



Revista Chilena de Historia Natural

ISSN: 0716-078X

editorial@revchilhistnat.com

Sociedad de Biología de Chile

Chile

DE LA ROSA-MERA, CLAUDIA; FERRERA-CERRATO, RONALD; ALARCÓN,
ALEJANDRO; SÁNCHEZ-COLÍN, MARÍA DE JESÚS; FRANCO-RAMÍREZ, ALICIA
Aislamiento de consorcios de hongos micorrícicos arbusculares de plantas medicinales y
su efecto en el crecimiento de vinca (*Catharanthus roseus*)

Revista Chilena de Historia Natural, vol. 85, núm. 2, 2012, pp. 187-198

Sociedad de Biología de Chile

Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=369944301005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Aislamiento de consorcios de hongos micorrícicos arbusculares de plantas medicinales y su efecto en el crecimiento de vinca (*Catharanthus roseus*)

Isolation of arbuscular mycorrhizal fungi consortia from medicinal plants and their effectiveness on growth of vinca (*Catharanthus roseus*)

CLAUDIA DE LA ROSA-MERA^{1, 3}, RONALD FERRERA-CERRATO¹, ALEJANDRO ALARCÓN^{1, *},
MARÍA DE JESÚS SÁNCHEZ-COLÍN² & ALICIA FRANCO-RAMÍREZ¹

¹Área de Microbiología, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Carretera Federal México- Texcoco km 36.5, Montecillo 56230, Estado de México

²Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Fuerte de Loreto esq. Batalla del 5 de Mayo s/n, Ejército de Oriente, Iztapalapa 09230, Distrito Federal, México

³Dirección actual: Departamento de Biología (Área de Botánica), División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco No. 186, Vicentina, Iztapalapa, 09340, Distrito Federal, México

*Autor correspondiente: aalarconcp@gmail.com

RESUMEN

Este trabajo consistió en propagar e identificar hongos micorrícicos arbusculares (HMA) recolectados de plantas medicinales (PM) de áreas naturales de bosques mixtos, y seleccionar consorcios micorrícicos con base en la promoción del crecimiento de vinca *Catharanthus roseus* (L) G. Don, planta medicinal cuyos alcaloides tienen propiedades antineoplásicas. En la primera fase experimental se recolectaron raíces y suelo rizosférico de 13 PM establecidas en campo para evaluar el porcentaje de colonización total (PCT) y cuantificar el número de esporas; además, se tomó una parte del suelo para establecer plantas trampa en invernadero durante 10 meses, y posteriormente evaluar el PCT e identificar los principales géneros de HMA. Todas las PM en su condición natural presentaron colonización micorrícica, observándose cuatro géneros de HMA (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*), de los cuales *Acaulospora* y *Glomus* fueron los predominantes. En la segunda fase experimental se seleccionaron ocho consorcios con base en el PCT (> 40 %) obtenido en las plantas trampa, que correspondieron a las muestras recolectadas de *Adiantum capillus-veneris* L., *Castilleja tenuiflora* Benth., *Erigeron karvinskianus* DC., *Pimpinella anisum* L., *Plantago major* L., *Ricinus communis* L., *Rubus fruticosus* L. y *Rumex mexicanus* Meisn. Estos consorcios fueron inoculados en plántulas de *C. roseus* para evaluar su capacidad de estimular el crecimiento de esta especie en condiciones de invernadero. Después de 70 días, a pesar de presentar un solo género predominante (*Glomus*), el consorcio aislado de *R. mexicanus* promovió de manera más consistente el crecimiento de *C. roseus* (número de hojas, área foliar y peso seco foliar) en comparación con el resto de los consorcios micorrícicos.

Palabras clave: colonización micorrícica, cultivos trampa, planta medicinal, selección de hongos micorrícicos, simbiosis micorrícica.

ABSTRACT

This study consisted on propagating and identifying arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) collected from medicinal plants (MP) of natural areas of mixed forest (Estado de Mexico), and selecting mycorrhizal consortia based on the growth promotion of *Catharanthus roseus* (L) G. Don, medicinal plant whose alkaloids have antineoplastic properties. In the first experimental stage, roots and rhizospheric soil were collected from the 13 MP in which the mycorrhizal colonization percentage (MCP) and the number of spores were assessed; in addition, soil samples were used for establishing culture traps under greenhouse conditions for 10 months and thus, the main AMF genera were identified. All MP showed AMF colonization, and four fungal genera were identified (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, and *Scutellospora*) from which *Acaulospora* and *Glomus* were predominant. The second experimental stage allowed the selection of eight consortia based on the MCP of trap cultures (> 40 %), that corresponded to samples collected from *Adiantum capillus-veneris* L., *Castilleja tenuiflora* Benth., *Erigeron karvinskianus* DC., *Pimpinella anisum* L., *Plantago major* L., *Ricinus communis* L., *Rubus fruticosus* L. and *Rumex mexicanus* Meisn. These consortia were inoculated to *C. roseus* to evaluate their capability for stimulating the plant growth under greenhouse conditions. After 70 days, in spite of presenting only one predominant AMF genus (*Glomus*), the consortium isolated from *R. mexicanus* showed more consistent effects on the growth of *C. roseus* (leaves number, leaf area and leaf dry weight) when compared to the remaining mycorrhizal consortia.

Key words: culture trap, medicinal plant, mycorrhizal colonization, mycorrhizal symbiosis, selection of mycorrhizal fungi.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) no son capaces de crecer en ausencia de una planta hospedante, por lo que son considerados simbioses obligados, condición biológica que representa mayor dificultad para propagarlos masivamente. La manera más común de propagar a los HMA consiste en colocar sus esporas o propágulos en un suelo previamente esterilizado y sembrar la semilla de una planta micorrícica. Al cabo de cuatro meses, el suelo y las raicillas de la planta trampa pueden utilizarse como un inoculante de HMA (Blanco & Salas 1997, Cuenca et al. 2007). La planta micorrícica, también llamada “planta trampa”, debe tener características especiales como: (1) ser micotrófica obligada y no selectiva a las diferentes especies de HMA; (2) adaptarse a un rango amplio de condiciones de suelo y clima; (3) fácil de mantener en cultivo; (4) con semillas de alto porcentaje de germinación, sin necesidad de procesos de escarificación complicados; y (5) no debe ser altamente susceptible a enfermedades de hábito radical (Salas & Blanco 2000).

Un inóculo es definido como un producto biológico (líquido o sólido) que facilita la introducción de propágulos de microorganismos cuyas actividades fisiológicas auxilian en el crecimiento y desarrollo de las plantas. En el caso de los HMA, el inoculante suele consistir ya sea de esporas, hifas, fragmentos de raíces colonizadas o suelo rizosférico donde se detecte una abundancia de hifas de HMA (Alarcón et al. 2004). El inóculo de HMA obtenido a partir de “plantas trampa”, usualmente es incorporado al sustrato mediante dos métodos, (1) mezclándolo uniformemente con el sustrato, previo al llenado de los recipientes o macetas; o bien (2) colocándolo en bandas de 3 a 5 cm, bajo la superficie del sustrato. Aunque este último método puede ser muy laborioso, se asegura un rápido contacto entre las raíces y el hongo, a medida que las raíces crecen hacia las bandas de inóculo (Castellano & Molina 1989).

La inoculación utilizando un inóculo obtenido por el método de “plantas trampa” provee la mejor fuente de HMA por varias razones, y cuando es producido de manera apropiada, existe mínimo riesgo de introducir plagas o enfermedades, ya que el inóculo es confiable, eficiente y fácil de aplicar. Además,

la “planta trampa” permite a la vez seleccionar cepas de HMA que favorezcan el crecimiento y la nutrición vegetal (Castellano & Molina 1989).

La asociación que establecen los HMA no es específica ya que cualquiera de estos puede colonizar diferentes plantas susceptibles de formar esta simbiosis. Sin embargo, algunos hongos benefician en mayor grado a un determinado hospedante en comparación con otros, aun bajo determinadas condiciones edafoclimáticas, lo que denota diferencias funcionales existentes entre especies de HMA. Lo anterior resalta la importancia de seleccionar cepas de HMA o consorcios de ellos, para dirigirlos a una especie vegetal o condición muy específica, con el fin de tener resultados satisfactorios en su crecimiento (Rodríguez et al. 2004, Trejo et al. 2011).

Varios factores intervienen en la efectividad de la simbiosis micorrícica como el genotipo del HMA, la especie de la planta y las características químicas, físicas y biológicas del suelo (Brundrett & Abbott 2002, Kosuta et al. 2005, Baar 2008). Así, la selección específica de HMA debe preceder a su uso en grandes escalas, considerando la planta y las condiciones ambientales específicas (Cavallazzi et al. 2008). En el caso de los consorcios micorrícicos arbusculares se plantea la hipótesis de que la composición de especies fúngicas que intervienen en una rizósfera de una planta medicinal (PM) en particular puede tener mayor efecto benéfico en comparación con aquellos consorcios o cepas de HMA aislados de plantas no medicinales y que han sido probados exitosamente en plantas de interés agrícola o frutícola. Los objetivos del presente estudio fueron: (1) propagar e identificar HMA de consorcios obtenidos de PM, propagados en cultivos trampa, y (2) comparar su efecto benéfico en el crecimiento de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., y seleccionar al más promisorio para esta PM cuya importancia radica en su capacidad de producir alcaloides con propiedades antineoplásicas (Levésque & Jehl 2007).

MÉTODOS

Fase 1. Propagación y selección de consorcios de HMA obtenidos de la rizósfera de PM

Se realizó un muestreo aleatorio de la rizósfera de 13 PM encontradas en áreas naturales de bosques mixtos (Parque Izta-Popo, Estado de México) en donde se

delimitó una superficie de 12 m²; para cada especie de PM encontrada en el área seleccionada, se tomó toda la raíz y suelo rizosférico de cinco individuos de una misma especie. El suelo de donde se recolectaron las muestras rizosféricas corresponde a un andosol de origen volcánico, moderadamente ácido (pH 5.6) y con alto contenido de materia orgánica (15.7 %); la clase textural es franco-arenosa con 10.1 % de arcilla, 15.8 % de limo y 74 % arena 74 %; con buen drenaje y buena aireación con densidad aparente de 0.72 g cm⁻³. A partir del suelo rizosférico recolectado (200 g aproximadamente) de cada individuo de PM, se conformó una sola muestra compuesta (1 kg aproximadamente) para su posterior análisis y uso en los cultivos trampa. Los ejemplares de cada especie vegetal fueron colocados en una prensa botánica para su posterior identificación taxonómica.

En las raíces de las PM se evaluó la colonización micorrícica por el método de clareo y tinción con azul tripiano (Phillips & Hayman 1970) y el porcentaje de colonización total (PCT) fue estimado por el método de Biermann & Linderman (1981). Una parte del suelo rizosférico fue utilizado para extraer y cuantificar el número de esporas de HMA (Gerdemann & Nicolson 1963), expresado en 100 g de suelo seco. Dada la cantidad de raíz y suelo rizosférico recolectado para cada especie medicinal directamente de campo, misma que se utilizaría para establecer las plantas trampa, no se contempló un análisis estadístico para la estimación del PCT y para la estimación del número de esporas a partir las muestras recolectadas de campo, por lo que estas determinaciones solo se hicieron en dos réplicas de muestras compuestas de raíz o de suelo de cada PM.

La otra parte del suelo (800 g aproximadamente) se utilizó para propagar las esporas presentes en la rizósfera de cada una de las PM recolectadas, mediante cultivos trampa en condiciones de invernadero (Salas & Blanco 2000). Se estableció una sola repetición de plantas trampa para cada muestra compuesta de suelo recolectada de cada PM. El suelo rizosférico, el cual incluía fragmentos de raíces colonizadas y micelio y esporas de los HMA, se colocó en una maceta con arena estéril (1.2 kg) y se sembró con semillas de *Bracharia brizantha* Hochst. Staf., dadas sus características de formar simbiosis con HMA y por producir abundante raíz, lo que permite tener mayor oportunidad para el establecimiento de la simbiosis y producción de propágulos micorrícicos. A cada maceta con las plantas trampa se aplicaron riegos semanales con solución nutritiva Long Ashton modificada para aplicar 11 mg P L⁻¹ (Hewitt 1966), durante su permanencia en condiciones de invernadero. Después de diez meses, las plantas trampa fueron cosechadas para determinar en duplicados, el PCT en raíz, y el recuento de esporas en 10 g, mediante los procedimientos previamente descritos.

La identificación de los géneros de HMA se basó en la caracterización morfológica de las esporas, considerando el tipo de hifa de sostén, así como el tamaño, la forma, la ornamentación, y el número y el grosor de las capas que conforman la pared de la espóra (Varela-Fregoso & González-Chávez 2007). Las esporas extraídas del suelo sin aparente daño mecánico, fueron examinadas al microscopio estereoscópico, seleccionadas por sus similitudes morfológicas y colocadas en portaobjetos en grupos de 20 a 25 esporas, y en otro portaobjetos se colocó el mismo grupo y número de esporas, las cuales fueron rotas con cuidado. Cada preparación fue observada al microscopio de campo claro para caracterizar las capas que conforman la pared de las esporas, y realizar las mediciones correspondientes. La identificación se basó en las claves de los especímenes

incluidos en la página web del INVAM (2008). A partir de las preparaciones, se tomaron fotografías con microscopio óptico (Olympus, Modelo BX5, Japón).

Fase 2. Efectividad de consorcios de HMA en la promoción del crecimiento de Catharanthus roseus (L.) G. Don.

Las plántulas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don variedad Pacífica rojo cereza (adquiridas en la empresa Plántulas de Tetela S. de R. L. de C. V. Cuernavaca, Morelos) con siete semanas de crecimiento fueron llevadas al invernadero para ser trasplantadas a macetas que contenían 1 kg de sustrato constituido por turba y agrolita (1:1 v/v) previamente pasteurizado durante tres días. La temperatura y la humedad relativa fue monitoreada con una miniestación climática (data logger watchdog modelo 150, Spectrum® Technologies Inc., Illinois, USA). La humedad relativa promedio máxima fue de 82.9 % ± 7.05 y mínima de 25.78 % ± 11.08, y la temperatura promedio máxima de 35.4 °C ± 5.44 y mínima de 13.7 °C ± 1.60. Las plántulas fueron inoculadas al momento del trasplante con 10 g del inóculo correspondiente a cada planta trampa, aplicándolo directamente sobre el sistema radical (Alarcón et al. 2004).

Se consideraron once tratamientos que incluyeron al testigo, la inoculación individual de cada uno de los ocho consorcios obtenidos y propagados de las PM (*Adiantum capillus-veneris* L., *Castilleja tenuiflora* Benth., *Erigeron karvinskianus* DC., *Pimpinella anisum* L., *Plantago major* L., *Ricinus communis* L., *Rubus fruticosus* L. y *Rumex mexicanus* Meisn.), así como la inoculación del consorcio micorrícico *Glomus* Zac19 o con la cepa *Glomus intraradices* Schenk. Los inóculos del consorcio *Glomus* Zac19 y de la cepa *Glomus intraradices* Schenk & Smith fueron utilizados como cepas de referencia con base en sus efectos benéficos reportados en diferentes plantas (Godoy et al. 1993, Alarcón & Ferrera-Cerrato 1999, Khalil et al. 1999, Manjarrez-Martínez et al. 1999). Las plántulas fueron regadas cada tercer día con agua corriente, y cada ocho días se les aplicó un riego con solución nutritiva de Long Ashton.

Después de 70 días, las plantas fueron cosechadas para evaluar el número de hojas, el área foliar, la biomasa seca, y el PCT. El área foliar fue determinada con un medidor de área foliar (Area Meter, Modelo LI-3100; Nebraska, USA). La biomasa seca se obtuvo al pesar por separado hojas, tallos y raíces de *C. roseus*, en una balanza analítica (Sartorius, Modelo Analytic AC 210S, Illinois, USA), después de que los diferentes órganos de la planta fueron secados en un horno (FELISA, Modelo 242-A, D.F. México) a 70 °C por 72 h. El PCT fue evaluado por el método previamente mencionado.

El experimento contempló un diseño de tratamientos completamente al azar, con 11 tratamientos y cinco repeticiones cada uno. Los datos fueron analizados mediante el programa SAS para Windows (SAS Institute Inc. 2002), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$).

RESULTADOS

Fase 1. Propagación de consorcios y selección de HMA obtenidos de la rizósfera de PM

Las trece PM recolectadas presentaron colonización por HMA en su condición natural.

Los PCT oscilaron del 14 al 84 %, presentando el valor más alto la especie *T. lucida* y el más bajo *R. mexicanus* (Tabla 1). La especie *T. lucida* presentó el mayor número de esporas en su rizósfera, mientras que *R. mexicanus* presentó el menor número de ellas (Tabla 1). En las 13 PM se observó una diversidad taxonómica integrada por los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, predominando los géneros *Acaulospora* y *Glomus*. La rizósfera de *E. karvinskianus* presentó mayor número de géneros de HMA (cuatro géneros); en contraste, *C. tenuiflora*, *F. vesca* y *R. communis* presentaron un solo género de HMA en su rizósfera correspondiendo a *Acaulospora*, mientras que en *R. mexicanus* el único género identificado fue *Glomus* (Tabla 1).

De los trece consorcios micorrícicos propagados y obtenidos en cultivos trampa, se realizó una selección inicial basada en aquellos que presentaron un PCT superior al 40 %, con el fin de considerarlos como inóculos para la fase experimental 2. Este criterio de selección basado en el PCT, se justifica por ser considerado como indicador del potencial infectivo de un inóculo (Salas & Blanco 2000). Así, se obtuvieron ocho inóculos correspondientes a las siguientes PM: *A. capillus-veneris* (50 % de PCT y 39 esporas en 10 g), *C. tenuiflora* (84 % y 27 esporas en 10 g), *E. karvinskianus* (94 % y 21 esporas en 10 g), *P. anisum* (85 % y 62 esporas en 10 g), *P. major* (87 % y 131 esporas en 10 g), *R. communis* (44 % y 55 esporas en 10 g), *R. fruticosus* (98 % y 60 esporas en 10 g), y *R. mexicanus* (40 % y 44 esporas en 10 g).

Fase 2. Efectividad de consorcios de HMA en la promoción del crecimiento de Catharanthus roseus

Las plantas inoculadas con los consorcios provenientes de *R. mexicanus* y *P. major* presentaron el mayor número de hojas mostrando diferencias significativas ($P \leq 0.001$) con respecto al tratamiento inoculado con *G. intraradices* cuyo número de hojas promedio fue de 25 (Fig. 1). Por su parte, las plantas inoculadas con los consorcios obtenidos de la rizósfera de *R. mexicanus*, *P. major*, *C. tenuiflora*, *R. communis*, *A. capillus-veneris*, *P. anisum* y el consorcio *Glomus* Zac19, presentaron mayor área foliar (Fig.

1), destacando el tratamiento inoculado con el consorcio proveniente de *R. mexicanus* (244.5 cm²), aunque no existieron diferencias significativas entre estos tratamientos con el testigo. En contraste, el tratamiento con menor área foliar correspondió al inoculado con *G. intraradices* (Fig. 1).

El peso seco de hojas de *C. roseus* fue significativamente afectado ($P \leq 0.001$) por la inoculación de los consorcios micorrícicos (Fig. 2A). El tratamiento inoculado con el consorcio obtenido de *C. tenuiflora*, superó significativamente ($P \leq 0.05$) el peso seco foliar obtenido en los tratamientos inoculados con los consorcios aislados de *E. karvinskianus* y *R. fruticosus*, y en los tratamientos inoculados con *Glomus* Zac19 y con la cepa *G. intraradices* (Fig. 2A). La inoculación con HMA tuvo efectos significativos ($P \leq 0.001$) en el peso seco de tallo de *C. roseus* (Fig. 2B), donde el tratamiento inoculado con el consorcio procedente de *E. karvinskianus* y el tratamiento inoculado con la cepa *G. intraradices* presentaron significativamente menor peso seco (Fig. 2B). En el peso seco de la raíz, el valor más alto se obtuvo con la inoculación de los consorcios aislados de *A. capillus-veneris* y de *R. mexicanus*, aunque sin mostrar diferencias significativas con el testigo (Fig. 2C). En contraste, el tratamiento inoculado con la cepa *G. intraradices* presentó el valor más bajo en esta variable (Fig. 2C).

Con respecto al número de botones florales y al número de flores no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2); sin embargo, los consorcios procedentes de *P. major*, *A. capillus-veneris*, *R. communis*, y *Glomus* Zac19 produjeron mayor número de botones florales, mientras que los consorcios aislados de *C. tenuiflora* y *A. capillus-veneris* mostraron mayor número de flores (Tabla 2).

El PCT fue significativamente ($P \leq 0.001$) mayor en el tratamiento inoculado con el consorcio obtenido de *R. mexicanus* (35 %) seguido por los tratamientos inoculados con los consorcios de *E. karvinskianus* y de *C. tenuiflora*, entre los cuales no hubo diferencias significativas (Tabla 2). En contraste, los tratamientos inoculados con *G. intraradices* y *Glomus* Zac19 exhibieron los valores más bajos de colonización (Tabla 2).

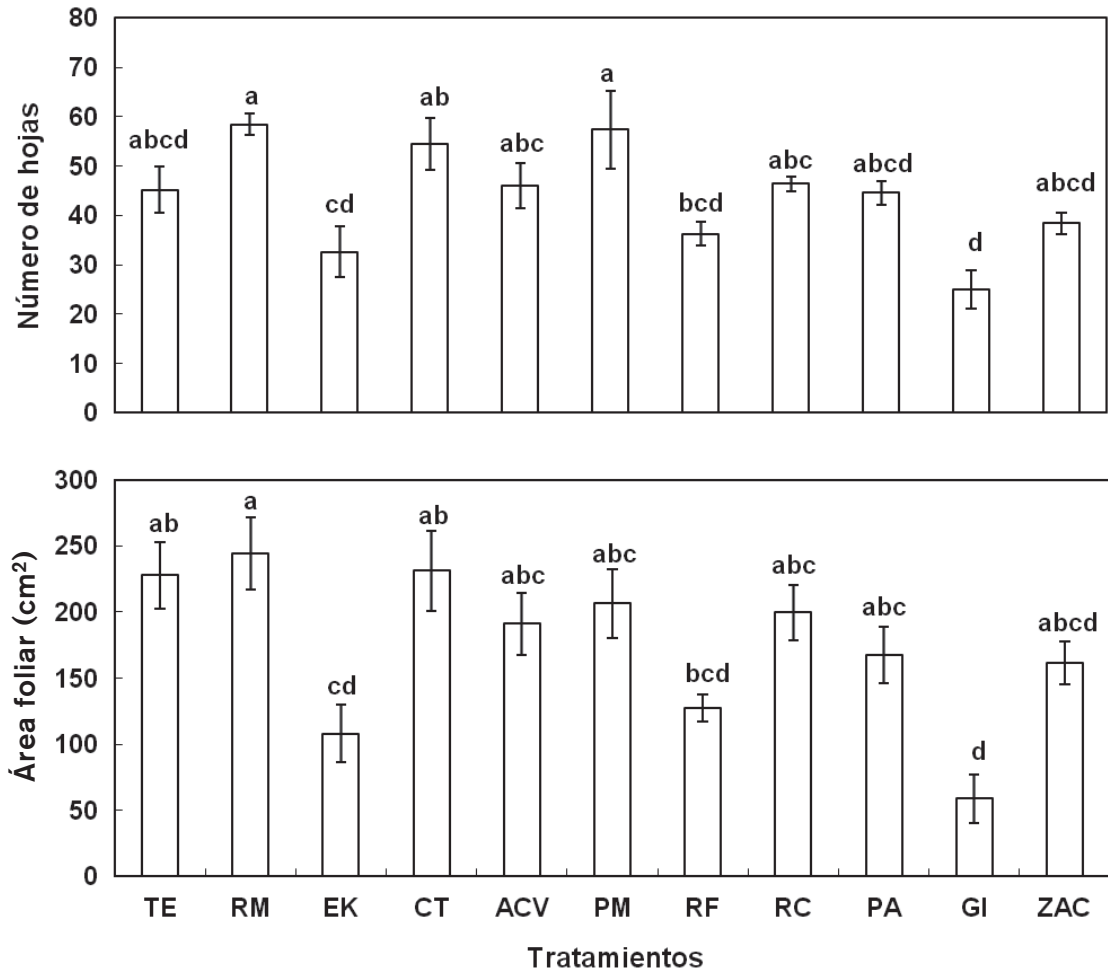


Fig. 1: Número de hojas y área foliar en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto de la inoculación de consorcios micorrícicos arbusculares aislados de plantas medicinales, después de 70 días. $n = 5$. Medias \pm EE. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$). Abreviaturas: TE = Testigo (sin inocular), RM = *Rumex mexicanus* Meisn, EK = *Erigeron karvinskianus* DC., CT = *Castilleja tenuiflora* Benth., ACV = *Adiantum capillus-veneris* L., PM = *Plantago major* L., RF = *Rubus fruticosus* L., RC = *Ricinus communis* L., PA = *Pimpinella anisum* L., GI = *Glomus intraradices*, y ZAC = *Glomus* ZAC-19.

Effects of the inoculation of arbuscular mycorrhizal fungal consortia isolated from medicinal plants on the number of leaves and leaf area of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., after 70 days. $n = 5$. Means \pm SE. Identical letters on bars are not significantly different (Tukey, $\alpha = 0.05$). Abbreviations: TE = Control (without inoculation), RM = *Rumex mexicanus* Meisn, EK = *Erigeron karvinskianus* DC., CT = *Castilleja tenuiflora* Benth., ACV = *Adiantum capillus-veneris* L., PM = *Plantago major* L., RF = *Rubus fruticosus* L., RC = *Ricinus communis* L., PA = *Pimpinella anisum* L., GI = *Glomus intraradices*, and ZAC = *Glomus* ZAC-19.

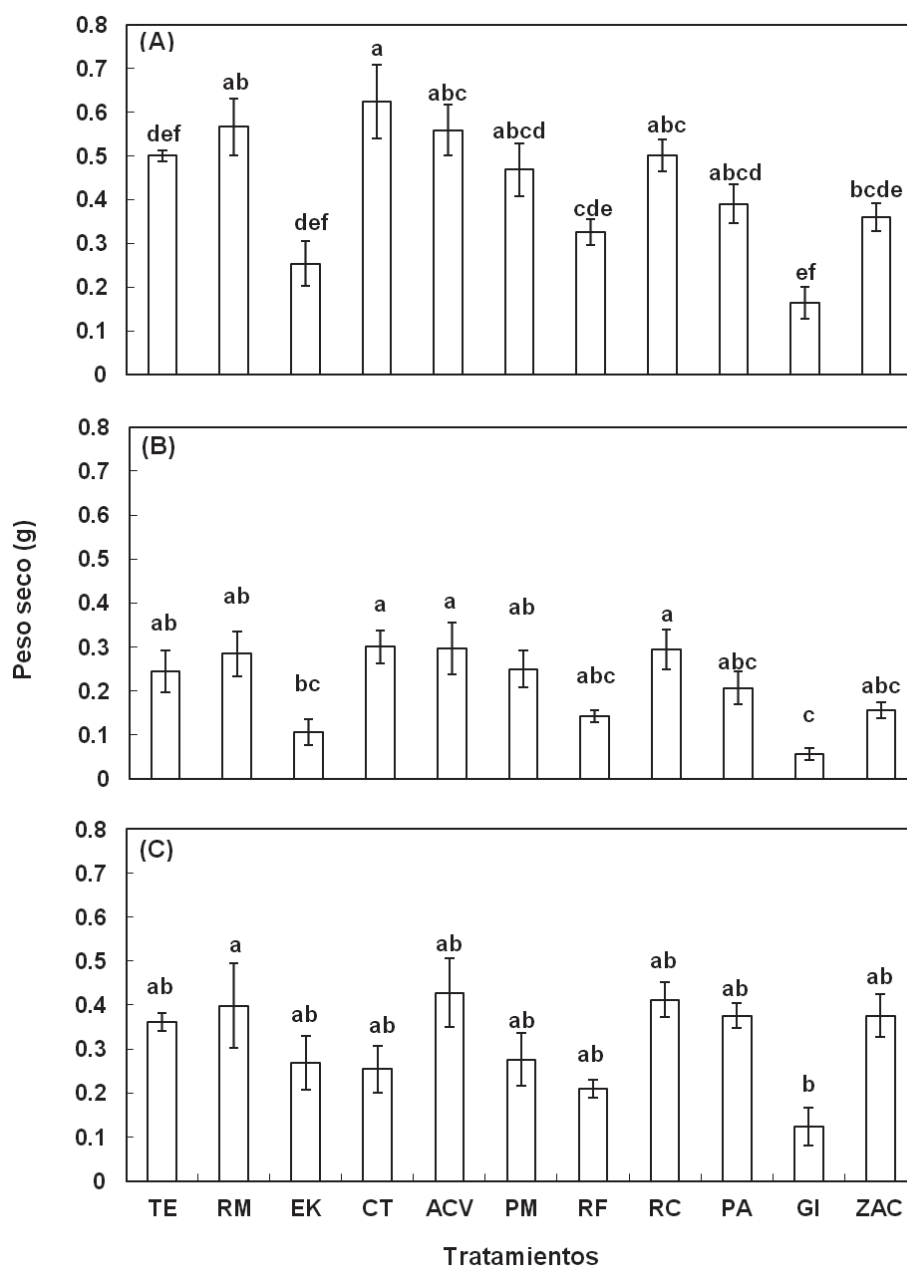


Fig. 2: Peso seco de hojas (A), tallo (B) y raíz (C) en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto de la inoculación de consorcios micorrícicos arbusculares aislados de plantas medicinales, después de 70 días. $n = 5$. Medias \pm EE. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$). Abreviaturas: TE = Testigo (sin inocular), RM = *Rumex mexicanus* Meisn, EK = *Erigeron karvinskianus* DC., CT = *Castilleja tenuiflora* Benth., ACV = *Adiantum capillus-veneris* L., PM = *Plantago major* L., RF = *Rubus fruticosus* L., RC = *Ricinus communis* L., PA = *Pimpinella anisum* L., GI = *Glomus intraradices*, y ZAC = *Glomus* ZAC-19.

Effects of the inoculation of arbuscular mycorrhizal fungal consortia isolated from medicinal plants on the leaf, stem and root dry weight of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., after 70 days. $n = 5$. Means \pm SE. Identical letters on bars are not significantly different (Tukey, $\alpha = 0.05$). Abbreviations: TE = Control (without inoculation), RM = *Rumex mexicanus* Meisn, EK = *Erigeron karvinskianus* DC., CT = *Castilleja tenuiflora* Benth., ACV = *Adiantum capillus-veneris* L., PM = *Plantago major* L., RF = *Rubus fruticosus* L., RC = *Ricinus communis* L., PA = *Pimpinella anisum* L., GI = *Glomus intraradices*, and ZAC = *Glomus* ZAC-19.

TABLA 1

Géneros de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), porcentajes de colonización micorrícica y número de esporas presentes en la rizósfera de plantas medicinales recolectadas en áreas naturales de bosques mixtos (Parque Natural Izta-Popo, Estado de México, México).

Arbuscular mycorrhizal fungal genera, percentage of mycorrhizal colonization and spore number found in the rhizosphere of medicinal plants collected from natural areas of mixed forests (Izta-Popo Natural Park, state of Mexico, Mexico).

Nombre científico (Familia botánica)	Géneros de HMA	Colonización micorrícica (%)	Número de esporas 100 g de suelo
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L. (Adiantaceae)	<i>Acaulospora</i> y <i>Glomus</i>	65	146
<i>Baccharis conferta</i> H.B.& K. (Compositae)	<i>Acaulospora</i> sp1 y <i>Acaulospora</i> sp2	70	34
<i>Castilleja tenuiflora</i> Benth. (Asteraceae)	<i>Acaulospora</i>	19	146
<i>Erigeron karvinskianus</i> DC. (Asteraceae)	<i>Acaulospora</i> , <i>Scutellospora</i> , <i>Gigaspora</i> y <i>Glomus</i>	20	58
<i>Eryngium carlinae</i> Delar. (Apiaceae)	<i>Acaulospora</i> y <i>Glomus</i>	72	34
<i>Fragaria vesca</i> L. (Rosaceae)	<i>Acaulospora</i>	42	62
<i>Phytolacca icosandra</i> L. (Phytolaccaceae)	<i>Glomus</i> sp1 y <i>Glomus</i> sp2	29	186
<i>Pimpinella anisum</i> L. (Apiaceae)	<i>Acaulospora</i> y <i>Glomus</i>	38	176
<i>Plantago major</i> L. (Plantaginaceae)	<i>Acaulospora</i> y <i>Glomus</i>	59	166
<i>Ricinus communis</i> L. (Euphorbiaceae)	<i>Acaulospora</i>	73	130
<i>Rubus fruticosus</i> L. (Rosaceae)	<i>Scutellospora</i> y <i>Glomus</i>	58	168
<i>Rumex mexicanus</i> Meisn. (Polygonaceae)	<i>Glomus</i>	14	30
<i>Tagetes lucida</i> Cav. (Asteraceae)	<i>Acaulospora</i> y <i>Glomus</i>	85	240

TABLA 2

Colonización micorrícica y número de flores y de botones florales de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto de la inoculación de consorcios micorrícicos arbusculares aislados de plantas medicinales, después de 70 días. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$). $n = 5$.

Mycorrhizal colonization, and number of flowers and floral buttons of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., inoculated with arbuscular mycorrhizal fungal consortia isolated from medicinal plants, after 70 days. Identical letters in the same column are not statistically different (Tukey, $\alpha = 0.05$). $n = 5$.

Tratamientos	Colonización micorrícica (%)	Número	
		Flores	Botones
Testigo	0.0 g	2.6 a	2.4 a
<i>Rumex mexicanus</i> Meisn	35.0 a	2.4 a	3.2 a
<i>Erigeron karvinskianus</i> DC.	32.6 ab	2.2 a	3.0 a
<i>Castilleja tenuiflora</i> Benth.	30.0 abc	4.0 a	3.2 a
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	28.4 bcd	4.4 a	5.6 a
<i>Plantago major</i> L.	27.5 bcd	2.2 a	5.8 a
<i>Rubus fruticosus</i> L.	25.0 cde	2.2 a	1.8 a
<i>Ricinus communis</i> L.	22.6 de	2.2 a	4.6 a
<i>Pimpinella anisum</i> L.	20.0 e	2.8 a	3.6 a
<i>Glomus intraradices</i>	9.1 f	1.6 a	2.8 a
<i>Glomus</i> Zac19	5.0 fg	2.2 a	4.4 a
Significancia	0.001	NS	NS

DISCUSIÓN

Fase 1. Propagación de consorcios y selección de HMA obtenidos de la rizósfera de PM

Las 13 PM silvestres de acuerdo con su uso medicinal, se agruparon en: (1) aquellas que se utilizan como galactógeno (producción de leche): *P. anisum*; (2) aquellas con acción cicatrizante: *P. icosandra*; (3) las que se utilizan como astringentes y carminativas: *F. vesca*, *R. fruticosus*, *R. mexicanus* y *P. major*; (4) aquellas utilizadas contra enfermedades renales: *E. karvinskianus*, *C. tenuiflora*, *E. carlinae*; (5) aquellas con acción purgante: *R. communis*; (6) como agentes antimicrobianos: *B. conferta* y *T. lucida*, e (7) hipertensivos: *A. capillus-veneris* (Aguilar et al. 1994, Bnouham 2010, Haq et al. 2011, Regalado et al. 2011).

Todas las PM en su condición natural presentaron micorriza arbuscular, denotando la ubicuidad de estos HMA (Giasson et al. 2008, Öpik et al. 2008). Algunos estudios se han enfocado a la asociación de HMA con PM. Por ejemplo, Panwar & Tarafdar (2006) estudiaron la riqueza taxonómica de HMA en tres plantas medicinales (*Leptadenia reticulata* (Retz) Wight & Arn, *Mitragyna parvifolia* (Roxb.) Korth, *Withania coagulans* (Stocks) Dunal) cuya diversidad estuvo conformada por cinco géneros (*Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* y *Paraglomus*), predominando el género *Glomus* con diez especies. En el presente estudio se observó la abundancia de los géneros *Gigaspora*, *Scutellospora* y en especial la predominancia de los géneros *Acaulospora* y *Glomus*. No obstante, no se lograron identificar con precisión las

especies correspondientes a cada género, por lo que es necesaria a futuro, la elaboración de cultivos monoespecíficos para proceder a dicha identificación.

Fase 2. Efectividad de consorcios de HMA en la promoción del crecimiento de Catharanthus roseus

Las variaciones en el número de hojas y área foliar en las plantas de vinca al ser inoculadas con los consorcios de HMA pueden ser debidas a las diferencias en su composición y en la compatibilidad que estos tengan con la planta, como fue el caso de *Camptotheca acuminata* Decne, cuyo crecimiento fue dependiente del HMA inoculado (Zhao et al. 2006). La composición de los HMA en los consorcios influye en la promoción del crecimiento vegetal; así, por ejemplo, se ha demostrado que el grado de tecnificación de las fincas cafetaleras influye en la composición de especies de HMA y en su efecto en el crecimiento de plántulas de café (Trejo et al. 2011).

El uso de inóculos mixtos es justificable debido a que en la naturaleza las plantas están expuestas a una mezcla de especies de HMA, además de que se incrementan las posibilidades de que más de uno de los hongos colonice a la planta y eventualmente promueva su crecimiento (Cuenca et al. 2003). El beneficio de los HMA típicamente se relaciona con la promoción del crecimiento y el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas (Abu-Zeyad et al. 1999, Larsen et al. 2009, Milleret et al. 2009). No obstante, el grado de beneficio que los HMA aportan a la planta puede tener variaciones por efecto de la especie del hongo inoculado.

Los consorcios obtenidos de las PM presentaron variaciones en la promoción del peso seco de las plantas de vinca, lo cual fue dependiente del consorcio inoculado. Estas variaciones concuerdan con el trabajo realizado por Ruiz-Lozano & Azcon (2000) al comparar el efecto de dos HMA (*Glomus* sp. y *G. deserticola*) en el peso seco de plantas de lechuga, el cual fue significativamente mayor con la inoculación de *G. deserticola*.

Respecto al efecto en el peso seco de la raíz, la variación en la respuesta a la inoculación por diferentes HMA ya ha sido reportada. Así, esta variación se debe en parte a la diferente

respuesta que tienen los hongos para aportar nutrientes a la planta hospedante (Vessey 2003). Por su parte, Chu (1999) observó la respuesta de *Euterpe oleracea* Mart. a la inoculación con siete especies de HMA (*Scutellispora gilmorei*, *Acaulospora* sp., *Gigaspora margarita*, *Entrophospora colombiana*, *Scutellispora heterogama*, *Gigaspora* sp. y *Scutellispora* sp.), donde los resultados mostraron diferencias en el peso seco de la raíz, siendo *S. gilmorei* la especie con mayor efecto en la promoción del crecimiento de este órgano vegetal. De manera similar, Giri et al. (2005) al evaluar el efecto de dos HMA (*Glomus fasciculatum* y *Glomus macrocarpum*) en *Cassia siamea* Lam., encontraron que el peso seco de la raíz fue mayor con *G. macrocarpum*.

En general, los consorcios micorrícicos procedentes de las PM tuvieron mayor efecto benéfico en el crecimiento de vinca en comparación con cepas que proceden de otros cultivos agrícolas (*Glomus* Zac19 y *G. intraradices*). Lo anterior denota la importancia de seleccionar cepas o consorcios específicos para inducir el crecimiento en ciertas plantas de interés no solo ornamental, sino también medicinal, como ha sido también indicado para especies vegetales de interés agronómico (Bâ et al. 2000, Cavallazzi et al. 2007, Trejo et al. 2011). Cabe señalar que con respecto al peso seco de flores y botones florales no se obtuvieron diferencias significativas por efecto de la inoculación de los consorcios micorrícicos en las plantas de vinca.

Los datos referentes al PCT indican que la respuesta de *C. roseus* a la inoculación con HMA presentó variación en la compatibilidad fúngica con la planta, la cual es medida por el establecimiento de la simbiosis en el sistema radical de vinca. Las variaciones en el PCT en las PM inoculadas con HMA ya han sido previamente reportadas (Ruiz-Lozano & Azcon 2000, Anderson 2008, Li et al. 2008). Por su parte, Gupta et al. (2002) al evaluar el efecto de *G. fasciculatum* en tres cultivares de *Mentha arvensis* Becker (cultivares Kalka, Shivalik y Gomti) observaron que el cultivar Shivalik mostró mayor porcentaje de colonización (68 %), indicando que algunos cultivares son menos susceptibles de ser colonizados por los HMA. Además, Zhao et al. (2006) al inocular plantas de *C. acuminata* con tres especies de HMA (*Acaulospora mellea*, *G.*

diaphanum y *Sclerocystis sinuosa* –actualmente reclasificada como *G. sinuosum*–) encontraron que *S. sinuosa* presentó mayor porcentaje de colonización. Por su parte, Bâ et al. (2000) analizaron la compatibilidad funcional medida por la colonización micorrícica en trece árboles frutales tropicales inoculados con dos HMA (*G. aggregatum* y *G. intraradices*), denotando que la colonización por los dos HMA fue dependiente de la especie del árbol frutal.

Los resultados obtenidos fortalecen la hipótesis de que la comunidad de HMA presentes en la rizósfera de las plantas, tiene un efecto benéfico diferencial en función de su compatibilidad con el hospedante en el cual se lleva a cabo la inoculación. Además, se resalta la importancia de explorar la diversidad de HMA presentes en la rizósfera de las plantas que integran un ecosistema, y con ello, seleccionar aquellas cepas o consorcios micorrícicos cuya diversidad funcional permita obtener mayor beneficio en las plantas a las que se dirige esta biotecnología.

Conclusiones

Se identificaron a nivel de género los HMA de los consorcios obtenidos tanto de la rizósfera de las PM como de aquellos propagados en cultivos trampa, siendo los géneros predominantes *Acaulospora* y *Glomus*. Los consorcios obtenidos de PM expresaron variabilidad en la composición taxonómica de HMA donde el consorcio procedente de *Erigeron karvinskianus* presentó más géneros de HMA (cuatro géneros), mientras que *C. tenuiflora*, *F. vesca*, *Ricinus communis* y *R. mexicanus* presentaron un solo género micorrícico arbuscular.

Los consorcios micorrícicos mostraron diferencias en la colonización del sistema radical de *C. roseus*, cuyo crecimiento fue significativamente favorecido de manera más consistente por la inoculación del consorcio obtenido de *R. mexicanus*. Las respuestas en crecimiento (número de hojas, área foliar, y peso seco) son más dependientes de la colonización micorrícica, mientras que el número de botones florales y el número de flores de las plantas de vinca no mostraron diferencias significativas entre los consorcios micorrícicos.

AGRADECIMIENTOS: Al CONACYT por la beca proporcionada a Claudia de la Rosa-Mera durante sus estudios de Maestría. Trabajo parcialmente financiado por el proyecto SEP-CONACYT 130262. A manera de homenaje, Claudia de la Rosa Mera, Ronald Ferrera-Cerrato, Alejandro Alarcón y Alicia Franco Ramírez expresamos nuestras condolencias por la pérdida irreparable de la maestra, colega y amiga, baluarte de la investigación de la micorriza en México, María de Jesús Sánchez Colín (Q.E.P.D., marzo 4, 2012).

BIBLIOGRAFÍA

- ABU-ZEYAD R, AG KHAN & C KHOO (1999) Occurrence of arbuscular mycorrhiza in *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and production of castanospermine. *Mycorrhiza* 9: 111-117.
- AGUILAR A, JR CAMACHO, S CHINO, P JÁQUEZ & ME LÓPEZ (1994) Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal, México.
- ALARCÓN A & R FERRERA-CERRATO (1999) Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana* (México) 17: 179-191.
- ALARCÓN A, JJ ALMARAZ, R FERRERA-CERRATO, MCA GONZÁLEZ-CHÁVEZ, ME LARA, MJ MANJARREZ, R QUINTERO & S SANTAMARÍA (2004) Manual: Tecnología de hongos micorrízicos en la producción de especies forestales en vivero. Colegio de Postgraduados Montecillo, SEMARNAT-PRONARE, Distrito Federal, México.
- ANDERSON RC (2008) Growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization of two prairie grasses grown in soil from restorations of three ages. *Restoration Ecology* 16: 650-656.
- BÂ AM, C PLENCHETTE, P DANTHU, R DUPONNOIS & T GUISSOU (2000) Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit trees in Senegal. *Agroforestry Systems* 50: 95-105.
- BAAR J (2008) From production to application of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural systems: Requirements and needs. En: Varma A (ed) *Mycorrhiza*: 361-373. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- BIERMAN B & RG LINDERMAN (1981) Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: A proposed method towards standardization. *New Phytologist* 87: 423-432.
- BLANCO FA & EA SALAS (1997) Micorrizas en la agricultura: Contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21: 55-67.
- BNOUHAM M (2010) Medicinal plants with potential galactagogue activity used in the moroccan pharmacopoeia. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 7: 1-13.
- BRUNDRETT MC & LK ABBOTT (2002) Arbuscular mycorrhizas in plant communities. En: Sivasithamparan K, KW Dixon & RL Barrett (eds) *Microorganisms in plant conservation and biodiversity*: 151-193. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- CASTELLANO MA & R MOLINA (1989) *Mycorrhizae*. En: Landis TD, RW Tinus, SE McDonald &

- JP Barnett (eds) The container tree nursery manual: 101-167. Agricultural Handbook 674. US Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC.
- CAVALLAZZI JRP, OK FILHO, SL STURMER, PT RYGIEWICZ & MM DE MENDONÇA (2007) Screening and selecting arbuscular mycorrhizal fungi for inoculating micropropagated apple rootstocks in acid soils. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 90: 117-129.
- CHU EY (1999) The effects of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seedlings. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34: 1019-1024.
- CUENCA G, A CÁCERES, Z HASMY & C URDANETA (2007) Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia* 32: 23-29.
- CUENCA G, Z DE ANDRADE, M LOVERA, L FAJARDO, E MENESES, M MARQUES & R MACHUCA (2003) Pre-selección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de la Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela. *Ecotropicos* (Venezuela) 16: 27-40.
- GERDEMANN JW & TH NICOLSON (1963) Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- GIASSON P, A KARAM & A JAOUICH (2008) Arbuscular mycorrhizae and alleviation of soil stresses on plant growth. En: Siddiqui ZA, MS Akhtar & K Futai (eds) *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry*: 99-134. Springer Science, Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands.
- GIRI B, R KAPOOR & KG MUKERJI (2005) Effect of the arbuscular mycorrhizae *Glomus fasciculatum* and *G. macrocarpum* on the growth and nutrient content of *Cassia siamea* in a semi-arid Indian wasteland soil. *New Forests* 29: 63-73.
- GODOY R, R CARRILLO & H PEREDO (1993) Compatibilidad y eficiencia in vitro de *Glomus intraradices* en coníferas nativas del sur de Chile. *Bosque* 14: 57-63.
- GUPTA ML, A PRASAD, M RAM & S KUMAR (2002) Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology* 81: 77-79.
- HAQ F, H AHMAD & M ALAM (2011) Traditional uses of medicinal plants of Nandiar Khuwarr catchment (District Battagram) Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 39-48.
- HEWITT EJ (1966) The composition of the nutrient solution. En: Hewitt EJ (ed) *In sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*: 187-246. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham, UK.
- INVAM (2008) International Culture Collection of (Vesicular)-Arbuscular Mycorrhizal Fungi URL: <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/genuskey.htm> (accedido Julio 22, 2008).
- KHALIL GA, R FERRERA-CERRATO, JL AGUILAR-ACUNA & M LARQUE-SAAVEDRA (1999) Crecimiento de *Sesbania emerus* (Aubl) Urban inoculada con *Glomus* sp. en presencia de vermicomposta. *Terra Latinoamericana* (México) 17: 109-114.
- KOSUTA S, T WINZER & M PARNISKE (2005) Arbuscular mycorrhiza. En: Márquez AJ (ed) *Lotus japonicus Handbook*: 87-95. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- LARSEN J, P CORNEJO & JM BAREA (2009) Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 286-292.
- LEVÊSQUE D & F JEHL (2007) Molecular pharmacokinetics of catharanthus (vinca) alkaloids. *Journal of Clinical Pharmacology* 47: 579-588.
- LI H, FA SMITH, S DICKSON, RE HOLLOWAY & SE SMITH (2008) Plant growth depressions in arbuscular mycorrhizal symbioses: Not just caused by carbon drain? *New Phytologist* 178: 852-862.
- MANJARREZ-MARTÍNEZ MJ, R FERRERA-CERRATO & MC GONZÁLEZ-CHÁVEZ (1999) Efecto de la vermicomposta y la micorriza arbuscular en el desarrollo y tasa fotosintética del chile serrano. *Terra Latinoamericana* (México) 17: 9-15.
- MILLERET R, RC LE BAYON & JM GOBAT (2009) Root, mycorrhiza and earthworm interactions: Their effects on soil structuring processes, plant and soil nutrient concentration and plant biomass. *Plant Soil* 316: 1-12.
- ÖPIK M, U SAKS, J KENNED & T DANIELL (2008) Global diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi-community composition and links with functionality En: Varma A (ed) *Mycorrhiza*: 89-111. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- PANWAR J & JC TARAFDAR (2006) Distribution of three endangered medicinal plant species and their colonization with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Arid Environments* 65: 337-350.
- PHILLIPS JM & DS HAYMAN (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- REGALADO EL, MD FERNÁNDEZ, JA PINO & OA ECHENMENDIA (2011) Chemical composition and biological properties of the leaf essential oil of *Tagetes lucida* Cav. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research* 23: 63-67.
- RODRÍGUEZ YY, B DE LA NOVAL, F FERNÁNDEZ & P RODRÍGUEZ (2004) Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicon esculentum* M. var "Amalia"). *Ecología Aplicada* 3: 162-171.
- RUIZ-LOZANO JM & R AZCÓN (2000) Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza* 10: 137-143.
- SALAS E & F BLANCO (2000) Selección de plantas hospederas y efectos del fósforo para la producción de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares por el método de cultivo en macetas. *Agronomía Costarricense* 24: 19-28.

- SAS Institute Inc (2002) The SAS system for windows version 9.0 SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.
- TREJO D, R FERRERA-CERRATO, R GARCÍA, L VARELA, L LARA & A ALARCÓN (2011) Efectividad de siete consorcios nativos de hongos micorrícicos arbusculares en plantas de café en condiciones de invernadero y campo. *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 23-31.
- VARELA-FREGOSO LY & MCA GONZÁLEZ-CHÁVEZ (2007) Taxonomía de los hongos formadores de micorriza arbuscular. En: Fuentes-Dávila G & R Ferrera-Cerrato (eds) *Ecología de la raíz*: 57-72. Segunda reimpresión. Sociedad Mexicana de Fitopatología, Ciudad Obregón, Sonora.
- VESSEY JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- ZHAO X, T YU, Y WANG & X YAN (2006) Effect of arbuscular mycorrhiza on the growth of *Camptotheca acuminata* seedlings. *Journal of Forestry Research* 17: 121-123.

Responsabilidad editorial: Bernardo González

Recibido el 10 de diciembre de 2010; aceptado el 7 de mayo de 2012