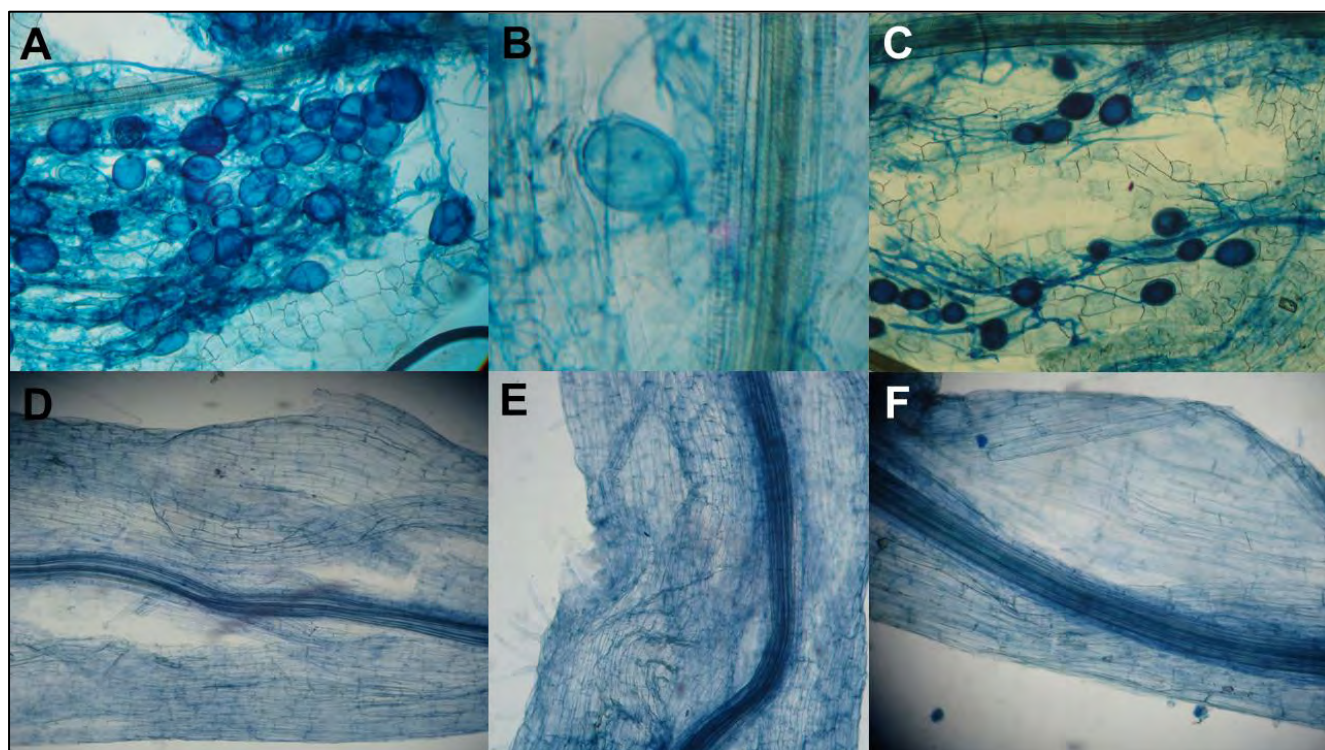
**Figura 16.** A) *Entrophospora baltica*; B) *Entrophospora infrequens*; C) *Funneliformis mosseae*; D) *Gigaspora margarita*; E) *Glomus* sp.; F) *Racocetra* sp.

## 8.9 Porcentaje de colonización total y fraccionada

En las plantas con micorriza (M+), se tuvo presencia de hifas y vesículas. En la figura 17, se observa el porcentaje total de 85.55% de colonización y un 82.77% de colonización de hifas y un 65.55% de colonización de vesículas; en el caso de las plantas sin micorriza (M-) no presentaron ninguna estructura. En la figura 18, se muestra una imagen comparando las raíces de M+ y M-.



**Figura 17.** Porcentaje de colonización radical de hongos micorrizógenos arbusculares. Las líneas sobre las barras representan el error estándar.



**Figura 18.** Corte de la raíz de la planta *Dracocephalum moldavica*; A) B) (16x) y C) (10x), raíz micorrizada con presencia de hifas y vesículas; D) E) y F) (10x), raíz sin presencia de micorrízica.

### 8.10 Contenidos de metabolitos secundarios en tejido de *Dracocephalum moldavica*

El análisis químico de *Dracocephalum moldavica*, arrojó nueve compuestos, representados en la Cuadro 1, estos se presentan en plantas M+ y M-, cinco compuestos están en mayor porcentaje para M+ y cuatro en mayor porcentaje para M-.

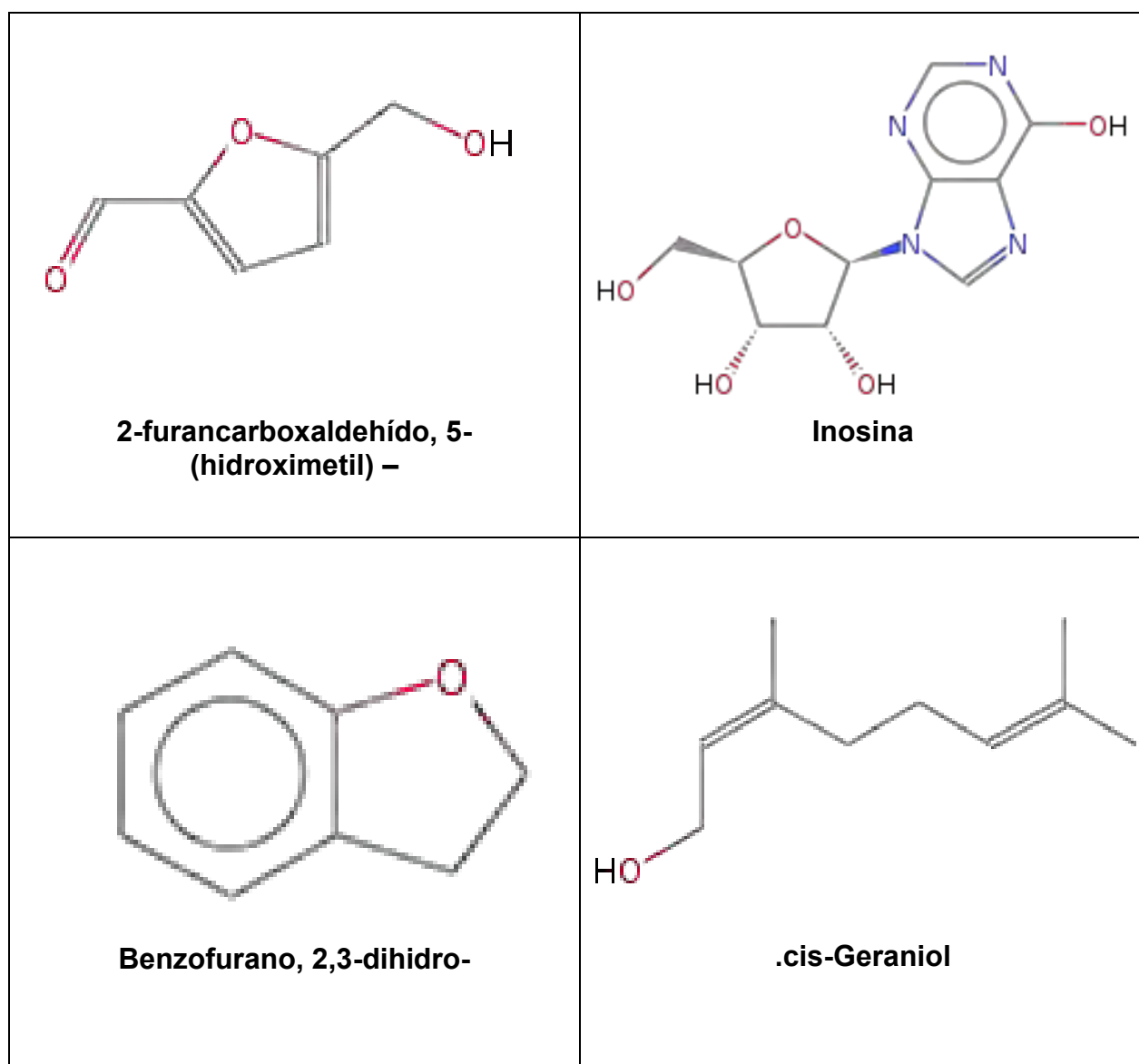
**Cuadro 1.** Concentración relativa porcentual de compuestos volátiles de *Dracocephalum moldavica* (L.), con en plantas micorrizada (M+) y no micorrizada (M-). R.T. (Tiempo de Retención).

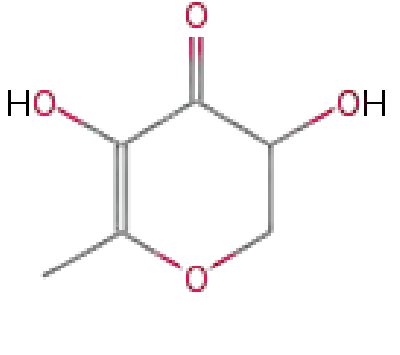
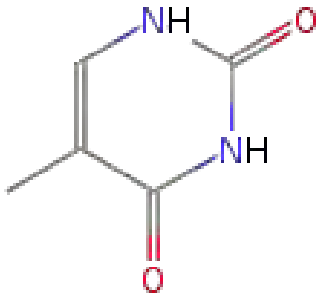
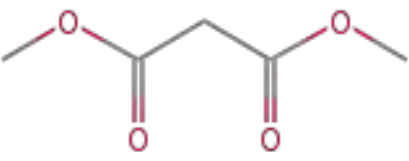
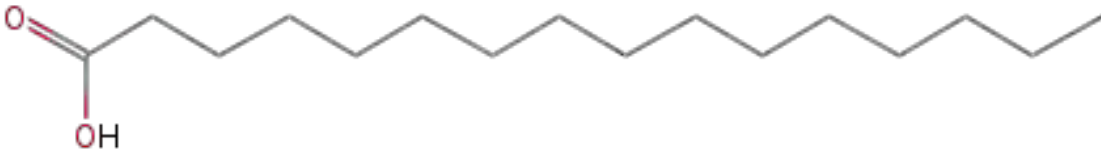

R.T.	% M+	% M-	Compuesto
9.34	2.80	4.90	Monometil malonato
10.79	6.83	5.10	Timina
12.80	7.95	6.51	4H-piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-
15.03	8.47	7.97	Benzofurano, 2,3-dihidro-
15.30	29.58	37.58	2-furancarboxaldehído, 5- (hidroximetil) -



19.79	3.29	8.21	. cis-Geraniol
21.26	34.20	23.31	Inosina
30.86	2.23	2.86	1,15-Pentadecanediol
33.34	4.66	3.56	n-hexadecanoico ácido

En la figura 19, se muestra el nombre y estructura química de los nueve compuestos químicos encontrados por medio de la cromatografía de gases que se realizó en los tejidos de las estructuras componentes (tallo, hoja y flor) de *Dracocephalum moldavica*.



 <p><b>4H-piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-</b></p>	 <p><b>Timina</b></p>	 <p><b>Monometil malonato</b></p>
 <p><b>n-hexadecanoico ácido</b></p>		
 <p><b>1,15 – Pentadecanediol</b></p>		

**Figura 19.** Nombre y estructura química de los compuestos del análisis químico en tejidos de *Dracocephalum moldavica* (L.). (<http://webbook.nist.gov/chemistry/> Fecha de consulta: 20 de febrero 2016).

## IX. DISCUSIÓN

Se tiene como resultado en este estudio para *Dracocephalum moldavica* que el inocular con HMA dando la formación de la micorriza sí presentó un mayor crecimiento en las variables como fue: altura, número de hojas y biomasa seca, presentando un contraste con las plantas no inoculadas, los resultados coinciden con diferentes autores respecto a que el inocular con HMA ayuda a su crecimiento vegetativo, como Manjarrez-Martínez *et al.* (1999) reporta para la producción de frutos en chile serrano (*Capsicum annuum* L.) fue favorecida por la inoculación micorrízica más la adición de 3.0, 4.0 y 6.0 g de vermicomposta, presentando que los hongos micorrízicos arbusculares en conjunto con la vermicomposta en chile es benéfica, ya que fue factible en el desarrollo vegetativo y reproductivo de esta especie. Pulido *et al.* (2003) en donde ellos presentan un estudio de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y cebolla (*Allium cepa* L.) inoculadas con HMA, las especies utilizadas *Glomus clarum*, *G. fasciculatum* y *G. mosseae*. Los resultados para ambos cultivos, produjeron posturas con valores de altura y longitud radical considerados óptimos. Con las inoculaciones de rizobacterias (RPCV) + HMA se lograron posturas de calidad superior a la alcanzada con las mejores variantes de inoculación simple, destacándose las combinaciones de *G. clarum* y *G. fasciculatum* con *A. brasilense* para el tomate y de *G. clarum* y *G. fasciculatum* con *A. chroococcum* para la cebolla.

*Dracocephalum moldavica* tiene mayor biomasa seca en las plantas que se inocularon con HMA así coincidiendo con Franco y Cano (2006) que presentan un estudio sobre el crecimiento de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) inoculado con *Glomus intraradices*, dando como resultado que la simbiosis causó incrementos significativos en índice de clorofila, contenido de proteína foliar, y biomasa seca y radical; teniendo un porcentaje de colonización micorrízica de 42%.

También se puede mencionar a Quiñones-Aguilar *et al.* (2014), coincidiendo con ellos que el evaluar el efecto del HMA, sí incrementa las variables de altura y biomasa seca; ya que ellos al trabajar con la papaya (*Carica papaya* L.) inoculado con *Glomus* sp. Zac-2 (HMA) y dosis de fósforo, observan que las variables como la altura de la planta, diámetro del tallo y biomasa seca fueron diferentes ( $P \leq 0.05$ ) entre plantas con y sin

HMA, independientemente de la dosis de fósforo. Teniendo como resultado que las plantas con HMA incrementaron su crecimiento más de 500 % con respecto a las no inoculadas; el índice relativo de dependencia micorrízica (IRDM) fue 99 %.

Jérez (2013) realizó la inoculación de HMA en *Ocimum basilicum* y obtuvo un mejor crecimiento en altura de plantas inoculadas que las plantas no inoculadas. Arango *et al.* (2012), reportan para *Mentha piperita* inoculadas con HMA, cuatro especies diferentes del género *Glomus* y un mayor crecimiento y biomasa seca en comparación a las no inoculadas, Los HMA inoculados en plantas ayudan a incrementar la productividad y reducir la aplicación de fertilizantes, ya que la simbiosis micorrízica aumenta de forma marcada la absorción de nutrientes como el nitrógeno, el potasio, el calcio, el zinc, el magnesio y especialmente el fósforo; mejora el transporte y la absorción de agua en la planta, así como la resistencia de la planta huésped a la sequía (Merryweather y Fitter, 1996; Rivas, 1997; Alkaraki y Clark, 1998 y Alkaraki, 1998). Además contrarresta el ataque de patógenos, ya sea por la ocupación previa del espacio de las raicillas o por la estimulación de los mecanismos de defensa bioquímica (Cuenca *et al.*, 1997; Dassi *et al.*, 1998;). Los casos anteriores son de plantas de la familia Lamiaceae que se les ha inoculado con HMA, teniendo así un mejor crecimiento en altura y biomasa seca; coincidiendo con este actual trabajo de la planta *Dracocephalum moldavica* que pertenece a esta familia, donde se observa que el inocular con los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), sí ayuda al crecimiento en altura, número de hojas y biomasa seca, en comparación con las plantas no inoculadas, teniendo el 85.55% de colonización radical micorrízica en raíces de *D. moldavica*, ya que la asociación simbiótica de HMA en las raíces de las plantas producen diversos cambios y/o modificaciones a nivel fisiológico, entre los que destacan los incrementos en la actividad fotosintética, por efecto de la mayor capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> y, por consiguiente, el incremento de las tasas de crecimiento y biomasa producida, que las plantas micorrizadas presentan en comparación con plantas no micorrizadas (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1996; Alarcón *et al.*, 1997a; Olalde, 1997).

Salvioli *et al.* (2012), realizaron un trabajo con plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) donde las inocularon con *Glomus mosseae*, favoreciendo su crecimiento

en altura, producción en número y rendimiento total del fruto, así mismo, la inoculación aceleró la floración que se produjo a los 47 días posterior al trasplante; las plantas sin micorriza florecieron 5 días más tarde. Este trabajo coincide con la aceleración de la floración de *Dracocephalum moldavica*, en el cual las plantas micorrizadas (M+) florecen en la semana diez, y en las plantas no micorrizadas (M-) una semana después; la asociación con la micorriza no sólo ayuda en el crecimiento en altura y número de hojas, si no también acelera la floración de la planta.

Mena-Echeverría *et al.* (2011) presentan un trabajo donde compararon el efecto de la inoculación con HMA (*Glomus hoi-like*) y un conglomerado de especies de HMA (*Glomus constrictum*, *Glomus geosporum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus tortuosum* y *Acaulospora scrobiculata*), sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de sorgo (*Sorghum vulgare* L.) sometidas a estrés hídrico. Los resultados mostraron que, en general, en las plantas sometidas al estrés hubo una disminución del crecimiento y el desarrollo, no así en los tratamientos micorrizados, independientemente del déficit hídrico. En las variables de crecimiento y absorción de fósforo, se observaron valores superiores en los tratamientos donde se empleó el conglomerado de especies y en las variables fisiológicas (conductancia estomática y tasa fotosintética) se obtuvieron respuestas similares. Las plantas inoculadas con el conglomerado de especies, fueron las que mejor soportaron y se recuperaron del déficit hídrico, lo que pudo estar asociado a la ocurrencia de efectos sinérgicos entre las diferentes especies que lo conforman, potenciándose unas a otras.

También se puede mencionar un estudio realizado en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inoculado con hongos micorrízicos arbusculares, del género *Glomus*, favoreciendo un rendimiento agrícola, al encontrar una respuesta positiva al tratamiento y en el contenido foliar de nitrógeno, fósforo y potasio, ya que hubo una mayor movilidad de estos nutrientes (Mujica-Peréz, 2012).

Se encontraron 14 taxones de HMA; diez de ellas se determinaron a nivel de especie y los cuatro restantes a nivel de género; se identificaron en total ocho géneros y diez especies; teniendo mayor presencia los géneros *Acaulospora* y *Funneliformis*, y con una menor presencia del género *Glomus*.

Para el Parque Estatal “El Faro”, sólo hay un trabajo reportado de HMA, en cual Carrillo-Vergara *et al.* (2013), mencionan 17 taxas, de las cuales son 10 especies y siete géneros, teniendo de igual forma mayor presencia de *Acaulospora* y de *Glomus* en temporada de lluvia. Olivera-Morales *et al.* (2011), reportaron *Acaulospora laevis*, *Acaulospora spinosa* y *Funneliformis mosseae*, presentes en los bosques templados y también registrados por Carrillo-Vergara *et al.* (2012), lo cual coincide con lo encontrado en este estudio.

Los resultados del análisis químico de *Dracocephalum moldavica* fue agregar nueve compuestos químicos a los ya reportados, como son: monometil malonato, timina, 4H-piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-, oxaadbenzofurano, 2,3-dihidro-, 2-furancarboxaldehído, 5- (hidroximetil) -, cis-Geraniol, Inosina, 1,15-pentadecanediol y ácido n-hexadecanoico, ya que no coinciden con los reportados por Dastmalchi *et al.* (2007), en el cual ellos obtuvieron como metabolitos secundarios: ácido hidroxicinámico, flavonoides, ácido cafeíco, ácido ferúlico, ácido rosmarínico, luteolina, luteolina-7- O glucósido y apigenina para *D. moldavica*; tampoco coincidiendo con los 17 compuestos reportados por Yang *et al.* (2013), en donde ellos encuentran un compuesto como nuevo, identificado como flavonoide glucósido; pero por otra parte, Martínez-Vázquez *et al.* (2012), mencionan que no se cuenta con pruebas científicas de su eficacia y no existen datos precisos sobre su actividad en México; ellos al realizar un estudio a *D. moldavica* reportan que presenta flavona y glucósidos, que atribuyen efectos sedantes.

Se encuentra que *Dracocephalum moldavica* y *Agastache mexicana* son confundidas por los pobladores, usando las plantas para los mismos remedios; cabe mencionar a Reyes *et al.* (2005) que reportan los principales metabolitos secundarios para *Agastache mexicana* que son: mentona, camfeno,  $\beta$ -Pineno, limoneno, p-cimeno, cineol, citronelal, pulegona y flavonoides; ya que también Cristians *et al.* (2015), menciona al ácido rosmarínico, el hiperósido y a la rutina como otros metabolitos secundarios presentes en *A. mexicana*; los compuestos reportados para *D. moldavica*, y los obtenidos en éste estudio no presentan ninguna similitud, pero Dastmalchi *et al.* (2007), y Kakasy *et al.* (2006), reportaron en sus estudios de *D. moldavica* al compuesto ácido rosmarínico, que también lo presenta *A. mexicana*, teniendo por ahora un

compuesto compartido entre estas dos especies; por el cual se podría entender por qué ambas plantas son confundidas y usadas para los mismo remedios.

En este estudio, de los nueve compuestos que se reportan, se observa que cinco de ellos tienen una mayor concentración en plantas micorrizadas y el resto presentan una mayor concentración en las plantas no micorrizadas, observando que el inocular con HMA está incrementado los metabolitos secundarios de *Dracocephalum moldavica* esto puede ser posible que la concentración de algunos compuestos químicos en las plantas no asociadas a micorrizas, estuvieron en un mayor estrés en comparación con las plantas que sí estuvieron asociadas a la micorriza; los resultados coinciden con diferentes autores respecto a que el inocular con HMA ayuda a incrementar metabolitos secundarios en plantas medicinales como es el caso de Khaosaad *et al.* (2006) en donde ellos reportan para *Origanum vulgare* var. *Cona* y *Origanum vulgare* b13/2 que el inocularlos con HMA (*Glomus mosseae*) incrementó la concentración del aceite esencial de las plantas micorrizadas en comparación de las no micorrizadas; Arango *et al.* (2012), evaluaron los efectos de HMA (*Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*) en el desarrollo de *Mentha piperita*, y obtuvieron un aumento en la producción de aceites esenciales; Nemec y Lund (1990) reportaron que inocular con *Glomus intraradices* induce variaciones significativas en la proporción y la composición de las sustancias volátiles de hojas de cítricos en *Citrus jambhiri*; y en *Mentha arvensis* encontraron que la presencia de HMA ayudo al crecimiento y la acumulación de aceites esenciales así como una mejor absorción de minerales (Khaliq y Janardhanan, 1997; Freitas *et al.*, 2004). Kapoor *et al.* (2002; 2004) realiza un trabajo con tres especies de plantas (*Anethum graveolens*, *Trachyspermum ammi* y *Foeniculum vulgare*), y dos especies de hongos (*Glomus macrocarpum* y *G. fasciculatum*) teniendo como resultado que el hongo favoreció el crecimiento, contenido de fosfato y concentración de metabolitos secundarios en las tres especies de plantas; y a Copetta *et al.* (2006) reportando que inocular con *Gigaspora rosea* aumenta el aceite esencial, ya que lo asocian a un mayor número de tricomas glandulares peltados (sitios principales de la síntesis de aceite esencial) en la zona basal y central de la hoja; Por otra parte, Mucciarelli *et al.* (2003), mencionan que también el inocular con HMA, se puede incrementar la producción de terpenos de la misma especie; Toussaint *et al.* (2007) realizaron un estudio de la parte aérea de *Ocimum basilicum* que

al ser inoculadas con *Glomus caledonium* y *Glomus mosseae*, da como resultado el incremento en la producción de antioxidantes (ácido cafeíco y ácido rosmarínico), ellos explican que posiblemente el incremento de la concentración de los antioxidantes por *Glomus caledonium* y *Glomus mosseae* puede estar relacionado con el suministro del nitrógeno. Ya que al ser alta la asimilación de nitrógeno en las plantas micorrizadas contribuyen a la producción de aminoácidos como la tirosina y la fenilalanina, aminoácidos que resultan importantes en la producción de ácido cafeíco y romarínico. Al incrementarse estos aminoácidos, existe una alta producción de enzimas importantes en la síntesis de estos antioxidantes; y por último De la Rosa-Mera (2011), reporta que en plantas micorrizadas de *Catharanthus roseus* (L.), se incrementa la concentración de los alcaloides (vinblastina y vincristina), y las plantas no micorrizadas tuvieron mayor presencia de metabolitos de interés biológico.

Wink (2007), explica que los compuestos químicos tienen algunas funciones fisiológicas, por ejemplo las pectinas que sirven para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas. Por otra parte, una concentración mayor de algunos compuestos puede ser la respuesta a una falta de nutrientes y déficit de agua, restringiendo finalmente el crecimiento de las plantas y una reducción en la velocidad fotosintética; los carbohidratos no estructurales tienden a ser acumulados y pueden explicar el aumento de síntesis de sustancias de defensas basadas en carbono pertenecientes al metabolismo secundario. La confirmación de este balance entre carbono y nutrientes, ha sido observada en especies que se desarrollan en medios con baja disponibilidad de agua o nutrientes, en las que existe un aumento en la concentración de taninos condensados, lignina, fenoles totales y/o glucósidos de fenoles (Gershenzon, 1984; Bryant y Julkunen-Tiitto, 1995). La concentración en compuestos químicos de las plantas micorrizadas puede ser mayor, ya que al estar en simbiosis se tiene acceso a nutrientes y la planta no está sometida algún estrés, Rasouli-Sadaghiani *et al.*, (2010) mencionan que un mecanismo que probablemente expliqué la participación de los HMA en el incremento de metabolitos secundarios, puede estar correlacionado con la facilitación nutrimental, pues dichos nutrientes pueden contribuir a la elaboración de precursores importantes en la síntesis de los compuestos.



## X. CONCLUSIONES

El inocular con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) las plantas de *Dracocephalum moldavica*, benefició su crecimiento y concentración en los metabolitos secundarios.

El inocular con HMA para la formación de micorriza en la raíz de *D. moldavica* favoreció el desarrollo desde la plántula hasta la floración; las plantas micorrizadas tuvieron mayor desarrollo vegetal (altura y número de hojas) en comparación a las no micorrizadas.

Se obtuvieron nueve compuestos químicos de la planta completa (tallos, hojas y flores) de *Dracocephalum moldavica*, observándose mayor concentración en cinco compuestos químicos (Timina; 4H-piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-; Benzofurano, 2,3-dihidro-; Inosina y n-hexadecanoico ácido) en plantas micorrizadas y los cuatro compuestos restantes (Monometil malonato; 2-furancarboxaldehído; 5- (hidroximetil) -; .cis-Geraniol y 1,15-Pentadecanediol) tuvieron mayor concentración en plantas no micorrizadas.

De los nueve compuestos químicos reportados para la planta, ocho son nuevos registros para *D. moldavica*.

De los compuestos obtenidos en el estudio para *D. moldavica* y los compuestos reportados en la literatura para *A. mexicana*, no hubo ninguna similitud entre las dos plantas.

Se registraron ocho géneros y diez especies de hongos micorrízicos arbusculares presentes en el suelo del Parque Estatal "El Faro", Estado de México, que fue usado como inóculo. Los géneros predominantes fueron *Acaulospora*, *Entrophospora* y *Funneliformis*.

## **XI. RECOMENDACIONES**

Continuar realizando estudios de *Dracocephalum moldavica* y sus metabolitos secundarios presentes en hoja, flor y tallo, ya que en México se tiene información escasa de esta planta en relación a su uso medicinal.

Comparar los metabolitos secundarios entre *D. moldavica* y *Agastache mexicana* y así encontrar más similitudes entre estas y por lo cual están siendo confundidas y utilizadas para los mismos remedios.

Llevar a cabo el mismo estudio, bajo condiciones de vivero, para comparar los resultados.

## XII. LITERATURA CONSULTADA

- Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4<sup>th</sup> Ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804 pp.
- Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. 1996. Dinámica de colonización y efecto de hongos endomicorrízicos sobre el crecimiento de *Casuarina equisetifolia* L. In: Pérez-Moreno, J. y Ferrera-Cerrato, R. (eds.). Nuevos horizontes en agricultura: Agroecología y desarrollo sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. 298-302 pp.
- Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J.J. y Villegas-Monter, A. 1997a. Distribución de carbohidratos y fósforo en la simbiosis *Citrus volkameriana*-*Glomus* spp. In: Ordaz-Chaparro, V., Alcántar G., Castro, C. B. y Mejía M.P. (eds.). La investigación edafológica en México 1996-1997. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Villahermosa, Tabasco. 131 pp.
- Alexaides, M.N. and Sheldon, J.W. 1996. Selected guidelines for ethnobotanical research: a field manual. New York Botanical Garden, Bronx, N. Y., U.S.A. 306 pp.
- Alkaraki, G.M and Clark, R.B. 1998. Growth, mineral acquisition and weater use by mycorrhizal wheat grown under weater stress. *J. of Plant Nutrition*, 21 (2):263.
- Alkaraki, G.M. 1998. Benefit, cost and weater use efficiency of arbuscular mycorrhizal durum wheat grown under drought stress. *Mycorrhiza*. 8 (1):41
- Allen, M.F. 1991. The ecology of mycorrhizae. University Press, Cambridge. 184 pp.
- Álvarez-Sánchez, F.J. y Monroy, A. 2008. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízica y sus implicaciones en la restauración. Las prensas de Ciencias, UNAM, México, D.F. 244 pp.
- Álvarez- Sánchez, J. y Naranjo G.E. 2003. Ecología del suelo en la selva tropical húmeda de México. Instituto de Ecología, A.C., Instituto de Biología y Facultad de Ciencias, UNAM. Xalapa, México. 316pp.
- Arango, M. C., Ruscitti, M. F., Ronco, M. G., and Beltrano, J. 2012. Mycorrhizal fungi inoculation and phosphorus fertilizer on growth, essential oil production and nutrient

uptake in peppermint (*Mentha piperita* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(4), 692-699.

Ávalos, A. y Pérez-Urria E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. *Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145.

Bryant, J. P., and Julkunen-Tiitto, R. 1995. Ontogenic development of chemical defense by seedling resin birch: energy cost of defense production. *Journal of Chemical Ecology*, 21(7), 883-896.

Caballero, J. y Cortés, L. 2001. Percepción uso y manejo tradicional de los recursos vegetales en México. In: *Plantas Cultura y Sociedad*. B Rendón, S Rebollar, J Caballero, M A Martínez (eds). Universidad Autónoma Metropolitana–SEMARNAP, México D.F. 79–100 pp.

Camargo-Ricalde, S.L., Montaña N.M., Rosa-Mera C.J.D.L. y Arias S.A.M. 2012. Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria* [en línea]. 1 de julio de 2012, Vol. 13, No.7 [Consultada: 16 de julio de 2015]. Disponible en Internet: [<http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/index.html>] ISSN: 1607-6079.

Canales, M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar A., Durán A. y Lira R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán–Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Bot. Mex.* 75:21–43.

Casas, A., Valiente-Banuet A., Viveros J.L., Dávila P., Lira R., Caballero J., Cortés, L. and Rodríguez I. 2001. Plant resources of the Tehuacán Valley, México. *Econ. Bot.* 55:129–166.

Castellanos, I. and Espinosa-García, F.J. 1997. Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: a test with *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and seed secondary metabolites. *Biochemical Systematics and Ecology* 25:591-602.

Carrillo-Vergara, E.J., Peredo-Beltrán, S., Chimal-Sánchez, E. y García-Sánchez, R. (2013, octubre). Riqueza de hongos micorrizógenos arbusculares en plantas medicinales del Parque Estatal “Cerro El Faro”, Tlalmanalco, Estado de México.

Cartel presentado en el 9° Congreso de Investigación en la FES Zaragoza, D. F., México.

- Cervantes, R.M.C. 2002. Plantas de importancia económica de las zonas áridas de México. Instituto de Geografía UNAM México 1-21 pp.
- Costa, J., Cervera, S., Cunill, F., Esplugas, S., Mans, C. y Mata, J. 2004. Curso de Ingeniería Química. España: Reverté. S.A. 456 pp.
- Copetta, A., Lingua, G. and Berta, G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. Mycorrhiza, 16: 485–494.
- Cristians, S., Madariaga, A. y Mendoza, K. 2015. Catálogo de Plantas Medicinales selectas cultivadas en la Ciudad de México enfocado al Control de Calidad. SEDEREC, Cd. de México. 60 pp.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). pp. 1250-1318. In: B. Buchanan., W. Gruissem., and R. Jones R. (eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Vol. 24. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1367 pp.
- Cuartero, J. and Fernández-Muñoz R. 1999. Tomato and salinity. Sci. Hortic. 78:83-125.
- Cuenca, G., De Andrade, Z. y Escalante, G. 1997. Arbuscular mycorrhizae in the rehabilitation of fragile degraded tropical lands. Biology and fertility of soils, 26(2), 107-111.
- Cuevas, A. y Brambila, B. 2003. Química I. México: Umbral. 131 pp.
- Dassi, B., Dumas-Gaudot, E. and Gianinazzi, S. 1998. Do pathogenesis-related (PR) proteins play a role in bioprotection of mycorrhizal tomato roots towards *Phytophthora parasitica*?. Physiological and Molecular Plant Pathology, 52(3), 167-183.
- Dastmalchi, K., Dorman H.J.D., Koşar M. and Hiltunen R. 2007. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water soluble extract of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract Food Science and Technology, 40 (2), 239–248 pp.

- Dávila, P., Arizmendi M.C., Valiente–Banuet A., Casas A., Villaseñor J.L. and Lira S.R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán–Cuicatlán Valley. *Biodiv. Conserv.* 11:421–442.
- De la Rosa Mera, C.J. 2011. Micorriza arbuscular y estrés abiótico en el contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Tesis M. en C. Montecillo, Texcoco. Colegio de Postgraduados. 96- 99 pp.
- Díaz, R. y Gamazo C. 1995. Manual de Técnicas de Investigación. Masson. España. 63-67pp.
- Espinosa-García, F.J. 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal, pp. 231-249, en Anaya, A.L., Espinosa-García, y Cruz-Ortega, R. (eds), *Interacciones Químicas ente Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su aplicación*. UNAM, Plaza y Valdez., México D.F.
- Fernández, R. 2008. Las micorrizas: desenterrando un tesoro. *Revista Agricultura Orgánica*. 22-25 pp.
- Ferrera, C.R. y Alarcón A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*. Vol.8. No.2. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. 175-183 pp.
- Firenzuoli, F. and Gori, L. 2007. Herbal medicine today: clinical and research issues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(S1), 37-40.
- Fitter, A.H. and Hay R.K.M. 2002. *Environmental physiology of plants*. 2<sup>a</sup> ed. Academic Press, London.
- Fonnegra, R., y Jiménez, S. 2007. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia. 368 pp.
- Franco, A. D. y Cano, I. G. 2006. Colonización micorrízica arbuscular y crecimiento de genotipos de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(3), 203-206.
- Freitas, M.S., Martins, M.A., Curcino, I. and Vieira, I.J. 2004 Yield and quality of essential oils of *Mentha arvensis* in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesqui Agropecu Bras*, 39: 887–894.

- Gerdemann, J.W. and Nicolson T. H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological society*, 46(2), 235-244 pp.
- Gershenzon, J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In *Phytochemical adaptations to stress*. Springer US. 273-320 pp.
- González, R.M., Montagut, P., Sansón M.C. y Salcedo, R. 2014. *Problemario de Química*. México: Grupo Editorial Patria. 272 pp.
- Hardy, K., Buckley, S., Collins, M.J., Estalrich, A., Brothwell, D., Copeland, L., García-Taberner, A., García-Vargas, S., De la Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., Huguet, R., Bastir, M., Santamaría, D., Madella, M., Wilson, J., Cortés, A.F., and Rosas, A. 2012. Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*, 99(8), 617-626.
- Harley, R.M. and Pastore J.F.B. 2012. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa* 58:1-55.
- Harrison, M.J. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*. 59:19-42.
- Hernández-Cuevas, L., Castillo A.S., Guadarrama C.P., Martínez O.Y., Romero R.M. y Sánchez G.I. 2003. *Hongos micorrizógenos arbusculares del Pedregal de San Ángel*. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 82 pp.
- Hernández, T., Canales M., Caballero J., Durán A. y Liras R. 2005. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Interciencia* 30:17–27.
- Hildebrandt, U., Reguar M. and Bothe H. 2007. Arbuscular micorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68 139-146.
- Hunt, R., Causton D.R., Shipley B. and Askew A. P. 2002. A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany*, 90(4), 485-488.

- Ioset, J.R., Raelison G.E. and Hostettmann K. 2003. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), 29-36.
- Jakobsen, I., Joner E.J. and Larsen J. 1994. Hyphal phosphorus transport, a keystone to mycorrhizal enhancement of plant growth. In *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser Basel. 133-146 pp.
- Jerez, E. 2013. Efectos de periodos cortos de estrés e inoculación micorrízica en el comportamiento de la albahaca blanca (*O. basilicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 25(2), 29-35.
- Kakasy, A., Füzfai, Z., Kursinszki, L., Molnár-Perl, I., and Lemberkovics, É. 2006. Analysis of non-volatile constituents in *Dracocephalum* species by HPLC and GC-MS. *Chromatographia*, 63(13), S17-S22.
- Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K.G. 2002. *Glomus macrocarpum*, a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in dill (*Anethum graveolens* L.) and carum (*Trachyspermum ammi* L. Sprague). *World J. Microbiol. Biotechnol*, 18: 459–463.
- Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K.G. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource Technol.*, 93: 307–311.
- Kerrola, K. and Kallio, H. 1993. Volatile compounds and odor characteristics of carbon dioxide extracts of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits. *J. Agric. Food Chem.* (41):785-790.
- Khaosaad, T., Vierheiling, H., Nell, M., Zitterl-Eglsser, K. y Novak, J. 2006. Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16:443-446.
- Khaliq, A. and Janardhanan, K.K. 1997. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on the productivity of cultivated mints. *J. Med. Arom. Plant Sci.*, 19: 7–10.
- Koh, H. L., Wang, H., Zhou S., Chan, E. and Woo, S.O. 2006. Detection of aristolochic acid I, tetrandrine and fangchinoline in medicinal plants by high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40(3), 653-661.



- Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, Ed. Omega, Barcelona España, 32-41 pp.
- Leonti, M., Sticher O. and Heinrich M. 2003. Antiquity of medicinal plant usage in two Macro–Mayan ethnic groups (México). J. Ethnopharmacol. 88:119–124.
- Linares, E., Flores, B. y Bye, R. 1993. Selección de Plantas Medicinales de México. Limusa. México. 98 pp.
- Linares, D., Bye R. y Flores, B. 1999. Plantas Medicinales de México. Usos, Remedios y Tradiciones. Instituto de Biología, UNAM, México. 155 pp.
- López, M.L. 2007. Evaluación de 5 inóculos multiespecíficos de hongos producidos en el invernadero. Tesis de Licenciatura. Fes Zaragoza UNAM. 92 pp.
- Lu, X., and Koide, R.T. 1994. The effects of mycorrhizal infection on components of plant growth and reproduction. New Phytologist, 128(2), 211-218.
- Mann, J. 1987. Secondary metabolism. 2<sup>a</sup> ed. Oxford University Press. New York.
- 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, 17(1), 9-15.
- Martin, G. 2001. Etnobotánica: Manual de métodos. Norda-Comunidad. Montevideo, Uruguay. 240 pp.
- Mar-Rodríguez, R. 2016. Crecimiento de toronjil (*Dracocephalum moldavica* L.) micorrizado, en condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de estudios Superiores Zaragoza. Carrera de Biólogo. 56 pp.
- Martínez-Vázquez, M., Estrada-Reyes, R., Martínez-Laurrabaquio, A., López-Rubalcava, C. and 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(3), 908-917.
- Mena-Echevarría, A., Fernández-Suárez, K., Jerez-Mompie, E., Olalde-Portugal, V. y Serrato, R. 2011. Influencia de la inoculación con *Glomus hoilike* y un conglomerado de especies de HMA en el crecimiento de plantas de sorgo sometidas o no a estrés hídrico. Cultivos Tropicales, 32(1), 16-27.

- Merryweather, J. and Fitter, A. 1996. Phosphorus nutrition of and obligately mycorrhizal plant treated with the fungicide benomyl in the field. *New Phytol.* 132:307.
- Monroy-Ortiz, C. y Monroy R. 2006. Las plantas, compañeras de siempre: la experiencia en Morelos. Laboratorio de Ecología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.
- Monroy, C. y Castillo, P. 2007. Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos. 2da ed. Universidad Autónoma de Morelos, CONABIO. 405 pp.
- Morton, J.B. and Benny, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zigomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an amendment of Glomaceae. *Mycotaxon* 37(1): 471-491.
- Mujica-Pérez, Y. 2012. Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) por dos vías diferentes en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 33(4), 71-76.
- Muñoz, F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Cuarta reimpresión. Mundi-prensa. España.
- NCBI. 2010. Glomeromycota Taxonomy. [http://www.Amf-phylogeny\\_home](http://www.Amf-phylogeny_home).
- Nemec, S. and Lund, E. 1990. Leaf volatiles of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Citrus jambhiri* Lush. *J. Essent. Oil Res.*, 2: 287–297.
- Noa, M., Pérez N., Díaz G. y Vega S. 2005. Análisis de Glicomacropéptido (GMP) de suero de quesería en leche por HPLC. *Cromatografía de Gases y de Líquidos de Alta Resolución: Aplicación en el análisis de alimentos*. Editados por Universidad Autónoma Metropolitana. Serie Académicos CBS No 57. ISBN 970-331-0297-2. 305-310 pp.
- Oehl, F., Souza, F.A. and Sieverding, E. 2008. Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. *Mycotaxon* 106: 311–360.
- Oehl, F., Silva, G.A., Goto, B.T. and Sieverding, E. 2011a. Glomeromycetes: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116: 75–120.
- Oehl, F., Silva, G.A., Goto B.T., Maia, L.C. and Sieverding, E. 2011b Glomeromycota: two new classes and a new order. *Mycotaxon*: 365–379.

- Oehl, F., Silva G.A., Maia, L.C., Sousa, N.M.F., Vieira, H.E.E. and Silva, G.A. 2011c. *Orbispora* gen. nov., ancestral in the Scutellosporaceae (Glomeromycetes). *Mycotaxon* 116: 161–169.
- Oehl, F., Silva, G.A., Sánchez-Castro, I., Goto, B.T., Maia, L.C., Vieira, H.E.E., Barea, J.M., Sieverding, E. and Palenzuela, J. 2011d. Revision of Glomeromycetes with entrophosporoid and glomoid spore formation with three new genera. *Mycotaxon* 117: 297–316.
- Olalde, P.V. 1997. Fisiología de plantas micorrizadas. In: Memorias del VI Congreso Nacional de Micología/IX Jornadas Científicas. Tapachula, Chiapas. 51 pp.
- 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. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (89), 115-121.
- OMS. 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002- 2005. Ginebra: OMS.
- Pandey, D.K. and Banik. R.M. 2009. The influence of dual inoculation with *Glomus mosseae* and *Azotobacter* on growth and barbalion content of *Aloe vera*. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3:703-714.
- Pattinsib, G.S., Hammill, K.A., Sutton, B.G. and McGee, P.A. 1990. Simulated Fire Reduces the Density of Arbuscular Mycorrhizal Fungi at the Soil Surface. *Mycological Reseaych*. 103: 491-496.
- Peña-Cortés, H. and Willmitzer, L. 1995. The role of hormones in gene activation in response to wounding. pp. 395-414. In: P.J Davis (ed.). *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 833 pp.
- Peterson, R. L. and Farquhar, M.L. 1994, "MycorrhizasIntegrated development between roots and fungi", *Mycologia*, 86 (3), 311-326.
- Phillips, J.M. and Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- Prance, G. 1991. What is the ethnobotany today? *Journal Ethnopharmacology* 32: 209-216.

- Pulido, L. E., Medina, N. y Cabrera, A. 2003. La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y cebolla (*Allium cepa* L.). I. Crecimiento vegetativo. Cultivos Tropicales, 24(1), 15-25.
- Quiñones-Aguilar, E. E., López-Pérez, L., y Rincón-Enríquez, G. 2014. Dinámica del crecimiento de papaya por efecto de la inoculación micorrízica y fertilización con fósforo. Revista Chapingo. Serie horticultura, 20(2), 223-237.
- Rasouli-Sadaghiani, M., Hassani, A., Barin, M., Rezaee, D.Y. and Sefidkon, F. 2010. Effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on growth, essential oil production and nutrients uptake in basil. Journal of Medicinal Plants Research 4(21): 2222-2228.
- Reyes-Jurado, F., Palou, E. y López-Malo A. 2012. Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 6, 29-39.
- Reyes, R. S., 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: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar, (4), 2.
- Rivas, G.G. 1997. Micorrizas: manejo integrado de plagas. Hoja Técnica. 20:1.
- Rodríguez-Calderón, R. 2011. Establecimiento de plantas de zacate navajita *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. Ex Griffiths inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) sometidas a sequía en condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura en Biología. UNAM FES Zaragoza, México.
- Salvioli, A., Zouari, I., Chalot, M., and Bonfante, P. 2012. The arbuscular mycorrhizal status has an impact on the transcriptome profile and amino acid composition of tomato fruit. BMC plant biology, 12(1), 44.
- Savolainen, V., Chase Y., Hoot, L., Morton, S.B., Soltis, C. M., Bayer, D.E., Fay, C., Bruijn, A. Y., Sullivan, S. and Qiu, Y. L. 2000. Phylogenetics of flowering plants based upon a combined analysis of plastid atpB and rbcL gene sequences. Systematic Biology 49:306-362.

- Sekhara, R.D., Schorderet, R. M., Feller, U. and Reinhardt, D. 2007. A petunia mutant affected in intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Journal* 51:739-750.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. y Rocha-Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Schüßler, A. and Walker, C. 2010. The Glomeromycota. A Species List with New Families and New Genera. Arthur Schüßler & Christopher Walker, Gloucester Disponible en línea:  
<[www.lrz.de/~schuessler/amphylo/Schuessler&Walker2010\\_Glomeromycota.pdf](http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/Schuessler&Walker2010_Glomeromycota.pdf)>
- Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello. Colombia. 195-202 pp.
- Skoog, D.A. y Leary J.J. 1996. Análisis instrumental. McGraw Hill. España, 4ª ed. 935 pp.
- Skoog, D. A., West D.M. y Holler F.J. 1997. Fundamentos de Química Analítica. Reverté, S.A. Berceña, 4ª ed. 615 pp.
- Smith, S.E. and Read, D.J. 2010. Mycorrhizal simbiosis. Academic Press: California, USA. 3rd Edition. 800 pp.
- Soto, R., Vega G. y Tamajón A.L. 2002. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus*. Stapf (caña santa). *Rev. Cubana Plantas Med.* 7:89-95.
- Tedersoo, L., Hansen, K., Perry, B.A. and Kjølner, R. 2006. Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* 170:581-596.
- Toussaint, J.P., Smith, A. and Smith, E. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza*. 17:291-297.
- Van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglou, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. and Sanders I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- Vidal, C.M.C. 2003. El desarrollo de la legislación sobre plantas medicinales en la comunidad europea y su incorporación en el ordenamiento jurídico español. Su problemática. *Derecho y Salud*. 11: 65-108.

- Villarino, V.T. 1999. Las plantas de extractos bases para un plan de desarrollo del sector. Mundi-prensa, Fundación Alfonso Martín Escudero, España.
- Villar, R., Ruíz-Robledo, J., Quero, J.L., Poorter, H., Valladares, F. y Marañón, T. 2008. Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. En: Valladares, F. (ed.), Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante (segunda edición), Ministerio de Medio Ambiente. EGRAF, S. A., Madrid. 193-230 pp.
- Wink, M. 2007. Bioprospecting: the search for bioactive lead structures from nature. Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications, 97-116 pp.
- Xiwen, L. and Hedge, I. C. 1994. Lamiaceae. En: Wu, Z. Y. y P. H. Raven, (eds.) Flora of China. Vol. 17 (Verbenaceae through Solanaceae). Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. 50- 299 pp.
- Yang, S., Wang, L., Guo, X., Lou, H., and Ren, D. 2013. A new flavonoid glycoside and other constituents from *Dracocephalum moldavica*. Natural product research, 27(3), 201-207.
- Zeng, Y., Guo, L.P., Chen, B.D., Hao, Z.P., Wang, J.Y., Huang, L.Q. and Zhang, Y. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and prospectives. Mycorrhiza, 23(4), 253-265 pp.

### **Páginas web consultadas**

- Libro del Web de Química del NIST (National Institute of Standards and Technology). Departamento de Química, Universidad de Aveiro, Portugal. (Fecha de consulta: 20 de febrero 2016). Disponible en: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana 2009. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. (Fecha de consulta: 28 de agosto 2016). Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>