

## Scion and rootstock compatibility in *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. in response to genotypic variation

### Compatibilidad de la púa y el portainjerto en *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. como respuesta a la variación genotípica

Benito González-Jiménez<sup>1</sup>; Marcos Jiménez-Casas<sup>1\*</sup>; Javier López-Upton<sup>1</sup>; Miguel Á. López-López<sup>1</sup>; Rodrigo Rodríguez-Laguna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Postgrado en Ciencias Forestales. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Rancho Universitario Exhacienda Aquetzalpa. C. P. 43600. Tulancingo, Hidalgo, México.

\*Corresponding author: marcosjc@colpos.mx; tel.: +52 595 952 0200 ext. 1454.

#### Abstract

**Introduction:** Clonal orchards increase genetic gain, usually established by grafting. In pines, scion-rootstock genetic compatibility could improve grafted plant production.

**Objectives:** To evaluate scion-rootstock compatibility of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. in response to genotypic variation.

**Materials and methods:** Scions of four outstanding genotypes (G105, G106, G114 and G115) were grafted onto rootstocks of the same half-sib families (F105, F106, F114 and F115) in all combinations in a randomized complete block design. The following were evaluated: grafting, survival, needle development and growth in length and diameter of the graft.

**Results and discussion:** The analysis of variance indicated that grafting ranged from 70 to 82.5 %; the effect was significant only for the scion genotype factor ( $P < 0.0001$ ), being higher with G115. The genotype\*family interaction had significant effect ( $P < 0.0001$ ) on graft survival; the best combinations were G115 + F114 (85 %), G114 + F105 (80 %), G115 + F105 (75 %) and G115 + F106 (75 %). G105 (26 cm) and G115 (2 mm) had the highest values ( $P < 0.05$ ) for growth in length and diameter, respectively. All the grafts developed needles after five months.

**Conclusions:** Grafting with genotype G115 and family F105, in combination with any family or genotype, were the most successful. Scions and rootstocks of the same genotype or family were not favorable for graft compatibility in *P. patula*.

**Keywords:** superior genotypes; grafting; graft survival; genetic improvement; progeny.

#### Resumen

**Introducción:** Los huertos clonales incrementan la ganancia genética, generalmente se establecen con injertos. En pinos, la compatibilidad genética púa-patrón podría mejorar la producción de planta injertada.

**Objetivos:** Evaluar la compatibilidad entre púa y portainjerto de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. en respuesta a la variación genotípica.

**Materiales y métodos:** Se injertaron púas de cuatro genotipos sobresalientes (G105, G106, G114 y G115) sobre patrones de las mismas familias de medios hermanos (F105, F106, F114 y F115) en todas sus combinaciones con el diseño bloques completos al azar. Se evaluó prendimiento, supervivencia, desarrollo de acículas y crecimiento en longitud y diámetro del injerto.

**Resultados y discusión:** El análisis de varianza indicó que el prendimiento de los injertos varió de 70 a 82.5 %; el efecto fue significativo solo en el factor genotipo de la púa ( $P < 0.0001$ ), siendo mayor con el G115. La interacción genotipo\*familia tuvo efecto significativo ( $P < 0.0001$ ) en la supervivencia del injerto; las mejores combinaciones fueron G115 + F114 (85 %), G114 + F105 (80 %), G115 + F105 (75 %) y G115 + F106 (75 %). El G105 (26 cm) y G115 (2 mm) mostraron los valores más altos ( $P < 0.05$ ) en el crecimiento en longitud y diámetro, respectivamente. A los cinco meses, todos los injertos desarrollaron acículas.

**Conclusiones:** Los injertos realizados con el genotipo G115 y familia F105, en combinación con cualquier familia o genotipo, fueron los más exitosos. Las púas y patrones del mismo genotipo o familia no favorecieron la compatibilidad de los injertos en *P. patula*.

**Palabras clave:** genotipos superiores; prendimiento del injerto; supervivencia del injerto; mejoramiento genético; progenie.

## Introduction

*Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. is a widely distributed subtropical pine, due to high productivity, wood quality and easy management (Vargas-Hernández & Vargas-Abonce, 2016). There is growing interest in its genetic improvement, which contemplates the establishment of asexual seed orchards (ASO) from outstanding trees (Aparicio-Rentería, Viveros-Viveros, & Rebolledo-Camacho, 2013). Currently, the Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT project 2017-2-291322 aims to establish four ASO of *P. patula* in the states of Hidalgo, Oaxaca, Puebla and Veracruz.

Through cloning, outstanding genotypes are multiplied to produce seed of high genetic quality (Hartmann, Kester, Davies Jr., & Geneve, 2014). In conifers, trees express their superiority at maturity, but the ability to develop adventitious roots is reduced making it difficult to use layering and rooting cuttings (Wendling, Trueman, & Xavier, 2014). At present practice, clones used for ASO establishment in pines are obtained by grafting (Pérez-Luna et al., 2020), as with *P. elliottii* Engelm. var. *elliottii* and *P. taeda* L. in the United States (White, Duryea, & Powell, 2018) and *P. patula* and *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* (Mirov) Harrison in México (Barrera-Ramírez et al., 2020; Vargas-Hernández & Vargas-Abonce, 2016).

Grafting is the physical union of two genetic entities of different origin (Darikova, Savva, Vaganov, Grachev, & Kuznetsova, 2011). It has recently been shown that both the scion and the recipient plant maintain their original genomes and do not share DNA, but epigenetic information does communicate within the plant by RNA flow between contiguous cells of the scion and rootstock and acts in activating or deactivating genes in the recipient plant (Lewsey et al., 2016). This propagation technique in conifers is characterized by low grafting percentages and survival associated with the genetic and epigenetic basis, as well as its internal anatomy, health, taxonomic affinity between scion and rootstock, bud phenology, rootstock age, grafting technique, soil and climate conditions, and management during grafting (González-Jiménez, Jiménez-Casas, López-Upton, López-López, & Rodríguez-Laguna, 2022).

Scion and rootstock genotype are an important factor in compatibility and a source of variation in grafting, survival, development and morphology (Warschefsky et al., 2016). Scion-rootstock compatibility studies in conifers have focused at the species level with satisfactory results in intraspecific grafting (Darikova et al., 2011). In the case of *Pinus rzedowskii* Madrigal & M. Caball., scions show higher affinity when grafted on the same species (Solario-Barragán, Delgado-Valerio, Molina-Sánchez, Rebolledo-Camacho, & Tafolla-

## Introducción

*Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. es un pino subtropical de distribución amplia, debido a su productividad, calidad de madera y fácil manejo (Vargas-Hernández & Vargas-Abonce, 2016). Existe interés creciente en su mejoramiento genético, que contempla el establecimiento de huertos semilleros asexuales (HSA) a partir de árboles sobresalientes (Aparicio-Rentería, Viveros-Viveros, & Rebolledo-Camacho, 2013). En la actualidad, el Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT proyecto 2017-2-291322 tiene como objetivo el establecimiento de cuatro HSA de *P. patula* en los estados de Hidalgo, Oaxaca, Puebla y Veracruz.

Por medio de la clonación se multiplican genotipos sobresalientes con el fin de producir semilla de alta calidad genética (Hartmann, Kester, Davies Jr., & Geneve, 2014). En coníferas, los árboles expresan su superioridad al llegar a la madurez, pero se reduce la capacidad de desarrollo de raíces adventicias dificultando el empleo de acodos y enraizamiento de estacas (Wendling, Trueman, & Xavier, 2014). En la práctica actual, los clones utilizados para el establecimiento de HSA en pinos son obtenidos por medio de injertos (Pérez-Luna et al., 2020), como sucede con *P. elliottii* Engelm. var. *elliottii* y *P. taeda* L. en Estados Unidos (White, Duryea, & Powell, 2018) y *P. patula* y *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* (Mirov) Harrison en México (Barrera-Ramírez et al., 2020; Vargas-Hernández & Vargas-Abonce, 2016).

El injerto es la unión física de dos entidades genéticas de origen diferente (Darikova, Savva, Vaganov, Grachev, & Kuznetsova, 2011). Recientemente se ha demostrado que tanto la púa como la planta receptora mantienen sus genomas originales y no comparten ADN, pero la información epigenética si se comunica dentro de la planta por el flujo de ARN entre células contiguas de la púa y el patrón y actúa en la activación o desactivación de genes en la planta receptora (Lewsey et al., 2016). Esta técnica de propagación en coníferas se caracteriza por los porcentajes bajos de prendimiento y supervivencia asociados a la base genética y epigenética, así como a su anatomía interna, sanidad, afinidad taxonómica entre la púa y el patrón, fenología de la yema, edad del patrón, técnica de injerto, condiciones edafoclimáticas y manejo durante el prendimiento (González-Jiménez, Jiménez-Casas, López-Upton, López-López, & Rodríguez-Laguna, 2022).

El genotipo de la púa y patrón constituyen un factor importante en la compatibilidad y fuente de variación del prendimiento, supervivencia, desarrollo y morfología de los injertos (Warschefsky et al., 2016). Los estudios de compatibilidad púa-patrón en coníferas se han enfocado a nivel de especie con resultados satisfactorios en injertos intraespecíficos (Darikova et al., 2011). En el caso de *Pinus rzedowskii* Madrigal &

Martínez, 2021), suggesting that the graft affinity could increase when scion and rootstock come from the same genotype or family.

Other authors report morphological and physiological variation among genotypes or interspecific, therefore, the response will be different when being part of a plant grafted as scion or rootstock (Tandonnet, Cookson, Vivin, & Ollat, 2010); therefore, it is necessary to identify favorable scion-rootstock combinations at the genotype level. In this regard, Pina, Cookson, Calatayud, Trinchera, and Herrea (2017) suggest evaluating graft compatibility before considering the use of a rootstock for a specific scion genotype. In *P. elliotii*, scion genotype had an effect on survival and stromule formation one year after grafting, mainly due to differences in the specific ability to flower and respond to tissue attachment (Medina Perez, White, Huber, & Martin, 2007). On the other hand, in *Larix gmelinii* var. *japonica*, grafting survival depended more on the clonal characteristics of the scion than on the rootstock (Kita, Kon, Ishizuka, Agathokleous, & Kuromaru, 2018). For the case of *P. patula*, there are no references about the performance of scion or rootstock genotype on grafts.

Therefore, the objective of the study was to evaluate the compatibility between scion and rootstock of *P. patula* in response to genotypic variation. Greater compatibility is expected in scions grafted on the same progeny.

## Materials and Methods

### Selection of biological material

From the Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT 2017-2-291322 project, four genotypes were selected from the ejido Peñuelas in Pueblo Nuevo, municipality of Chignahuapan, Puebla (G105, G106, G114 and G115). The trees selected showed superiority in height, diameter at breast height and stem straightness within each of their sources (Table 1). The source of G105 and G106 was a progeny trial (19° 57' 43.14" LN and 98° 06' 15.25" LW, 2 574 m elevation) at a distance of 50 m between trees; while that of G114 and G115 was a sexual seed orchard (19° 57' 36.09" LN and 98° 06' 18.92" LW, 2 592 m elevation), at a distance of 36 m between trees. The distance between both sources was 250 m.

### Sexual propagation

In October 2018, 10 cones were collected from the upper third of the open-pollinated crown of the four genotypes selected for rootstock production. A total of 300 seeds were extracted from each genotype, separating the cores by flotation, and 160 full seeds

M. Caball., las púas muestran mayor afinidad al ser injertadas en la misma especie (Solorio-Barragán, Delgado-Valerio, Molina-Sánchez, Rebolledo-Camacho, & Tafolla-Martínez, 2021), lo cual sugiere que la afinidad del injerto podría incrementar cuando la púa y el patrón provienen del mismo genotipo o familia.

Otros autores reportan variación morfológica y fisiológica entre genotipos o interespecífica, por ello, la respuesta será diferente al ser parte de una planta injertada como púa o patrón (Tandonnet, Cookson, Vivin, & Ollat, 2010); por tanto, es necesario identificar las combinaciones púa-patrón favorables a nivel de genotipo. En este sentido, Pina, Cookson, Calatayud, Trinchera, y Herrea (2017) sugieren evaluar la compatibilidad del injerto antes de considerar el uso de un patrón para un genotipo de púa específico. En *P. elliotii*, el genotipo de la púa tuvo efecto en la supervivencia y formación de estróbilos al año de ser injertados, principalmente por las diferencias en la capacidad específica para florecer y responder a la unión del tejido (Medina Perez, White, Huber, & Martin, 2007). Por otro lado, en *Larix gmelinii* var. *japonica*, la supervivencia del injerto dependió más de las características clonales de la púa que del patrón (Kita, Kon, Ishizuka, Agathokleous, & Kuromaru, 2018). Para el caso de *P. patula* no se tienen referencias sobre el desempeño del genotipo de púa o patrón en los injertos.

En tal contexto, el objetivo del estudio fue evaluar la compatibilidad entre púa y portainjerto de *P. patula* en respuesta a la variación genotípica. Se espera mayor compatibilidad en las púas injertadas en su misma progenie.

## Materiales y métodos

### Colecta del material biológico

Del proyecto del Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT 2017-2-291322 se seleccionaron cuatro genotipos del ejido Peñuelas en Pueblo Nuevo, municipio de Chignahuapan, Puebla (G105, G106, G114 y G115). Los árboles elegidos mostraron superioridad en altura, diámetro normal y rectitud del fuste dentro de cada una de sus fuentes (Cuadro 1). La fuente del G105 y G106 fue un ensayo de progenie (19° 57' 43.14" LN y 98° 06' 15.25" LO, 2 574 m) a una distancia de 50 m entre los dos árboles; mientras que la del G114 y G115 fue un huerto semillero sexual (19° 57' 36.09" LN y 98° 06' 18.92" LO, 2 592 m de altitud), a una distancia de 36 m entre los dos árboles. La distancia entre ambas fuentes fue de 250 m.

### Propagación sexual

En octubre de 2018 se colectaron 10 conos del tercio superior de la copa de polinización abierta de los cuatro genotipos seleccionados para la producción de planta

**Table 1. Characteristics of the four superior *Pinus patula* genotypes selected as scion stock plants and their progeny for rootstock, obtained from a progeny trial (G105 and G106) and a seed orchard (G114 and G115) located in Chignahuapan, Puebla.**

**Cuadro 1. Características de los cuatro genotipos superiores de *Pinus patula* seleccionados como donadores de pías y su progenie para planta patrón, obtenidos de un ensayo de progenie (G105 y G106) y un huerto semillero (G114 y G115) ubicados en Chignahuapan, Puebla.**

Genotype/Genotipo	Age (years)/Edad (años)	Height (m)/Altura (m)	Diameter (cm)/Diámetro (cm)
G105	11	9.40	19.8
G106	11	9.80	21.6
G114	15	17.1	25.2
G115	15	16.3	24.8

Age at bud collection (2020). Height and diameter at the time of genotype selection (2018).

Edad al momento de la recolecta de las yemas (2020). Altura y diámetro al momento de la selección de los genotipos (2018).

were selected from each tree. Seeds were sown and germinated in individual 320 mL plastic containers under greenhouse conditions at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Mexico. The substrate was pine bark, perlite and tepezil in a 60-20-20 ratio, respectively. In the mixture, 8 g·L<sup>-1</sup> of eight-month controlled release fertilizer Multicote® 18-6-12 + 2MgO + microelements were included. In September 2019, rootstock plants were transplanted into 1 L rigid plastic container maintaining control of the genotype that originated each sapling. A mixture of peat moss, perlite and vermiculite (60-20-20 %, respectively) was used as substrate, including the nutrient formula and amount of controlled-release fertilizer used in the germination stage. Three months later, the rootstocks were removed from the greenhouse and placed under direct sun.

Each rootstock was irrigated with 400 mL of water three times per week with a hand watering can, adjusting the pH to 5.7 with 85 % phosphoric acid. Peters Professional® 20-20-20 soluble fertilizer was added at the rate of 1 g·L<sup>-1</sup>, once a week. A total of 80 vigorous plants from each family were selected for use as rootstock on March 25, 2020. Plants averaged 60 cm in height and 8.1 mm stem base diameter.

### Asexual propagation

Scions were collected on 01 April 2020 from the same four genotypes used as seed donors for the rootstock plant (G105, G106, G114 and G115) (Figure 1a). The buds (scions) presented a phenological stage of active growth before emitting strong needles without apparent pests or diseases; average length and diameter were 13 cm and 4.9 mm, respectively.

A trained person climbed to the top of each tree with the use of a tree vertical bike and safety equipment.

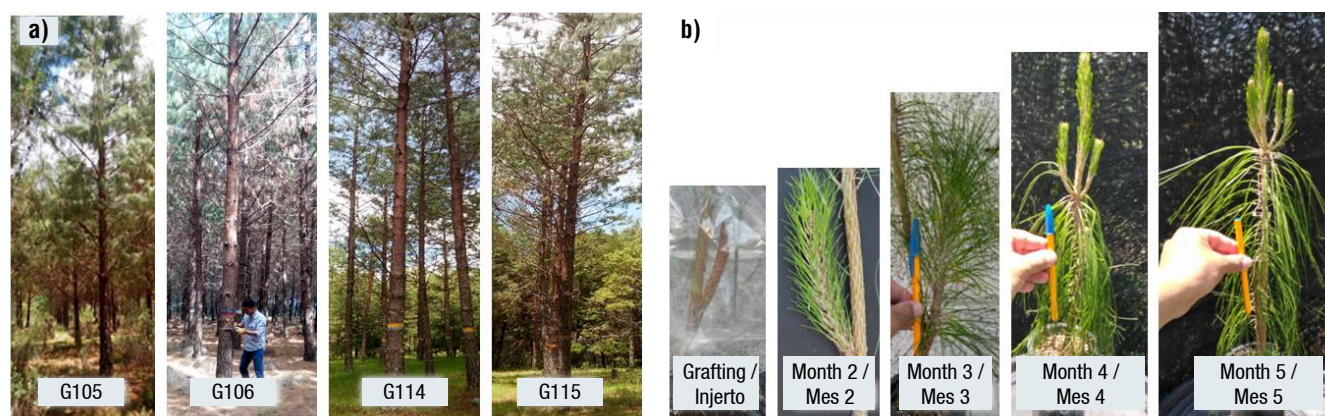
patrón. Se extrajeron 300 semillas de cada genotipo, separando las vanas por flotación y se seleccionaron 160 semillas llenas de cada árbol. Las semillas se sembraron y germinaron en envases individuales de plástico con capacidad de 320 mL en condiciones de invernadero en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, México. El sustrato fue corteza de pino, perlita y tepezil en proporción 60-20-20, respectivamente. En la mezcla se incluyeron 8 g·L<sup>-1</sup> de fertilizante de liberación controlada de ocho meses Multicote® 18-6-12 + 2MgO + microelementos. En septiembre de 2019, las plantas patrón se trasplantaron a envase de plástico rígido de 1 L manteniendo el control del genotipo que originó cada arbolito. Se utilizó una mezcla de turba de musgo, perlita y vermiculita (60-20-20 %, respectivamente) como sustrato, incluyendo la fórmula nutritiva y cantidad de fertilizante de liberación controlada que se utilizó en la etapa de germinación. Tres meses después, los patrones se sacaron del invernadero y se colocaron a sol directo.

Cada planta patrón se regó con 400 mL de agua tres veces por semana con regadera manual, ajustando el pH a 5.7 con ácido fosfórico al 85 %. El fertilizante soluble Peters Profesional® 20-20-20 se adicionó a razón de 1 g·L<sup>-1</sup>, una vez por semana. El 25 de marzo de 2020, 80 plantas vigorosas de cada familia se seleccionaron para su uso como patrón. Las plantas tuvieron, en promedio, 60 cm de altura y 8.1 mm de diámetro de la base del tallo.

### Propagación asexual

Las pías se colectaron el 01 de abril de 2020 de los mismos cuatro genotipos utilizados como donadores de semilla para la planta patrón (G105, G106, G114 y G115) (Figura 1a). Las yemas (pías) presentaban un estado fenológico de crecimiento activo antes de emitir acículas, vigorosas, sin plagas ni enfermedades aparentes; la longitud y diámetro promedio fueron 13 cm y 4.9 mm, respectivamente.





**Figure 1. Selected *Pinus patula* trees and graft development: a) superior genotypes selected as bud (scion) and seed (rootstock) donors; b) grafting development in the first five months.**

**Figura 1. Árboles seleccionados de *Pinus patula* y desarrollo del injerto: a) genotipos superiores seleccionados como donadores de yemas (púas) y semilla (planta patrón); b) desarrollo de la púa injertada en los primeros cinco meses.**

Buds were collected from the upper half of the canopy with extension scissors, cutting them at the base of the new growth. The cut buds were gathered at the base of the tree and moistened, wrapped in newspaper and stored in plastic bags. Packages of 120 scions per genotype (considering 50 % more than required) were transported inside the cooler with ice to the Colegio de Postgraduados facilities. The packages were kept refrigerated at 4 °C until the following day to be grafted. Scions were adjusted to a length of 7 cm before grafting. On April 02, 2020, grafting was performed in a reciprocal manner, grafting the scion of each of the four genotypes evaluated on the progeny of the same genotype and on the progeny of the other three genotypes; in total 20 grafting procedures were performed for each of the 16 combinations.

In this experiment, the lateral grafting technique was used at 10 cm from the base of the main stem of the rootstock (without cutting it), making a cut of 2 cm in length and 80° of inclination with a cutter. The scion was cut twice with a scalpel and a number 12 blade to give it a wedge shape in the basal part, exposing two planes of the cambium. In this experiment, the lateral grafting technique was used at 10 cm from the base of the main stem of the rootstock (without cutting it), making a cut of 2 cm in length and 80° of inclination with a cutter. The scion was cut twice with a scalpel and a number 12 blade to give it a wedge shape in the basal part, exposing two planes of the cambium. Subsequently, the cambium of both parts was made to coincide by inserting the graft. Then, to seal the grafted area, a strip of plastic (thin, 1 cm wide and 50 µm thick) was placed with several turns around the area. Finally, a transparent polyethylene bag (15 x 25 cm) was placed over the graft to prevent dehydration (González-Jiménez et al., 2022).

Una persona capacitada subió a la copa de cada árbol con el uso de bicicleta para escalado de árboles y equipo de seguridad. Las yemas se colectaron en la mitad superior de la copa con tijeras de extensión, cortándolas en la base del nuevo crecimiento. Las yemas cortadas se juntaron a pie del árbol y se humedecieron, se envolvieron en papel periódico y guardaron en bolsas plásticas. Los paquetes de 120 púas por genotipo (considerando 50 % más de las requeridas) se transportaron dentro de la nevera con hielo a las instalaciones del Colegio de Postgraduados. Los paquetes se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta al día siguiente para ser injertadas. Las púas se ajustaron a una longitud de 7 cm antes de injertar. El 02 de abril de 2020 se realizaron los injertos de forma recíproca, injertando la púa de cada uno de los cuatro genotipos evaluados sobre la progenie de su mismo genotipo y sobre la progenie de los otros tres genotipos; en total se hicieron 20 injertos para cada una de las 16 combinaciones.

En el experimento se usó la técnica de injerto lateral a 10 cm de la base del tallo principal del patrón (sin decapitarlo), haciendo un corte de 2 cm de longitud y 80° de inclinación con cúter. A la púa se le hicieron dos cortes con bisturí y navaja del número 12 para darle forma de cuña en la parte basal exponiendo dos planos del cámbium. Posteriormente, se hizo coincidir el cámbium de ambas partes al insertar la púa en la hendidura del patrón. Enseguida, para sellar la zona injertada, se colocó una tira de plástico (hule cristal delgado de 1 cm de ancho y 50 µm de grosor) con varias vueltas alrededor de la zona. Finalmente, una bolsa de polietileno transparente (15 x 25 cm) se colocó sobre el injerto para evitar su deshidratación (González-Jiménez et al., 2022).

Las actividades de manejo postinjerto incluyeron la apertura paulatina de la bolsa entre los 35 y 60 días; eliminación del plástico en el punto de unión a los

Post-grafting management activities included the gradual opening of the bag at 35 to 60 days; removal of the plastic at the point of union at two and a half months (when complete healing was observed); and pruning of the rootstock in three stages (40, 60 and 100 days), removing approximately one third of the aboveground part at each date, until only the grafted bud was left as rootstock leader. Irrigation, fertilization and fungicide application continued with the same management as in the rootstock production.

Between the 30th and 60th day after grafting, once a week, visual inspections of the union point of each graft were carried out through the plastic bag to identify phytosanitary problems. Phytopathogenic fungi were detected at the union point in less than 5 % of the total grafts. To correct the problem, the bag was removed, the affected area was left exposed and cleaned with a swab moistened with Pursue® 5 mL·L<sup>-1</sup>; quaternary ammonium salts; finally, the area was exposed, and the plastic bag was replaced.

### Experimental design

A randomized block experimental design with factorial arrangement was applied: 1) scion genotype with four levels (G105, G106, G114 and G115) and 2) rootstock family with four levels (F105, F106, F114 and F115). Four blocks with 16 treatments were established; each treatment was represented with five grafts per block, so a total of 320 grafts were inserted.

Data were analyzed using the statistical model  $Y_{ijk} = \mu + \beta_k + G_i + F_j + G_i * F_j + GF_{ij} + \epsilon_{ijk}$ ; where,  $Y_{ijk}$  = value of the response variable corresponding to repetition  $k$  of level  $i$  of  $G$  and level  $j$  of  $F$ ;  $\mu$  = overall mean;  $\beta_k$  = effect of block;  $G_i$  = effect of scion;  $F_j$  = effect of rootstock family;  $GF_{ij}$  = interaction scion genotype\* rootstock family;  $\epsilon_{ijk}$  = experimental error;  $i$  = G105, G106, G114 and G115;  $j$  = F105, F106, F114 and F115;  $k$  = 1, 2, 3 and 4 replicates.

The variables studied were grafting (%) and number of grafts that developed needles (%) at two months, graft survival (%) monthly until 12 months, and length (cm) and diameter (mm) of the grafted scion at five months.

### Statistical analysis

Data were subjected to Tukey's analysis of variance and multiple comparison of means in the statistical program SAS 9.4 (Statistical Analysis System [SAS], 2013). The data of the variables evaluated in percentage, as they did not meet the assumption of normality using the Shapiro-Wilk test, were transformed with the function  $[T = \arcsine(\sqrt{Y})]$  before performing the ANOVA and subsequently retransformed to the original units with the function  $[Y = 100 \sin^2(T)]$  (Barrera-Ramírez et al., 2020).

dos meses y medio (cuando se observó la cicatrización completa); y podas del patrón en tres etapas (40, 60 y 100 días), eliminando aproximadamente un tercio de la parte aérea en cada fecha, hasta dejar solo la yema injertada como líder de la planta. El riego, fertilización y aplicación de fungicidas continuaron con el mismo manejo que en la producción de la planta patrón.

Entre el día 30 y 60 después del injertado, una vez por semana, se hicieron inspecciones visuales del punto de unión de cada injerto, a través de la bolsa plástica, para identificar problemas fitosanitarios. Se detectaron hongos fitopatógenos en el punto de unión en menos del 5 % del total de injertos. Para corregir el problema se retiró la bolsa, se dejó expuesta la zona afectada y se limpió con un hisopo humedecido con sales cuaternarias de amonio Pursue® 5 mL·L<sup>-1</sup>; finalmente, la zona quedó expuesta y se volvió a colocar la bolsa plástica.

### Diseño experimental

Se aplicó un diseño experimental en bloques al azar con arreglo factorial: 1) genotipo de la púa con cuatro niveles (G105, G106, G114 y G115) y 2) familia del patrón con cuatro niveles (F105, F106, F114 y F115). Se establecieron cuatro bloques con 16 tratamientos; cada tratamiento estuvo representado con cinco injertos por bloque, por lo que se realizaron un total de 320 injertos.

Los datos se analizaron usando el modelo estadístico  $Y_{ijk} = \mu + \beta_k + G_i + F_j + G_i * F_j + GF_{ij} + \epsilon_{ijk}$ ; donde,  $Y_{ijk}$  = valor de la variable respuesta correspondiente a la repetición  $k$  del nivel  $i$  de  $G$  y nivel  $j$  de  $F$ ;  $\mu$  = media general;  $\beta_k$  = efecto del bloque;  $G_i$  = efecto del genotipo de la púa;  $F_j$  = efecto de la familia del patrón;  $GF_{ij}$  = interacción genotipo de la púa\* familia del patrón;  $\epsilon_{ijk}$  = error experimental;  $i$  = G105, G106, G114 y G115;  $j$  = F105, F106, F114 y F115;  $k$  = 1, 2, 3 y 4 repeticiones.

Las variables evaluadas fueron prendimiento (%) y número de injertos que desarrollaron acículas (%) a los dos meses, supervivencia del injerto (%) mensualmente hasta los 12 meses, y longitud (cm) y diámetro (mm) de la púa injertada a los cinco meses.

### Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey en el programa estadístico SAS 9.4 (Statistical Analysis System [SAS], 2013). Los datos de las variables evaluadas en porcentaje, al no cumplir con el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, se transformaron con la función  $[T = \arcseno(\sqrt{Y})]$  antes de realizar el análisis de varianza y posteriormente se retransformaron a las unidades originales con la función  $[Y = 100 \text{seno}^2(T)]$  (Barrera-Ramírez et al., 2020).

## Results and Discussion

Based on the information in Table 2, the effect of scion genotype was different ( $P < 0.05$ ) in all variables and the effect of rootstock family was different for survival, diameter growth and needle development. The interaction between the evaluated factors only had an effect on survival. In general, an average of 74.7 % of the grafts were attached, 50.0 % survived, with 20.8 cm of growth in length and 1.6 mm in diameter; 65 % of the grafts attached developed needles (Table 3).

### Effect of scion genotype

#### Grafting

Table 3 indicates that the percentages of *P. patula* grafting success ranged from 70 to 82 %. Genotype G115 had 12.5 % higher grafting ( $P < 0.0001$ ) compared to G106. Differences between scion genotypes suggest that each has a different ability to bind to the host plant tissue.

In conifers, variable results have been reported, but in most cases with grafting success rates of less than 50 % (Flores García, Morales González, Muñoz Flores, Prieto Ruiz, & Pineda Ojeda, 2013). In lateral grafting of *P. patula*, more favorable results have been recorded when grafting scions from juvenile trees (73 %) than from mature trees (35 %) (Aparicio-Rentería et al., 2013; González-Jiménez et al., 2022). Although it was not a factor considered in the present study, the age difference (four years) between scion donor trees was not favorable for grafting with the younger age genotypes (G105 and G106; Table 1); on the contrary, G115 had the highest grafting values (82.5 %).

The high percentages of grafting in this study show that the scion genotypes had the capacity to join their tissues in a functional way. The phenological stage of the buds (active growth) was suitable for

## Resultados y discusión

Con base en la información del Cuadro 2, el efecto del genotipo de la púa fue diferente ( $P < 0.05$ ) en todas las variables y el efecto de la familia del patrón lo fue en la supervivencia, crecimiento en diámetro y desarrollo de acículas. La interacción entre los factores evaluados solo tuvo efecto en la supervivencia. En general, en el experimento se obtuvo en promedio 74.7 % de prendimiento, 50.0 % de supervivencia, 20.8 cm de crecimiento en longitud y 1.6 mm en diámetro; 65 % de los injertos prendidos desarrolló acículas (Cuadro 3).

### Efecto del genotipo de la púa

#### Prendimiento

El Cuadro 3 indica que los porcentajes de prendimiento de *P. patula* variaron de 70 a 82 %. El genotipo G115 presentó 12.5 % mayor prendimiento ( $P < 0.0001$ ) que el G106. Las diferencias entre los genotipos de púa sugieren que cada uno tiene capacidad distinta para unirse al tejido de la planta receptora.

En coníferas se han obtenido resultados variables, pero en la mayoría de los casos con prendimiento menor de 50 % (Flores García, Morales González, Muñoz Flores, Prieto Ruiz, & Pineda Ojeda, 2013). En injertos laterales de *P. patula* se han tenido resultados más favorables al injertar púas de árboles juveniles (73 %) que de árboles maduros (35 %) (Aparicio-Rentería et al., 2013; González-Jiménez et al., 2022). Aunque no fue un factor considerado en el presente estudio, la diferencia de edad (cuatro años) entre los árboles donadores de púas no favoreció el prendimiento con los genotipos de menor edad (G105 y G106; Cuadro 1); por lo contrario, el G115 obtuvo los valores de prendimiento más altos (82.5 %).

Los porcentajes altos de prendimiento en este estudio indican que los genotipos de púa tuvieron la capacidad de unir sus tejidos de forma funcional. El estado fenológico

**Table 2. P values of the analysis of variance for the scion compatibility variables of four superior *Pinus patula* genotypes grafted on rootstocks of the same four families.**

**Cuadro 2. Valores P del análisis de varianza para las variables de compatibilidad de las púas de cuatro genotipos superiores de *Pinus patula* injertadas en patrones de las mismas cuatro familias.**

Source of variation/ Fuente de variación	Grafting (%)/ Prendimiento (%)	Survival (%)/ Supervivencia (%)	Length (cm)/ Longitud (cm)	Diameter (mm)/ Diámetro (mm)	Needles (%)/ Acículas (%)
Block/Bloque	0.5046	0.3378	0.6548	0.8307	0.1262
Scion genotype (SG)/ Genotipo de la púa (GP)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0002
Rootstock family (RF)/ Familia del patrón (FP)	0.5046	<0.0001	0.3274	0.0201	0.0159
SG*RF/GP*FP	0.4684	0.0050	0.1701	0.8348	0.1173



grafting, because they come from trees with superior characteristics, healthy and young age, which is recommended to achieve grafting success (Pérez-Luna et al., 2019). In addition, environmental conditions during grafting allowed the cellular processes, which start when grafting, to be carried out correctly (Hartmann et al., 2014), regardless of scion genotype.

Although the genotype\*family interaction effect was not significant ( $P = 0.4684$ ), the grafting percentage was higher with an unrelated genotype and rootstock family: G105 + F106 ( $85 \pm 9.6$ ), G106 + F105 ( $85 \pm 9.6$ ), G114 + F115 ( $85 \pm 5.0$ ) y G115 + F114 ( $90 \pm 10.0$ ). Pina et al. (2017) suggested testing and selecting, for each genotype of interest, the rootstock plant that improves grafting and reduces initial incompatibility.

### Survival

Besides grafting, graft survival is a factor of great relevance since the graft must be kept alive to fulfill its purpose. A difference ( $P < 0.0001$ ) was detected in the survival of G115 and G114 compared to G105 and G106. The highest survival at 12 months was obtained with G115 buds (73.8 %) with a difference of 41.3, 46.3 and 7.5 % compared to G105, G106 and G114 (Table 3). In grafts of *P. elliottii*, Medina Pérez et al. (2007) found differences in survival and stolon formation between scion genotypes, one year after grafting.

In the case of pine trees, it has been identified that graft survival decreases considerably over time. For *P. patula*, survival was reduced 71 % seven months after grafting (Aparicio-Rentería et al., 2013); in *P. engelmannii* Carr. it decreased to 12.5 % six months after grafting (Pérez-Luna et al., 2020) and to 27 % in *P. pseudostrobus* 90 days after grafting (Barrera-Ramírez et al., 2020).

In the two scion genotypes with high survival (G115 and G114), the highest number of dead grafts was in the grafting stage (first two months) and only 8.7 % (G115) and 7.5 % (G114) in the month 2-12 interval (Figure 2a). Barrera-Ramírez et al. (2020) agreed that the highest percentage of grafting mortality was recorded during the first 40 days, because more than 50 % had grafting problems. On the contrary, the highest mortality rate in G105 (40 %) and G106 (42.5 %) was recorded after grafting (Figure 2a). Aparicio-Rentería et al. (2013) attributed the mortality of *P. patula* grafts in the first year to extreme environmental conditions due to high temperatures, excessive rain, hail and frost under nursery conditions before being taken to the open field. In the present study, the main cause of mortality in the 2–12-month period was root necrosis resulting in total plant death (scion and rootstock) in almost 100 % of the cases. Ford, Jones, and Chirwa (2014) reported that *P. patula* is susceptible to attack by phytopathogenic fungi in the early years.

de las yemas (crecimiento activo) fue conveniente para ser injertadas, ya que provienen de árboles con características superiores, sanos y de edad juvenil, lo cual se recomienda para lograr el éxito del injerto (Pérez-Luna et al., 2019). Además, las condiciones ambientales durante el prendimiento permitieron que los procesos celulares, que inician al momento de injertar, se llevaran a cabo correctamente (Hartmann et al., 2014), independientemente del genotipo de púa.

Aunque el efecto de la interacción genotipo\*familia no fue significativo ( $P = 0.4684$ ), el porcentaje de prendimiento fue mayor con un genotipo y una familia de patrón no emparentada: G105 + F106 ( $85 \pm 9.6$ ), G106 + F105 ( $85 \pm 9.6$ ), G114 + F115 ( $85 \pm 5.0$ ) y G115 + F114 ( $90 \pm 10.0$ ). Pina et al. (2017) sugirieron probar y seleccionar, para cada genotipo de interés, la planta patrón que mejore el prendimiento y reduzca la incompatibilidad inicial.

### Supervivencia

Además del prendimiento, la supervivencia del injerto es un factor de gran relevancia, ya que este se debe mantener vivo para cumplir su finalidad. Se detectó diferencia ( $P < 0.0001$ ) en la supervivencia del G115 y G114 respecto al G105 y G106. La supervivencia más alta a los 12 meses se obtuvo con yemas del G115 (73.8 %) con diferencia de 41.3, 46.3 y 7.5 % respecto al G105, G106 y G114 (Cuadro 3). En injertos de *P. elliottii*, Medina Pérez et al. (2007) encontraron diferencias en la supervivencia y formación de estróbilos entre genotipos de púa, al año de ser injertados.

En pinos se ha identificado que la supervivencia del injerto se reduce considerablemente a través del tiempo. Para *P. patula*, la supervivencia se redujo 71 % a los siete meses después de injertar (Aparicio-Rentería et al., 2013); en *P. engelmannii* Carr. disminuyó a 12.5 % a los seis meses (Pérez-Luna et al., 2020) y a 27 % en *P. pseudostrobus* a los 90 días (Barrera-Ramírez et al., 2020).

En los dos genotipos de púa con supervivencia alta (G115 y G114), el mayor número de injertos muertos se presentó en la etapa de prendimiento (dos primeros meses) y solamente 8.7 % (G115) y 7.5 % (G114) en el intervalo del mes 2-12 (Figura 2a). Barrera-Ramírez et al. (2020) coincidieron que el mayor porcentaje de mortalidad en injertos se registró durante los primeros 40 días, ya que más del 50 % presentaron problemas de prendimiento. Por lo contrario, la mayor tasa de mortalidad en el G105 (40 %) y G106 (42.5 %) se registró después del prendimiento (Figura 2a). Aparicio-Rentería et al. (2013) atribuyeron la mortalidad de injertos de *P. patula* en el primer año a las condiciones ambientales extremas por altas temperaturas, exceso de lluvia, granizo y heladas en condiciones de vivero antes de



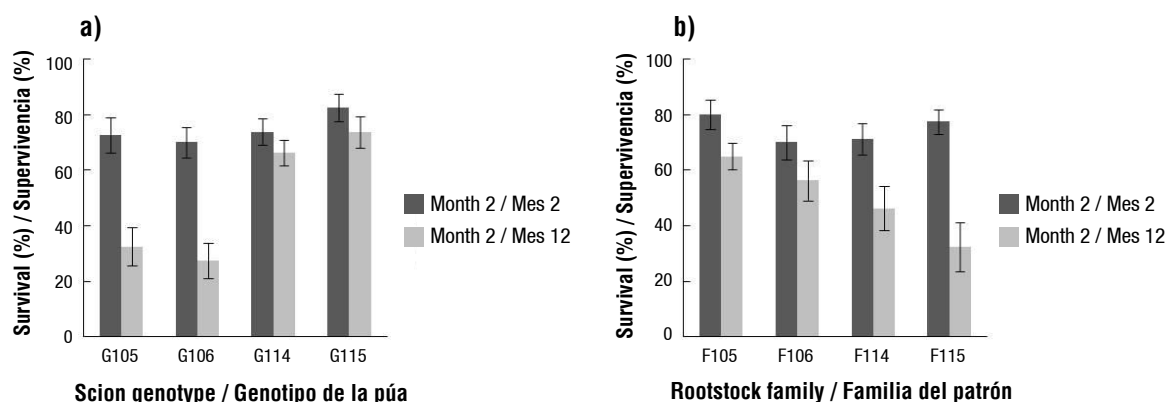
**Table 3. Mean values and standard error ( $\pm$ ) of the compatibility analysis of scions of four superior *Pinus patula* genotypes grafted on rootstocks of the same four families.**

**Cuadro 3. Valores medios y error estándar ( $\pm$ ) del análisis de compatibilidad de las púas de cuatro genotipos superiores de *Pinus patula* injertadas en patrones de las mismas cuatro familias.**

Factor/ Factor	Grafting (%)/ Prendimiento (%)	Survival (%)/ Supervivencia (%)	Length (cm)/ Longitud (cm)	Diameter (mm)/ Diámetro (mm)	Needles (%)/ Acículas (%)
<b>Scion genotype / Genotipo de púa</b>					
G105	72.5 $\pm$ 6.3 ab	32.5 $\pm$ 6.8 b	26.0 $\pm$ 1.2 a	1.8 $\pm$ 0.1 a	69.2 $\pm$ 7.0 a
G106	70.0 $\pm$ 5.5 b	27.5 $\pm$ 6.3 b	16.1 $\pm$ 1.0 c	1.1 $\pm$ 0.2 b	40.6 $\pm$ 8.0 b
G114	73.8 $\pm$ 4.7 ab	66.3 $\pm$ 4.7 a	20.7 $\pm$ 0.8 b	1.3 $\pm$ 0.1 b	69.7 $\pm$ 6.8 a
G115	82.5 $\pm$ 4.8 a	73.8 $\pm$ 5.7 a	20.5 $\pm$ 0.9 b	2.0 $\pm$ 0.1 a	80.9 $\pm$ 5.2 a
<b>Rootstock family / Familia del patrón</b>					
F105	80.0 $\pm$ 5.2 a	65.0 $\pm$ 4.7 a	21.3 $\pm$ 1.0 a	1.9 $\pm$ 0.1 a	64.3 $\pm$ 2.5 ab
F106	70.0 $\pm$ 6.1 a	56.3 $\pm$ 7.1 ab	21.9 $\pm$ 1.5 a	1.6 $\pm$ 0.2 ab	81.9 $\pm$ 6.0 a
F114	71.3 $\pm$ 5.8 a	46.3 $\pm$ 7.9 bc	20.6 $\pm$ 1.3 a	1.3 $\pm$ 0.2 b	56.2 $\pm$ 8.4 b
F115	77.5 $\pm$ 4.4 a	32.5 $\pm$ 8.7 c	19.4 $\pm$ 1.5 a	1.5 $\pm$ 0.2 ab	58.0 $\pm$ 9.2 b
Average / Promedio	74.7	50.0	20.8	1.6	65.1

For each factor, means with different letters in the same column are statistically different according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

Para cada factor, medias con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).



**Figure 2. *Pinus patula* graft survival from month 2 to 12 of grafting: a) survival of scion genotype factor; b) survival of rootstock family factor.**

**Figura 2. Supervivencia del injerto de *Pinus patula* del mes 2 al 12 de injertado: a) supervivencia del factor genotipo de púa; b) supervivencia del factor familia del patrón.**

Moreover, physiological and anatomical incompatibility between scion and rootstock also affect survival, as either party can weaken or kill the grafted tree; few studies had focused on the impact of scion on rootstock (Han, Guo, Korpelainen, Niinemets, & Li, 2019). Tandonnet et al. (2010) determined that root vigor is conferred by the grafted scion, as the scion genotype induced necrosis in rootstock roots. In the present study, G115 and G114, after grafting, could have efficiently assimilated the resources provided by the rootstock and vice versa, because the interaction capacity determines grafting success (Goldschmidt, 2014).

ser llevados a campo. En el presente estudio, la causa principal de mortalidad en el periodo del mes 2-12 fue la necrosis en las raíces que dio lugar a la muerte de la planta completa (púa y patrón) en casi 100 % de los casos. Ford, Jones, y Chirwa (2014) reportaron que *P. patula* es susceptible al ataque de hongos fitopatógenos en los primeros años.

Por otra parte, la incompatibilidad fisiológica y anatómica entre la púa y el patrón también influyen en la supervivencia, ya que alguna de las dos partes puede debilitar o matar al árbol injertado; pocos

### Graft growth and needle development

The genotypes used as scions had a significant effect ( $P < 0.0001$ ) on the initial growth response for length and diameter (Table 2). The greatest growth in graft length was observed with scions of genotype G105 (26 cm) with a difference of 9.9, 5.3 and 5.5 cm compared to G106, G114 and G115, while G115 (2.0 mm) and G105 (1.8 mm) favored the greatest growth in diameter (Table 3).

The scions of the genotypes evaluated expressed their initial growth potential because they were collected and grafted in early spring, when the main shoot elongation occurs in actively growing pines (Guadaño et al., 2016) (Figure 1a). Each genotype may have different ability to be propagated by grafting. Genotype influences variations in both reproductive phenology and morphological characteristics among clones due to genetic diversity among individuals of the same species (Sivacioglu, Ayan, & Celik, 2009). Han et al. (2019) found that scion genotype caused strong effect on proline concentration in graft roots in *Populus*. Meanwhile, Sivacioglu et al. (2009) found genotype effect on the growth of several *Pinus sylvestris* L. clones from an asexual seed orchard.

The grafted scions that developed needles more rapidly, at two months, were the scions of G115 (80.9 %), G114 (69.7 %) and G105 (69.2 %) with significant differences ( $P = 0.0002$ ) with G106 (40.6 %). These three genotypes also had the highest values in length and diameter growth (Table 3). This can be attributed to the fact that plants grafted with these scion genotypes, by developing faster, reactivated growth favoring photosynthesis and carbohydrate production (Barrera-Ramírez et al., 2020). This speed of response is important in lateral grafting, since the aboveground part of the rootstock is pruned gradually and at the end only the needles that the grafted scion has managed to develop remain (Muñoz et al., 2013).

### Effect of rootstock family

#### Grafting

The statistical difference was not significant ( $P = 0.4684$ ) among the four rootstock families (Table 2), even though there is a 10 % difference between the highest and lowest grafting success (Table 3), which may be associated with the sample size and may need to be increased in subsequent tests. In addition, it should be considered that there is genetic variability in the species and each family is composed of half-siblings, where each plant is a different genotype. The high percentage of grafting among the rootstock

estudios han puesto atención en el impacto de la púa sobre el patrón (Han, Guo, Korpelainen, Niinemets, & Li, 2019). Tandonnet et al. (2010) determinaron que el vigor de la raíz es conferido por la púa injertada, ya que el genotipo de púa indujo necrosis en las raíces del portainjerto. En el presente estudio, el G115 y G114, después del prendimiento, pudieron haber asimilado eficientemente los recursos proporcionados por el patrón y viceversa, ya que la capacidad de interacción determina el éxito del injerto (Goldschmidt, 2014).

### Crecimiento del injerto y desarrollo de acículas

Los genotipos utilizados como púas tuvieron efecto significativo ( $P < 0.0001$ ) en la respuesta del crecimiento inicial en longitud y diámetro (Cuadro 2). El mayor crecimiento en longitud del injerto se observó con púas del genotipo G105 (26 cm) con diferencia de 9.9, 5.3 y 5.5 cm con respecto al G106, G114 y G115; mientras que el G115 (2.0 mm) y el G105 (1.8 mm) favorecieron los mayores crecimientos en diámetro (Cuadro 3).

Las púas de los genotipos evaluados expresaron su potencial de crecimiento inicial debido a que se colectaron e injertaron a inicios de primavera, cuando ocurre el principal alargamiento del brote en pinos con crecimiento activo (Guadaño et al., 2016) (Figura 1a). Cada genotipo puede tener diferente capacidad de ser propagado por injerto. El genotipo influye en variaciones tanto en la fenología reproductiva como en las características morfológicas entre clones, debido a la diversidad genética entre individuos de la misma especie (Sivacioglu, Ayan, & Celik, 2009). Han et al. (2019) demostraron que el genotipo de la púa causó fuerte efecto sobre la concentración de prolina en las raíces de injertos en *Populus*. Por su parte, Sivacioglu et al. (2009) encontraron efecto del genotipo sobre el crecimiento de varios clones de *Pinus sylvestris* L. de un huerto semillero asexual.

Los injertos prendidos que desarrollaron acículas más rápidamente, a los dos meses, fueron las púas del G115 (80.9 %), G114 (69.7 %) y G105 (69.2 %) presentando diferencias significativas ( $P = 0.0002$ ) con el G106 (40.6 %). Esos tres genotipos también presentaron los valores más altos en crecimiento de longitud y diámetro (Cuadro 3). Lo anterior se puede atribuir a que las plantas injertadas con estos genotipos de púas, al desarrollarse más rápido, reactivaron el crecimiento favoreciendo la fotosíntesis y producción de carbohidratos (Barrera-Ramírez et al., 2020). Esta velocidad de respuesta es de gran relevancia en injertos laterales, ya que la parte aérea del patrón se poda paulatinamente y al final solo quedan las acículas que la púa injertada haya logrado desarrollar (Muñoz et al., 2013).

families (between 70 and 80 %) could also be related to the quality of the rootstock plant, since the seed of each family comes from superior trees: F105 and F106 (progeny trial) and F114 and F115 (purified sexual seed orchard). In this sense, the genotypes were crossed with other superior trees in the trial or orchard and as a product of genetic recombination may have generated higher quality seed (Muñoz-Gutiérrez et al., 2017); furthermore, the phytosanitary and nutritional status of the genotypes was adequate at the time of grafting.

### Survival

F105 showed the highest average value (65 %) with significant differences ( $P < 0.0001$ ) of 8.7, 18.7 and 32.5 % with F106, F114 and F115, respectively (Table 3). During the first two months after grafting, only the grafted scion died and the rootstock remained alive, indicating that tissue union was not achieved during grafting. The highest mortality occurred in the period from month 2-12 and varied for each family, decreasing 15, 13.7, 25 and 45 % in F105, F106, F114 and F115, respectively (Figure 2b). In this period, mortality occurred in the whole plant and could have been caused by phytosanitary problems related to some fungus or group of phytopathogenic fungi or by physiological, genetic or mechanical incompatibility of the tissues between the scion and the rootstock. In this period, plant mortality occurred in the whole plant and could have been caused by phytosanitary problems related to fungi or groups of phytopathogenic fungi or by physiological, genetic or mechanical incompatibility of the tissues between scion and rootstock. Perhaps the better performance of F105 could be more related to a greater tolerance to the problems that caused mortality in the other three families evaluated. Martínez-Ballesta, Alcaraz-López, Muries, Mota-Cadenas, and Carvajal (2010) suggested that improper formation of scion-pattern healing callus can also affect the flow of nutrients and water from the root to the aboveground part, and photosynthates in the opposite direction, eventually leading to death of the entire plant. In South Africa, Ford et al. (2014) reported root damage of *P. patula* by seed and cutting propagation, and detected that it is susceptible to *Fusarium circinatum*, which reduced nursery survival by up to 32 %.

Grafting has been widely used in other areas to increase productivity and improve resistance to diseases and abiotic stresses, therefore, scion grafting should be considered on rootstocks with high resistance to phytosanitary problems in roots (Han et al., 2019). In this regard, the F105 rootstock family could be used for rootstock production in future grafting studies;

### Efecto de la familia del patrón

#### Prendimiento

La diferencia estadística no fue significativa ( $P = 0.4684$ ) entre las cuatro familias de patrón (Cuadro 2), a pesar de que hay 10 % de diferencia entre el prendimiento mayor y el menor (Cuadro 3), lo cual puede estar asociado al tamaño de muestra y quizá haya que aumentarla en pruebas siguientes. Además, se debe considerar que hay variabilidad genética en la especie y cada familia está integrada de medios hermanos, donde cada planta es un genotipo diferente. El porcentaje alto de prendimiento entre las familias de patrón (entre 70 y 80 %) también pudiera relacionarse con la calidad de la planta patrón, ya que la semilla de cada familia proviene de árboles superiores: F105 y F106 (ensayo de progenie) y F114 y F115 (huerto semillero sexual depurado). En este sentido, los genotipos se cruzaron con otros árboles superiores del ensayo o del huerto y como producto de la recombinación genética pudo haberse generado semilla de mayor calidad (Muñoz-Gutiérrez et al., 2017); además, el estado fitosanitario y nutricional de los genotipos era bueno al momento de injertar.

#### Supervivencia

La F105 mostró el valor promedio más alto (65 %) con diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) de 8.7, 18.7 y 32.5 % con la F106, F114 y F115, respectivamente (Cuadro 3). Durante los dos primeros meses después del injertado solo murió la púa injertada y el patrón continuó vivo, lo cual indica que durante el prendimiento no se logró la unión de los tejidos. La mayor mortalidad se presentó en el periodo del mes 2-12 y varió respecto a cada familia, disminuyendo 15, 13.7, 25 y 45 % en la F105, F106, F114 y F115, respectivamente (Figura 2b). En este periodo, la mortalidad ocurrió en la planta completa y pudo haber sido causada por problemas fitosanitarios relacionados con algún hongo o grupo de hongos fitopatógenos o por incompatibilidad fisiológica, genética o mecánica de los tejidos entre la púa y el patrón. Quizá el mejor desempeño de la F105 pudo estar más relacionado con una mayor tolerancia a los problemas que causaron la mortalidad en las otras tres familias evaluadas. Martínez-Ballesta, Alcaraz-López, Muries, Mota-Cadenas, y Carvajal (2010) indicaron que la formación incorrecta de callo de cicatrización púa-patrón también puede afectar el flujo de nutrimentos y agua de la raíz a la parte aérea, y los fotosintatos en dirección opuesta, llegando a provocar la muerte de la planta completa. En Sudáfrica, Ford et al. (2014) reportaron daños en las raíces de *P. patula* mediante propagación por semilla y estacas, y detectaron que es susceptible a *Fusarium circinatum*, lo cual redujo la supervivencia en vivero hasta 32 %.



however, it is necessary to continue with trials to identify the best *P. patula* families for this purpose. Furthermore, variation within rootstock families should be considered because they originate from seed; this heterogeneity may affect the rootstock performance at the family level (Izhaki et al., 2018).

Differences found in rootstock families suggest that rootstocks may vary in functionality; for example, in their ability to capture soil resources and transport them to the scion or in root system architecture, behavior and interaction with the rhizosphere (Gautier et al., 2019).

### **Graft growth and needle development**

The ANOVA showed no difference in the effect of rootstock family on length growth ( $P = 0.3274$ ), but only in diameter ( $P = 0.0201$ ; Table 2). This homogeneity in graft height could favor their management in the seed orchards. F105 (1.9 mm) showed a difference in diameter growth compared to F114 (1.3 mm; Table 3), so the use of rootstocks from half-sib families, originated from seed, may produce growth variability. Clonal rootstocks decrease variability, but *P. patula* has no efficient protocol to produce them (Izhaki et al., 2018).

The genotype\*pattern interaction had no significant effect on growth ( $P > 0.05$ ); however, G105 had the highest growth in diameter when grafted onto the same F105 progeny (2.1 mm). This may be related to the vigor of this particular family and not to genetic affinity, because it was the best in all cases for this variable: G106 + F105 (1.6 mm), G114 + F105 (1.6 mm) and G115 + F105 (2.2 mm).

Needle development was assessed at two months to detect how fast these structures develop. At five months, all grafts had developed needles. The rootstock family F106 favored the formation of needles more rapidly (81.9 %) and had differences with F114 and F115 of 25.7 and 23.9 %, respectively (Table 3). Perhaps the response of F106 is related to a rapid vascular connection between the graft parts allowing the flow of water and nutrients to the scion to restart needle development (Hartmann et al., 2014). The faster the needles appear, the faster photosynthesis and production of carbohydrates required by the grafted plant is expected to start, favoring the reactivation of its growth (Barrera-Ramírez et al., 2020). The formation of needles in *P. pseudostrobus* was observed after 45 days of age (Barrera-Ramírez et al., 2020). Martínez-Ballesta et al. (2010) mention that the physiological implications of the connection between scion and rootstock on leaf area, morphology, growth, biomass and photosynthesis in grafts are poorly documented.

Los injertos han sido utilizados ampliamente en otras áreas para incrementar la productividad y mejorar la resistencia a enfermedades y estrés abiótico, por ello, se debe considerar el injerto de púas en patrones con resistencia alta a problemas fitosanitarios en las raíces (Han et al., 2019). En este sentido, la familia de patrón F105 podría utilizarse para producción de planta patrón en estudios futuros de injerto; sin embargo, es necesario continuar con ensayos para identificar las mejores familias de *P. patula* para este fin. Asimismo, se debe considerar la variación dentro de familias de portainjertos por ser originadas a partir de semilla; tal heterogeneidad puede influir en el desempeño del patrón a nivel de familia (Izhaki et al., 2018).

Las diferencias encontradas en las familias del patrón sugieren que los portainjertos pueden variar en su funcionalidad; por ejemplo, en su capacidad para capturar recursos del suelo y transportarlos a la púa o en la arquitectura del sistema de raíces, funcionamiento e interacción con la rizosfera (Gautier et al., 2019).

### **Crecimiento del injerto y desarrollo de acículas**

El análisis de varianza no mostró diferencias por efecto de la familia de patrón sobre el crecimiento en longitud ( $P = 0.3274$ ), solamente en diámetro ( $P = 0.0201$ ; Cuadro 2). Esta homogeneidad en la altura de los injertos pudiera favorecer su manejo en los huertos semilleros. La F105 (1.9 mm) presentó diferencia en el crecimiento en diámetro con la F114 (1.3 mm; Cuadro 3), por lo que el uso de portainjertos de familias de medios hermanos, originadas a partir de semilla, puede producir variabilidad en el crecimiento. Los patrones clonales disminuyen la variabilidad, pero en *P. patula* no se tiene un protocolo eficiente para producirlos (Izhaki et al., 2018).

La interacción genotipo\*patrón no tuvo efecto significativo en el crecimiento ( $P > 0.05$ ); sin embargo, el G105 tuvo el mayor crecimiento en diámetro al injertarse en su misma progenie F105 (2.1 mm). Tal afinidad puede estar relacionada con el vigor de esta familia en particular y no por afinidad genética, ya que fue la mejor en todos casos para esta variable: G106 + F105 (1.6 mm), G114 + F105 (1.6 mm) y G115 + F105 (2.2 mm).

El desarrollo de acículas se evaluó a los dos meses para detectar la rapidez con la que se generan estas estructuras. A los cinco meses, todos los injertos las habían desarrollado. La familia de patrón F106 favoreció más rápidamente la formación de acículas (81.9 %) y tuvo diferencias con la F114 y F115 de 25.7 y 23.9 %, respectivamente (Cuadro 3). Quizá la respuesta de la F106 esté relacionada con una rápida conexión vascular entre las partes del injerto permitiendo el flujo de agua y nutrientes a la púa para reanudar el desarrollo de acículas (Hartmann et al., 2014). Mientras más rápido

### The interaction of factors on survival

The effect of scion genotype on graft survival in *P. patula* is influenced by the rootstock family. The best combinations for each of the four scion genotypes were G115 + F114 (85 %), G114 + F105 (80 %), G106 + F105 (60 %) and G105 + F106 (60 %) (Table 4). In this regard, Kita et al. (2018) evaluated grafts of *L. gmelinii* and concluded that each scion genotype had higher survival being grafted on an unrelated rootstock family and not on its same progeny as expected.

Although each scion genotype has affinity for a particular rootstock family (Table 4), F105 was more stable (first or second highest value) in survival. This family showed characteristics that favored graft viability over time, so it could be considered as a rootstock in future grafting trials. Kita et al. (2018) indicate that with an appropriate rootstock a tree can be obtained showing the best qualities of both genetic entities (scion-rootstock) and Lewsey et al. (2016) suggest considering the epigenetic basis for the interaction that occurs between the parts that integrate the graft. In contrast, F115 was the least favorable, because when grafted with G105 and G106, all grafts died after 12 months (Table 4); therefore, the use of this family as rootstock is not a guarantee for survival.

There is no information in *P. patula* on important families that can be used as rootstocks, despite their importance for grafting success, survival and vigor (Barrera-Ramírez et al., 2020). In fact, scion donor trees in *P. patula* have been selected according to their timber characteristics, but not for their physiological response to grafting.

aparezcan las acículas se espera que la fotosíntesis y producción de carbohidratos requeridos por la planta injertada inicien, favoreciendo la reactivación de su crecimiento (Barrera-Ramírez et al., 2020). En *P. pseudostrobus* la formación de acículas se observó desde los 45 días (Barrera-Ramírez et al., 2020). Martínez-Ballesta et al. (2010) mencionan que las implicaciones fisiológicas de la conexión entre la púa y el patrón sobre el área foliar, morfología, crecimiento, biomasa y fotosíntesis en injertos están poco documentadas.

### Interacción de los factores en la supervivencia

El efecto del genotipo de púa en la supervivencia del injerto en *P. patula* está influenciado por la familia de patrón. Las mejores combinaciones para cada uno de los cuatro genotipos de púa fueron: G115 + F114 (85 %), G114 + F105 (80 %), G106 + F105 (60 %) y G105 + F106 (60 %) (Cuadro 4). Al respecto, Kita et al. (2018) evaluaron injertos de *L. gmelinii* y concluyeron que cada genotipo de púa presentó mayor supervivencia siendo injertado en una familia de patrón no emparentada y no en su misma progenie como se esperaba.

Aunque cada genotipo de púa tenga afinidad por una familia de patrón en particular (Cuadro 4), la F105 fue más estable (primer o segundo valor más alto) en la supervivencia. Esta familia presentó características que favorecen la viabilidad del injerto a través del tiempo, por lo que pudiera considerarse como patrón en pruebas futuras de injerto. Kita et al. (2018) indican que con un portainjerto apropiado se puede obtener un árbol que exhiba las mejores cualidades de ambas entidades genéticas (púa-patrón) y Lewsey et al. (2016) sugieren considerar la base epigenética por la

**Table 4. Interaction between scion genotype and rootstock family on *Pinus patula* graft survival at 12 months.**

**Cuadro 4. Interacción entre el genotipo de púa y la familia del patrón sobre la supervivencia del injerto de *Pinus patula* a los 12 meses.**

Scion genotype/ Genotipo de púa	Rootstock family/ Familia de patrón	Survival (%)/ Supervivencia (%)	Scion genotype/ Genotipo de púa	Rootstock family/ Familia del patrón	Survival (%)/ Supervivencia (%)
G105	F105	45 ± 5.0	G114	F105	80 ± 8.2
G105	F106	60 ± 14.1	G114	F106	60 ± 14.1
G105	F114	25 ± 5.0	G114	F114	55 ± 5.0
G105	F115	00 ± 0.0	G114	F115	70 ± 5.8
G106	F105	60 ± 8.2	G115	F105	75 ± 5.0
G106	F106	30 ± 5.8	G115	F106	75 ± 15.0
G106	F114	20 ± 8.2	G115	F114	85 ± 15.0
G106	F115	00 ± 0.0	G115	F115	60 ± 8.2

Mean values ± standard error.

Valores medios ± error estándar.

## Conclusions

*P. patula* graft compatibility varied according to the combination between genotype and family. Grafting with genotype G115, in combination with any family, was the most successful; similarly, grafting with family F105 in combination with any genotype was the most successful. On the other hand, scions and rootstocks of the same genotype or family were not a guarantee of graft compatibility. These results indicate that the detection and selection of good families such as F105 for rootstock production would ensure greater graft compatibility with any genotype to be cloned. This would increase the production of grafted plants with high genetic gain required in asexual seed orchards of *P. patula*.

## Acknowledgments

The first author thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted for his doctoral studies, and to the Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica, through the project CONAFOR-2017-2-291322 "Establishment of regional asexual seed orchards and *Pinus* progeny trials for the genetic evaluation of tree progenitors".

*End of English version*

## References / Referencias

- Aparicio-Rentería, A., Viveros-Viveros, H., Rebolledo-Camacho, V. (2013). Huertos semilleros clonales: Una alternativa para los programas de reforestación en Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4(20), 90–97. doi: 10.29298/rmcf.v4i20.373
- Barrera-Ramírez, R., Vargas-Hernández, J. J., López-Aguillón, R., Muñoz-Flores, H. J., Treviño-Garza, E. J., & Aguirre-Calderón, O. A. (2020). Influencia de factores externos e internos en el prendimiento inicial de injertos de *Pinus pseudostrobus* var. *oaxacana* (Mirov) Harrison. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 27(2), 243–456. doi: 10.5154/r.rchscfa.2020.05.037
- Darikova, J. A., Savva, Y. V., Vaganov, E. A., Grachev, A. M., & Kuznetsova, G. V. (2011). Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock (a review). *Journal of Siberian Federal University (Biology)*, 1(4), 54–63. Retrieved from <http://journal.sfu-kras.ru/en/article/2376>
- Flores García, A., Morales González, E., Muñoz Flores, H., Prieto Ruiz, J., & Pineda Ojeda, T. (2013). *Técnicas de injertado "enchapado lateral" y "fisura terminal" en Pinus pseudostrobus Lindl.* México: INIFAP.
- Ford, M. C., Jones, B. N., & Chirwa, W. P. (2014). *Pinus patula* and pine hybrid hedge productivity in South Africa: a comparison

interacción que se da entre las partes que integran al injerto. En contraste, la F115 fue la menos favorable, ya que al combinarse con el G105 y G106, todos los injertos murieron a los 12 meses (Cuadro 4); por lo tanto, el uso de esta familia como patrón no garantiza la supervivencia.

No existe información en *P. patula* de familias sobresalientes que puedan ser utilizadas como patrón, pese a su importancia sobre el prendimiento, supervivencia y vigor del injerto (Barrera-Ramírez et al., 2020). Incluso, los árboles donadores de púas en *P. patula* han sido seleccionados por sus características maderables, pero no por su respuesta fisiológica al ser injertados.

## Conclusiones

La compatibilidad del injerto de *P. patula* varió según la combinación entre genotipo y familia. Los injertos realizados con el genotipo G115, en combinación con cualquier familia, fueron los más exitosos; de manera similar sucedió con la familia F105 en combinación con cualquier genotipo. Por otro lado, las púas y patrones del mismo genotipo o familia no garantizaron la compatibilidad de los injertos. Estos resultados indican que la detección y selección de buenas familias como la F105 para la producción de planta patrón, aseguraría mayor compatibilidad del injerto con cualquier genotipo que se desee clonar. Esto incrementaría la producción de planta injertada con alta ganancia genética requerida en los huertos semilleros asexuales de *P. patula*.

## Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar sus estudios de Doctorado, así como al Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, CONAFOR-CONACYT, a través del proyecto CONAFOR-2017-2-291322 "Establecimiento de huertos semilleros asexuales regionales y ensayos de progenie de *Pinus patula* para la valoración genética de los progenitores".

*Fin de la versión en español*



- between two vegetative propagation systems exposed to natural infection by *Fusarium circinatum*. *Southern Forests*, 76(3) 167–175. doi: 10.2989/20702620.2014.916501
- Gautier, A. T., Chambaud, C., Brocard, L., Ollat, N., Gambetta, G. A., Delrot, S., & Cookson, S. J. (2019). Merging genotypes: graft union formation and scion-rootstock interactions. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 747–755. doi: 10.1093/jxb/ery422
- Goldschmidt, E. E. (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–9. doi: 10.3389/fpls.2014.00727
- González-Jiménez, B., Jiménez-Casas, M., López-Upton, J., López-López, M. Á., Rodríguez-Laguna, R. (2022). Combinación de técnicas de injertación para clonar genotipos superiores de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. *Agrociencia*, 56(5), 105–117. doi: 10.47163/agrociencia.v56i5.2582
- Guadaño, C., Iglesias, S., Leon, D., Arribas, S., Gordo, J., Gil, L., ... Mutke, S. (2016). *Establecimiento de plantaciones clonales de Pinus pinea para la producción de piñón mediterráneo*. España: INIA. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/310287648>
- Han, Q., Guo, Q., Korpelainen, H., Niinemets, Ü., & Li, C. (2019). Rootstock determines the drought resistance of poplar grafting combinations. *Tree Physiology*, 39(11), 1855–1866. doi: 10.1093/treephys/tpz102
- Hartmann, T. H., Kester, E. D., Davies Jr., T. F., & Geneve, L. R. (2014). *Plant propagation principles and practices* (8th ed.). USA: Pearson.
- Izhaki, A., Yitzhak, Y., Blau, T., David, I., Rotbaum, A., Rivov, J., & Zilkah, S. (2018). Rooting of cuttings of selected *Diospyros virginiana* clonal rootstocks and bud growth in rooted cuttings. *Scientia Horticulturae*, 232, 13–21. doi: 10.1016/j.scienta.2017.12.051
- Kita, K., Kon, H., Ishizuka, W., Agathokleous, E., & Kuromaru, M. (2018). Survival rate and shoot growth of grafted Dahurian larch (*Larix gmelinii* var. *japonica*): a comparison between Japanese larch (*L. kaempferi*) and F1 hybrid larch (*L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi*) rootstocks. *Silvae Genetica*, 67(1), 111–116. doi: 10.2478/sg-2018-0016
- Lewsey, G. M., Hardcastle, J., T., Melnyk, W. C., Molnar, A., Valli, A., Urich, A. M., ...Ecker, R. J. (2016). Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(6), E801–E810. doi: 10.1073/pnas.1515072113
- Martínez-Ballesta, M. C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., & Carvajal, M. (2010). Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 112–118. doi: 10.1016/j.scienta.2010.08.002
- Medina Perez, A. M., White, T. L., Huber, D. A., & Martin, T. A. (2007). Graft survival and promotion of female and male strobili by topgrafting in a third-cycle slash pine (*Pinus elliotii* var. *elliottii*) breeding program. *Canadian Journal of Forest Research*, 37(7), 1244–1252. doi: 10.1139/X07-004
- Muñoz-Gutiérrez, L., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., Ramírez-Herrera, C., Jiménez-Casas, M., Alderete, A., & Díaz-Ruiz, R. (2017). Variación espacial y temporal de la dispersión de polen de un huerto semillero y en rodales naturales cercanos de *Pinus patula*. *Bosque*, 38(1), 169–181. doi: 10.4067/S0717-92002017000100017
- Pérez-Luna, A., Prieto-Ruiz, J. Á., López-Upton, J., Carrillo-Parra, A., Wehenkel, C., Chávez-Simental, J. A., & Hernández-Díaz, J. C. (2019). Some factors involved in the success of side veneer grafting of *Pinus engelmannii* Carr. *Forests*, 10(2), 1–18. doi: 10.3390/f10020112
- Pérez-Luna, A., Wehenkel, C., Prieto-Ruiz, J. A., López-Upton, J., Solís-González, S., Chávez-Simental, J. A., & Hernández-Díaz, J. C. (2020). Grafting in conifers: a review. *Pakistan Journal of Botany*, 52(4), 1–10. doi: 10.30848/PJB2020-4(10)
- Pina, A., Cookson, S. J., Calatayud, A., Trinchera, A., & Errea, P. (2017). Physiological and molecular mechanisms underlying graft compatibility. In G. Colla, F. Pérez-Alfocea, & D. Schwarz (Eds.), *Vegetable grafting: principles and practices* (pp. 132–154). Croydon, London, UK: CABI. doi: 10.1079/9781780648972.0000
- Sivacioglu, A., Ayan, S., & Celik, A. D. (2009). Clonal variation in growth, flowering and cone production in a seed orchard of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 8(17), 4084–4093. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/62133>
- Solorio-Barragán, E. R., Delgado-Valerio, P., Molina-Sánchez, A., Rebollo-Camacho, V., & Tafolla-Martínez, M. A. (2021). Injerto interespecífico como alternativa para la propagación asexual de *Pinus rzedowskii* Madrigal & Caball. Del. en riesgo de extinción. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 27(2), 277–288. doi: 10.5154/rchscfa.2020.06.046
- Statistical Analysis System (SAS), (2013). The SAS system for Windows version 9.4. Cary, North Carolina, USA: Author
- Tandonnet, J. P., Cookson, S. J., Vivin, P., & Ollat, N. (2010). Scion genotype controls biomass allocation and root development in grafted grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(2), 290–300. doi: 10.1111/j.1755-0238.2009.00090.x
- Vargas-Hernández, J. J., & Vargas-Abonce, J. I. (2016). Effect of giberellic acid (GA4/7) and partial stem girdling on induction of reproductive structures in *Pinus patula*. *Forest Systems*, 25(2), 1–11. doi: 10.5424/fs/2016252-09254
- Warschefsky, J. E., Klein, L. L., Frank, H. M., Chitwood, H. D., Londo, P. J., von Wettberg, J. B. E., & Miller, J. A. (2016). Rootstocks: diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes. *Trends in Plant Science*, 21(5), 418–437. doi: 10.1016/j.tplants.2015.11.008
- Wendling, I., Trueman, S. J., & Xavier, A. (2014). Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests*, 45(4), 473–486. doi: 10.1007/s11056-014-9415-y
- White, T. L., Duryea, M. L., & Powell, G. L. (2018). Genetically improved pines for reforesting Florida's timberlands. *EDIS*, 2018(1), 6. doi: 10.32473/edis-fr007-2017

