

Mycorrhiza and fertilization: effect on the production of *Pinus engelmannii* Carr. in nursery

Micorrizas y fertilización: efecto en la producción de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero

Silvia Salcido-Ruiz¹; José Á. Prieto-Ruiz²; José L. García-Rodríguez³; Enrique Santana-Aispuro⁴; Jorge A. Chávez-Simental⁵

¹Universidad Juárez del Estado de Durango, Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales. Av. Río Papaloapan y bulevar Durango s/n, col. Valle del Sur, C. P. 34120. Durango, Dgo., México.

²Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Forestales. Av. Río Papaloapan y bulevar Durango s/n. Col. Valle del Sur. C. P. 34120. Durango, Durango, México.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro de Investigación Norte-Centro (CIRNOC), Campo Experimental Valle del Guadiana (CEVAG). km 4.5 carretera Durango-El Mezquital. C. P. 34170. Durango, Dgo., México.

⁴Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente del estado de Durango, vivero forestal Praxedis Guerrero. Av. Ferrocarril 109. C. P. 34070. Durango, Dgo, México.

⁵Universidad Juárez del Estado de Durango, Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera. Bulevar Guadiana núm. 501, Cd. Universitaria, C. P. 34120. Durango, Dgo., México.

*Corresponding author: jprieto@ujed.mx; tel.: +52 (618) 136 1952.

Abstract

Introduction: In the nursery, controlled-release fertilization and inoculation with mycorrhizal fungi promote the quality of plant material reproduced in containers.

Objective: To evaluate the effect of two commercial mycorrhizal inoculants and one controlled-release fertilizer on the development of *Pinus engelmannii* Carr. in nursery.

Materials and methods: Two commercial inoculants (fungi native to Mexico [1 mL·plant⁻¹ with 1.05 x 10⁷ spores·mL⁻¹] and exotics [1.5 mL·plant⁻¹ with 6.5 x 10⁶ spores·mL⁻¹]), two doses of a controlled-release fertilizer (11-28-11 NPK [3 and 6 g·L⁻¹]) and a control were evaluated; in total, nine treatments were used. The variables analyzed were: survival, stem height, root collar diameter, wet and dry biomass, ratio of dry biomass of the aerial part/dry biomass of the root part, lignification index, Dickson's quality index and mycorrhizal colonization.

Results and discussion: Survival (80 to 96 %) was similar between treatments. Eight months after sowing, seedlings showed significant differences ($P \leq 0.05$) in morphological variables; combined treatments gave better results. Plants with commercial inoculum of native fungi (1 mL·plant⁻¹ [*Amanita rubescens* Pers., *Amanita* sp., *Lactarius indigo* [Schwein] Fr., *Ramaria* sp. and *Boletus* sp.]) and fertilization of 3 g·L⁻¹ had higher Dickson quality index. It was observed that the higher the fertilization dose, the lower the percentage of mycorrhizal colonization.

Conclusion: The combination of ectomycorrhizal inoculum of native fungi and low-dose fertilization showed that both components are complementary in the plant development of *P. engelmannii*.

Resumen

Introducción: En el vivero, la fertilización de liberación controlada y la inoculación con hongos micorrízicos favorecen la calidad del material vegetal reproducido en contenedores.

Objetivo: Evaluar el efecto de dos inoculantes micorrízicos comerciales y un fertilizante de liberación controlada sobre el desarrollo de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero.

Materiales y métodos: Se evaluaron dos inoculantes comerciales (hongos nativos de México [1 mL·planta⁻¹ con 1.05 x 10⁷ esporas·mL⁻¹] y exóticos [1.5 mL·planta⁻¹ con 6.5 x 10⁶ esporas·mL⁻¹]), dos dosis de un fertilizante de liberación controlada (11-28-11 de NPK [3 y 6 g·L⁻¹]) y un testigo; en total, se tuvieron nueve tratamientos. Las variables analizadas fueron: supervivencia, altura del tallo, diámetro al cuello de la raíz, biomasa húmeda y seca, relación biomasa seca de la parte aérea/biomasa seca de la parte radical, índice de lignificación, índice de calidad de Dickson y colonización micorrízica.

Resultados y discusión: La supervivencia (80 a 96 %) fue similar entre tratamientos. A los ocho meses de la siembra, las plantas mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en las variables morfológicas; los tratamientos combinados dieron mejores resultados. Las plantas con inoculante comercial de hongos nativos (1 mL·planta⁻¹ [*Amanita rubescens* Pers., *Amanita* sp., *Lactarius indigo* [Schwein] Fr., *Ramaria* sp. y *Boletus* sp.]) y fertilización de 3 g·L⁻¹ tuvieron mayor índice de calidad de Dickson. Se observó que a mayor dosis de fertilización existió menor porcentaje de colonización micorrízica.

Conclusión: La combinación de inoculante ectomicorrízico de hongos nativos y fertilización en dosis baja demostró que ambos componentes son complementarios en el desarrollo de planta de *P. engelmannii*.

Keywords: native fungi; ectomycorrhiza; controlled-release fertilizer; mycorrhizal colonization; plant quality.

Palabras clave: hongos nativos; ectomicorriza; fertilizante de liberación controlada; colonización micorrízica; calidad de planta.

Introduction

The term mycorrhiza refers to the symbiotic association between plant roots and the fungal mycelium of the soil (Honrubia, 2009). It is estimated that 90 % of plants form mycorrhizal symbiosis; the development of this type of symbiosis began approximately 400 million years ago (Sosa, Sanchez, Morales, & Cruz, 2006). Mycorrhizae promote the solubility and mobility of nutrients from the soil to the plant, conferring greater resistance to water stress and damage by disease (Carrasco-Hernández et al., 2010; Pera & Parladé, 2005). Likewise, mycorrhizae improve soil structure and interaction with beneficial microorganisms, thus contributing to plant development and growth (Gómez-Romero, Villegas, Sáenz-Romero, & Lindig-Cisneros, 2013; Osorio, 2012).

Among the types of mycorrhizae are endomycorrhizae and ectomycorrhizae; the latter are characterized by the formation of external mycelium and a Hartig network between the root cells without penetrating the cell wall. Ectomycorrhiza is established in more than 5000 species of fungi, mostly in the class Basidiomycetes, and in about 3000 species of angiosperms and gymnosperms. Ectomycorrhizae are associated with forest species and are relevant in the production of plants of the genus *Pinus* in nurseries. This genus is a forced symbiont, so the absence of mycorrhizae affects plant survival and development (García, Sarmiento, Sierra, & Mejía, 2012). Hence the importance of considering the presence of ectomycorrhizae as a parameter that evaluates the quality of the forest plant produced in the nursery (Martínez, Sarmiento, Sigala, Rosales, & Montoya, 2016; Secretaría de Economía, 2016).

In the nursery stage, the production of forest seedlings in containers requires inputs and processes to favor the quality of the plant material. Some of these are the growth medium, the type of container, the incorporation of fertilizers, inoculation with mycorrhizal fungi, irrigation, and control of environmental factors (Baltasar, Barroetaveña, & Rajchenberg, 2007; Castro-Garibay, Aldrete, López-Upton, & Ordáz-Chaparro, 2018). Nutrients are added either by incorporating controlled-release fertilizers into the substrate and nutrient solutions into the irrigation water, according to the needs of the plant during the production process, or by using both options (Dumroese, Landis, & Wilkinson, 2012). Respect to ectomycorrhizal fungi, the simplest and most common way to inoculate spores into plants is through water during irrigation (Baltasar et al., 2007).

Within the forest plant production cycle in nursery, it is more common for applied commercial inoculants to

Introducción

El término micorriza se refiere a la asociación simbiótica entre raíces de plantas y el micelio de hongos del suelo (Honrubia, 2009). Se estima que 90 % de las plantas forman simbiosis micorrízica; el desarrollo de este tipo de simbiosis inició hace aproximadamente 400 millones de años (Sosa, Sánchez, Morales, & Cruz, 2006). Las micorrizas favorecen la solubilidad y movilidad de nutrimentos del suelo a la planta, confiriendo mayor resistencia al estrés hídrico y a daños por enfermedades (Carrasco-Hernández et al., 2010; Pera & Parladé, 2005). Asimismo, las micorrizas mejoran la estructura del suelo y la interacción con microorganismos benéficos, por lo que coadyuvan en el desarrollo y crecimiento de las plantas (Gómez-Romero, Villegas, Sáenz-Romero, & Lindig-Cisneros, 2013; Osorio, 2012).

Entre los tipos de micorrizas se encuentran las endomicorrizas y las ectomicorrizas; estas últimas se caracterizan por formar micelio externo y una red de Hartig entre las células de la raíz sin penetrar la pared celular. La ectomicorriza se establece en más de 5000 especies de hongos, en su mayoría de la clase Basidiomycetes, y en alrededor de 3000 especies de angiospermas y gimnospermas. Las ectomicorrizas se asocian a especies forestales y son relevantes en la producción de planta del género *Pinus* en vivero. Este género es simbiote obligado, de modo que la ausencia de las micorrizas afecta la supervivencia y el desarrollo de las plantas (García, Sarmiento, Sierra, & Mejía, 2012). De ahí la importancia de considerar la presencia de ectomicorrizas como un parámetro que evalúa la calidad de la planta forestal producida en vivero (Martínez, Sarmiento, Sígala, Rosales, & Montoya, 2016; Secretaría de Economía, 2016).

En la etapa de vivero, la producción de planta forestal en contenedor requiere de insumos y procesos para favorecer la calidad del material vegetal. Algunos de estos son el medio de crecimiento, el tipo de contenedor, la incorporación de fertilizantes, la inoculación con hongos micorrízicos, el riego y el control de los factores ambientales (Baltasar, Barroetaveña, & Rajchenberg, 2007; Castro-Garibay, Aldrete, López-Upton, & Ordáz-Chaparro, 2018). La adición de nutrimentos se hace mediante la incorporación de fertilizantes de liberación controlada en el sustrato y de soluciones nutritivas en el agua de riego, de acuerdo con las necesidades de la planta durante el proceso de producción o bien se utilizan ambas opciones (Dumroese, Landis, & Wilkinson, 2012). Con respecto a los hongos ectomicorrízicos, la forma más sencilla y común de inocular esporas en las plantas es a través del agua durante el riego (Baltasar et al., 2007).

contain a mixture of spores of several native or exotic fungal species, such as *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch and *Scleroderma citrinum* Pers. (García et al., 2012). In this regard, Prieto, García, Mejía, Huchín, and Aguilar (2009) found that out of 10 forest nurseries in the state of Durango only one considered mycorrhization as a cultural practice, using commercial inoculants with the spores of the exotic fungi mentioned above.

Three trends have been reported regarding mycorrhization and fertilization. The first refers to an adverse relationship, where the higher the fertilization, the lower the degree of mycorrhization (Baltasar et al., 2007; Salgado, Rajchenberg, & Barroetaveña, 2009). The second reports that mycorrhization is not affected by fertilization (Khasa et al., 2001) and the last one sustains a differentiated response that depends on the species of the ectomycorrhizal fungus; that is, one species may be more susceptible to fertilization than another (Brundett, Bougher, Dell, Grove, & Malajczuk, 1996; Trappe, 1977).

In Mexico, Escobar-Alonso and Rodríguez (2019), in their review of the state of the art on plant quality in *Pinus*, indicate the scarcity of studies related to mycorrhizal species, levels of mycorrhization and their effect on plant quality, and therefore recommend the increase of this type of trials. In this sense, the aim of the present work was to evaluate the effect of two commercial mycorrhizal inoculants and a controlled-release fertilizer on the development of *Pinus engelmannii* Carr. in nursery. One commercial 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.), while the other included a mixture of spores of exotic fungi (*P. tinctorius* and *S. citrinum*). It is assumed that at least one combination of inoculum type and fertilization dose favors the plant quality of *P. engelmannii* to a greater extent.

Materials and methods

Location of the study area

The experiment was conducted at the Praxedis Guerrero forest nursery of the Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente of the State of Durango, Mexico. The nursery is located at kilometer 12.5 of the Durango-El Mezquital highway, southeast of the city of Durango, Dgo. at the coordinates 23° 56' 58.3" LN and 104° 34' 07.4" LO at 1 890 m.

Production conditions

According to its development phase, the plant grew in different areas of the nursery. In the establishment

Dentro del ciclo de producción de planta forestal en vivero, lo más común es que se apliquen inoculantes comerciales que contienen mezclas de esporas de varias especies de hongos nativos o exóticos, como es el caso de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch y *Scleroderma citrinum* Pers. (García et al., 2012). Al respecto, Prieto, García, Mejía, Huchín, y Aguilar (2009) encontraron que de 10 viveros forestales en el estado de Durango solo uno consideraba la micorrización como práctica de cultivo, utilizando inoculantes comerciales con las esporas de los hongos exóticos antes mencionados.

Con respecto a la micorrización y fertilización se han reportado tres tendencias. La primera refiere una relación adversa, donde a mayor fertilización hay menor grado de micorrización (Baltasar et al., 2007; Salgado, Rajchenberg, & Barroetaveña, 2009). La segunda reporta que la micorrización no es afectada por la fertilización (Khasa et al., 2001) y la última sostiene una respuesta diferenciada que depende de la especie del hongo ectomicorrízico; es decir, una especie puede ser más susceptible a la fertilización que otra (Brundett, Bougher, Dell, Grove, & Malajczuk, 1996; Trappe, 1977).

En México, Escobar-Alonso y Rodríguez (2019), en su revisión del estado del arte sobre calidad de planta en *Pinus*, indican la escasez de estudios relacionados con especies micorrízicas, niveles de micorrización y su efecto en la calidad de planta, por lo que recomiendan el incremento de este tipo de ensayos. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de dos inoculantes micorrízicos comerciales y de un fertilizante de liberación controlada sobre el desarrollo de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero. Un inoculante comercial contenía una mezcla de esporas de hongos nativos de México (*Amanita rubescens* Pers., *Amanita* sp., *Lactarius indigo* [Schwein] Fr., *Ramaria* sp. y *Boletus* sp.), mientras que el otro incluía una mezcla de esporas de hongos exóticos (*P. tinctorius* y *S. citrinum*). Se parte de la hipótesis de que al menos una combinación de tipo de inoculante y dosis de fertilización favorece la calidad de planta de *P. engelmannii* en mayor medida.

Materiales y métodos

Localización del área de estudio

El experimento se realizó en el vivero forestal Praxedis Guerrero de la Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente del estado de Durango, México. El vivero se localiza en el kilómetro 12.5 de la carretera Durango-El Mezquital, al sureste de la ciudad de Durango, Dgo. en las coordenadas 23° 56' 58.3" LN y 104° 34' 07.4" LO a 1 890 m.

stage, from October 11th to November 21st, 2018, the plant was in a greenhouse with a metallic structure protected with a 720 μm white polyethylene film, covered by a 50 % shadow mesh and with side curtains. From 22 November 2018 to 31 January 2019, the plant continued to grow in a tunnel greenhouse with green polyethylene, 720 μm caliber and 50 % shadow mesh. The average temperature and relative humidity were 20 °C and 66 %, respectively.

Three and a half months after sowing (from February 1st to May 11th, 2019), corresponding to the fast growing stage, the vegetative material was moved to another production area with 50 % shadow mesh, where the average temperature was 18.5 °C and relative humidity 48 %. Finally, in the pre-conditioning stage, seven months after sowing (from May 12th to June 12th 2019), the plant was exposed to outdoor conditions with an average temperature of 23 °C and relative humidity of 42 %.

Plant production

Before sowing, as a pre-germination treatment, the seed was soaked in water at room temperature for 24 h and at the end fungicide was applied. The sowing was carried out on October 11th, 2018. A mixture of peat moss (57 %), vermiculite (23 %) and agrolite (20 %) was used as substrate. The total porosity of the substrate was 68.1 % and the aeration porosity was 31.5 % with a water retention capacity of 36.6 %, normal values according to the NMX-AA-170-SCFI-2016 standard (Secretaría de Economía, 2016). Black containers (165 mL volume) made of rigid polyethylene with internal root guides were used. During the preparation of the substrate, the nutrition of the plant was done by adding granulated controlled-release fertilizer (from eight to nine months) with a composition of 11-28-11 of N-P-K, respectively.

Prior to inoculation, spore concentrations in each inoculum were checked with the Neubauer chamber or hemacytometer to determine the doses used in each proposed treatment. Inoculants with native and exotic fungal spores had a concentration of 1.05×10^7 spores- mL^{-1} and 6.5×10^6 spores- mL^{-1} , respectively. Inoculation was carried out four months after sowing when the seedlings had secondary roots (Figure 1a). The procedure consisted in injecting the spore solution directly into the growing substrate, at an angle of approximately 45° to the main root of the plant at a depth of 5 cm, ensuring that the solution had the greatest possible contact with the root system (Figure 1b).

Evaluated treatments and experimental design

The treatments were distributed in a randomized full-block experimental design. Nine treatments were evaluated considering controlled inoculation derived

Condiciones de producción

De acuerdo con su fase de desarrollo, la planta creció en diferentes áreas del vivero. En la etapa de establecimiento, del 11 de octubre al 21 de noviembre de 2018, la planta estuvo en un invernadero de estructura metálica protegida con película de polietileno blanco calibre 720 μm , cubierta a su vez por malla sombra al 50 % y con cortinas laterales. A partir del 22 de noviembre de 2018 y hasta el 31 de enero de 2019, la planta continuó su crecimiento en un invernadero tipo túnel con polietileno verde calibre 720 μm y malla sombra de 50 %. Los promedios de temperatura y humedad relativa fueron 20 °C y 66 %, respectivamente.

A los tres meses y medio después de la siembra (del 1 de febrero al 11 de mayo de 2019), correspondiente a la etapa de crecimiento rápido, el material vegetativo se cambió a otra área de producción con malla sombra al 50 %, donde la temperatura promedio fue de 18.5 °C y la humedad relativa de 48 %. Por último, en la etapa de precondicionamiento, a los siete meses después de la siembra (del 12 de mayo al 12 de junio de 2019), la planta se expuso a condiciones de intemperie con temperatura promedio de 23 °C y humedad relativa de 42 %.

Producción de la planta

Previo a la siembra, como tratamiento pregerminativo, la semilla se remojó en agua a temperatura ambiente durante 24 h y al término se aplicó fungicida. La siembra se realizó el 11 de octubre de 2018. Como sustrato se empleó una mezcla a base de turba (57 %), vermiculita (23 %) y agrolita (20 %). La porosidad total del sustrato fue de 68.1 % y la porosidad de aireación de 31.5 % con capacidad de retención de agua de 36.6 %, valores normales de acuerdo con la norma NMX-AA-170-SCFI-2016 (Secretaría de Economía, 2016). Se utilizaron envases negros (165 mL de volumen) de polietileno rígido con guías de raíces internas. Durante la preparación del sustrato, la nutrición de la planta se hizo mediante la adición de fertilizante granulado de liberación controlada (ocho a nueve meses de duración) con la composición 11-28-11 de N-P-K, respectivamente.

Previo a la inoculación, las concentraciones de esporas en cada inoculante se verificaron con la cámara Neubauer o hematócitómetro para fijar las dosis empleadas en cada tratamiento propuesto. Los inoculantes con esporas de hongos nativos y exóticos tuvieron una concentración de 1.05×10^7 esporas- mL^{-1} y 6.5×10^6 esporas- mL^{-1} , respectivamente. La inoculación se realizó cuatro meses después de la siembra cuando las plántulas presentaron raíces secundarias (Figura 1a). El procedimiento consistió en inyectar la solución de esporas directamente en el sustrato de

from two commercial products plus a non-inoculation condition, combined with two doses of controlled-release fertilizer, as well as a control without fertilizer (Table 1). A commercial inoculum was used which consisted of a mixture of spores from fungi native to Mexico: *A. rubescens*, *Amanita* sp., *L. indigo*, *Ramaria* sp. and *Boletus* sp.; the other commercial inoculum included a mixture of spores from exotic fungi: *P. tinctorius* and *S. citrinum*. Each treatment consisted of four replicates with 49 plants each.

cultivo, aproximadamente en un ángulo de 45° con respecto a la raíz principal de la planta a una profundidad de 5 cm, procurando que la solución tuviera el mayor contacto posible con el sistema radical (Figura 1b).

Tratamientos evaluados y diseño experimental

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental de bloques completos al azar. Se evaluaron nueve tratamientos considerando la



Figure 1. (a) Seedling of *Pinus engelmannii* with secondary roots at the time of inoculation. (b) Inoculation technique used.

Figura 1. (a) Plántula de *Pinus engelmannii* con raíces secundarias al momento de la inoculación. (b) Técnica de inoculación empleada.

Table 1. Treatments applied with commercial mycorrhizal inoculants and controlled-release fertilizer in the development of *Pinus engelmannii* in nursery.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados con inoculantes micorrícicos comerciales y fertilizante de liberación controlada en el desarrollo de *Pinus engelmannii* en vivero.

Treatments/ Tratamientos	Description/Descripción
1 (Control)/ (Testigo)	No controlled-release fertilizer and no inoculant/ Sin fertilizante de liberación controlada y sin inoculante
2 (FB)	Low fertilization (3 g·L ⁻¹)/Fertilización baja (3 g·L ⁻¹)
3 (FA)	High fertilization (6 g·L ⁻¹)/Fertilización alta (6 g·L ⁻¹)
4 (ICHN)	Commercial inoculant with native fungal spores (1 mL·plant ⁻¹ [1.05 x 10 ⁷ esporas·mL ⁻¹])/ Inoculante comercial con esporas de hongos nativos (1 mL·planta ⁻¹ [1.05 x 10 ⁷ esporas·mL ⁻¹])
5 (ICHE)	Commercial exotic fungal spore inoculant (1.5 mL·plant ⁻¹ [6.5 x 10 ⁶ esporas·mL ⁻¹])/ Inoculante comercial con esporas de hongos exóticos (1.5 mL·planta ⁻¹ [6.5 x 10 ⁶ esporas·mL ⁻¹])
6 (ICHN+FB)	Commercial inoculant with native fungal spores plus low fertilization/ Inoculante comercial con esporas de hongos nativos más fertilización baja
7 (ICHN+FA)	Commercial inoculant with native fungal spores plus high fertilization/ Inoculante comercial con esporas de hongos nativos más fertilización alta
8 (ICHE+FB)	Commercial inoculant with exotic fungal spores plus low fertilization/ Inoculante comercial con esporas de hongos exóticos más fertilización baja
9 (ICHE+FA)	Commercial inoculant with exotic fungal spores plus high fertilization/ Inoculante comercial con esporas de hongos exóticos más fertilización alta

Variables evaluated

At eight months after sowing and four months after inoculation, the survival rate of the lot under study was determined, and from a total of 10 seedlings per experimental unit, extracted at random: stem height, root collar diameter, wet and dry biomass of the aerial part, and root were evaluated.

To estimate the dry biomass, the plants were dehydrated at 65 °C in a forced ventilation oven for 72 h. Three plant quality indices were also determined which, through an evaluation of morphological variables, allow the prediction of the adaptation opportunity of a plant when it is moved to the field (Prieto et al., 2009). These indices were: ratio of dry biomass of the aerial part/dry biomass of the root part, lignification index (IL) and Dickson quality index (ICD) (Dickson, Leaf, & Hosner, 1960). The last two were obtained using the following expressions:

$$IL = \left(\frac{\text{Total dry weight (g)}}{\text{Total wet weight (g)}} \right) \times 100$$

$$ICD = \frac{\text{Total dry weight (g)}}{\frac{\text{Height (cm)}}{\text{Diameter (mm)}} + \frac{\text{Dry weight air part (g)}}{\text{Dry weight root (g)}}$$

The percentage of mycorrhizal colonization (PCM) was evaluated in the root system of three seedlings taken randomly from each experimental unit. The substrate adhered to the root system of the plants was removed with running water; subsequently, 100 cm of secondary roots per plant were randomly selected and preserved in a solution of formaldehyde, alcohol (96°), glacial acetic acid and distilled water in a ratio of 10:50:5:35. The number of mycorrhized and non-mycorrhized apexes was determined with a stereo microscope (Leica® EZ4 HD, Switzerland). The PCM was calculated with the equation used by García (2018):

$$PCM = \left(\frac{\text{Mycorrhized Apexes}}{\text{Mycorrhized Apexes} + \text{Non - Mycorrhized Apexes}} \right)$$

The percentage values of mycorrhizal colonization and survival were transformed with the arcsine and square root function. The data were subjected to an analysis of variance; in cases where significant differences existed, a Tukey mean separation test was performed, using the SAS® statistical program version 9.2 (Statistical Analysis System, 2009).

inoculación controlada derivada de dos productos comerciales más una condición sin inoculación, combinados con dos dosis de fertilizante de liberación controlada, así como un testigo sin fertilizante (Cuadro 1). Se utilizó un inoculante comercial compuesto por una mezcla de esporas de hongos nativos de México: *A. rubescens*, *Amanita* sp., *L. indigo*, *Ramaria* sp. y *Boletus* sp.; el otro inoculante comercial incluía una mezcla de esporas de hongos exóticos: *P. tinctorius* y *S. citrinum*. Cada tratamiento estuvo compuesto de cuatro repeticiones con 49 plantas cada una.

Variables evaluadas

A los ocho meses de la siembra y a los cuatro meses de la inoculación, se determinó la supervivencia del lote bajo estudio y se evaluaron la altura del tallo, diámetro al cuello de la raíz, biomasa húmeda y seca de la parte aérea, radical y total de 10 plantas por unidad experimental, extraídas en forma aleatoria.

Para estimar la biomasa seca, las plantas se deshidrataron a 65 °C en horno de ventilación forzada durante 72 h. También se determinaron tres índices de calidad de planta que, a través de una evaluación de variables morfológicas, permiten predecir la oportunidad de adaptación de una planta cuando se traslada a campo (Prieto et al., 2009). Estos índices fueron: relación biomasa seca de la parte aérea/biomasa seca de la parte radical, índice de lignificación (IL) e índice de calidad de Dickson (ICD) (Dickson, Leaf, & Hosner, 1960). Los dos últimos se obtuvieron mediante las expresiones siguientes:

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

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

El porcentaje de colonización micorrícica (PCM) se evaluó en el sistema de raíces de tres plantas de cada unidad experimental tomadas al azar. El sustrato adherido al sistema radical de las plantas se eliminó con agua corriente; posteriormente, se seleccionaron al azar 100 cm de raíces secundarias por planta, las cuales se conservaron en una solución de formaldehído, alcohol (96°), ácido acético glacial y agua destilada en proporción 10:50:5:35. El número de ápices micorrizados y no micorrizados se determinó con un microscopio estereoscópico (Leica® EZ4 HD, Suiza). El PCM se calculó con la ecuación utilizada por García (2018):

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

Results and discussion

Morphological variables

The average value of the root collar diameter showed statistical differences ($P \leq 0.05$) between the treatments. The difference between the extreme values (2.60 to 5.11 mm) was of 100 %; according to Figure 2, the commercial exotic fungal spore inoculum (1.5 mL·plant⁻¹) plus low fertilization (3 g·plant⁻¹) (treatment 8 = ICHE + FB) generated the highest values. NMX-AA-170-SCFI-2016 stipulates that the *P. engelmannii* plant requires a minimum diameter of 5 mm to be considered as a quality plant that can be planted in the field (Secretaría de Economía, 2016).

Although treatments 2 (FB), 3 (FA) and 9 (ICHE + FA) were statistically equal ($P \leq 0.05$) to treatment 6 (ICHN + FB), only the latter managed to comply with the minimum diameter established by NMX-AA-170-SCFI-2016; while the plants in the control treatment and the unfertilized treatments, regardless of the type of inoculum, had the lowest response (Figure 2).

Los valores porcentuales de colonización micorrícica y los de supervivencia se transformaron con la función arcoseno y raíz cuadrada. Los datos se sometieron a un análisis de varianza; en los casos donde existieron diferencias significativas se hizo una prueba de separación de medias de Tukey, utilizando el programa estadístico SAS® versión 9.2 (Statistical Analysis System, 2009).

Resultados y discusión

Variables morfológicas

El valor promedio del diámetro del cuello de la raíz presentó diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos. La diferencia entre los valores extremos (2.60 a 5.11 mm) fue del 100 %; de acuerdo con la Figura 2, el inoculante comercial con esporas de hongos exóticos (1.5 mL·planta⁻¹) más fertilización baja (3 g·planta⁻¹) (tratamiento 8 = ICHE + FB) generó los valores más altos. La NMX-AA-170-SCFI-2016 estipula que la planta de *P. engelmannii* requiere un diámetro mínimo de 5 mm para considerar que es de

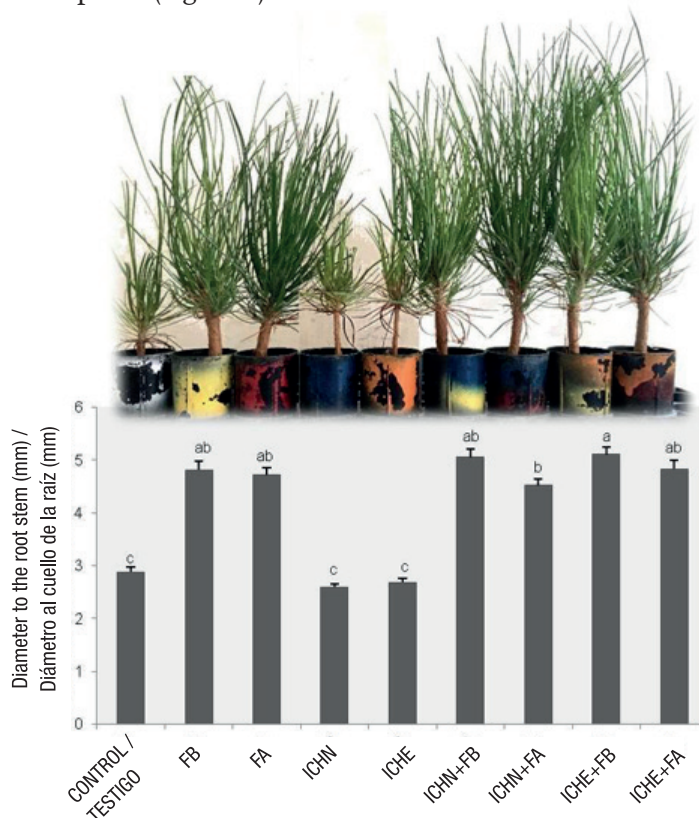


Figure 2. Diameters of *Pinus engelmannii* obtained in treatments with commercial mycorrhizal inoculants and controlled-release fertilizers in nursery. FB = low fertilization (3 g·L⁻¹), FA = high fertilization (6 g·L⁻¹), ICHN = commercial inoculant with native fungal spores (1 mL·plant⁻¹ [1.05 x 10⁷ spores·mL⁻¹]), ICHE = commercial inoculant with exotic fungal spores (1.5 mL·plant⁻¹ [6.5 x 10⁶ spores·mL⁻¹]).

Figura 2. Diámetros de *Pinus engelmannii* obtenidos en los tratamientos con inoculantes micorrícicos comerciales y fertilizante de liberación controlada en vivero. FB = fertilización baja (3 g·L⁻¹), FA = fertilización alta (6 g·L⁻¹), ICHN = inoculante comercial con esporas de hongos nativos (1 mL·planta⁻¹ [1.05 x 10⁷ esporas·mL⁻¹]), ICHE = inoculante comercial con esporas de hongos exóticos (1.5 mL·planta⁻¹ [6.5 x 10⁶ esporas·mL⁻¹]).

Figure 3 shows the effect of treatments on the dry biomass of plants. The treatments with the highest total dry biomass were 6 (ICHN + FB) and 8 (ICHE + FB) with significant differences ($P \leq 0.05$) with respect to the rest of the treatments. The dry biomass of the aerial part varied from 0.36 to 1.67 g, with treatment 8 (ICHE + FB) once again standing out. Fertilizer treatments and those that combined inoculum and fertilizer produced more aerial biomass than the solely inoculated and control treatments. Regarding the dry biomass of the root part, the range was from 0.44 to 1.12 g, where the treatment of the commercial inoculant with native fungal spores (1 mL·plant⁻¹) plus low fertilization (3 g·plant⁻¹) (treatment 6 = ICHN + FB) stood out; the lowest values occurred in the unfertilized treatments.

Rentería-Chávez, Pérez-Moreno, Cetina-Alcalá, Ferrera-Cerrato, and Xoconostle-Cázares (2017) determined that *Pinus greggii* Engelm. plants inoculated with edible ectomycorrhizal fungi developed higher total biomass than those without inoculation. However, in the present study, the treatments with the lowest results were not the non-inoculated ones, but those without fertilizer. This is consistent with the findings of Vázquez-Cisneros et al. (2018), who found that the addition of slow-release fertilizer positively influenced the growth of species in the genus *Pinus* compared to the unfertilized plant.

calidad y que pueda ser plantada en campo (Secretaría de Economía, 2016).

Aunque los tratamientos 2 (FB), 3 (FA) y 9 (ICHE + FA) fueron estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$) al tratamiento 6 (ICHN + FB), solo este último logró cumplir con el diámetro mínimo que establece la NMX-AA-170-SCFI-2016; mientras que las plantas del tratamiento testigo y de los tratamientos sin fertilizar, independientemente del tipo de inoculante, tuvieron la respuesta más baja (Figura 2).

La Figura 3 muestra el efecto de los tratamientos sobre la biomasa seca de las plantas. Los tratamientos con mayor biomasa seca total fueron el 6 (ICHN + FB) y el 8 (ICHE + FB) con diferencias significativas ($P \leq 0.05$) respecto al resto de los tratamientos. La biomasa seca de la parte aérea varió de 0.36 a 1.67 g, sobresaliendo nuevamente el tratamiento 8 (ICHE + FB). Los tratamientos con fertilizante y los que combinaron inoculante y fertilizante produjeron mayor biomasa aérea que los únicamente inoculados y que el testigo. Respecto a la biomasa seca de la parte radical, el rango fue de 0.44 a 1.12 g, donde sobresalió el tratamiento del inoculante comercial con esporas de hongos nativos (1 mL·planta⁻¹) más fertilización baja (3 g·planta⁻¹) (tratamiento 6 = ICHN + FB); los valores más bajos ocurrieron en los tratamientos sin fertilizar.

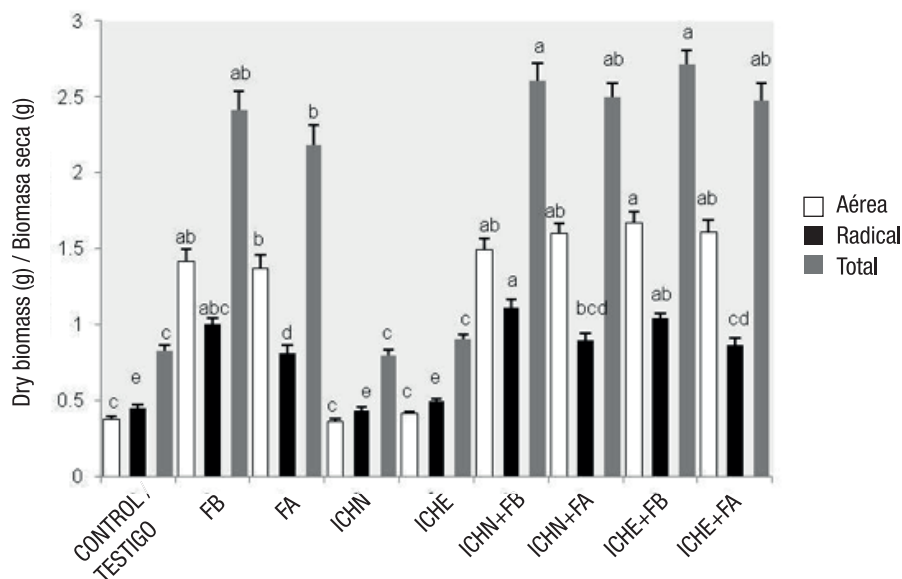


Figure 3. Dry biomass of *Pinus engelmannii* in the nursery, under treatments with commercial mycorrhizal inoculants and controlled-release fertilizers. FB = low fertilization (3 g·L⁻¹), FA = high fertilization (6 g·L⁻¹), ICHN = commercial inoculant with native fungal spores (1 mL·plant⁻¹ [1.05 × 10⁷ spores·mL⁻¹]), ICHE = commercial inoculant with exotic fungal spores (1.5 mL·plant⁻¹ [6.5 × 10⁶ spores·mL⁻¹]).

Figura 3. Biomasa seca de *Pinus engelmannii* en vivero, bajo los tratamientos con inoculantes micorrízicos comerciales y fertilizante de liberación controlada. FB = fertilización baja (3 g·L⁻¹), FA = fertilización alta (6 g·L⁻¹), ICHN = inoculante comercial con esporas de hongos nativos (1 mL·planta⁻¹ [1.05 × 10⁷ esporas·mL⁻¹]), ICHE = inoculante comercial con esporas de hongos exóticos (1.5 mL·planta⁻¹ [6.5 × 10⁶ esporas·mL⁻¹]).

Plant quality indices

The mean values of the ratio of dry biomass of the aerial part to dry biomass of the root part varied from 0.86 to 1.94. Treatments 3 (FA), 7 (ICHN + FA), 8 (ICHE + FB), and 9 (ICHE + FA) were in the range of 1.5 to 2.5, which represents an appropriate balance between transpiration and water uptake areas (Sáenz, Muñoz, Pérez, Rueda, & Hernández, 2014). Treatments 1 (Control), 4 (ICHN) and 5 (ICHE), characterized by not having fertilizer, obtained lower values (Table 2), which means that the root biomass is higher than the aerial one; therefore, there is disproportionality in the plant (Rodríguez, 2008).

Prieto et al. (2009) refer that the lignification index expresses the level of pre-conditioning of the plants; when they are of quality they present values of 25 to 30 %. This is related to the weathering phase where individuals suffer stress due to the drastic change in light conditions, from shadow mesh to outdoor and from more to less availability of humidity. In the present study, the treatments that lacked fertilizer reached optimal values ($P \leq 0.05$).

The Dickson's Quality Index is an integrated measure of morphological traits, where high values express better plant quality (García, 2018; Prieto et al., 2009). This index has been used to select better proportioned

Rentería-Chávez, Pérez-Moreno, Cetina-Alcalá, Ferrera-Cerrato, y Xoconostle-Cázares (2017) determinaron que las plantas de *Pinus greggii* Engelm. inoculadas con hongos ectomicorrícicos comestibles desarrollaron mayor cantidad de biomasa total con respecto a aquellas sin inocular. No obstante, en el presente estudio, los tratamientos con los resultados más bajos no fueron los no inoculados, sino los que carecieron de fertilizante. Esto concuerda con lo reportado por Vázquez-Cisneros et al. (2018), quienes encontraron que la incorporación de fertilizante de liberación lenta influyó positivamente en el crecimiento de especies del género *Pinus* en comparación con la planta sin fertilizar.

Índices de calidad de planta

Los valores medios de la relación biomasa seca de la parte aérea/biomasa seca de la parte radical variaron de 0.86 a 1.94. Los tratamientos 3 (FA), 7 (ICHN + FA), 8 (ICHE + FB) y 9 (ICHE + FA) estuvieron dentro del rango de 1.5 a 2.5, el cual representa un balance apropiado entre las áreas de transpiración y de absorción de agua (Sáenz, Muñoz, Pérez, Rueda, & Hernández, 2014). Los tratamientos 1 (Testigo), 4 (ICHN) y 5 (ICHE), caracterizados por no tener fertilizante, obtuvieron valores menores (Cuadro 2), lo que significa que la biomasa radical es mayor que la aérea; por tanto, hay desproporcionalidad en la planta (Rodríguez, 2008).

Table 2. Mean values of plant quality indices of *Pinus engelmannii* at eight months after sowing, under mycorrhizal inoculation and controlled-release fertilization treatments.

Cuadro 2. Valores medios de los índices de calidad de planta de *Pinus engelmannii* a los ocho meses después de la siembra, bajo tratamientos de inoculación micorrízica y fertilización de liberación controlada.

Treatments/ Tratamientos	Relation dry biomass air/radical/ Relación biomasa seca aérea/radical	Index of lignification (%)/ Índice de lignificación (%)	Dickson's quality index/ Índice de calidad de Dickson
1 Control/Testigo	0.86 ± 0.04	25.76 ± 1.04 bc	0.36 ± 0.02 d
2 FB	1.41 ± 0.07	25.11 ± 0.49 bc	0.85 ± 0.04 abc
3 FA	1.76 ± 0.09	22.84 ± 0.60 c	0.70 ± 0.05 c
4 ICHN	0.87 ± 0.04	27.85 ± 0.81 ab	0.30 ± 0.02 d
5 ICHE	0.89 ± 0.06	30.56 ± 0.87 a	0.36 ± 0.02 d
6 ICHN+FB	1.38 ± 0.06	24.89 ± 0.41 bc	0.98 ± 0.05 a
7 ICHN+FA	1.89 ± 0.09	23.91 ± 0.68 c	0.76 ± 0.04 bc
8 ICHE+FB	1.63 ± 0.07	25.10 ± 0.47 bc	0.90 ± 0.04 ab
9 ICHE+FA	1.94 ± 0.10	22.99 ± 0.54 c	0.76 ± 0.04 bc

Means with different letters in the same column indicate significant difference between treatments according to Tukey ($P \leq 0.05$). \pm = Standard error of the media. FB = low fertilization (3 g·L⁻¹), FA = high fertilization (6 g·L⁻¹), ICHN = commercial inoculant with native fungal spores (1 mL·plant⁻¹ [1.05 x 10⁷ spores·mL⁻¹]), ICHE = commercial inoculant with exotic fungal spores (1.5 mL·plant⁻¹ [6.5 x 10⁶ spores·mL⁻¹]).

Medias con letra diferente en la misma columna indican diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey ($P \leq 0.05$). \pm Error estándar de la media. FB = fertilización baja (3 g·L⁻¹), FA = fertilización alta (6 g·L⁻¹), ICHN = inoculante comercial con esporas de hongos nativos (1 mL·planta⁻¹ [1.05 x 10⁷ esporas·mL⁻¹]), ICHE = inoculante comercial con esporas de hongos exóticos (1.5 mL·planta⁻¹ [6.5 x 10⁶ esporas·mL⁻¹]).

plants, as well as to predict their response once planted in the field (Sáenz et al., 2014). The results varied from 0.30 to 0.98, positioning the commercial inoculant with native fungal spores treatment (1 mL·plant⁻¹) plus low fertilization (3 g·plant⁻¹) (treatment 6 = ICHN + FB) as the best, with significant differences ($P \leq 0.05$) with respect to the rest of the treatments. This is in agreement with what Martínez et al. (2016) report, who obtained an index of 1.08 as an effect of the inoculation with *Russula delica* Fr. in *P. engelmannii*, maintaining a fertilization regime according to the stages of development of the plant. According to this parameter, in the present study, the plants in the treatments without fertilization were those of lower quality (Table 2).

Survival

According to Figure 4, survival varied from 80 to 96 %, with no significant differences ($P \leq 0.05$) among treatments. The literature reports negative effects on plants when using high doses of fertilization (Marschner, 2012), favoring plant susceptibility to pests and diseases that lead to death. This may explain the mortality caused by a more severe damping off outbreak in treatments 3 (FA), 7 (ICHN + FA) and 9 (ICHE + FA), characterized by high fertilization doses. This disease occurs in forest nurseries and is caused by a complex of fungi of the genera *Phytophthora*, *Pythium*,

Prieto et al. (2009) refieren que el índice de lignificación expresa el nivel de preacondicionamiento de las plantas; cuando son de calidad presentan valores de 25 a 30 %. Esto se relaciona con la fase de intemperización donde los individuos sufren estrés debido al cambio drástico en las condiciones de luz, de malla sombra a intemperie y de mayor a menor disponibilidad de humedad. En el presente estudio, los tratamientos que carecían de fertilizante alcanzaron valores óptimos ($P \leq 0.05$).

El índice de calidad de Dickson es una medida integrada de rasgos morfológicos, donde los valores altos expresan mejor calidad de planta (García, 2018; Prieto et al., 2009). Este índice se ha utilizado para la selección de plantas mejor proporcionadas, así como para predecir su respuesta una vez plantadas en campo (Sáenz et al., 2014). Los resultados variaron de 0.30 a 0.98, posicionando al tratamiento del inoculante comercial con esporas de hongos nativos (1 mL·planta⁻¹) más fertilización baja (3 g·planta⁻¹) (tratamiento 6 = ICHN + FB) como el mejor, con diferencias significativas ($P \leq 0.05$) respecto al resto de los tratamientos. Esto concuerda con lo que reportan Martínez et al. (2016), quienes obtuvieron un índice de 1.08 como efecto de la inoculación inducida con *Russula delica* Fr. en *P. engelmannii*, manteniendo un régimen de fertilización acorde con las etapas de desarrollo de la planta. De acuerdo con este parámetro, en el presente estudio, las

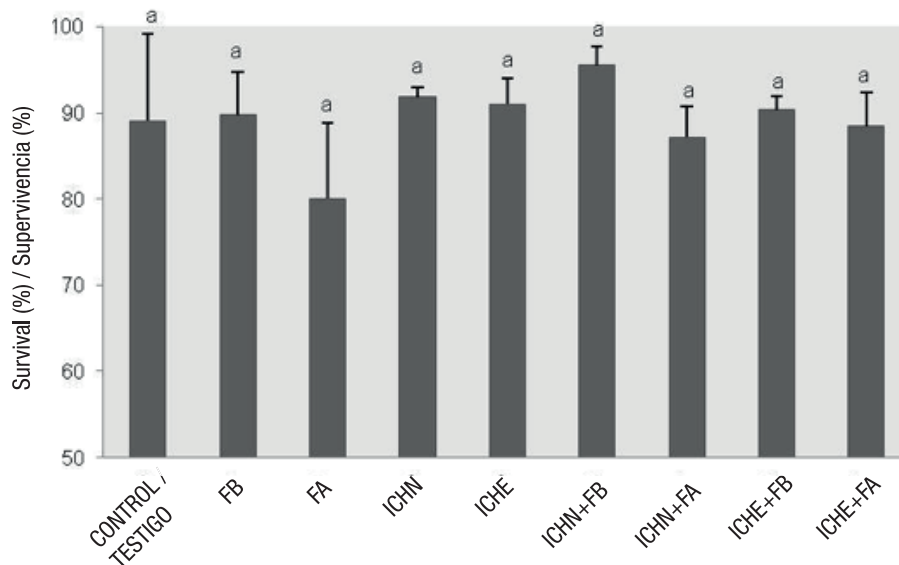


Figure 4. Survival of *Pinus engelmannii* plants in treatments with commercial mycorrhizal inoculants and controlled-release fertilizer, after eight months from sowing. FB = low fertilization (3 g·L⁻¹), FA = high fertilization (6 g·L⁻¹), ICHN = commercial inoculant with native fungal spores (1 mL·plant⁻¹ [1.05 x 10⁷ spores·mL⁻¹]), ICHE = commercial inoculant with exotic fungal spores (1.5 mL·plant⁻¹ [6.5 x 10⁶ spores·mL⁻¹]).

Figura 4. Supervivencia de las plantas de *Pinus engelmannii* en los tratamientos con inoculantes micorrícicos comerciales y fertilizante de liberación controlada, después de ocho meses de la siembra. FB = fertilización baja (3 g·L⁻¹), FA = fertilización alta (6 g·L⁻¹), ICHN = inoculante comercial con esporas de hongos nativos (1 mL·planta⁻¹ [1.05 x 10⁷ esporas·mL⁻¹]), ICHE = inoculante comercial con esporas de hongos exóticos (1.5 mL·planta⁻¹ [6.5 x 10⁶ esporas·mL⁻¹]).

Fusarium and *Rhizoctonia*; its main characteristic is the necrosis of the conduction tissue at the neck of the seedling root that causes its death (Cibrián, Alvarado, & García, 2007).

Percentage of mycorrhizal colonization

Figure 5 shows that the PCM varied from 15 to 71 % and showed a reverse trend to the fertilization dose used. Treatments 3 (FA), 7 (ICHN + FA) and 9 (ICHE + FA), characterized by having doses of 6 g·L⁻¹ of controlled-release fertilizer, had low mycorrhization regardless of the type of inoculant, which is consistent with what is reported by Baltasar (2007) and Salgado et al. (2009). The treatments with higher PCM were 1 (Control), 4 (ICHN), 5 (ICHE) and 6 (ICHN + FB), highlighting treatment 4, although without statistical differences between them, indicating that the symbiosis was established with more abundance in a nutrient limited environment, functioning as an auxiliary nutrition mechanism. This is consistent with the observations of Bücking, Liepold, and Ambilwade (2012), who recognize the existence of two pathways for nutrient absorption in plants; the direct one involving the epidermis and root hairs, and the second through the ectomycorrhizae. In the latter, the external mycelium favors a greater exploration in the soil. Regarding the treatments without inoculation, due to the test being conducted under normal production

plantas de los tratamientos sin fertilización fueron las de menor calidad (Cuadro 2).

Supervivencia

Acorde con la Figura 4, la supervivencia varió de 80 a 96 %, sin que existieran diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos. La literatura reporta efectos negativos en las plantas al utilizar dosis altas de fertilización (Marschner, 2012), favoreciendo la susceptibilidad de la planta a plagas y enfermedades que conducen a la muerte. Esto puede explicar la mortalidad causada por un brote de *damping off* más severo en los tratamientos 3 (FA), 7 (ICHN + FA) y 9 (ICHE + FA), caracterizados por tener dosis alta de fertilización. Esta enfermedad se presenta en viveros forestales y es causada por un complejo de hongos de los géneros *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*; su característica principal es el necrosamiento del tejido de conducción a nivel del cuello de la raíz de la plántula que ocasiona su muerte (Cibrián, Alvarado, & García, 2007).

Porcentaje de colonización micorrícica

La Figura 5 muestra que el PCM varió de 15 a 71 % y mostró tendencia inversa a la dosis de fertilización empleada. Los tratamientos 3 (FA), 7 (ICHN + FA) y 9 (ICHE + FA), caracterizados por tener dosis de

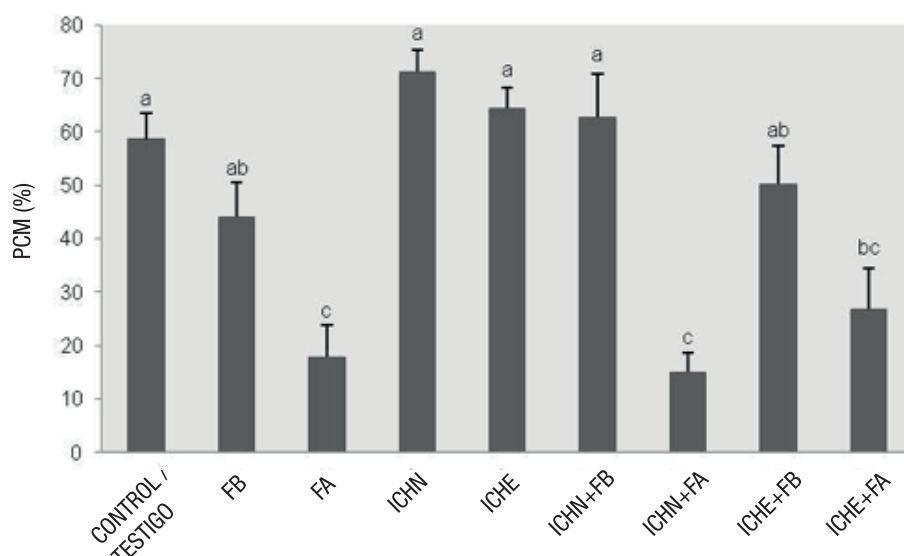


Figure 5. Mycorrhizal colonization (PCM) in *Pinus engelmannii* plants under mycorrhizal treatments and controlled-release fertilizers, after eight months from sowing. FB = low fertilization (3 g·L⁻¹), FA = high fertilization (6 g·L⁻¹), ICHN = commercial inoculant with native fungal spores (1 mL·plant⁻¹ [1.05 x 10⁷ spores·mL⁻¹]), ICHE = commercial inoculant with exotic fungal spores (1.5 mL·plant⁻¹ [6.5 x 10⁶ spores·mL⁻¹]).

Figura 5. Colonización micorrícica (PCM) en plantas de *Pinus engelmannii* bajo tratamientos de micorrización y fertilizantes de liberación controlada, después de ocho meses de la siembra. FB = fertilización baja (3 g·L⁻¹), FA = fertilización alta (6 g·L⁻¹), ICHN = inoculante comercial con esporas de hongos nativos (1 mL·planta⁻¹ [1.05 x 10⁷ esporas·mL⁻¹]), ICHE = inoculante comercial con esporas de hongos exóticos (1.5 mL·planta⁻¹ [6.5 x 10⁶ esporas·mL⁻¹]).

conditions in nursery, the plants developed undesirable ectomycorrhizal colonization.

Although there was a negative trend with respect to the percentage of mycorrhization and the fertilization used, the results showed that treatment 6 (ICHN + FB) had a balance between the two variables; this had a favorable impact on the quality of the plant produced in that treatment, confirming the hypothesis. In general, the fungus-root association had a differentiated response depending on the amount of fertilizer used, which coincides with that proposed by Trappe (1977). In this respect, Brundett et al. (1996) carried out a study on fertilization and mycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus diversicolor* F. Muell., and found that the increase in the dose of mineral fertilization had an effect on the decrease in mycorrhizal colonization; however, this effect was differential, finding that the genus *Scleroderma* is less susceptible to fertilization than *P. tinctorius*.

Characterization of ectomycorrhizae

In the present study three morphotypes of ectomycorrhizae were found: one from the commercial inoculant with native fungal spores and two from the commercial inoculant with exotic fungal spores. From the first inoculant containing spores of *A. rubescens*, *Amanita* sp., *L. indigo*, *Ramaria* sp. and *Boletus* sp., only one morphotype was identified that was related to the genus *Amanita* spp. and presented dichotomous branching without rhizomorphs, with straight unbranched ends of cylindrical non-inflammatory shape and slightly sharp end, ochre, yellowish ochre or white with presence of mantle (Figure 6a) (Determination of ectomycorrhizae [DEEMY], 2019). The remaining species contained in the inoculant (*L. indigo*, *Ramaria* sp. and *Boletus* sp.) did not form ectomycorrhizae. In this regard, Ishida, Nara, Tanaka, Kinoshita, and Hogetsu (2008) and Nara (2009), mentioned that some species of ectomycorrhizal fungi are pioneers, so their spores respond quickly to germination in the presence of roots of host plants, in contrast, other species (which include species of the genus *Lactarius*) require additional stimuli obtained as the habitat develops, so the spore inoculation may not be successful.

From the inoculant with exotic fungal spores, two morphotypes were identified; the first one related to *S. citrinum*, which in structures with initial development was characterized by ectomycorrhizae with stipe and dichotomous branching, white color and without presence of rhizomorphs. The mycorrhizal systems in mature stages presented mainly stipe and coralloid branching of yellowish-white color, with straight unbranched ends and presence of rhizomorphs (Figure 6b). The second morphotype had

6 g·L⁻¹ de fertilizante de liberación controlada, tuvieron baja micorrización independientemente del tipo de inoculante, lo cual concuerda con lo reportado por Baltasar (2007) y Salgado et al. (2009)). Los tratamientos con mayor PCM fueron el 1 (testigo), 4 (ICHN), 5 (ICHE) y 6 (ICHN + FB), destacando el tratamiento 4, aunque sin diferencias estadísticas entre sí, lo que indica que la simbiosis se estableció con más abundancia en un ambiente limitado en nutrientes, funcionando como mecanismo de nutrición auxiliar. Esto concuerda con lo observado por Bücking, Liepold, y Ambilwade (2012), quienes reconocen la existencia de dos vías para la absorción de nutrimentos en las plantas; la directa que involucra la epidermis y los pelos absorbentes de la raíz, y la segunda a través de las ectomicorrizas. En esta última, el micelio externo favorece una mayor exploración en el suelo. Con respecto a los tratamientos sin inocular, debido a que el ensayo se realizó bajo condiciones normales de producción en vivero, las plantas desarrollaron colonización ectomicorrízica indeseable.

Si bien existió la tendencia negativa respecto al porcentaje de micorrización y la fertilización empleada, los resultados mostraron que el tratamiento 6 (ICHN + FB) tuvo un balance entre las dos variables; esto repercutió favorablemente en la calidad de planta producida en ese tratamiento, confirmando la hipótesis planteada. De manera general, la asociación hongo-raíz tuvo una respuesta diferenciada en función de la cantidad de fertilizante empleado, lo cual coincide con lo planteado por Trappe (1977). Al respecto, Brundett et al. (1996) realizaron un estudio sobre fertilización y hongos micorrízicos asociados a *Eucalyptus diversicolor* F. Muell. y encontraron que el aumento en la dosis de fertilización mineral repercutió en la disminución en la colonización micorrízica; sin embargo, dicho efecto fue diferencial encontrando que el género *Scleroderma* es menos susceptible a la fertilización que *P. tinctorius*.

Caracterización de ectomicorrizas

En el presente estudio se encontraron tres morfotipos de ectomicorrizas: uno del inoculante comercial con esporas de hongos nativos y dos del inoculante comercial con esporas de hongos exóticos. Del primer inoculante que contenía esporas de *A. rubescens*, *Amanita* sp., *L. indigo*, *Ramaria* sp. y *Boletus* sp., solo se identificó un morfotipo afín al género *Amanita* spp. que presentó ramificación dicotómica sin rizomorfos, con terminaciones no ramificadas rectas de forma cilíndrica no inflamada y terminación ligeramente afilada, de colores ocre, ocre-amarillento o blanco con presencia de manto (Figura 6a) (Determination of ectomycorrhizae [DEEMY], 2019). El resto de las especies contenidas en el inoculante (*L. indigo*, *Ramaria* sp. y *Boletus* sp.) no formaron ectomicorrizas. Al

stipe and coralloid structures with brown dichotomous ramifications, straight unbranched apexes and rhizomorphs of restricted connection to the lateral part of the apexes. This description corresponds to the one made by Valdés, Ambriz, Camacho, and Fierros (2010), who tested the same product used in the present work and which also contained spores of *P. tinctorius*, only in roots of *Pinus devoniana* Lindl. (Figure 6c).

In treatments without inoculum (Control, FB and FA) mycorrhizal colonization was observed in initial stages, a condition that did not allow the identification of species. In general, mycorrhizal systems in the treatments with only inoculum (ICHN and ICHE), as well as those with inoculum and low fertilization (ICHN + FB and ICHE + FB) showed ectomycorrhizae in mature stages; in contrast, treatments with inoculum and high fertilization (ICHN + FA and ICHE + FA) showed mycorrhizal structures in initial stages of development (Figures 6d and 6e). This could indicate that the level of mycorrhization, up to the time of evaluation, was affected as a function of fertilization

respecto, Ishida, Nara, Tanaka, Kinoshita, y Hogetsu (2008) y Nara (2009) mencionan que algunas especies de hongos ectomicorrícicos son pioneros, por lo que sus esporas responden rápido a la germinación ante la presencia de raíces de las plantas hospederas; en contraste, otras especies (donde se incluyen especies del género *Lactarius*) requieren estímulos adicionales que se obtienen conforme el hábitat se desarrolla, por lo que la inoculación con esporas puede no ser exitosa.

Del inoculante con esporas de hongos exóticos, se identificaron dos morfotipos; el primero afín a *S. citrinum*, que en estructuras con desarrollo inicial se caracterizó por ectomicorrizas estipitadas con ramificación dicotómica, de color blanco y sin presencia de rizomorfos. Los sistemas de micorrizas en estadios maduros presentaron ramificación principalmente coraloide estipitadas de color blanco amarillento, con terminaciones rectas no ramificadas y presencia de rizomorfos (Figura 6b). El segundo morfotipo tuvo estructuras coraloideas estipitadas con ramificaciones dicotómicas color marrón, ápices rectos no ramificados

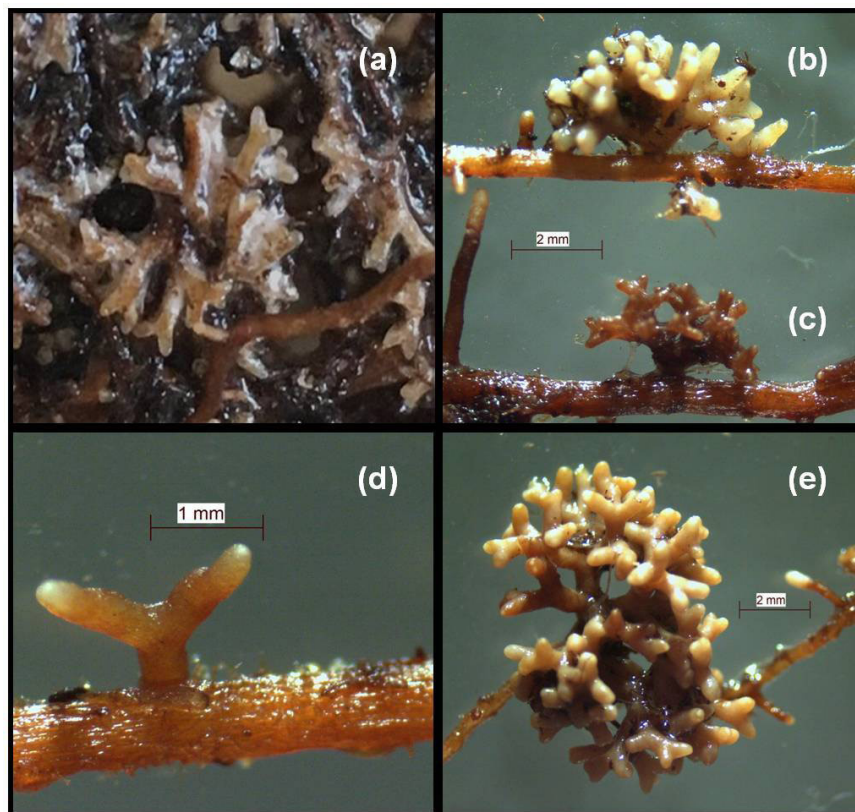


Figure 6. Ectomycorrhizal morphotypes in *Pinus engelmannii*: (a) *Amanita* spp. related morphotype; (b) *Scleroderma citrinum* related morphotype; (c) *Pisolithus tinctorius* related morphotype described by Valdés et al. (2010); (d) initial stage ectomycorrhiza; (e) mature stage *Scleroderma citrinum* related ectomycorrhiza.

Figura 6. Morfotipos de ectomicorrizas en *Pinus engelmannii*: (a) morfotipo afín a *Amanita* spp.; (b) morfotipo afín a *Scleroderma citrinum*; (c) morfotipo afín a cepa comercial de *Pisolithus tinctorius* descrita por Valdés et al. (2010); (d) ectomicorriza en desarrollo inicial; (e) ectomicorriza afín a *Scleroderma citrinum* en estadio maduro.

dose, delaying the development of ectomycorrhizae, as observed by Marx (1980).

Conclusions

The combination of commercial inoculant with native fungal spores (1 mL·plant⁻¹) and 3 g·L⁻¹ fertilization led to a better quality of the plant compared to commercial inoculant with exotic fungal spores (1.5 mL·plant⁻¹), demonstrating that both components favor the quality of *Pinus engelmannii* in nursery. The incorporation of the high dose of controlled-release fertilizer led to a negative trend in the percentage of mycorrhization. The diversity of ectomycorrhizal fungal spores contained in commercial inoculants does not result in a diversity of mycorrhizal formation, as it happens with the commercial inoculant of native fungi. The results represent a contribution to the technical knowledge for the production of quality plant of *P. engelmannii* in nursery, which affects the survival of the species in the field.

Acknowledgements

To CONACYT, for the financing granted to Dr. Silvia Salcido Ruiz within the framework of a post-doctoral stay in the Institutional Program for the Doctorate in Agricultural and Forestry Sciences at the Universidad Juárez del Estado de Durango. To the Secretary of Natural Resources and Environment of the government of the state of Durango, for the support for this work with infrastructure and materials in the forest nursery "Praxedis Guerrero".

End of English version

References / Referencias

- Baltasar, M. D., Barroetaveña, C., & Rajchenberg, M. (2007). Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque*, 28(3), 226–233. doi: 10.4067/S0717-92002007000300007
- Brundett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuk, N. (1996). *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Canberra, Australia: Australian Center for International Agricultural Research. doi: 10.13140/2.1.4880.5444
- Bücking, H., Liepold, E., & Ambilwade, P. (2012). The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes. In N. Kumar, & S. Charan (Eds.), *Plant science* (pp. 107–138). doi: 10.5772/52570
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J. J., Quintero-Lizaola, R., & Torres-Aquino, M. (2010). Caracterización de

y rizomorfo de conexión restringida a la parte lateral de los ápices. Esta descripción corresponde a la realizada por Valdés, Ambriz, Camacho, y Fierros (2010), quienes probaron el mismo producto utilizado en el presente trabajo y que de igual forma contenía esporas de *P. tinctorius*, solo que en raíces de *Pinus devoniana* Lindl. (Figura 6c).

En los tratamientos sin inoculante (testigo, FB y FA) se observó colonización micorrícica en estadios iniciales, condición que no permitió la identificación de especies. De manera general, se observó que los sistemas de micorrizas en los tratamientos con solo inoculante (ICHN y ICHE), así como aquellos con inoculante y fertilización baja (ICHN + FB y ICHE + FB) presentaron ectomicorrizas en estadio maduro; en contraste, los tratamientos con inoculante y fertilización alta (ICHN + FA y ICHE + FA) mostraron estructuras micorrícicas en estadios de desarrollo inicial (Figuras 6d y 6e). Esto podría indicar que el nivel de micorrización, hasta el momento de la evaluación, fue afectado en función de la dosis de fertilización, retrasando el desarrollo de las ectomicorrizas, tal como lo observó Marx (1980).

Conclusiones

La combinación de inoculante comercial con esporas de hongos nativos (1 mL·planta⁻¹) y fertilización de 3 g·L⁻¹ propició mejor calidad de la planta respecto al inóculo comercial con esporas de hongos exóticos (1.5 mL·planta⁻¹), demostrando que ambos componentes favorecen la calidad de *Pinus engelmannii* en vivero. La incorporación de la dosis alta de fertilizante de liberación controlada propició una tendencia negativa en el porcentaje de micorrización. La diversidad de esporas de hongos ectomicorrícicos contenidos en los inoculantes comerciales no resulta en una diversidad de formación de micorrizas, como ocurre con el inoculante comercial de hongos nativos. Los resultados representan un aporte al conocimiento técnico para la producción de planta de calidad de *P. engelmannii* en vivero, lo cual repercute en la supervivencia de la especie en campo.

Agradecimientos

Al CONACYT, por el financiamiento otorgado a la Dra. Silvia Salcido Ruiz dentro del marco de una estancia posdoctoral 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 gobierno del estado de Durango, por el apoyo para este trabajo con infraestructura y materiales en el vivero forestal "Praxedis Guerrero".

Fin de la versión en español

- micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(4), 567–577. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342010000400009&lng=es&tlng=es
- Castro-Garibay, S. L., Aldrete, A., López-Upton, J., & Ordáz-Chaparro, V. M. (2018). Efecto del envase, sustrato y fertilización en el crecimiento de *Pinus greggii* var. *australis* en vivero. *Agrociencia*, 52(1), 115–127. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000100115&lng=es&tlng=es
- Cibrián, T. D., Alvarado, R. D., & García, D. S. E. (2007). *Enfermedades forestales en México*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Determination of ectomycorrhizae (DEEMY). (2019). An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. Retrieved August 1, 2019 from <http://www.deemy.de/>
- Dickson, A., Leaf, A. L., & Hosner, J. F. (1960). Quality appraisal of white pine seedling stock in nurseries. *The Forestry Chronicle*, 36(1), 10–13. doi: 10.5558/tfc36010-1
- Dumroese, R. K., Landis, T. D., & Wilkinson, K. M. (2012). Riego y fertirriego. In M. G. Buamscha, L. T. Contardi, R. K. Dumroese, J. A. Enricci, R. R. Escobar, H. E. Gonda, ...Wilkinson, K. M. (Eds.), *Producción de plantas en viveros forestales* (pp. 115–125). Buenos Aires, Argentina: Consejo Federal de Inversiones, Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
- Escobar-Alonso, S., & Rodríguez, T. D. A. (2019). Estado del arte en la investigación sobre calidad de planta del género *Pinus* en México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(55), 1–38. doi: 10.29298/rmcf.v10i55.558
- García, R. J. L. (2018). Micorrización controlada de plantas del género *Pinus* en vivero y su incidencia sobre atributos del material y del comportamiento. Tesis doctoral, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- García, R. J. L., Sarmiento, L. H., Sierra, A. D., & Mejía, B. J. M. (2012). *Hongos silvestres ectomicorrízicos de bosques templados de los municipios de Pueblo Nuevo, San Dimas y Durango, Durango*. México: Campo Experimental Valle del Guadiana, INIFAP-SAGARPA. Retrieved from <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3539>
- Gómez-Romero, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C., & Lindig-Cisneros, R. (2013). Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Revista Madera y Bosques*, 19(3), 51–63. doi: 10.21829/myb.2013.193327
- Honrubia, M. (2009). Las micorrizas: Una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 66(S1), 133–144. doi: 10.3989/ajbm.2226
- Ishida, T. A., Nara, K., Tanaka, M., Kinoshita, A., & Hogetsu, T. (2008). Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist*, 180(2), 491–500. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02572.x
- Khasa, P. D., Sigler, L., Chakravarty, P., Dancik, B. P., Erickson, L., & Mc Curdy, D. (2001). Effect of fertilization on growth and ectomycorrhizal development of container-grown and bare-root nursery conifer seedling. *New Forests*, 22(3), 179–197. doi: 10.1023/A:1015674921878
- Marschner, P. (2012). *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (3rd ed.). USA: Elsevier/Academic Press.
- Martínez, N. L. E., Sarmiento, L. H., Sígala, R. J. A., Rosales, M. S., & Montoya, A. J. B. (2016). Respuesta a la inoculación inducida de *Russula delica* Fr. en plantas de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(33), 108–117. doi: 10.29298/rmcf.v7i33.93
- Marx, D. H. (1980). Ectomycorrhizal fungus inoculations: A tool for improving forestations practices. In P. Mykola (Ed.), *Tropical mycorrhiza research* (pp. 13–71). USA: Oxford University Press.
- Nara, K. (2009). Spores of ectomycorrhizal fungi: ecological strategies for germination and dormancy. *New Phytologist*, 181(2), 245–248. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02691.x
- Osorio, N. W. (2012). Uso de hongos formadores de micorriza como alternativa biotecnológica para promover la nutrición y el crecimiento de plántulas. *Revista Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal*, 1(2), 1–4. Retrieved from <https://www.bioedafologia.com/sites/default/files/documentos/pdf/Hongos-formadores-de-micorrizas.pdf>
- Pera, J., & Parladé, J. (2005). Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 14(3), 419–433. Retrieved from <https://recyt.fecyt.es/index.php/IA/article/view/2340/1736>
- Prieto, R. J. A., García, R. J. L., Mejía, B. J. M., Huchín, A. S., & Aguilar, V. J. L. (2009). *Producción de planta del género Pinus en vivero en clima templado frío*. (1.^a ed.). Durango, México: Campo Experimental Valle del Guadiana INIFAP.
- Rentería-Chávez, M. C., Pérez-Moreno, J., Cetina-Alcalá, V. M., Ferrera-Cerrato, R., & Xoconostle-Cázares, B. (2017). Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 93–104. doi: 10.1016/j.ram.2016.06.004
- Rodríguez, T. D. A. (2008). *Indicadores de calidad de planta forestal*. México: Mundi Prensas.
- Sáenz, R. J. T., Muñoz, F. H. J., Pérez, D. C. M. A., Rueda, S. A., & Hernández, J. (2014). Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero “Morelia”, estado de Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(26), 98–111. doi: 10.29298/rmcf.v5i26.293
- Salgado, S. M. E., Rajchenberg, M., & Barroetaveña, C. (2009). Evaluación del estado micorrízico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego, sin

- manejo de la micorrización. *Bosque*, 30(3), 127–134. doi: 10.4067/S0717-92002009000300002
- Secretaría de Economía. (2016). Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2014: Certificación de operación de viveros forestales. Retrieved March 9, 2019 from http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5464460
- Sosa, R. T., Sánchez, N. J., Morales, G. E., & Cruz, C. F. (2006). Interacción micorrizas arbusculares-*Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* (Poaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 43–54. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11n1/v11n1a04.pdf>
- Statistical Analysis System (SAS Institute Inc.). (2009). SAS ver. 9.2. Cary, NC, USA: Author.
- Trappe, J. M. (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathology*, 15, 203–222. doi: 10.1146/annurev.py.15.090177.001223
- Valdés, R. M., Ambriz, P. E., Camacho, V. A., & Fierros, G. A. M. (2010). Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 1(2), 53–64. doi: 10.29298/rmcf.v1i2.637
- Vázquez-Cisneros, I., Prieto-Ruiz, J. A., López-López, M. A., Wehenkel, C., Domínguez-Calleros, P. A., & Muñoz-Sáez, F. E. (2018). Growth and survival of plantation of *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. var. *greggii* under different fertilization treatments. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 24(2), 251–264. doi: 10.5154/r.rchscfa.2017.05.036