

***Pinus greggii* ENGELM.: RESPUESTA A LA INOCULACIÓN MICORRÍCICA CONTROLADA Y A LA FERTILIZACIÓN EN VIVERO**

***Pinus greggii* ENGELM.: RESPONSE TO CONTROLLED MYCORRHIZAL INOCULATION AND FERTILIZATION IN NURSERY**

Silvia **Salcido-Ruiz**¹, José Ángel **Prieto-Ruiz**^{2*}, José Leonardo **García-Rodríguez**³,
Enrique **Santana-Aispuro**⁴, Jorge Armando **Chávez-Simental**⁵

¹Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad Juárez del Estado de Durango. 34120. Durango, Durango. ²Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Juárez del Estado de Durango. 34120. Durango, Durango. (jprieto@ujed.mx). ³Campo Experimental Valle del Guadiana. Centro de Investigación Regional Norte-Centro. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 34170. Durango, Durango. ⁴Vivero Forestal "Praxedis Guerrero". Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente del Estado de Durango. 34070. Durango, Durango. ⁵Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera. Universidad Juárez del Estado de Durango. 34120. Durango, Durango.

RESUMEN

En México, la producción de planta de *Pinus greggii* Engelm. en vivero debe alcanzar estándares morfológicos y fisiológicos fijados por la Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales (NMX-AA-170-SCFI-2016), donde destaca la nutrición y la presencia de micorrizas. El objetivo del estudio fue evaluar el crecimiento de *Pinus greggii* en la etapa de vivero, con base en la inoculación micorrízica con dos productos comerciales y el uso de un fertilizante de liberación controlada en dos dosis. La hipótesis fue que al menos una combinación del tipo de inoculante y dosis de fertilización, favorece el crecimiento de las plantas en proporción mayor. El diseño experimental fue bloques completos al azar con nueve tratamientos, los datos se analizaron con ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. A los 11 meses de la siembra se analizaron variables morfológicas, índices de calidad, porcentaje de supervivencia y de micorrización; además, se caracterizaron las ectomicorrizas desarrolladas. La supervivencia varió de 64 a 99%, con los porcentajes mayores en los tratamientos inoculados solo con hongos nativos o exóticos. Las plantas mostraron diferencias significativas en las variables morfológicas; los tratamientos combinados, sin importar la dosis o tipo de inoculante, mostraron resultados mejores. El porcentaje de colonización micorrízica varió de 37 a 63%, y destacaron los tratamientos

ABSTRACT

In Mexico, *Pinus greggii* Engelm. in nursery must reach morphological and physiological standards set by the Mexican Standard for the Certification of the Operation of Forest Nurseries (NMX-AA-170-SCFI-2016), where nutrition and the presence of mycorrhizae are emphasized. The objective this study was to evaluate the growth of *Pinus greggii* in the nursery stage, based on mycorrhizal inoculation with two commercial products and a controlled release fertilizer in two doses. The hypothesis was that at least a combination of type of inoculant and fertilization dose would favor the growth of the plants in a greater proportion. The experimental design consisted of complete randomized blocks with nine treatments. Data were analyzed with ANOVA and the means of treatments were compared with the Tukey test. At 11 months after sowing, morphological variables, quality indices, percentage of survival and mycorrhization were analyzed. In addition, the developed ectomycorrhizae were characterized. Survival ranged from 64 to 99%, with the highest percentages in treatments inoculated only with native or exotic fungi. Plants showed significant differences in morphological variables; the combined treatments, regardless of the dose or type of inoculant, showed better results. The percentage of mycorrhizal colonization ranged from 37 to 63%, and the treatments with better response were those inoculated with spores of exotic fungi and fertilized (both doses). The diversity of fungal spores contained in the commercial inoculants did not coincide with the fungal species that established symbiosis with *P. greggii*. Thus, the addition of controlled release fertilizer and inoculation with commercial products resulted in quality plant production.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2954-535X>

Recibido: agosto, 2020. Aprobado: abril, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 273-290. 2021.

inoculados con esporas de hongos exóticos y fertilizados (en ambas dosis). La diversidad de esporas de hongos contenidos en los inoculantes comerciales no coincidió con las especies de hongos que establecieron simbiosis con *P. greggii*. En conclusión, la adición de fertilizante de liberación controlada e inoculación con productos comerciales dio como resultado una producción de planta de calidad.

Palabras clave: calidad de planta, fertilizante de liberación controlada, inoculantes comerciales, micorrización.

INTRODUCCIÓN

Las micorrizas son el resultado de la relación simbiótica mutualista entre las raíces de las plantas vasculares y cierto tipo de hongos del suelo, estos últimos contribuyen a que el agua y los nutrientes sean mejor aprovechados por las plantas, y a cambio reciben elementos carbonados para alimentarse (Barragán-Soriano *et al.*, 2018). Un elemento importante para incrementar la calidad de planta en especies del género *Pinus* en vivero, es el uso de inoculantes con propágulos provenientes de zonas boscosas, o elaborados de manera comercial por ser más prácticos (Valdés *et al.*, 2019).

Pinus greggii es nativo de la Sierra Madre Oriental de México y entre sus cualidades destaca su capacidad para desarrollarse en sitios deficientes de nutrientes; se utiliza con fines de protección o restauración en áreas degradadas, así como para establecer plantaciones forestales comerciales (Dvorak, 2010). La producción de planta de *P. greggii* en vivero abarca un periodo de seis a ocho meses, tiempo en el cual el material vegetativo debe tener condiciones apropiadas de luminosidad, temperatura, humedad, nutrición, espacio de crecimiento y sanidad. De acuerdo con la Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales (NMX-AA-170-SCFI-2016) (Secretaría de Economía, 2016), al salir del vivero las plantas de esta especie deben tener de 25 a 30 cm de altura, ≥ 4 mm de diámetro a la base del cuello, seis a ocho meses de edad, con presencia de micorrizas en sus raíces y 25% o más de lignificación del tallo; estos parámetros son predictores de que tendrán probabilidades mayores de supervivencia y crecimiento en campo.

Escobar-Alonso y Rodríguez-Trejo (2019) resaltaron la importancia de estudiar aspectos sobre inoculación controlada en especies del género *Pinus* y su

Key words: plant quality, controlled release fertilizer, commercial inoculants, mycorrhization.

INTRODUCTION

Mycorrhizae are the result of the mutualistic symbiotic relationship between the roots of vascular plants and certain types of soil fungi. The latter contribute to the better use of water and nutrients by plants, and in return they receive carbon elements to feed (Barragán-Soriano *et al.*, 2018). An important element to increase plant quality in species of the genus *Pinus* in nurseries is the use of inoculants with propagules from wooded areas, or commercial strains because they are more practical (Valdés *et al.*, 2019).

Pinus greggii is native to the Sierra Madre Oriental of Mexico and among its qualities, the predominant is the ability to develop well in nutrient deficient sites. It is used for protection or restoration purposes in degraded areas, as well as to establish commercial forest plantations (Dvorak, 2010). The production of *P. greggii* plants in the nursery lasts a period of six to eight months, time during which the vegetative material must have appropriate conditions of light, temperature, humidity, nutrition, growth space and health. According to the Mexican standard Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales (NMX-AA-170-SCFI-2016) (Secretaría de Economía, 2016), at ending the nursery period, plants of this species must be 25 to 30 cm tall, ≥ 4 mm in diameter at the base of the neck, six to eight months old, with mycorrhizae evident in their roots, and 25% or more lignification of the stem. These parameters are considered signs that they will have greater probabilities of survival and growth in the field.

Escobar-Alonso and Rodríguez-Trejo (2019) highlighted the importance of studying some aspects of controlled inoculation in species of the *Pinus* genus and their effects on the quality of the plants produced in nursery. The objective of this research was to evaluate the growth of *P. greggii* in the nursery stage plus inoculation with mycorrhizal fungi from two commercial products, and the use of a controlled release fertilizer in two doses. The hypothesis was that at least a combination of type of inoculant and dose of fertilization would favor the growth of plants in a greater proportion.

efecto en la calidad de planta producida en vivero. El objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento de *P. greggii* en la etapa de vivero, más la inoculación con hongos micorrícicos de dos productos comerciales y el uso de un fertilizante de liberación controlada en dos dosis. La hipótesis fue que al menos una combinación del tipo de inoculante y dosis de fertilización, favorece el crecimiento de las plantas en proporción mayor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El estudio se realizó en el vivero forestal “Praxedis Guerrero”, ubicado en el kilómetro 12.5 de la carretera Durango-El Mezquital (23° 56' 58.3" N y 104° 34' 07.4" O, 1890 m de altitud). El vivero pertenece a la Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente del Gobierno del estado de Durango, México, tiene una superficie de 20 ha y una capacidad de producción de cinco millones de plantas.

Producción de la planta

La planta se produjo en envases, conocidos como tubetes, de polietileno rígido de color negro, con guías de raíces internas y 165 mL de capacidad, colocados en rejillas portatubetes de 98 cavidades. Como sustrato se empleó una mezcla de turba (*Sphagnum*) (57%), vermiculita (23%) y perlita (20%). La porosidad total del sustrato fue 68%, la porosidad de aireación fue 32% y la capacidad de retención de agua fue 36%; de acuerdo con la norma mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016, son valores adecuados para el desarrollo del sistema de raíces de las plantas (Secretaría de Economía, 2016).

Semilla de *Pinus greggii* Engelm. var. *greggii* procedente del estado de Nuevo León se utilizó. Antes de la siembra, como tratamiento pre germinativo la semilla se sumergió en agua a temperatura ambiente durante 24 h, después se escurrió para eliminar el exceso de agua, enseguida se aplicó fungicida Tecto'60 (Thiabendazol: 2-(4-thiazolil)-1H-benzimidazol) para evitar daños por hongos productores de *Damping off*, y se secó a la intemperie. La siembra se realizó el 18 de octubre de 2018 y se colocaron dos semillas por envase.

Durante el desarrollo del experimento la planta se colocó en diversas áreas de producción en el vivero, con base en su etapa de crecimiento. En la etapa de establecimiento, 18 de octubre de 2018 al 30 de enero de 2019, la planta permaneció en un área con estructura de metal y ventanas laterales, cubierta con película

MATERIALS AND METHODS

Location

The study was carried out in the “Praxedis Guerrero” forest nursery, located at kilometer 12.5 of the Durango-El Mezquital highway (23° 56' 58.3" N and 104° 34' 07.4" W, 1890 m altitude). The nursery belongs to the Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente under the State Government of Durango, Mexico; it has an area of 20 ha and a production capacity of five million plants.

Plant production

Plants were produced in containers, known as tubes, made of rigid black polyethylene, with internal root guides and a 165 mL capacity, placed in 98-cavity tube racks. As substrate we used a mixture of peat (*Sphagnum*) (57%), vermiculite (23%) and perlite (20%). The total porosity of the substrate was 68%, the aeration porosity was 32% and the water retention capacity was 36%; according to the Mexican standard NMX-AA-170-SCFI-2016, these are adequate values for the development of the root system of plants (Secretaría de Economía, 2016).

Pinus greggii Engelm. var. *greggii* seed from the state of Nuevo León was used. Before sowing, as a pre-germination treatment, the seed was immersed in water at room temperature for 24 h, then drained to remove water excess, then Tecto'60 fungicide (Thiabendazole: 2-(4-thiazolyl) - 1H-benzimidazole) was applied to avoid damage by *Damping off*, and dried in the open. Sowing was carried out on October 18, 2018 and two seeds were placed per container.

During the experiment, the plants were placed in different production areas in the nursery, according to their growth stage. In the establishment stage, from October 18, 2018 to January 30, 2019, plants remained in an area with a metal structure and side windows, covered with a 720 μ m milky white polyethylene film and a 50% shade mesh was placed over it. The average temperature was 17 °C, and relative humidity was 74%. From January 31 to March 17, 2019, the plants continued growing in a tunnel-type greenhouse covered with 720 μ m green polyethylene film and 50% shade mesh, where the average temperature was 18 °C, and relative humidity was 47%.

Since five months after sowing, March 18, 2019 until May 17, 2019, the experiment was in an area with a 50% shade mesh, where the average temperature was 18 °C, and relative humidity 46%. For the pre-conditioning stage, May 18 to September 17, 2019, plants were exposed to outdoor conditions, where the average temperature was 23 °C, and relative humidity was 41%.

de polietileno color blanco lechoso de 720 μm y sobre ésta se colocó una malla sombra al 50%; la temperatura promedio fue 17 °C y la humedad relativa fue 74%. Del 31 de enero al 17 de marzo de 2019 la planta continuó su crecimiento en un invernadero tipo túnel cubierto con película de polietileno color verde de 720 μm y malla sombra de 50%, donde el promedio de temperatura fue 18 °C y la humedad relativa fue 47%.

Desde los cinco meses de la siembra, 18 de marzo de 2019, hasta el 17 de mayo de 2019, el experimento estuvo en un área con malla sombra al 50%, donde la temperatura promedio fue 18 °C y la humedad relativa 46%. Para la etapa de pre acondicionamiento, 18 de mayo al 17 de septiembre de 2019, la planta se expuso a condiciones de intemperie, donde la temperatura promedio fue 23 °C y la humedad relativa fue 41%.

Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue bloques completos al azar con nueve tratamientos y cuatro repeticiones, con 49 plantas cada una. Los tratamientos incluyeron inoculación controlada con dos productos comerciales fabricados en México (Ecto-Myc® y MycorTree Ecto-inyectable®), y fertilización con Multicote 8®, de liberación controlada y con una composición de 11N-28P-11K, más microelementos (Cuadro 1). El fertilizante se aplicó durante la preparación de la mezcla de sustrato.

El inoculante Ecto-Myc® contenía una mezcla de esporas de hongos nativos de México: *Amanita rubescens* Pers., *Amanita* sp., *Lactarius indigo* [Schwein] Fr., *Ramaria* sp. y *Boletus* sp. El inoculante MycorTree Ecto-inyectable® incluía esporas de hongos exóticos: *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch y *Scleroderma citrinum* Pers. Las dosis utilizadas en los tratamientos de inoculación controlada se estimaron de acuerdo con la concentración de esporas en cada inoculante, determinada en una Cámara de

Experimental design and treatments

The experimental design was arranged in complete randomized blocks with nine treatments and four replications, with 49 plants each. Treatments included controlled inoculation with two commercial products manufactured in Mexico (Ecto-Myc® and MycorTree Ecto-injectable®), and fertilization with Multicote 8®, controlled release, and with a composition of 11N-28P-11K, plus microelements (Table 1). The fertilizer was applied during preparation of the substrate mix.

The Ecto-Myc® inoculant contained a mixture of spores of fungi native to Mexico: *Amanita rubescens* Pers., *Amanita* sp., *Lactarius indigo* [Schwein] Fr., *Ramaria* sp., and *Boletus* sp. The MycorTree Ecto-injectable® inoculant included spores of exotic fungi: *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch, and *Scleroderma citrinum* Pers. The doses used in the controlled inoculation treatments were estimated according to the concentration of spores in each inoculant, determined in a Neubauer Chamber. Ecto-Myc® had a concentration of 1.05×10^7 spores mL^{-1} , and MycorTree Ecto-injectable® 6.5×10^6 spores mL^{-1} . The inoculation was performed four months after sowing when there were secondary roots. The inoculation technique consisted of injecting the spore solution directly into the root system, 5 cm below the upper level of the substrate. Then, a light irrigation was applied so that the solution had greater contact with the root system.

Variable evaluation and statistical analysis

At 11 months after sowing, seven months after inoculation, we assessed the survival percentage of the plants. Ten individuals per experimental unit were randomly extracted to measure height from the stem base to the apical bud (PILOT® model

Cuadro 1. Inoculantes micorrícicos y fertilizante de liberación controlada evaluados en el crecimiento de *P. greggii* en vivero.

Table 1. Mycorrhizal inoculants and controlled release fertilizer evaluated in the growth of *P. greggii* in the nursery.

Tratamiento	Descripción
T	Sin fertilizante y sin inoculante (testigo)
FB	Fertilizante Multicote 8® (3 g L^{-1})
FA	Fertilizante Multicote 8® (6 g L^{-1})
HN	Inoculante Ecto-Myc® (1 mL planta $^{-1}$)
HE	Inoculante MycorTree Ecto-inyectable® (1.5 mL planta $^{-1}$)
HNFB	Inoculante Ecto-Myc® (1 mL planta $^{-1}$) y fertilizante Multicote 8® (3 g L^{-1})
HNFA	Inoculante Ecto-Myc® (1 mL planta $^{-1}$) y fertilizante Multicote 8® (6 g L^{-1})
HEFB	Inoculante MycorTree Ecto-inyectable® (1.5 mL planta $^{-1}$) y fertilizante Multicote 8® (3 g L^{-1})
HEFA	Inoculante MycorTree Ecto-inyectable® (1.5 mL planta $^{-1}$) y fertilizante Multicote 8® (6 g L^{-1})

Neubauer. Ecto-Myc® tuvo una concentración de 1.05×10^7 esporas mL^{-1} , y MycorTree Ecto-inyectable® 6.5×10^6 esporas mL^{-1} . La inoculación se realizó cuatro meses después de la siembra cuando había raíces secundarias. La técnica de inoculación consistió en inyectar la solución con esporas directamente al sistema radical, 5 cm debajo del nivel superior del sustrato; después, se aplicó un riego ligero a fin de que la solución tuviera contacto mayor con el sistema de raíces.

Evaluación de variables y análisis estadístico

A los 11 meses de la siembra, siete meses después de la inoculación, se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas. De manera aleatoria se tomaron 10 individuos por unidad experimental para medir altura desde la base del tallo a la yema apical (regla graduada modelo PILOT®), diámetro del cuello de la raíz (vernier digital Truper® modelo CALDI-6MP), biomasa húmeda y seca de la parte aérea, radical y total.

Para estimar biomasa seca las plantas se deshidrataron a 65 °C en horno de ventilación forzada (Felisa® modelo FE-291D) hasta que alcanzaron peso constante. Después, los pesos secos se registraron en una balanza analítica (Ohaus® modelo PA1502 con una precisión de 0.001 g) y se calcularon tres índices: relación biomasa seca de la parte aérea/biomasa seca de la parte radical, índice de lignificación (ecuación 1) e Índice de Calidad de Dickson (ecuación 2):

$$IL = \left(\frac{\text{Peso total seco (g)}}{\text{Peso total húmedo (g)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$ICD = \frac{\text{Peso total seco (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}}} \quad (2)$$

El porcentaje de colonización micorrícica (PCM) se evaluó en tres plantas de cada unidad experimental, seleccionadas al azar. Para ello se eliminó el sustrato del sistema de raíces con agua corriente y de cada planta se tomaron 100 cm de raíces secundarias, que para su conservación se colocaron en fijador (FAA) compuesto por formaldehído (10%), ácido acético glacial (5%) alcohol 96° (50%) y agua destilada (35%), hasta el momento de la evaluación. El número de ápices, con o sin micorrizas, se determinó por observación directa con un estereoscopio (Leica® EZ4 HD, Suiza) (Figura 1) y se calculó el PCM (ecuación 3).

$$PCM = \left(\frac{\text{Ápices micorrizados}}{\text{Ápices micorrizados} + \text{Ápices no micorrizados}} \right) \times 100 \quad (3)$$

graduated ruler), root neck diameter (Truper® digital vernier model CALDI-6MP); as well as biomass, fresh and dry, from aerial and root sections, and of complete plants.

To estimate the dry biomass, plants were dehydrated at 65 °C in a forced ventilation oven (Felisa® model FE-291D) until they reached constant weight. Then, the dry weights were recorded on an analytical balance (Ohaus® model PA1502 with a precision of 0.001 g) and three indices were calculated: dry biomass ratio of the aerial section/dry biomass of the root section, lignification index (equation 1) and Dickson's Quality Index (equation 2):

$$IL = \left(\frac{\text{Peso total seco (g)}}{\text{Peso total húmedo (g)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$ICD = \frac{\text{Peso total seco (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}}} \quad (2)$$

The percentage of mycorrhizal colonization (PCM) was evaluated in three plants of each experimental unit, randomly selected. To this end, we removed substrate of the root system with running water and 100 cm of secondary roots were taken from each plant. For their conservation we placed them in a fixative solution (FAA) composed of formaldehyde (10%), glacial acetic acid (5%) 96° alcohol (50%), and distilled water (35%), until the moment of evaluation. The number of apices, with or without mycorrhizae, was determined by direct observation with a stereoscope (Leica® EZ4 HD, Switzerland) (Figure 1) and the PCM was calculated (equation 3).

$$PCM = \left(\frac{\text{Ápices micorrizados}}{\text{Ápices micorrizados} + \text{Ápices no micorrizados}} \right) \times 100 \quad (3)$$

The percentage values of mycorrhizal colonization, as well as those of survival were transformed with the arcsine and square root functions. We performed analyses of variance (ANOVA) on the variables and used the Tukey test for the multiple comparison of means ($p \leq 0.05$), with the SAS statistical package (SAS Institute, 2009).

Figure 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Survival

Survival showed differences ($p \leq 0.05$) among treatments, with a variation from 64 to 99%; the

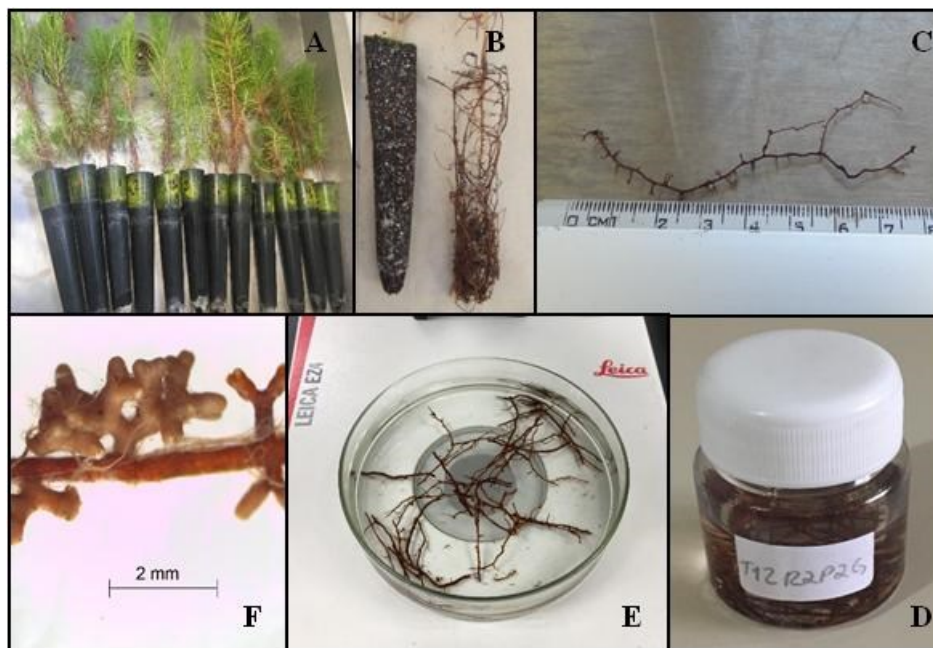


Figura 1. Proceso de determinación del porcentaje de micorrización. A) Planta evaluada. B) Planta con y sin sustrato. C) Selección de raíces secundarias. D) Muestra de raíces en conservación. E) Evaluación de raíces. F) Estructura micorrízica.

Figure 1. Process for determining the percentage of mycorrhization. A) Evaluated plant. B) Plant with and without substrate. C) Selection of secondary roots. D) Sample of roots in conservation. E) Root evaluation. F) Mycorrhizal structure.

Los valores porcentuales de colonización micorrízica así como los de supervivencia, se transformaron con las funciones arcoseno y raíz cuadrada. En las variables evaluadas se realizaron análisis de varianza (ANDEVA), con pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Supervivencia

La supervivencia presentó diferencias ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, con una variación de 64 a 99%; los porcentajes mayores se obtuvieron en los tratamientos HN y HE, caracterizados por tener solo inóculo. Los tratamientos con fertilización, solos o combinados con inóculo, así como el T, tuvieron resultados intermedios; los dos tratamientos con supervivencia menor fueron los inoculados combinados con la dosis alta de fertilización (Figura 2).

La mortalidad ocurrió al inicio de la etapa de pre acondicionamiento (mes de mayo), cuando la planta

highest percentages were obtained in the HN and HE treatments, which only contained inoculum. The treatments with fertilization, alone or combined with inoculum, as well as the T, had intermediate results. The two treatments with the lowest survival were those where inoculation was combined with the higher dose of fertilization (Figure 2).

Mortality occurred at the beginning of the pre-conditioning stage (in May), when plants were placed outdoors, due to a drastic change in the environmental conditions of cultivation after being exposed to greater solar radiation, they obtained an average of $1898 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation (RFA) compared to $497 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of RFA under shade mesh, which caused light and thermal stress in the plant. Escobar-Alonso (2012) indicated that in this stage a decrease in growth is induced and resistance to greater stress is promoted; which influence the morphological and physiological attributes of the plants. In turn, this favors survival on the field; however, for this to occur, changes in the environment must be gradual.

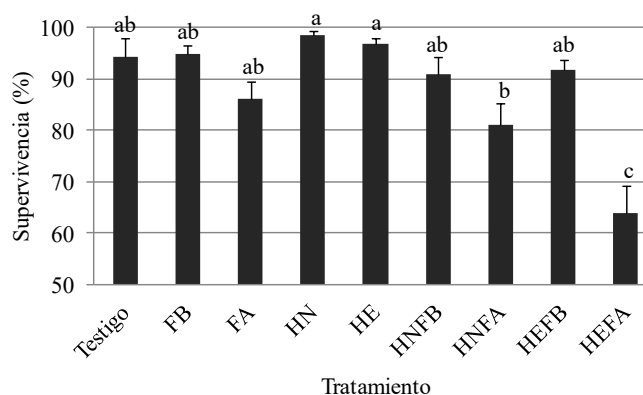


Figura 2. Supervivencia de *P. greggii* a los 11 meses de edad (Tukey; $p \leq 0.05$) bajo nueve combinaciones de tratamientos de inoculación micorrícica y fertilización en vivero. FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 2. Survival of *P. greggii* at 11 months of age (Tukey; $p \leq 0.05$) under nine combination treatments of mycorrhizal inoculation and fertilization in the nursery. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

se colocó a la intemperie, debido a un cambio drástico de las condiciones ambientales de cultivo al recibir radiación solar mayor, en promedio de $1898 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (RFA) en comparación con $497 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de RFA bajo malla sombra, lo que ocasionó estrés lumínico y térmico en la planta. Escobar (2012) indicó que en esta etapa se induce disminución del crecimiento y se promueve resistencia al estrés mayor; lo cual influye sobre los atributos morfológicos y fisiológicos de la planta. A su vez, esto permite que la supervivencia se favorezca en campo; sin embargo, para que esto ocurra los cambios en el ambiente deben ser paulatinos.

Indicadores morfológicos y calidad de planta

El valor promedio de altura presentó diferencias ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, los valores más altos (35.0 y 34.8 cm) se observaron en las plantas producidas con los tratamientos HNFB y HNFA (Figura 3), donde la inoculación y fertilización de manera conjunta favoreció el incremento en altura; el caso contrario ocurrió cuando estos factores se utilizaron de forma separada.

Como criterio de calidad de planta, la norma mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016 establece que la altura recomendada para *P. greggii* debe ser entre

Morphological indicators and plant quality

The average height value showed differences ($p \leq 0.05$) among treatments; the highest values (35.0 and 34.8 cm) were observed in the plants produced with the HNFB and HNFA treatments (Figure 3), where the inoculation and fertilization together favored height increase; the opposite occurred when these factors were used separately.

As a criterion of plant quality, the Mexican standard NMX-AA-170-SCFI-2016 establishes that the recommended height for *P. greggii* should be between 25 and 30 cm (Secretaría de Economía, 2016). Results showed that the treatments with mycorrhizal inoculum, in combination with fertilization; and the treatments with fertilization only (regardless of the dose), obtained the minimum height required; the rest of the treatments did not reach the established criteria.

Martínez-Reyes *et al.* (2012) evaluated the growth of *P. greggii* inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. without fertilizer, 14 months after sowing; in the uninoculated plant they obtained a height of 11 cm, while in the inoculated plant it was 27 cm. Bautista *et al.* (2018) analyzed the growth of *P. greggii* under different fertilization routines, and when using only

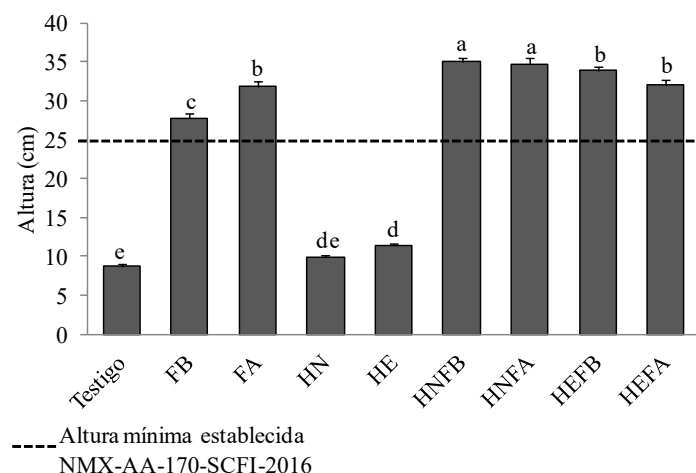


Figura 3. Altura promedio de *P. greggii* a los 11 meses de edad (Tukey; $p \leq 0.05$) bajo nueve tratamientos de inoculación micorrízica y fertilización en vivero. FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 3. Average height of *P. greggii* at 11 months of age (Tukey; $p \leq 0.05$) under nine treatments of mycorrhizal inoculation and fertilization in the nursery. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

25 y 30 cm (Secretaría de Economía, 2016); los resultados mostraron que los tratamientos con inóculo micorrízico, en combinación con fertilización; y los tratamientos sólo con fertilización (sin importar la dosis), obtuvieron la altura mínima requerida; el resto de los tratamientos no alcanzaron el criterio establecido.

Martínez-Reyes *et al.* (2012) evaluaron el crecimiento de *P. greggii* inoculado con el hongo ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. sin fertilizante, 14 meses después de la siembra, en planta sin inocular obtuvieron una altura de 11 cm, mientras que en la planta inoculada fue 27 cm. Bautista *et al.* (2018) analizaron el crecimiento de *P. greggii* bajo rutinas de fertilización diferentes y al utilizar solo fertilizante de liberación controlada, con dosis de 6 kg m^{-3} , la altura promedio fue 31.3 cm, siete meses después de su siembra.

Respecto al diámetro del cuello de la raíz existieron diferencias ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, los resultados más favorables se observaron cuando se combinó la fertilización con la inoculación de hongos ectomicorrízicos, sin importar la dosis y el tipo de inoculante. En cambio, los valores inferiores, al igual que en la variable altura, se encontraron en

controlled release fertilizer, with doses of 6 kg m^{-3} , the average height was 31.3 cm, seven months after sowing.

Regarding the diameter of the root neck, there were differences ($p \leq 0.05$) among treatments; the most favorable results were observed when fertilization was combined with the inoculation of ectomycorrhizal fungi, regardless of the dose and type of inoculant. On the other hand, the lower values, as in the height variable, were found in the unfertilized treatments (T, HN and HE) (Figure 4), which did not reach the minimum diameter required by the Mexican standard NMX-AA -170-SCFI-2016 ($\geq 4 \text{ mm}$) to be labelled as quality plants (Ministry of Economy, 2016).

Rentería-Chávez *et al.* (2017) evaluated the effect of inoculation with three species of ectomycorrhizal fungi on the growth and nutrition of *P. greggii*. They found that the diameter and height variables were higher in mycorrhized plants, regardless of the species used. Martínez-Reyes *et al.* (2012) obtained diameters of 1.6 mm in uninoculated *P. greggii* plants and 2.3 mm in mycorrhizal plants, the same as the T treatment, and similarly to the HN and HE treatments of this study.

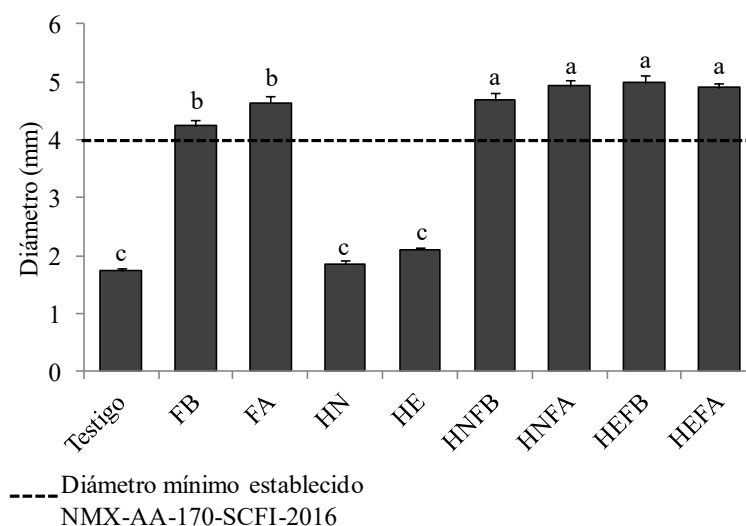


Figura 4. Diámetro promedio de *P. greggii* a los 11 meses de edad (Tukey; $p \leq 0.05$) bajo nueve tratamientos de inoculación micorrícica y fertilización en vivero. FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 4. Average diameter of *P. greggii* at 11 months of age (Tukey; $p \leq 0.05$) under nine treatments of mycorrhizal inoculation and fertilization in the nursery. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

los tratamientos sin fertilizar (T, HN y HE) (Figura 4), los cuales no alcanzaron el diámetro mínimo requerido por la norma mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016 (≥ 4 mm) para considerarla como planta de calidad (Secretaría de Economía, 2016).

Rentería-Chávez *et al.* (2017) evaluaron el efecto de la inoculación con tres especies de hongos ectomicorrícicos sobre el crecimiento y nutrición de *P. greggii*, encontraron que las variables diámetro y altura resultaron superiores en las plantas micorrizadas, sin importar la especie utilizada. Martínez-Reyes *et al.* (2012) obtuvieron diámetros de 1.6 mm en plantas de *P. greggii* sin inocular y de 2.3 mm en plantas micorrizadas, igual que el tratamiento T y de forma similar que los tratamientos HN y HE de este estudio.

Los resultados de biomasa seca aérea mostraron diferencias ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, el intervalo de valores que destaca es de 3.9 a 4.4 g, donde sobresalió el tratamiento HNFA, seguido de HEFA y FA, caracterizados por haberse fertilizado con dosis altas. En biomasa seca radical se obtuvieron valores promedio de 0.2 a 2.3 g, los tratamientos HNFB y HEFA resultaron ser los mejores. La biomasa seca total varió de 0.4 a 6.3 g, con los valores mayores en los tratamientos donde se aplicó inóculo micorrícico

The aerial dry biomass results showed differences ($p \leq 0.05$) among treatments; the higher interval of values was 3.9 to 4.4 g, where treatment HNFA was the better, followed by HEFA and FA. All of them characterized as high dose fertilization. In root dry biomass, average values of 0.2 to 2.3 g were obtained; the HNFB and HEFA treatments were the best. The total dry biomass ranged from 0.4 to 6.3 g, recording the highest values in the treatments where mycorrhizal inoculum was applied combined with fertilizer, regardless of the dose (Table 2).

In all cases, the treatments without fertilization (T, HN and HE) presented the lowest values, more than 10 times lower than those obtained in the higher treatments. Thus, on this point, we emphasize the importance of combining fertilization and inoculation to produce quality plants (Figure 5).

Biomass production in the treatments with high fertilization was similar to that reported by Vicente-Arbona *et al.* (2019), who analyzed plant quality of *P. greggii* produced in substrates based on sawdust and two doses of controlled release fertilizer (6 and 8 g L^{-1}), inoculated with *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke. Sáenz *et al.* (2014) evaluated the effect of fertilization on the quality of the *P. greggii* plants produced in

Cuadro 2. Biomasa seca de *P. greggii* a los 11 meses de edad bajo nueve tratamientos de inoculación micorrízica y fertilización en vivero. T= Testigo, FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Table 2. Dry biomass of *P. greggii* at 11 months of age under nine treatments of mycorrhizal inoculation and nursery fertilization. T = Control, FB= Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE= Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

Tratamiento	Biomasa aérea (g)	Biomasa radical (g)	Biomasa total (g)
T	0.2±0.01 d	0.2±0.01 e	0.4±0.02 c
FB	2.6±0.14 c	1.6±0.07 d	4.2±0.19 b
FA	3.9±0.16 ab	1.9±0.07 bc	5.8±0.22 a
HN	0.3±0.02 d	0.3±0.02 d	0.5±0.03 c
HE	0.4±0.02 d	0.4±0.03 d	0.8±0.04 c
HNFB	3.8±0.10 b	2.3±0.06 a	6.1±0.14 a
HNFA	4.4±0.15 a	1.9±0.08 bc	6.3±0.20 a
HEFB	3.7±0.18 b	2.1±0.10 ab	5.8±0.26 a
HEFA	4.0±0.12 ab	2.3±0.07 a	6.3±0.17 a

Medias con letras diferentes en una columna indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$). ± Error estándar de la media. ♦ Means with different letters in a column indicate statistical difference (Tukey; $p \leq 0.05$). ± Standard error of the mean.

combinado con fertilizante, sin importar la dosis (Cuadro 2).

En todos los casos, los tratamientos sin fertilización (T, HN y HE) presentaron los valores menores, más de 10 veces inferiores respecto a los obtenidos en los tratamientos superiores; en este punto destacamos la importancia de combinar la fertilización y la inoculación para producir planta de calidad (Figura 5).

La producción de biomasa en los tratamientos con fertilización alta fue similar a la documentada por Vicente-Arbona *et al.* (2019), quienes analizaron la calidad de planta de *P. greggii* producida en sustratos con base en aserrín y dos dosis de fertilizante de liberación controlada (6 y 8 g L⁻¹) e inoculados con *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke. Sáenz *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la fertilización en la calidad de planta de *P. greggii* producida en un vivero, obtuvieron una producción de biomasa seca total promedio de 2.9 g, y lo atribuyeron a la fertilización inadecuada. En nuestro estudio se obtuvo producción de biomasa seca total mayor que la registrada por estos autores.

a nursery; authors obtained an average total dry biomass production of 2.9 g, and attributed this value to inadequate fertilization. In our study, the total dry biomass production was higher than that recorded by these authors.

Results in the T, HN and HE treatments were similar to those found by Barragán-Soriano *et al.* (2018) who evaluated the contribution of the ectomycorrhizal fungus *H. mesophaeum* to the growth of *P. montezumae* Lamb. Regarding the lignification index, a percentage higher than 25% represents the reference value for a quality plant, since it reflects the optimal level of pre-conditioning. Our results showed that, except for T, HN and HE, plants produced with the other treatments had higher values than those recommended, with HNFB in the upper statistical group.

For the aerial : root dry biomass ratio, values should be between 1.5 and 2.5; of the evaluated treatments, only T, HN and HE were lower than that indicated interval. The remaining treatments showed favorable values, with a better balance between the

Los resultados en los tratamientos T, HN y HE fueron similares a los encontrados por Barragán-Soriano *et al.* (2018), quienes evaluaron el aporte del hongo ectomicorrícico *H. mesophaeum* al crecimiento de *P. montezumae* Lamb. Respecto al índice de lignificación, un porcentaje mayor a 25% representa el valor de referencia para planta de calidad, ya que refleja el nivel óptimo de pre acondicionamiento. Los resultados mostraron que salvo el T, HN y HE, la planta producida en los demás tratamientos tuvieron valores superiores al recomendado, con HNFB en el grupo estadístico superior.

Para la relación entre biomasa seca aérea y radical los valores deben ubicarse entre 1.5 y 2.5; de los tratamientos evaluados, solo el T, HN y HE fueron inferiores al intervalo indicado. El resto de tratamientos presentaron valores favorables, con equilibrio mejor entre la relación parte aérea y radical; cabe resaltar que son los mismos tratamientos donde la lignificación fue superior a 25% (Cuadro 3).

El Índice de Calidad de Dickson resultó mejor en los tratamientos combinados, sin importar la dosis o el tipo de inoculante, así como en el tratamiento FA. En contraste, los tratamientos T, HN y HE obtuvieron los valores más bajos, debido a la ausencia de fertilizante (Cuadro 3). Estos resultados significan la obtención de un índice mayor que el logrado por Bautista *et al.* (2018), Castro-Garibay *et al.* (2018) y Maldonado-Benitez *et al.* (2011).

Los valores menores en las variables de crecimiento e índices de calidad, sobre todo en los tratamientos sin fertilización, al igual que en el estudio de Domínguez-Núñez *et al.* (2004), se atribuyen a que la simbiosis micorrícica, en dependencia de su fase de establecimiento y funcionalidad, puede volverse un costo en el consumo de carbono para la planta hospedera, lo cual se expresa con un crecimiento menor (Pinkas *et al.* 2000).

Inoculación controlada

El porcentaje de colonización micorrícica varió de 37 a 63%. El tratamiento HEFA presentó el porcentaje mayor, seguido por el tratamiento HEFB, y en ambos casos destacó la aplicación del inoculante con esporas de hongos exóticos. Después, con valores entre 52 y 55% se ubicaron los tratamientos en donde se aplicó HN o HE, fertilizados y sin fertilizar. El porcentaje menor se obtuvo en el T, tratamiento sin

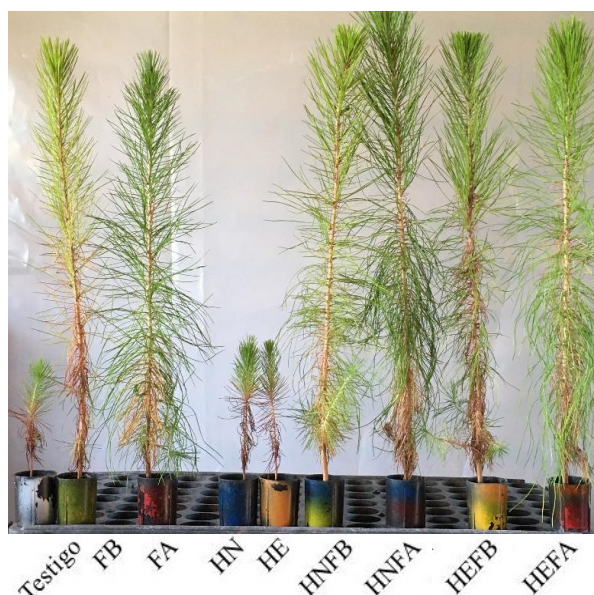


Figura 5. Aspecto final de la planta de *P. greggii* a los 11 meses de edad, bajo nueve tratamientos de inoculación micorrícica y fertilización en vivero. FB= Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN= Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB= Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA= Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB= Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA= Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 5. Final appearance of *P. greggii* plant at 11 months of age, under nine treatments of mycorrhizal inoculation and nursery fertilization. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

aerial and root sections. It is worth mentioning that these are the same treatments where lignification was higher than 25% (Table 3).

The Dickson Quality Index was better in the combined treatments, regardless of the dose or type of inoculant, as well as in the FA treatment. In contrast, the treatments T, HN and HE obtained the lowest values due to the absence of fertilizer (Table 3). These results mean obtaining a higher index than those observed by Bautista *et al.* (2018), Castro-Garibay *et al.* (2018) and Maldonado-Benitez *et al.* (2011).

The lower values in the growth variables and quality indices, especially in the treatments without

Cuadro 3. Valores medios de índices de calidad *P. greggii* a los 11 meses de edad bajo nueve tratamientos de inoculación micorrícica y fertilización en vivero. T = Testigo, FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Table 3. Mean values of *P. greggii* quality indices at 11 months of age under nine treatments from mycorrhizal inoculation and nursery fertilization. T = Control, FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

Tratamiento	Índice de lignificación (%)	Relación biomasa seca aérea/radical	Índice de Calidad de Dickson
T	23.7±1.22 d	1.2±0.09	0.1±0.00 c
FB	29.8±0.60 bc	1.6±0.10	0.5±0.03 b
FA	28.6±0.36 c	2.1±0.06	0.7±0.03 a
HN	18.9±0.75 e	1.1±0.08	0.1±0.01 c
HE	21.0±0.62 de	1.1±0.07	0.1±0.01 c
HNFB	33.4±0.44 a	1.7±0.06	0.7±0.03 a
HNFA	30.8±0.41 abc	2.4±0.11	0.7±0.04 a
HEFB	29.7±0.59 bc	1.9±0.09	0.7±0.04 a
HEFA	32.2±0.37 ab	1.8±0.07	0.8±0.03 a

Medias con letras diferentes en una columna indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$). ± Error estándar de la media. ♦ Means with different letters in a column indicate statistical difference (Tukey; $p \leq 0.05$). ± Standard error of the mean.

inocular que presentó colonización ectomicorrícica no buscada debido a que el experimento se realizó en condiciones normales de vivero, donde es posible la existencia de propágulos de hongos ectomicorrícicos radicados de forma natural (Figura 6). Al respecto, Salgado-Salomón *et al.* (2009) aportaron evidencia de que existen fuentes de inóculo micorrícico en los viveros de producción acelerada (sistema tecnificado), las cuales pueden provenir de los sustratos, del agua de riego o por esporas que existen en el sitio.

En nuestro estudio los niveles de micorrización concuerdan con lo informado por Vicente-Arbona *et al.* (2019), quienes encontraron 61% de tasa de micorrización en *P. greggii* inoculado con *L. laccata*. Resultados más altos de micorrización en *P. greggii* a los de este estudio, son los valores mayores al 77% publicados por Méndez-Neri *et al.* (2011) al inocular con *H. mesophaeum*, *L. laccata* y *Suillus aff. pseudo-brevipes*.

Martínez-Reyes *et al.* (2012) encontraron 79.5% de micorrización en *P. greggii* inoculado con *H.*

fertilization, as in the study by Domínguez-Núñez *et al.* (2004), are attributed to the fact that mycorrhizal symbiosis, depending on establishment stage and functionality, may become a carbon consumption cost for the host plant, leading to lower growth (Pinkas *et al.* 2000).

Controlled inoculation

The percentage of mycorrhizal colonization ranged from 37 to 63%. HEFA treatment presented the highest percentage, followed by HEFB treatment; in both cases, we should note the application of the inoculant with exotic fungal spores. Then, with values between 52 and 55%, HN and HE treatments, fertilized and unfertilized, followed. The lowest percentage was obtained in T, uninoculated treatment that presented unintended ectomycorrhizal colonization because the experiment was carried out under normal nursery conditions,

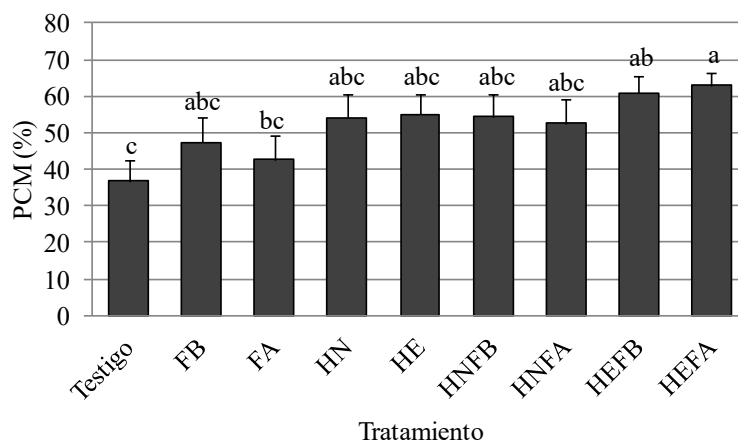


Figura 6. Porcentaje de colonización micorrícica (Tukey; $p \leq 0.05$) en raíces de *P. greggii* 11 meses después de su siembra en vivero bajo nueve tratamientos evaluados. FB = Fertilización Baja, FA = Fertilización Alta, HN = Hongos Nativos, HE = Hongos Exóticos, HNFB = Hongos Nativos y Fertilización Baja, HNFA = Hongos Nativos y Fertilización Alta, HEFB = Hongos Exóticos y Fertilización Baja, HEFA = Hongos Exóticos y Fertilización Alta.

Figure 6. Percentage of mycorrhizal colonization (Tukey; $p \leq 0.05$) in *P. greggii* roots 11 months after planting in the nursery under nine evaluated treatments. FB = Low Fertilization, FA = High Fertilization, HN = Native Fungi, HE = Exotic Fungi, HNFB = Native Fungi and Low Fertilization, HNFA = Native Fungi and High Fertilization, HEFB = Exotic Fungi and Low Fertilization, HEFA = Exotic Fungi and High Fertilization.

mesophaeum. Pero, Rentería-Chavez *et al.* (2017) obtuvieron valores menores a 30% en la colonización micorrícica en *P. greggii*, inoculado con *Hebeloma leucosarx* P.D. Orton, *L. laccata* y *L. bicolor* (Maire) P.D. Orton. Según Tateishi *et al.* (2003), porcentajes de micorrización mayores al 60% se consideran altos.

En otras especies del género *Pinus* se encontraron resultados similares. Barragán-Soriano *et al.* (2018) encontraron 76% de micorrización en *P. montezumae* inoculado con *H. mesophaeum*. En contraste, Baltasar *et al.* (2007) inocularon con *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. en *P. ponderosa* Dougl. ex Laws. y encontraron 38% de micorrización en el tratamiento mejor con fertilización baja, y porcentajes menores con fertilización alta.

Las diferencias en los porcentajes de micorrización resaltan la importancia de seleccionar especies de hongos ectomicorrícicos adecuados y de utilizar la técnica de inoculación apropiada (González-Ochoa *et al.* 2003). En nuestro estudio, por medio de micorrización controlada se confirmó la amplitud de la capacidad colonizadora (de media baja a alta) de las especies fúngicas probadas y su compatibilidad con *Pinus greggii*. Las diferencias en PCM encontradas entre tratamientos se atribuyeron principalmente al nivel de compatibilidad planta-hongo.

where the existence of naturally-based propagules of ectomycorrhizal fungus is possible (Figure 6). In this regard, Salgado-Salomón *et al.* (2009) provided evidence about sources of mycorrhizal inoculum found in accelerated production nurseries (high technology systems). These spores may proceed from substrates, irrigation water or spores already existent on site.

In our study, the levels of mycorrhizal colonization agree with those reported by Vicente-Arbona *et al.* (2019), who found a 61% mycorrhizal colonization rate in *P. greggii* inoculated with *L. laccata*. Whereas higher mycorrhizal colonization results in *P. greggii* than those in our study, are those values higher than 77% reported by Méndez-Neri *et al.* (2011), after inoculating plants with *H. mesophaeum*, *L. laccata* and *Suillus aff. pseudobrevipes*.

Martínez-Reyes *et al.* (2012) found 79.5% mycorrhization in *P. greggii* inoculated with *H. mesophaeum*. But Rentería-Chavez *et al.* (2017) obtained values lower than 30% in mycorrhizal colonization in *P. greggii*, inoculated with *Hebeloma leucosarx* P.D. Orton, *L. laccata* and *L. bicolor* (Maire) P.D. Orton. According to Tateishi *et al.* (2003), mycorrhizal percentages higher than 60% are considered high.

Caracterización de ectomicorizas

Con el inoculante MycorTree Ecto-inyectable® se generaron dos morfotipos afines a *Scleroderma citrinum* (Figura 7A) y a *Pisolithus tinctorius* (Figura 7B), el primer morfotipo se encontró en proporción mayor que el segundo. Para ambos morfotipos, las ectomicorizas formadas en los tratamientos sin fertilizar o con fertilización baja se encontraron en etapa madura; mientras que en los tratamientos con fertilización alta las estructuras se observaron en el desarrollo inicial.

El morfotipo afín a *S. citrinum* se caracterizó por presentar ectomicorizas estipitadas, con ramificación dicotómica, color blanco parduzco sin presencia de rizomorfos en etapa de desarrollo inicial. En etapa madura mostró ectomicorizas con ramificación coraloide estipitada, color blanco amarillento, terminaciones rectas no ramificadas y presencia de rizomorfos (DEEMY, 2019). El morfotipo afín a *Pisolithus tinctorius* presentó estructuras coraloides estipitadas con ramificaciones dicotómicas, ápices rectos no ramificados, color marrón amarillento y presencia de rizomorfos de conexión restringida. Esta caracterización coincide con la observada por Valdés *et al.* (2019) para *P. tinctorius* en simbiosis con *P. devoniana*; también utilizaron inóculo de origen comercial.

Los resultados con el inoculante Ecto-Myc®, compuesto de una mezcla de esporas de hongos nativos (*Lactarius indigo*, *Amanita rubescens*, *Amanita* sp., *Ramaria* sp. y *Boletus* sp.), no representaron la misma diversidad de especies que lo componen. Es

In other species of the genus *Pinus*, similar results were found. Barragán-Soriano *et al.* (2018) reported 76% mycorrhization in *P. montezumae* inoculated with *H. mesophaeum*. In contrast, Baltasar *et al.* (2007) inoculated *P. ponderosa* Dougl. ex Laws. with *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr., and found 38% mycorrhizal colonization in the best treatment with low fertilization, but lower percentages with high fertilization.

The differences in the percentages of mycorrhizal colonization emphasizes the importance of selecting suitable ectomycorrhizal fungal species, and using the appropriate inoculation technique (González-Ochoa *et al.* 2003). In our study, by means of controlled mycorrhizal infection, the amplitude of colonizing capacity (from medium-low to high) of the tested fungal species was confirmed, as well as their compatibility with *Pinus greggii*. The differences in PCM found among treatments were mainly attributed to the level of plant-fungus compatibility.

Characterization of ectomycorrhizae

With the MycorTree Ecto-injectable® inoculant, two morphotypes related to *Scleroderma citrinum* (Figure 7A) and *Pisolithus tinctorius* (Figure 7B) were generated. The first morphotype was found in a greater proportion than the second. For both morphotypes, the ectomycorrhizae formed in the unfertilized or low fertilization treatments were found in the mature stage; while in treatments with high fertilization, the structures were observed in their initial development.

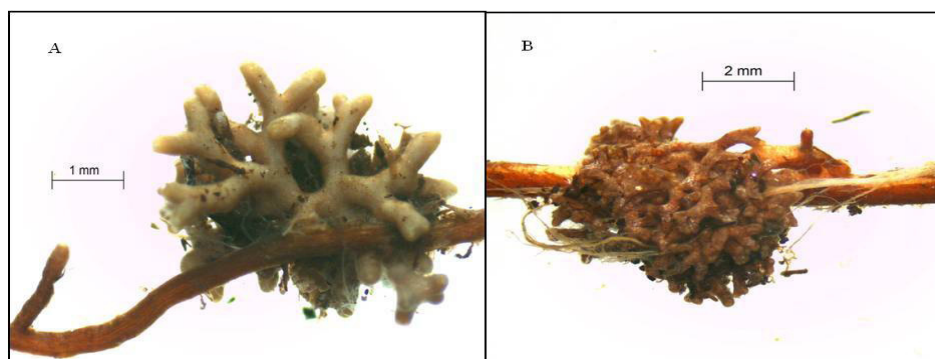


Figura 7. Estructuras micorrícicas. A) morfotipo afín a *S. citrinum*; B) morfotipo afín a *P. tinctorius*, identificados en raíces de plantas de *P. greggii* del tratamiento 5.

Figure 7. Mycorrhizal structures. A) morphotype related to *S. citrinum*; B) morphotype related to *P. tinctorius*, identified in roots of *P. greggii* plants from treatment 5.

posible que algunas de las esporas no lograran germinar y colonizar las raíces de las plantas. Una explicación factible es que las esporas de algunas especies de hongos ectomicorrícicos germinan más rápido que otras, porque requieren condiciones ambientales específicas (Nara, 2009; Ishida *et al.*, 2008).

Dos morfotipos principales se identificaron; el primero afín a *Amanita* spp. con ramificación dicotómica, terminaciones rectas no ramificadas, forma cilíndrica no inflamada y afilada, de colores ocre, ocre-amarillento o blanco con presencia de rizomorfos (Figura 8A) (DEEMY, 2019). Es preciso señalar que los productos comerciales no siempre tienen identificadas las especies de hongos que contienen, lo cual dificulta relacionar la descripción de las micorrizas formadas con el contenido de una especie en particular.

La incertidumbre respecto de las especies contenidas en este inoculante comercial, en principio ocasiona duda y no deja claro si la colonización tiene efectos sinérgicos o deletéreos sobre la calidad de la planta inoculada. Así que es difícil determinar cuál especie de hongo ectomicorrícico aportó beneficios mayores al fitobionte probado; este es el caso del se-

The morphotype related to *S. citrinum* was characterized by presenting stipitate ectomycorrhizae, with dichotomous branching, brownish-white color without the presence of rhizomorphs in the initial development stage. In its mature stage, this morphotype showed ectomycorrhizae with stipitate coral-like branching, yellowish-white color, straight unbranched terminations and the presence of rhizomorphs (DEEMY, 2019). The morphotype similar to *Pisolithus tinctorius* presented stipitate coral-like structures with dichotomous branches, straight unbranched apices, yellowish-brown color, and presence of restricted connection rhizomorphs. This characterization coincides with that observed by Valdés *et al.* (2019) for *P. tinctorius* in symbiosis with *P. devoniana*; they also used inoculum of commercial origin.

The results with the inoculant Ecto-Myc[®], composed of a mixture of spores of native fungi (*Lactarius indigo*, *Amanita rubescens*, *Amanita* sp., *Ramaria* sp. and *Boletus* sp.), did not represent the same diversity of species that compose it. It is possible that some of the spores failed to germinate and colonize the roots of the plants. A plausible

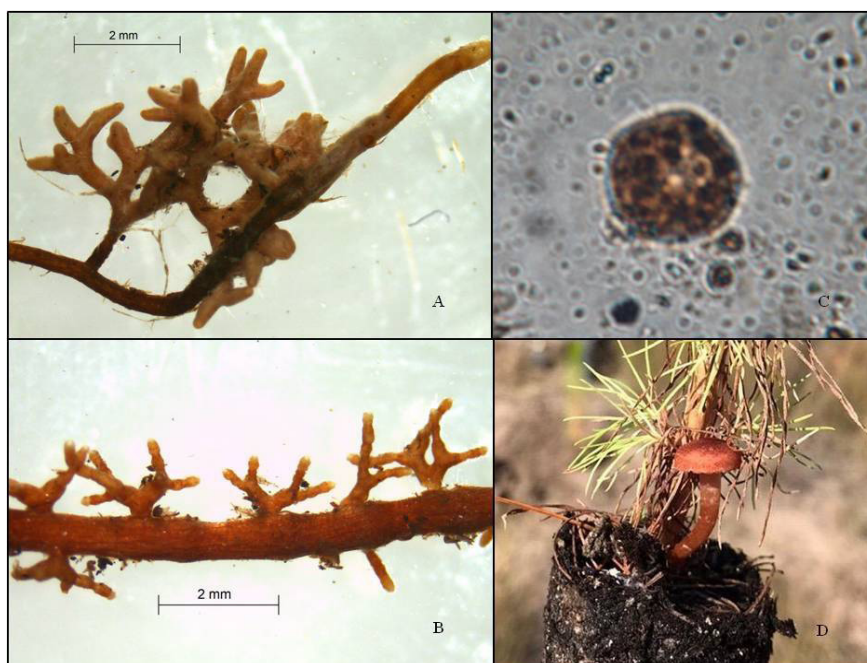


Figura 8. Estructuras micorrícicas del inoculante Ecto-Myc[®]. A) Morfotipo afín a *Amanita* spp. B) Morfotipo afín a *Laccaria* spp. C) Espora afín a *Laccaria* spp. D) Cuerpo fructífero afín a *Laccaria* spp.

Figure 8. Mycorrhizal structures of the Ecto-Myc[®] inoculant. A) Morphotype related to *Amanita* spp. B) Morphotype related to *Laccaria* spp. C) Spore related to *Laccaria* spp. D) Sporophore related to *Laccaria* spp.

gundo morfotipo encontrado, afín al género *Laccaria* spp., el cual presentó ramificación dicotómica de longitud igual, con constricciones en la base de las ramificaciones, desde la parte media y casi al llegar a los ápices, color marrón anaranjado (Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2019) (Figura 8B). La identificación a nivel de género se basó en la presencia de esporas compatibles con *Laccaria* spp. al momento de analizar el producto y determinar la concentración de esporas. Incluso, en los tratamientos donde se aplicó este inoculante se observaron cuerpos fructíferos de este género (Figura 8C y 8D).

La certeza en el contenido del inóculo puede solventarse si la recolección de los cuerpos fructíferos de hongos silvestres se hace en forma directa en campo, para procesarlos por medio de secado, molido, tamizado, empaquetado y almacenado (Carrasco-Hernández *et al.*, 2018), y de esta manera, el inoculante queda disponible para su aplicación en las raíces de las plantas.

CONCLUSIONES

La adición de fertilizante de liberación controlada e inoculación con productos comerciales con hongos ectomicorrícicos resultó una alternativa buena para producir planta de *P. greggii* de calidad, sobre la base de los requerimientos que estipula la norma mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016. La falta de fertilización ocasionó un desarrollo deficiente de la planta, respecto a la norma.

El porcentaje promedio de colonización micorrícica no tuvo influencia del tipo de inoculante o dosis de fertilización, sino por el nivel de compatibilidad planta-hongo.

No todas las esporas de las especies de hongos nativos contenidas en el inoculante comercial formaron estructuras micorrícicas en las raíces de las plantas de *P. greggii*. De modo que no fue posible determinar si existió incompatibilidad específica de alguna de ellas con la especie forestal estudiada.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo de estancia posdoctoral del primer autor en el Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad Juárez del estado de Durango. A la Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente del estado de Durango, por colaborar a través

de la explicación es que las esporas de algunas especies de ectomicorrizas se germinan más rápido que otras, porque requieren condiciones ambientales específicas (Nara, 2009; Ishida *et al.*, 2008).

Se identificaron dos morfotipos; el primero relacionado con *Amanita* spp. con ramificación dicotómica, terminaciones unbranched, no inflamadas y forma cilíndrica aguda, color ocre, ocre-amarillento o blanco, con la presencia de rizomorfos (Figura 8A) (DEEMY, 2019). Es worth noting que los productos comerciales no siempre tienen la especie de hongo que se identifica, lo que hace difícil relacionar la descripción de las micorrizas con el contenido de una especie particular.

La incertidumbre sobre las especies contenidas en un inoculante comercial, en principio genera dudas y no aclara si la colonización tiene efectos sinérgicos o deletéreos sobre la calidad de la planta inoculada. Por lo tanto, es difícil determinar qué especie de ectomicorriza proporcionó mayores beneficios al fitobionte probado. Este fue el caso del segundo morfotipo encontrado, relacionado con el género *Laccaria* spp., que mostró ramificación dicotómica de igual longitud, con constricciones en la base de las ramas, color naranja-marrón en la parte media, y casi al llegar a los ápices (Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2019) (Figura 8B). La identificación a nivel de género se basó en la presencia de esporas compatibles con *Laccaria* spp. al momento de analizar el producto y determinar la concentración de esporas. Además, en los tratamientos donde se aplicó este inoculante, se observaron cuerpos fructíferos de este género (Figura 8C y 8D).

La certeza en el contenido del inóculo puede lograrse si la recolección de los cuerpos fructíferos de hongos silvestres se hace directamente en el campo, para procesarlos mediante secado, molienda, tamizado, envasado y almacenamiento (Carrasco-Hernández *et al.*, 2018). De esta manera, el inoculante queda disponible para su aplicación en las raíces de las plantas.

CONCLUSIONS

The addition of controlled release fertilizer and inoculation with commercial products containing ectomycorrhizal fungi resulted in a good alternative to produce quality *P. greggii* plants, based on the requirements in the Mexican standard NMX-AA-

del apoyo del desarrollo del experimento en el Vivero Forestal “Praxedis Guerrero”.

LITERATURA CITADA

- Baltasar M., D., C. Barroetaveña, y M. Rajchenberg. 2007. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque* 28: 226-233. DOI:10.4067/S0717-92002007000300007
- Barragán-Soriano, J. L., J. Pérez-Moreno, J. J. Almaraz-Suárez, M. G. Carcaño-Montiel, y K. I. Medrano-Ortiz. 2018. La inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y bacterias incrementa el crecimiento y mejora la calidad fisiológica de *Pinus montezumae* Lamb. *Rev. Chapingo Ser. Cien. For. Amb.* 241: 3-16. DOI: 10.5154/r.rchscfa.2017.01.010
- Bautista O., G. I., J. A. Prieto R., J. C. Hernández D., E. Basave V., J. R. Goche T., y E. Montiel A. 2018. Crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. bajo diferentes rutinas de fertilización en vivero. *Rev. Mex. Cien. For.* 9: 213-233. DOI: 10.29298/rmcf.v9i49.171
- Carrasco-Hernández, V., D. A. Rodríguez-Trejo, J. Pérez-Moreno, V. M. Duarte-Zaragoza, J. L. Navarros-Sandoval, y R. Quintero-Lizaola. 2018. Evaluación del costo de producción de inoculantes ectomicorrízicos neotropicales a base de esporas. *Rev. Mex. Cien. Agr.* 9: 417-429. DOI: 10.29312/remexca.v9i2.1082
- Castro-Garibay, S. L., A. Aldrete, J. López-Upton, y V. M. Ordáz-Chaparro. 2018. Efecto del envase, sustrato y fertilización en el crecimiento de *Pinus greggii* var. *australis* en vivero. *Agrociencia* 52: 115-127. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v52n1/1405-3195-agro-52-01-115.pdf> (Consulta: marzo 2020).
- DEEMY (Determination of Ectomycorrhizae). 2019. An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. München, Germany. <http://www.deemy.de/> (Consulta: marzo 2020).
- Domínguez-Núñez J., J. A. Planelles B., R. Planelles, y J. A. Sainz de Omeñaca. 2004. Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. *Inves. Agrar.: Sist. Rec. For.* 13:317-328. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=930093> (Consulta: marzo 2020).
- Dvorak, W. S. 2010. *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. 601-603. In: Vozzo, J. A. (ed). *Manual de semillas de árboles tropicales*. Washington DC, USDA Forest Service. 887 p. <https://rngr.net/publications/manual-de-semillas-de-arboles-tropicales> (Consulta: febrero 2020)
- Escobar R., R. 2012. Fases de cultivo: Endurecimiento. In: Buamscha, G. L., T. Contard, R. K. Dumroese, J. A. Enricci, R. Escobar, H. E. Gonda, D. F. Jacobs, T. D. Landis, T. Luna, J. G. Mexal, y K. M. Wilkinson (eds). *Producción de plantas en viveros forestales*. Colección Nexos. Consejo Federal de Inversiones. Buenos Aires, Argentina. pp: 142-162. https://www.researchgate.net/publication/272790732_Fases_de_cultivo_establecimiento_y_crecimiento_rapido (Consulta: abril 2020).
- 170-SCFI-2016. The lack of fertilization caused poor development of plants when compared to the standards.
- The average percentage of mycorrhizal colonization was not influenced by the type of inoculant or fertilization dose, but by the level of plant-fungus compatibility.
- Not all the spores of the native fungal species contained in the commercial inoculant formed mycorrhizal structures in the roots of *P. greggii* plants. Thus, it was not possible to determine if there was a specific incompatibility of any of them with the forest species studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

To CONACYT (the Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) for funding a postdoctoral stay granted to first author on the Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales under the University Juárez of the state of Durango. To the Ministry of environment of Durango state, for collaborating in the development of the experiment at “Praxedis Guerrero” Forest Nursery.

—End of the English version—



- Escobar-Alonso, S., y D. A. Rodríguez T. 2019. Estado del arte en la investigación sobre calidad de planta del género *Pinus* en México. *Rev. Mex. Cien. For.* 10: 1-38. DOI: 10.29298/rmcf.v10i55.558.
- González-Ochoa A. I., J. de Las Heras, P. Torres, y E. Sánchez-Gómez. 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Ann. For. Sci.* 60:43-48. DOI: 10.1051/forest:2002072.
- Ishida, T.A., K. Nara, M. Tanaka, A. Kinoshita, and T. Hogetsu. 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180: 491– 500. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02572.x.
- Maldonado-Benitez, K. R., A. Aldrete, J. López-Upton, H. Vaqueza-Huerta, y V. M. Cetina-Alcalá. 2011. Producción de *Pinus greggii* Engelm. en mezclas de sustrato con hidrogel y riego, en vivero. *Agrociencia* 45: 389-398. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v45n3/v45n3a11.pdf> (Consulta: febrero 2020).

- Martínez-Reyes, M., J. Pérez-Moreno, L. Villarreal-Ruiz, R. Ferrera-Cerrato, B. Xoconostle-Cázares, J. J. Vargas-Hernández, y M. Honrubia-García. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. Rev. Chapingo Ser. Cien. For. Amb. 18: 183-192. DOI:10.5154/r.rchscfa.2010.11.112
- Méndez-Neri, M., J. Pérez-Moreno, R. Quintero-Lizaola, E. Hernández-Acosta, y A. Lara-Herrera. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. Terra Latinoamericana 29: 73-81. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792011000100073&lng=es&tlng=es (Consulta: febrero 2020).
- Nara, K. 2009. Spores of Ectomycorrhizal fungi: ecological strategies for germination and dormancy. New Phytologist 181: 245-248. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02691.x.
- Pinkas, Y., M. Maimon, E. Shabi, S. Elisha, Y. Shmulewich, and S. Freeman. 2000. Inoculation, isolation and identification of *Tuber melanosporum* from old and new oak host in Israel. Mycol. Res. 104: 472-477. DOI: 10.1017/S0953756299001458
- Rentería-Chávez, M. C., J. Pérez-Moreno, V. M. Cetina-Alcalá, R. Ferrera-Cerrato, y B. Xoconostle-Cázares. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. Rev. Argentina Microbiol. 49: 93-104. DOI: 10.1016/j.ram.2016.06.004.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., D. Ramírez-Martínez, R. Garibay-Orijel, V. Jacob-Cervantes, J. Pérez-Moreno, M. P. Ortega-Larrocea, y E. Arellano-Torres. 2019. Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. Rev. Mex. Biodiv. 90: 1:11. DOI: 10.22201/ib.20078706e.2019.90.2868.
- Sáenz, R., J. T., H. J. Muñoz F., C. M. A. Pérez D., S. A. Rueda, y J. Hernández. 2014. Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero "Morelia", estado de Michoacán. Rev. Mex. Cien. For. 5: 98-111. DOI: 10.29298/rmcf.v5i26.293.
- Salgado-Salomón, M. E., M. Rajchenber, y C. Barroetaveña. 2009. Evaluación del estado micorrízico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego, sin manejo de la micorrización. Bosque 30: 127-134. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173113299002> (Consulta: marzo 2020).
- SAS Institute. 2009. SAS/STAT® 9.2. User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, EEUU. <http://support.sas.com/documentation/cdl/en/statugmcmc/63125/PDF/default/statugmcmc.pdf> (Consulta: febrero 2020).
- Secretaría de Economía. 2016. Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016: Certificación de Operación de Viveros Forestales. México, D.F. <http://www.economia-nmx.gob.mx/normasmx/consulta.nmx> (Consulta: febrero 2020).
- Tateishi, T., K. Yokoyama, N. Kohno, H. Okabe, and T. Marumoto. 2003. Estimation of mycorrhizal colonization of the roots of oak seedlings inoculated with an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystea*. Soil Sci. Plant Nutr. 49:641-645. DOI: 10.1080/00380768.2003.10410054.
- Valdés, R., M., E. Ambríz P., A. Camacho V., y A. M. Fierros G. 2019. Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. Rev. Mex. Cien. For. 1: 53-64. DOI: 10.29298/rmcf.v1i2.637.
- Vicente-Arbona, J. C., V. Carrasco-Hernández, D. A. Rodríguez-Trejo, y A. Villanueva-Morales. 2019. Calidad de planta de *Pinus greggii* producida en sustratos a base de aserrín. Madera y Bosques 25: 1-14. DOI: 10.21829/myb.2019.2521784.