

Growth of *Pinus arizonica* Engelm. plants inoculated with *Pisolithus tinctorius* and *Astraeus hygrometricus* under greenhouse conditions

Crecimiento de plantas de *Pinus arizonica* Engelm. inoculadas con *Pisolithus tinctorius* y *Astraeus hygrometricus* en invernadero

Mirolava Quiñónez-Martínez^{1*}; Liliana de J. Gómez-Flores¹; Fortunato Garza-Ocañas²; José Valero-Galván¹; Jesús A. Nájera-Medellín¹

¹Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Av. Benjamín Franklin núm. 4650, zona PRONAF. C. P. 32310. Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Forestales. Carretera Nacional km 145. Linares, Nuevo León, México.

*Corresponding author: mquinone@uacj.mx; tel.: +52 656 176 4459.

Abstract

Introduction: Ectomycorrhizal associations are an essential component of nutrient cycling and forest health.

Objective: To evaluate the effects of spore inoculation of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch and *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan on *Pinus arizonica* Engelm. growth.

Materials and methods: Three mycorrhizal inoculation treatments (*A. hygrometricus*, *P. tinctorius* and Ectorrize[®]) were applied with three volumes (10, 25 and 50 mL: 10⁶ spores·mL⁻¹) and a control group with no inoculum. The variables measured were mycorrhizal survival and colonization; plant height; shoot length and diameter; root length and biomass. The ectomycorrhizas were characterized and a mineral analysis of nutritional elements in the shoot and root was performed. The effects of fungal species and inoculum volume were determined by randomized ANOVA ($\alpha = 0.05$).

Results and discussion: The volume of this inoculum had no significant effect ($P > 0.05$) on the variables, but there were differences between the fungal species and the control ($P > 0.05$); with *P. tinctorius* having the greatest significant effect. Inoculated plants had higher survival rate and higher amount of minerals in the composition compared to non-inoculated plants ($P > 0.05$). The ectomycorrhizas showed clear morphological differences; the Hartig net was observed as an indicator.

Conclusion: Inoculation with the ectomycorrhizal fungi improved the morphological development of *P. arizonica*. The smallest inoculum dose (10 mL: 10⁶ spores·mL⁻¹) is recommended, mainly of the fungus *P. tinctorius*.

Keywords: ectomycorrhizae; mineral analysis; symbiosis; Ectorrize; mycorrhizal system.

Resumen

Introducción: Las asociaciones ectomicorrícicas son un componente esencial para el ciclo de nutrientes y la salud del bosque.

Objetivo: Evaluar los efectos de la inoculación de esporas de los hongos ectomicorrícicos *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch y *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan sobre el crecimiento de *Pinus arizonica* Engelm.

Materiales y métodos: Se aplicaron tres tratamientos de inoculación fúngica (*A. hygrometricus*, *P. tinctorius* y Ectorrize[®]) con tres volúmenes (10, 25 y 50 mL: 10⁶ esporas·mL⁻¹) y un grupo control sin inóculo. Las variables medidas fueron supervivencia y colonización micorrícica; altura de la planta; longitud y diámetro del follaje; longitud de la raíz y biomasa. Las ectomicorrizas se caracterizaron y se hizo un análisis mineral de elementos nutricionales en el sistema aéreo y radicular. Los efectos de las especies fúngicas y el volumen del inóculo se determinaron mediante un ANOVA aleatorizado ($\alpha = 0.05$).

Resultados y discusión: El volumen de inoculante no tuvo efecto significativo ($P > 0.05$) sobre las variables, pero sí hubo diferencias entre la especie fúngica y el control ($P \leq 0.05$); siendo *P. tinctorius* el de mayor efecto significativo. Las plantas inoculadas tuvieron mayor tasa de supervivencia y mayor cantidad de minerales en la composición en comparación con las no inoculadas ($P \leq 0.05$). Las ectomicorrizas mostraron claras diferencias morfológicas; se observó la red de Hartig como indicador.

Conclusión: La inoculación con los hongos ectomicorrícicos causó mejoras en el desarrollo morfológico de *P. arizonica*. Se recomienda la dosis más pequeña de inóculo (10 mL: 10⁶ esporas·mL⁻¹), principalmente del hongo *P. tinctorius*.

Palabras clave: ectomicorrizas; análisis mineral; simbiosis; Ectorrize; sistema micorrícico.

Please cite this article as follows (APA 7): Mirolava Quiñónez-Martínez^{1*}; Gómez-Flores, L. J., Garza-Ocañas, F., Valero-Galván, J., & Nájera-Medellín, J. A. (2023) Growth of *Pinus arizonica* Engelm. plants inoculated with *Pisolithus tinctorius* and *Astraeus hygrometricus* under greenhouse conditions. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 29(2), 99-118. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2022.08.053>



Introduction

Most temperate forest trees form symbiotic mutualistic associations with diverse ectomycorrhizal fungi (EMF) (Marqués-Gálvez et al., 2022). The plant supplies carbon and energy to the fungal partner; at the same time, the fungal partner provides mineral nutrients that are difficult for the plant to assimilate, especially nitrogen and phosphorus (Ortega, 2015). Likewise, the associated fungus provides other benefits, such as increased tolerance to environmental stress, improved photosynthetic rate, osmotic resistance to pests and stimulation of growth regulating substances (Frank & García, 2021).

Inadequate forest reduction and management decreases or eliminates the mycorrhizal inoculum naturally found on the ground, resulting in a lower survival rate for fungal species and trees (Prado-Tarango et al., 2021). As an alternative to preserving fungal inoculum, measures have been taken to ensure the presence of EMF mycelium in plant roots. These include transporting large quantities of forest soil to the site where the seedlings are grown, but this practice is unsustainable (Sáenz-Romero, 2014). Another option is to grow EMF *in vitro* and perform mycorrhizal synthesis at the laboratory, greenhouses or field using aseptically germinated plants; however, it is necessary to determine the appropriate growth conditions, the fungal species to be used, as well as the cultivation techniques and the optimal amount of inoculum (Pérez-López et al., 2021; Walker & Jones, 2013).

Pinus arizonica Engelm. is one of the most commercially important pines in the state of Chihuahua, due to the quality of its wood, which has been affected by timber industry activities, forest fires, and agricultural clearing (Morales-Nieto et al., 2021; Silva-Flores et al., 2014). Despite their importance, no studies have been carried out to study the native fungal associates of *P. arizonica* in the Sierra Madre Occidental in Chihuahua; furthermore, no studies have reported the effects EMF may have on the growth of the species when inoculated *in vitro* or as spore suspension under greenhouse conditions. Therefore, the objective of this study was to evaluate the morphometric response of *P. arizonica* plants inoculated with spore preparations of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch and *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan. These EMF can live in poor soils with high acidity and withstand periods of drought stress (Sebastiana et al., 2020). The results of this research may be useful to improve the success of *P. arizonica* plants when established in the field during reforestation programs.

Introducción

La mayoría de los árboles de bosques templados forman asociaciones mutualistas simbióticas con diversos hongos ectomicorrícicos (HEM) (Marqués-Gálvez et al., 2022). La planta suministra carbono y energía al socio fúngico; al mismo tiempo, este aporta nutrientes minerales que son difíciles de asimilar por la planta, especialmente nitrógeno y fósforo (Ortega, 2015). Asimismo, el hongo asociado proporciona otros beneficios, como una mayor tolerancia al estrés ambiental, mejora en la tasa fotosintética, resistencia osmótica a plagas y estimulación de sustancias reguladoras del crecimiento (Frank & García, 2021).

La reducción y manejo inadecuado de los bosques disminuye o elimina el inóculo micorrícico que se encuentra naturalmente en el suelo, lo que se traduce en un menor porcentaje de supervivencia para las especies de hongos y árboles (Prado-Tarango et al., 2021). Como alternativa a la preservación del inóculo fúngico se han tomado medidas para asegurar la presencia del micelio de HEM en las raíces de las plantas. Una de ellas es transportar cantidades grandes de suelo forestal al lugar donde las plántulas se cultivan, pero esta práctica resulta insostenible (Sáenz-Romero, 2014). Otra opción es cultivar HEM *in vitro* y realizar síntesis de micorrizas en el laboratorio, invernaderos o campo utilizando plantas germinadas asepticamente; sin embargo, es necesario determinar las condiciones adecuadas de crecimiento, las especies de hongos a utilizar, así como las técnicas de cultivo y la cantidad óptima de inóculo (Pérez-López et al., 2021; Walker & Jones, 2013).

Pinus arizonica Engelm. es uno de los pinos comercialmente más importantes del estado de Chihuahua, debido a la calidad de la madera, la cual ha sido afectada por las actividades de la industria maderera, incendios forestales y desmonte agrícola (Morales-Nieto et al., 2021; Silva-Flores et al., 2014). A pesar de su importancia, no se han realizado estudios para investigar los asociados fúngicos nativos de *P. arizonica* en la Sierra Madre Occidental en Chihuahua; además, ningún estudio ha informado los efectos que los HEM pueden tener en el crecimiento de la especie cuando se inoculan *in vitro* o como suspensión de esporas en condiciones de invernadero. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta morfométrica de plantas de *P. arizonica* inoculadas con preparaciones esporales de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch y *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan. Estos HEM pueden vivir en suelos pobres con acidez alta y soportar periodos de estrés por sequía (Sebastiana et al., 2020). Los resultados de esta investigación pueden

Materials and Methods

Seed preparation

P. arizonica seeds were provided by the Forest Management Unit (UMAFOR) in the village of San Juanito in the municipality of Bocoyna, Chihuahua. Seeds were placed in a container with tap water for 24 h to discard floating seeds that were considered non-viable (Monroy-Vazquez et al., 2017). The remaining seeds at the bottom of the container were placed on moist blotting paper in a sealable plastic bag until germination. Seedbeds (with 77 cavities) were used in the greenhouse and filled with a sterile peat moss substrate. Seeds were placed 0.5 cm deep in the substrate and moistened with deionized water every third day. The plants were maintained in the greenhouse at the Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ) at an average temperature of 26.3 ± 1.06 °C and fertilized with Trifol 60 Plus® 20-20-20 once a month for nine months to ensure growth.

Field sampling of sporomes

P. tinctorius and *A. hygrometricus* sporomes (Figure 1) were harvested in August 2018 during the rainy season in temperate forests located in El Huérfano

ser de utilidad para mejorar el éxito de las plantas de *P. arizonica* cuando se establecen en el campo durante los programas de reforestación.

Materiales y métodos

Preparación de semillas

Las semillas de *P. arizonica* fueron proporcionadas por la Unidad de Manejo Forestal (UMAFOR) del poblado de San Juanito en el municipio de Bocoyna, Chihuahua. Las semillas se colocaron en un recipiente con agua del grifo durante 24 h para desechar las semillas flotantes que se consideraron inviables (Monroy-Vazquez et al., 2017). Las semillas restantes en el fondo del recipiente se colocaron en papel secante húmedo en una bolsa de plástico resellable hasta la germinación. En el invernadero se utilizaron semilleros (con 77 cavidades) que se llenaron con un sustrato estéril de musgo de turba. Las semillas se colocaron a 0.5 cm de profundidad en el sustrato y se humedecieron con agua desionizada cada tercer día. Las plantas se mantuvieron en el invernadero de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ) a una temperatura promedio de 26.3 ± 1.06 °C y se fertilizaron con Trifol 60 Plus® 20-20-20 una vez al mes durante nueve meses, para garantizar el crecimiento.

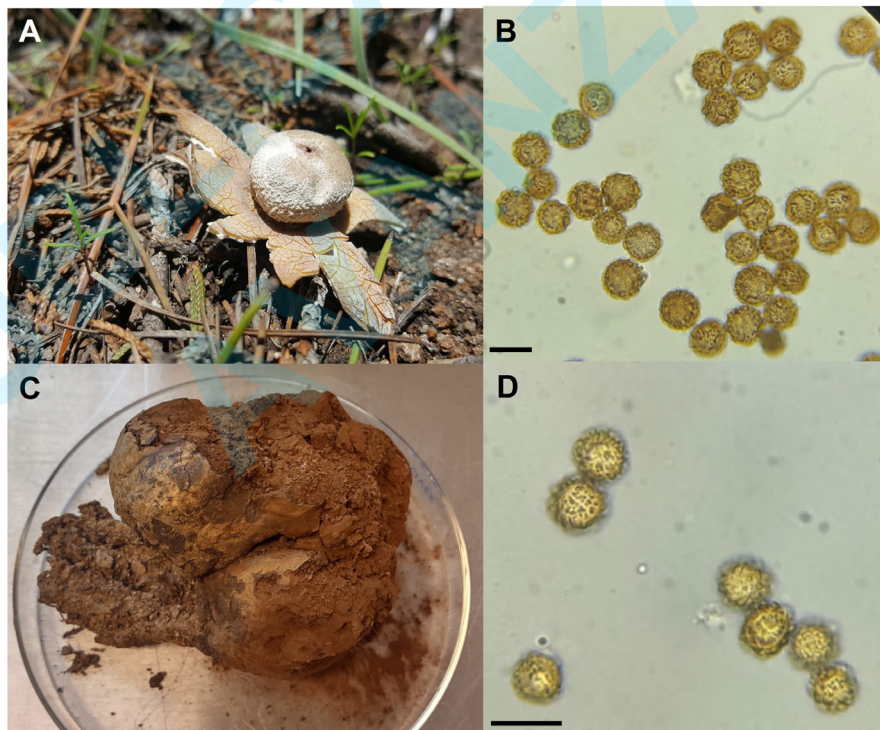


Figure 1. A) *Astraeus hygrometricus* sporomes, B) spores of *A. hygrometricus* (100x), C) sporome of *Pisolithus tinctorius*, D) spores of *P. tinctorius* (100x). Slide with scale at 10 μ m.

Figura 1. A) Esporomas de *Astraeus hygrometricus*, B) esporas de *A. hygrometricus* (100x), C) esporoma de *Pisolithus tinctorius*, D) esporas de *P. tinctorius* (100x). Regleta con escala a 10 μ m.

and San Juanito, Bocoyna, Chihuahua. Samples were taken to the Biodiversity Laboratory at the UACJ for spore extraction.

Preparation of fungal inoculum

A. hygrometricus and *P. tinctorius* sporomes were soaked with distilled water (to avoid possible contamination by bacteria or fungi) at a ratio of 1:50 for 2 h (Aguilar-Ulloa et al., 2016). The sporomes were then placed separately in a conventional blender and liquefied until homogeneous mixture, then sieved (1 mm mesh opening) and placed in glass vials. The inoculum was kept at 4 °C in the dark until use in the greenhouse. The number of spores per species was determined using a Neubauer chamber and the concentration was adjusted to 10^6 spores·mL⁻¹ (Konopická et al., 2021).

Plant inoculation

When pine plants reached an average height of 5 cm, the fungal inoculum was applied to the root system using 10, 25 and 50 mL volumes with 10 mL syringes; the spore inoculum (10^6 spores·mL⁻¹) was applied twice in one month (modified from Yin et al., 2018). Also, the commercial product Ectorrize® was used as a positive control, which contains spores of *P. tinctorius* and soil bacteria; similarly, the number of spores was adjusted to 10^6 spores·mL⁻¹. The negative control consisted only of non-inoculated plants. The number of inoculated plants in each treatment is shown in Table 1. The variability among the number of plants is explained by the fact that from the initial number (n = 40), there were elements below 5 cm in height to start the experiment.

Evaluation of mycorrhizal efficiency

Aboveground plant growth (height, stem and foliage diameter) was measured monthly from the start of inoculation for nine months using a Neiko 01407A

Muestreo de campo de esporomas

Los esporomas de *P. tinctorius* y *A. hygrometricus* (Figura 1) se cosecharon en agosto del 2018 durante la temporada de lluvias en bosques templados ubicados en El Huérfano y en San Juanito, Bocoyna, Chihuahua. Las muestras se llevaron al Laboratorio de Biodiversidad de la UACJ para la extracción de esporas.

Preparación de inóculo fúngico

Los esporomas de *A. hygrometricus* y *P. tinctorius* se remojaron con agua destilada (para evitar posible contaminación por bacterias u hongos) en una proporción de 1:50 durante 2 h (Aguilar-Ulloa et al., 2016). Después, los esporomas se colocaron por separado en una licuadora convencional y se licuaron hasta obtener una mezcla homogénea, que posteriormente se tamizó (abertura de malla de 1 mm) y se colocó en frascos de vidrio. El inóculo se mantuvo a 4 °C en la oscuridad hasta su uso en el invernadero. El número de esporas por especie se determinó mediante una cámara Neubauer y la concentración se ajustó a 10^6 esporas·mL⁻¹ (Konopická et al., 2021).

Inoculación de plantas

Cuando las plantas de pino alcanzaron una altura promedio de 5 cm, el inóculo fúngico se aplicó al sistema radicular utilizando volúmenes de 10, 25 y 50 mL con jeringas de 10 mL; el inóculo de esporas (10^6 esporas·mL⁻¹) se aplicó dos veces en un mes (modificado de Yin et al., 2018). Asimismo, se utilizó el producto comercial Ectorrize® como control positivo, el cual tiene esporas de *P. tinctorius* y bacterias del suelo; del mismo modo, el número de esporas se ajustó a 10^6 esporas·mL⁻¹. El control negativo consistió solo en plantas sin inoculación. El número de plantas inoculadas en cada tratamiento se muestra en el Cuadro 1. La variabilidad entre la cantidad de plantas se debe a que

Table 1. Volume of inoculum (10^6 spores·mL⁻¹) of *Astraeus hygrometricus* and *Pisolithus tinctorius* used on *Pinus arizonica* plants.

Cuadro 1. Volumen de inóculo (10^6 esporas·mL⁻¹) de *Astraeus hygrometricus* y *Pisolithus tinctorius* utilizado en plantas de *Pinus arizonica*.

Species/Especie	Volume of inoculum (mL)/ Volumen de inóculo (mL)	Plants per treatment/ Plantas por tratamiento
<i>A. hygrometricus</i>	10	29
<i>A. hygrometricus</i>	25	28
<i>A. hygrometricus</i>	50	23
<i>P. tinctorius</i>	10	30
<i>P. tinctorius</i>	25	33
<i>P. tinctorius</i>	50	33
Ectorrize®	10	31
Ectorrize®	25	32
Ectorrize®	50	24
Negative control	-	29

digital vernier. Biomass was recorded in fresh weight (g) for the aboveground part (leaves and stem) and root system; biomass in dry weight was measured by muffle drying.

Height measurements, root system diameter and biomass of aboveground part and root system (fresh and dry weight) were determined from a non-replaceable sampling method using five plants per treatment; the root system was washed with abundant tap water to remove the remaining substrate. Mycorrhizal colonization was determined with the equation used by Garza-Ocañas et al. (2018): colonization (%) = (number of mycorrhizal roots/ number of roots observed) * 100.

Characterization of ectomycorrhizae

The root systems of three randomly selected plants, per fungal species, were morphologically characterized nine months after inoculation. The external characteristics of fresh mycorrhizas were observed with the aid of a stereoscopic microscope and described in terms of branching type, root tip morphology, presence of rhizomorphs, mantle color and thickness, and mycorrhizal diameter (Agerer, 1991).

Histological characterization of the mycorrhizas began with a technique of fixing the samples with 1:1:1 formalin, alcohol, and acetic acid; they were then filtered with the aid of a vacuum pump followed by embedding in kerosene. Then, longitudinal and transverse sections of the mycorrhiza of 2 µm were placed on a rotating microtome. Finally, the sections were deparaffinized and stained with Loeffler's methylene blue (1 %) and brilliant green to observe and characterize the morphology of the fungal mantle and Hartig net (Prophet et al., 1995) using an optical microscope at 100x magnification.

Mineral content of the plant

Samples of the shoot and root system of the plants with each treatment were sent to the Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, where a mineral composition analysis was performed to determine the percentages of total nitrogen (Nt), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sodium (Na), as well as the amount in parts per million (ppm) of copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn) and zinc (Zn).

The micro-Kjeldahl technique was used to determine the amount of N, and the triazide digester mixture and the colorimetric vanadate technique for the percentage of P. The digester mixture is based on the extraction of P with the methodology of Tiessen and Moir (1993), and the colorimetric vanadate test is the one suggested

del número inicial (n = 40), existieron elementos que no alcanzaron los 5 cm de altura para iniciar el experimento.

Evaluación de la eficiencia micorrícica

El crecimiento aéreo de las plantas (altura, diámetro del tallo y del follaje) se midió mensualmente a partir del inicio de la inoculación, durante nueve meses, con un vernier digital Neiko 01407A. La biomasa se obtuvo en peso fresco (g) para la parte aérea (hojas y tallo) y sistema radicular; la biomasa en peso seco se obtuvo a través de secado en mufla.

Las medidas de altura, el diámetro del sistema radicular y la biomasa de la parte aérea y el sistema radicular (peso fresco y seco) se determinaron a partir de un método de muestreo no reemplazable utilizando cinco plantas por tratamiento; el sistema radicular se lavó con agua abundante del grifo para eliminar el sustrato restante. La colonización micorrícica se determinó con la ecuación utilizada por Garza-Ocañas et al. (2018): colonización (%) = (número de raíces micorrizadas/ número raíces observadas) * 100.

Caracterización de la ectomicorriza

Los sistemas radiculares de tres plantas seleccionadas al azar, por especie de hongo, se caracterizaron morfológicamente a los nueve meses de la inoculación. Las características externas de las micorrizas frescas se observaron con ayuda de un microscopio estereoscópico y se describieron en términos de tipo de ramificación, morfología de las puntas de las raíces, presencia de rizomorfos, color y grosor del manto, y diámetro de las micorrizas (Agerer, 1991).

La caracterización histológica de las micorrizas comenzó con una técnica de fijación de las muestras con 1:1:1 de formol, alcohol y ácido acético; posteriormente, se filtraron con ayuda de una bomba de vacío seguido de una inclusión en parafina. Después se realizaron cortes longitudinales y transversales de la micorriza de 2 µm en un microtomo de rotación. Por último, los cortes se desparafinaron y se tiñeron con azul de metileno de Loeffler (1 %) y verde brillante para observar y caracterizar la morfología del manto fúngico y red Hartig (Prophet et al., 1995) con ayuda de un microscopio óptico en un aumento de 100x.

Contenido mineral de la planta

Se enviaron muestras del sistema aéreo y radicular de las plantas con cada tratamiento al Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, donde se realizó un análisis de composición mineral para conocer los porcentajes del nitrógeno total (N_t), fósforo (P), potasio (K), calcio

by Murphy and Riley (1962). Quantification of K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn and Zn was also carried out using a mixture of triazide digesters and atomic absorption spectrophotometry (GBC Avanta-Sigma) (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 1990).

Statistical analysis

Shapiro-Wilk ($n \leq 30$) and Kolmogorov-Smirnov ($n > 30$) normality tests were carried out to determine whether the data conformed to a standard distribution; a Levene's test for homogeneity of variances ($P \geq 0.05$) was also used.

The effects of the fungal species (factor A) and the volume of spore inoculum used (factor B) on the morphometric variables (response variables: plant height, foliage diameter and stem height) were determined using a completely randomized ANOVA. A 4 x 3 factorial arrangement was used, corresponding to the spore inoculum of the two fungal species, the commercial inoculum of Ectorrize®, the negative control and the three inoculum volumes. Also, an ANOVA with a randomized design was performed to evaluate the effect of the fungal species on the morphometric variables of height and diameter of the root system and biomass of the shoot and root system (fresh and dry weight). Data showing heterogeneity of variances were analyzed with a T3 multiple comparison of means by Dunnett. Statistical analysis was performed in the statistical program SPSS version 20 (IBM Corporation, 2011) and GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, Inc., 2018) was used.

Results

Efficiency and colonization

Table 2 shows that, at the end of the experiment, inoculated plants had higher survival (93.5 to 100 %) than non-inoculated plants (74.3 %).

Figures 2, 3 and 4 show that inoculation with *P. tinctorius* and *A. hygrometricus* had a positive effect ($P \leq 0.05$) on all morphometric variables of *P. arizonica*. Average plant height (Figure 2), as well as diameter and length of foliage (Figure 4), was higher for inoculated treatments compared to the non-inoculated control, regardless of inoculum volume which had no statistically significant effect ($P > 0.05$). This indicates that EMF can establish symbiosis with *P. arizonica* plants at low inoculation volumes, generating effectiveness.

Statistical analysis determined that inoculant volume had no significant effect ($P > 0.05$) on plant height growth (Figure 2), stem diameter (Figure 3), and shoot length and diameter (Figure 4); however, interaction or combination of EMF and inoculated volume had effect

(Ca), magnesio (Mg) y sodio (Na), así como la cantidad en partes por millón (ppm) de cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn).

La técnica micro-Kjeldahl se utilizó para determinar la cantidad de N, y la mezcla digestora triazida y la técnica de vanadato colorimétrico para el porcentaje de P. La mezcla digestora se basa en la extracción del P con la metodología de Tiessen y Moir (1993), y la prueba colorimétrica de vanadato es la sugerida por Murphy y Riley (1962). La cuantificación de K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn y Zn también se hizo con una mezcla de digestores triazidos y espectrofotometría de absorción atómica (GBC Avanta-Sigma) (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 1990).

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk ($n \leq 30$) y Kolmogórov-Smirnov ($n > 30$) para determinar si los datos se ajustaron a una distribución normal, también se utilizó una prueba de homogeneidad de varianzas de Levene ($P \geq 0.05$).

Los efectos de las especies de hongos (factor A) y el volumen de inóculo de esporas utilizado (factor B) sobre las variables morfométricas (variables de respuesta: altura de la planta, diámetro del follaje y altura del tallo) se determinaron mediante un ANOVA completamente aleatorizado. Se utilizó una disposición factorial de 4 x 3, correspondiente al inóculo de esporas de las dos especies de hongos, el inóculo comercial de Ectorrize®, el control negativo y los tres volúmenes de inóculo. Asimismo, se realizó un ANOVA con un diseño aleatorio para evaluar el efecto de las especies de hongos sobre las variables morfométricas de altura y diámetro del sistema radicular y la biomasa de la parte aérea y el sistema radicular (peso fresco y seco). Los datos que mostraron heterogeneidad de las varianzas se analizaron con una comparación múltiple de medias T3 por Dunnett. El análisis estadístico se realizó en el programa estadístico SPSS versión 20 (IBM Corporation, 2011) y se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, Inc., 2018).

Resultados

Eficiencia y colonización

El Cuadro 2 indica que, al final del experimento, las plantas inoculadas tuvieron mayor supervivencia (93.5 a 100 %) que las no inoculadas (74.3 %).

Las Figuras 2, 3 y 4 muestran que la inoculación con *P. tinctorius* y *A. hygrometricus* tuvo efecto positivo ($P \leq 0.05$) en todas las variables morfométricas de *P. arizonica*. La altura promedio de las plantas (Figura 2), así como el diámetro y longitud del follaje (Figura 4), fue mayor en los

Table 2. Survival of *Pinus arizonica* plants after nine months of inoculation with *Astraeus hygrometricus* and *Pisolithus tinctorius* at a concentration of 10^6 spores·mL⁻¹ under greenhouse conditions.

Cuadro 2. Supervivencia de las plantas de *Pinus arizonica* a los nueve meses de inoculación con *Astraeus hygrometricus* y *Pisolithus tinctorius* a una concentración de 10^6 esporas·mL⁻¹ en condiciones de invernadero.

Treatment / Tratamiento	Inoculum volume (mL) / Volumen de inóculo (mL)	Survival (%) / Supervivencia (%)
<i>P. tinctorius</i>	10	100.0
<i>P. tinctorius</i>	25	96.9
<i>P. tinctorius</i>	50	100.0
Ectorrize®	10	93.5
Ectorrize®	25	90.6
Ectorrize®	50	100.0
<i>A. hygrometricus</i>	10	100.0
<i>A. hygrometricus</i>	25	100.0
<i>A. hygrometricus</i>	50	95.6
Control	-	74.3

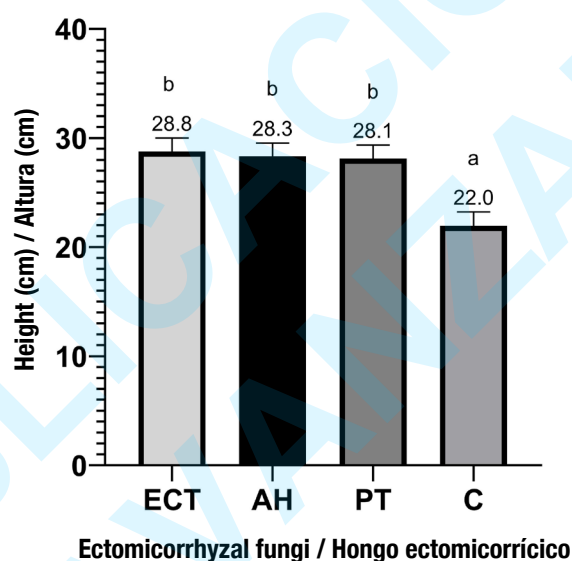


Figure 2. Height of *Pinus arizonica* plants under the effect of inoculation treatments with *Pisolithus tinctorius* (PT), Ectorrize® (ECT), *Astraeus hygrometricus* (AH) and a control treatment without inoculation (C). Different letters indicate significant differences between treatments according to Dunnett's multiple comparison of means ($P \leq 0.05$). Variance bars represent standard deviation from the mean ($n = 5$).

Figura 2. Altura de las plantas de *Pinus arizonica* bajo efecto de los tratamientos de inoculación con *Pisolithus tinctorius* (PT), Ectorrize® (ECT), *Astraeus hygrometricus* (AH) y un tratamiento control sin inoculación (C). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la comparación múltiple de medias de Dunnett ($P \leq 0.05$). Las barras de variación representan la desviación estándar de la media ($n = 5$).

on the variables (Table 3). In the case of plant height, shoot length and shoot diameter, it was observed that *P. tinctorius* generated the greatest growth with doses of 10 and 50 mL, being similar with Ectorrize® at 10 mL; for stem diameter, the best response was generated with *P. tinctorius* at a dose of 10 mL.

tratamientos inoculados en comparación con el control no inoculado, independientemente del volumen de inóculo que no tuvo efecto estadísticamente significativo ($P > 0.05$). Lo anterior indica que los HEM puede establecer simbiosis con las plantas de *P. arizonica* a bajos volúmenes de inoculación, generando efectividad.

Table 3. Interaction effect of ectomycorrhizal fungi and inoculum volume on growth variables of *Pinus arizonica*.
Cuadro 3. Efecto de interacción de los hongos ectomicorrízicos y volumen de inóculo sobre las variables de crecimiento de *Pinus arizonica*.

Inoculum volume (mL)/ Volumen de inóculo (mL)	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Ectorrize®	<i>Astraeus hygrometricus</i>	Control (no inoculum)/ Control (sin inóculo)
Plant height / Altura de la plántula				
10	28.6 ± 2.4 f	28.5 ± 3.4 f	24.4 ± 2.9 de	16.9 ± 3.4 a
25	24.7 ± 2.3 e	22.4 ± 3.4 bcd	23.5 ± 3.4 cde	
50	27.1 ± 4.2 f	22.0 ± 2.4 bc	25.0 ± 3.6 de	
Shoot length / Longitud del follaje				
10	26.1 ± 2.4 f	25.7 ± 3.3 f	21.3 ± 2.9 de	14.8 ± 3.1 a
25	22.3 ± 2.5 e	19.7 ± 3.2 cd	20.8 ± 3.2 cde	
50	24.5 ± 4.1 f	18.7 ± 2.3 bc	21.4 ± 3.7 de	
Shoot diameter / Diámetro del follaje				
10	21.7 ± 2.4 g	21.5 ± 3.8 g	17.6 ± 2.7 bcde	12.9 ± 4.1 a
25	16.5 ± 3.1 b	18.6 ± 2.9 cdef	18.1 ± 3.8 cdef	
50	20.6 ± 4.0 g	17.9 ± 3 bcdef	17.6 ± 4.6 bcdef	
Stem diameter / Diámetro del tallo				
10	5.7 ± 0.09 f	5.3 ± 0.6 e	4.3 ± 0.06 c	3.2 ± 0.08 a
25	5.3 ± 0.19 e	4.6 ± 0.08 d	4.1 ± 0.07 bc	
50	5.1 ± 0.06 de	4.6 ± 0.1 d	3.9 ± 0.06 b	

± standard deviation of the mean. For each variable, different letters indicate significant differences between means according to Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

± desviación estándar de la media. En cada variable, letras distintas indican diferencias significativas entre medias de acuerdo con la prueba de Dunnett ($P \leq 0.05$).

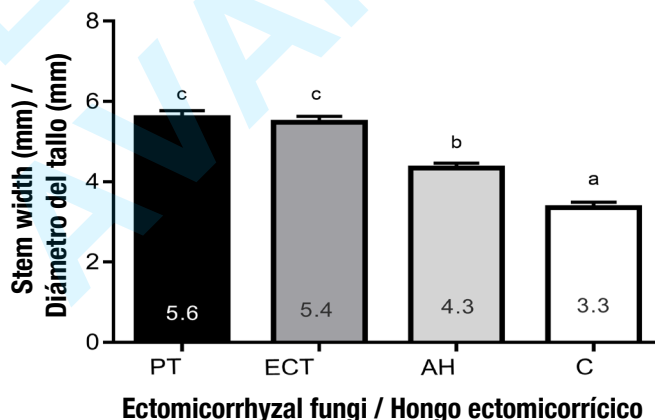


Figure 3. Stem diameter of *Pinus arizonica* under inoculation treatments with *Pisolithus tinctorius* (PT), Ectorrize® (ECT), *Astraeus hygrometricus* (AH) and a control treatment without inoculation (C). Different letters indicate significant differences between treatments according to Dunnett's multiple comparison of means ($P \leq 0.05$). Variation bars represent standard deviation from the mean ($n = 5$).

Figura 3. Diámetro del tallo de *Pinus arizonica* bajo tratamientos de inoculación con *Pisolithus tinctorius* (PT), Ectorrize® (ECT), *Astraeus hygrometricus* (AH) y un tratamiento control sin inoculación (C). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la comparación múltiple de medias de Dunnett ($P \leq 0.05$). Las barras de variación representan la desviación estándar de la media ($n = 5$).

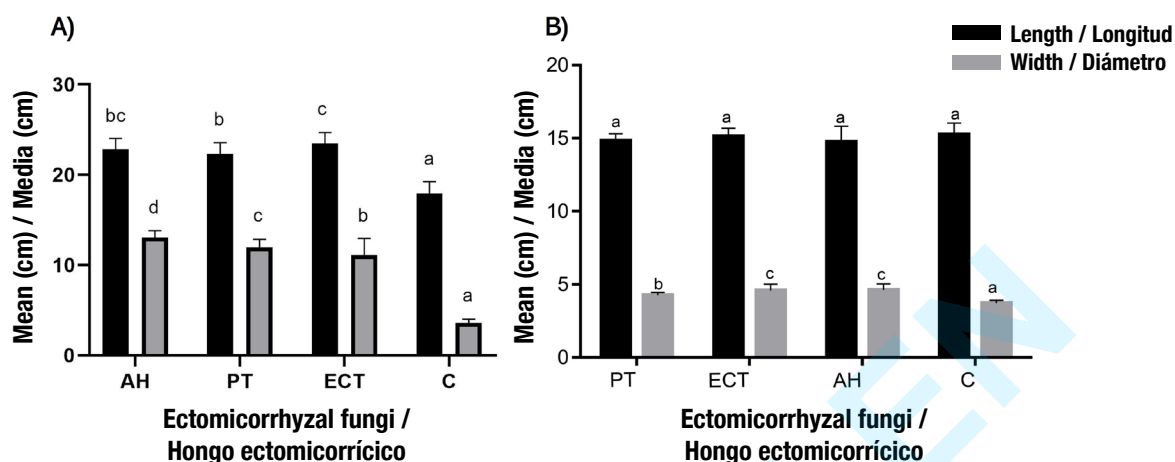


Figure 4. A) Average length and diameter of the shoot (A) and root system (B) of *Pinus arizonica* under inoculation treatments with *Pisolithus tinctorius* (PT), Ectorrize® (ECT), *Astraeus hygrometricus* (AH) and a control treatment without inoculation (C). Different letters indicate significant differences between treatments according to Dunnett's multiple comparison of means ($P \leq 0.05$). Variance bars represent standard deviation from the mean ($n = 5$).

Figura 4. A) Longitud y diámetro promedio del sistema aéreo (A) y radicular (B) de *Pinus arizonica* bajo tratamientos de inoculación con *Pisolithus tinctorius* (PT), Ectorrize® (ECT), *Astraeus hygrometricus* (AH) y un tratamiento control sin inoculación (C). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la comparación múltiple de medias de Dunnett ($P \leq 0.05$). Las barras de variación representan la desviación estándar de la media ($n = 5$).

For stem diameter (Figure 3), plants inoculated with Ectorrize® and *P. tinctorius* spores showed greater growth, followed by *A. hygrometricus*, compared to the control (3.36 cm).

Length and diameter of the shoot in the inoculated treatments were higher than in the non-inoculated control (Figure 4A). With respect to the root system, the inoculant treatments had a statistically similar effect on the length ($P > 0.05$) compared to the control (Figure 4B); it ranged from 14.04 to 15.26 cm. In contrast, the results for root system diameter (Figure 4B) showed differences among treatments ($P < 0.05$), with the control being smaller (3.72 cm); the highest values were reported with the Ectorrize® and *A. hygrometricus* treatments, with 4.60 and 4.62 cm, respectively.

The presence of inocula in the early stages of plant development has been reported to reduce the incidence of root pathogens (Sharma et al., 2014) because natural competition for space occurs between them and the EMF (Jung et al., 2012). In this study, no diseases caused by pathogenic fungal species were detected in inoculated *P. arizonica* plants or in the control.

In terms of biomass production, both shoot and root system (Figure 5), showed positive effects on *P. arizonica* plants compared to the control. Treatment with *P. tinctorius* spores stimulated higher shoot growth of plants (8.08 g) which differed significantly ($P < 0.05$)

El análisis estadístico determinó que el volumen de inoculante no tuvo efecto significativo ($P > 0.05$) sobre el crecimiento de la altura de las plantas (Figura 2), el diámetro del tallo (Figura 3) y la longitud y diámetro del follaje (Figura 4); sin embargo, la interacción o combinación de los HEM y el volumen inoculado sí mostró efecto sobre las variables (Cuadro 3). En el caso de la altura, longitud del follaje y diámetro del follaje de la planta se observa que *P. tinctorius* genera el mayor crecimiento a dosis de 10 y 50 mL, siendo similar con Ectorrize® a 10 mL; para el diámetro del tallo, la mejor respuesta se generó con *P. tinctorius* a dosis de 10 mL.

En cuanto al diámetro del tallo (Figura 3), las plantas inoculadas con esporas de *P. tinctorius* y Ectorrize® mostraron mayor crecimiento, seguidas de *A. hygrometricus*, en comparación con el control (3.36 cm).

La longitud y diámetro del sistema aéreo en los tratamientos inoculados fueron mayores que en el control no inoculado (Figura 4A). Con respecto al sistema de las raíces, los tratamientos inoculantes tuvieron efecto estadísticamente similar sobre la longitud ($P > 0.05$) en comparación con el control (Figura 4B); esta varió entre 14.04 y 15.26 cm. Por el contrario, los resultados para el diámetro del sistema radicular (Figura 4B) indicaron diferencias entre los tratamientos ($P < 0.05$), siendo menor el control (3.72 cm); los valores más altos se obtuvieron con los tratamientos Ectorrize® y *A. hygrometricus*, con 4.60 y 4.62 cm, respectivamente.

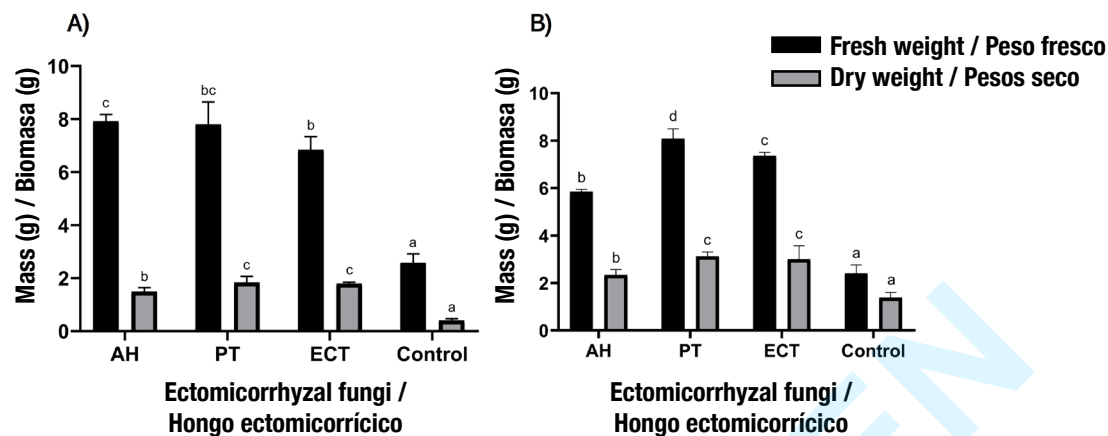


Figure 5. Biomass production of shoot (A) and root system (B) of *Pinus arizonica* under inoculation treatments with *Pisolithus tinctorius* (PT), Ectorrize® (ECT), *Astraeus hygrometricus* (AH) and a control treatment without inoculation (C). Different letters indicate significant differences between treatments according to Dunnett's multiple comparison of means ($P \leq 0.05$). Variance bars represent standard deviation from the mean ($n = 5$).

Figura 5. Producción de biomasa del sistema aéreo (A) y sistema radicular (B) de *Pinus arizonica* bajo tratamientos de inoculación con *Pisolithus tinctorius* (PT), Ectorrize® (ECT), *Astraeus hygrometricus* (AH) y un tratamiento control sin inoculación (C). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la comparación múltiple de medias de Dunnett ($P \leq 0.05$). Las barras de variación representan la desviación estándar de la media ($n = 5$).

with the non-inoculated control treatment (2.40 g). The highest fresh weight biomass for the root system was induced by *P. tinctorius* spore and Ectorrize® treatments with values of 7.92 and 7.80 g, respectively, and these differed significantly with those obtained by the control. The *P. tinctorius* spore treatments and the commercial product Ectorrize® also generated higher biomass in dry weight in the root system with 3.12 and 3.22 g, respectively.

Ectomycorrhizal colonization of *Pinus arizonica* roots

Table 4 indicates that *P. tinctorius* spores produced the highest percentage of ectomycorrhizal colonization on *P. arizonica* plants, followed by *A. hygrometricus* and Ectorrize®. The degree of mycorrhizal formation was classified according to Tateishi et al. (2003); based on the number of mycorrhizal roots, inoculated plants had a medium to high level (level IV).

Morphological characterization of ectomycorrhizas

Mycorrhizal characteristics, such as mantle color and branching type, helped to distinguish the two fungal species, and cross sections of histological sections were useful to identify the Hartig network and mantle thickness. Dichotomous mycorrhizas were the most abundant.

Figure 6 shows the light brown ectomycorrhizas of *P. tinctorius*, with darkening at the base, mainly dichotomous type. Some coraloid formations were observed but were not frequent; rhizomorphs were

Se ha informado que, en las primeras etapas del desarrollo de las plantas, la presencia de inóculos reduce la incidencia de patógenos de raíz (Sharma et al., 2014) porque se produce competencia natural por el espacio entre estos y los HEM (Jung et al., 2012). En este estudio no se detectaron enfermedades causadas por especies fúngicas patógenas en las plantas inoculadas de *P. arizonica* ni en el control.

En cuanto a la producción de biomasa, tanto de la parte aérea como del sistema radicular (Figura 5), se observaron efectos positivos en plantas de *P. arizonica* en comparación con el control. El tratamiento con esporas de *P. tinctorius* estimuló un mayor crecimiento aéreo de las plantas (8.08 g) que difirió significativamente ($P < 0.05$) con el tratamiento control no inoculado (2.40 g). La mayor biomasa en peso fresco para el sistema radicular fue inducida por tratamientos de esporas de *P. tinctorius* y Ectorrize® con valores de 7.92 y 7.80 g, respectivamente, y estos difirieron significativamente con los obtenidos en el control. Los tratamientos de esporas de *P. tinctorius* y el producto comercial Ectorrize® generaron también mayor biomasa en peso seco en el sistema radicular con 3.12 y 3.22 g, respectivamente.

Colonización ectomicorrícica de raíces de *Pinus arizonica*

El Cuadro 4 indica que las esporas de *P. tinctorius* produjeron el mayor porcentaje de colonización ectomicorrícica en las plantas de *P. arizonica*, seguidas por las de *A. hygrometricus* y Ectorrize®. El grado de formación de micorrizas se clasificó de acuerdo con

Table 4. Ectomycorrhizal colonization per inoculation treatment in *Pinus arizonica* plants.**Cuadro 4. Colonización ectomicorrícica por tratamiento de inoculación en plantas de *Pinus arizonica*.**

Species/Especie	Colonization (%)/Colonización (%)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	67.6 ± 1.1 d
Ectorrize®	56.8 ± 27 b
<i>Astraeus hygrometricus</i>	63.4 ± 2.6 c
Control	0.0 a

± standard deviation of the mean. Different letters indicate significant differences between species according to Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

± desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas entre especies de acuerdo con la prueba de Dunnett ($P \leq 0.05$).

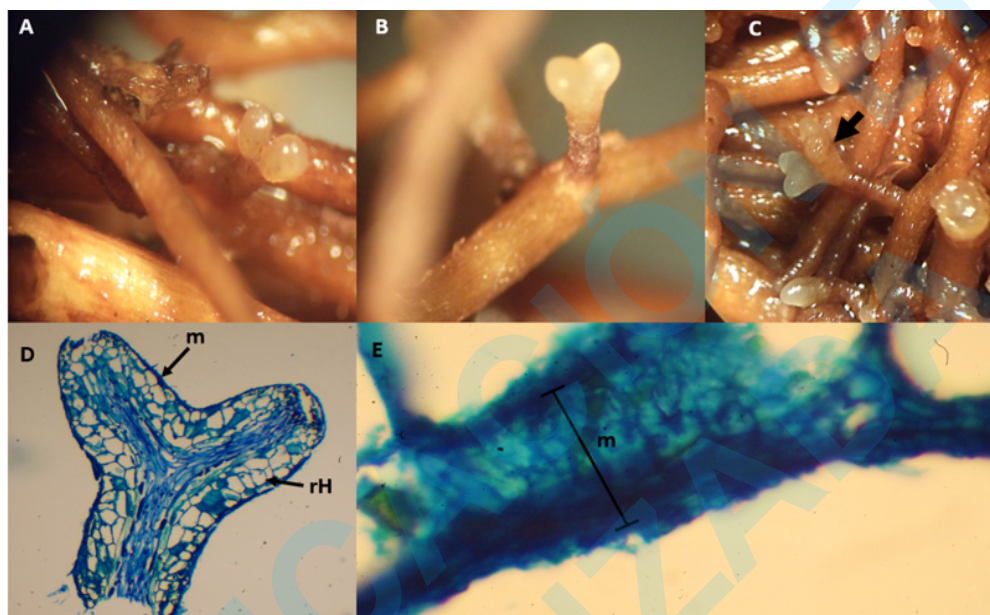


Figure 6. Ectomycorrhizae of *Pisolithus tinctorius* on *Pinus arizonica* plants: A) initial formation, B) dichotomous morphotype, C) coralloid morphotype, D) longitudinal section of ectomycorrhiza indicating the mantle (m) and Hartig network (rH), E) 20 μm thick mantle.

Figura 6. Ectomicorrizas de *Pisolithus tinctorius* en plantas de *Pinus arizonica*: A) formación inicial, B) morfotipo dicotómico, C) morfotipo coraloide, D) corte longitudinal de ectomicorriza indicando el manto (m) y la red de Hartig (rH), E) manto de 20 μm de espesor.

also identified. The length of the mycorrhizal system ranged from 1.3 to 2.5 mm and the diameter from 0.4 to 0.7 mm. Root tips measured 0.7 mm in length and 0.3 mm in diameter. The texture of the fungal mantle varied from granular to smooth, and the coloration was light brown to hyaline. Longitudinal sections of the mycorrhizas showed the mantle to be of plectenchymatous type H (Agerer, 1991); these are characterized by 15 to 20 μm diameter irregularly shaped hyphae. No clamp connections were observed. The Hartig network was composed of 2 to 3 μm diameter ovoid cells.

The morphological variability of the ectomycorrhizas produced by the Ectorrize® treatment is observed in Figure 7. The mycorrhizal system is dense with dichotomous type, with main branches and straight tips in the initial stages, although slightly sinuous

Tateishi et al. (2003); en función del número de raíces micorrícicas, las plantas inoculadas tuvieron un nivel medio a alto (nivel IV).

Caracterización morfológica de ectomicorrizas

Las características micorrícicas, como el color del manto y el tipo de ramificación, ayudaron a distinguir las dos especies de hongos, y las secciones transversales de los cortes histológicos fueron útiles para identificar la red de Hartig y el grosor del manto. Las micorrizas dicotómicas fueron las más abundantes.

La Figura 6 muestra las ectomicorrizas de *P. tinctorius* de color marrón claro, con oscurecimiento en la base de tipo principalmente dicotómicas. Se observaron algunas formaciones coraloideas, pero no fueron frecuentes, también se identificaron rizomorfos. La longitud del

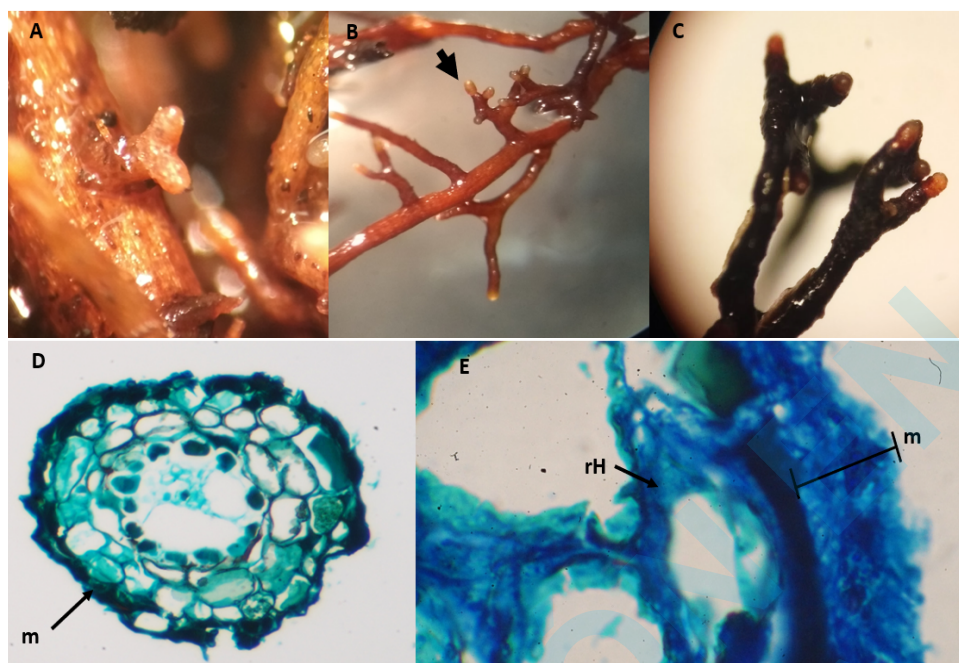


Figure 7. Ectomycorrhizae in *Pinus arizonica* plants with Ectorrize® inoculation treatment. A) Initial stage, B) dichotomous morphotype, C) mature ectomycorrhizas, D) cross section of ectomycorrhiza indicated in the mantle (m), E) plectenchymatous mantle (m) 15 μm thick N-type (Agerer, 1991) and Hartig network (rH), magnification 100x.

Figura 7. Ectomicorizas en plantas de *Pinus arizonica* con el tratamiento de inoculación Ectorrize®. A) Etapa inicial, B) morfotipo dicotómico, C) ectomicorizas maduras, D) sección transversal de ectomicoriza indicado en el manto (m), E) manto plectenquimático (m) de 15 μm de espesor tipo N (Agerer, 1991) y red de Hartig (rH), aumento de 100x.

at mature stage. The presence of rhizomorphs was not observed. The color of the mycorrhizas varied from dark brown to golden brown and the tips were lighter in color than the rest. The mycorrhizal system measured, on average, 3.1 to 5.4 mm in length and 1.5 mm in diameter, and the tips were 0.9 to 2.3 mm in length and 0.2 to 0.5 mm in diameter. The texture of the mantle varied from smooth to granular with a light brown to hyaline coloration. Transverse sections showed an N-type plectenchymatous mantle (Agerer, 1991), characterized by irregular hyphae. The mantle measured 10 to 15 μm thick and the Hartig network had semicircular shaped cells.

Morphology and color of mycorrhizas formed by the Ectorrize® treatment were similar to *P. tinctorius* but only at the initial stages, while the length of the mycorrhizal system was higher with the positive control. Changes in both treatments may be due to the addition of different bacterial strains used in the Ectorrize® product.

Figure 8 shows the morphology of *A. hygrometricus* mycorrhizas. It is important to mention that the study presents for the first time the morphological description of the mycorrhizal association of *A. hygrometricus* with *P. arizonica*. Formations were dichotomous and choraloid, the latter being

sistema micorrícico varió de 1.3 a 2.5 mm y el diámetro de 0.4 a 0.7 mm. Las puntas de las raíces midieron 0.7 mm de longitud y 0.3 mm de diámetro. La textura del manto fúngico varió de granular a liso, y la coloración fue marrón claro a hialino. Las secciones longitudinales de las micorizas mostraron que el manto es de tipo plectenquimático H (Agerer, 1991); estas se caracterizan por hifas de forma irregular de 15 a 20 μm de diámetro. No se observaron conexiones de abrazadera. La red Hartig estuvo compuesta por células ovoides de 2 a 3 μm de diámetro.

La variabilidad morfológica de las ectomicorizas producidas por el tratamiento con Ectorrize® se observa en la Figura 7. El sistema micorrícico es denso con ramificaciones principales de tipo dicotómica y puntas rectas en las etapas iniciales, aunque ligeramente sinuosas en estado maduro. No se observó la presencia de rizomorfos. El color de las micorizas varió del marrón oscuro al dorado y las puntas tenían un color más claro que el resto. El sistema micorrícico registró, en promedio, 3.1 a 5.4 mm de longitud y 1.5 mm de diámetro, y las puntas tuvieron 0.9 a 2.3 mm de longitud y 0.2 a 0.5 mm de diámetro. La textura del manto varió de liso a granular con una coloración marrón claro a hialina. Las secciones transversales mostraron un manto plectenquimático tipo N (Agerer, 1991), caracterizado por hifas irregulares. El manto

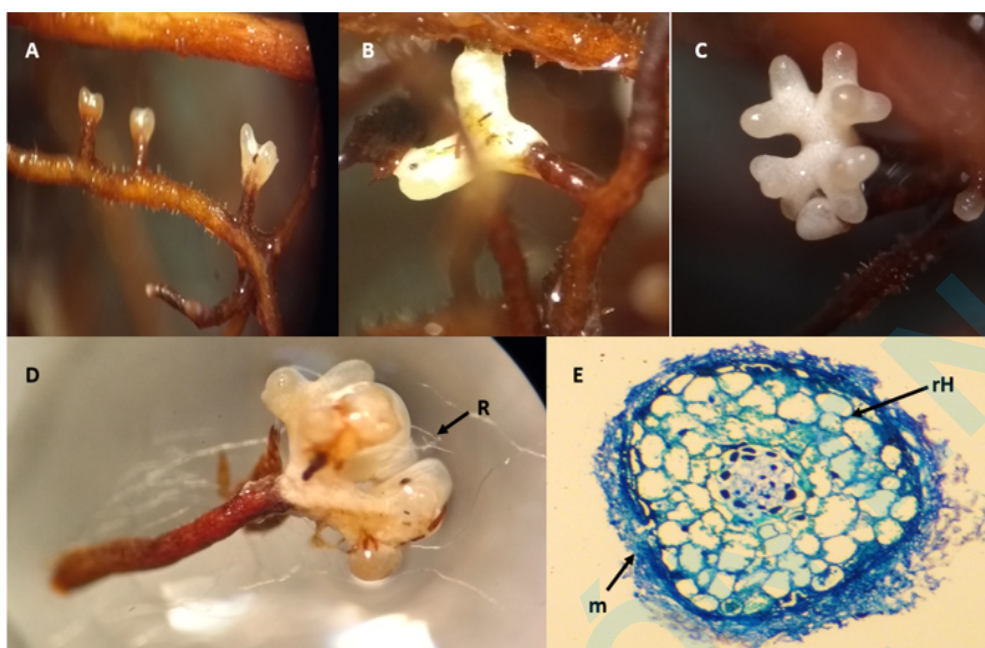


Figure 8. Ectomycorrhizas of *Astraeus hygrometricus* on *Pinus arizonica* plants: A) initial stage, B) dichotomous mycorrhizas, C) mature ectomycorrhizas with coralloid branching, D) rhizomorphs (R) and coralloid ectomycorrhizas, E) cross section of ectomycorrhizas showing the mantle (m) and Hartig network (rH).

Figura 8. Ectomicorrizas de *Astraeus hygrometricus* en plantas de *Pinus arizonica*: A) etapa inicial, B) micorrizas dicotómicas, C) ectomicorrizas maduras con ramificación coraloides, D) rizomorfos (R) y ectomicorrizas coraloides, E) sección transversal de ectomicorrizas mostrando el manto (m) y la red de Hartig (rH).

dominant at the mature stages. The presence of dense rhizomorphs was observed but restricted to one point. Mycorrhizas had white colorations, and some had slightly hyaline root tips; older mycorrhizas had a grayish color. The dichotomous type mycorrhizal system measured 2.1 mm in length by 1.4 mm in diameter and the tips averaged 1.1 mm in length by 0.4 mm in diameter. The coralloid morphotype ranged from 2 to 2.5 mm long by 2 mm in diameter and the tips measured 1.3 μm long by 0.5 μm in diameter. The texture of the mantle was granular to smooth at the tips. The histological cross section showed that the mantle morphology is plectenchymatous type B which is characterized by irregular hyphae on the mantle surface, arranged mainly longitudinally (Agerer, 1991). The thickness of the mantle was 70 μm . The Hartig network showed 3- to 5- μm long, semicircular, and elongated cells.

Mineral analysis in *Pinus arizonica* plants

High macronutrient content was observed in both shoot and root parts of *Pinus arizonica* plants inoculated with the commercial product Ectorrize® and with the fungi *A. hygrometricus* and *P. tinctorius* (Table 5). For the negative control, root system analyses could not be carried out, since the amount of biomass was insufficient.

midio de 10 a 15 μm de grosor y la red Hartig tuvo células de forma semicircular.

La morfología y el color de las micorrizas formadas por el tratamiento Ectorrize® fueron similares a *P. tinctorius*, pero solo en las etapas iniciales; mientras que la longitud del sistema micorrízico si fue mayor con el control positivo. Las variaciones en ambos tratamientos pueden deberse a la adición de diversas cepas bacterianas utilizadas en el producto Ectorrize®.

La Figura 8 muestra la morfología de las micorrizas de *A. hygrometricus*. Es importante mencionar que el estudio presenta por vez primera la descripción morfológica de la asociación micorrízica de *A. hygrometricus* con *Pinus arizonica*. Las formas fueron de tipo dicotómicas y coraloides, siendo estas últimas las dominantes en las etapas maduras. Se observó la presencia de rizomorfos densos, pero restringidos a un punto. Las micorrizas presentaron coloraciones blancas y algunas tenían puntas de raíces ligeramente hialinas; las micorrizas más viejas tenían un color grisáceo. El sistema micorrízico de tipo dicotómico midió 2.1 mm de largo por 1.4 mm de diámetro y las puntas tuvieron una longitud promedio de 1.1 mm por 0.4 mm de diámetro. El morfotipo coraloides varió de 2 a 2.5 mm de largo por 2 mm de diámetro y las puntas midieron 1.3 μm de largo por 0.5 μm de diámetro. La textura del manto fue granulosa a lisa en

Table 5. Mineral composition of *Pinus arizonica* plants inoculated with ectomycorrhizal fungi.Cuadro 5. Composición mineral de plantas de *Pinus arizonica* inoculadas con hongos ectomicorrícicos.

Variables / Variables	<i>Astraeus hygrometricus</i>		<i>Pisolithus tinctorius</i>		Ectorrize®		Control	
	Shoot / Parte aérea	Root / Sistema radicular	Shoot / Parte aérea	Root / Sistema radicular	Shoot / Parte aérea	Root / Sistema radicular	Shoot / Parte aérea	Root / Sistema radicular
Fresh weight (g) / Peso fresco (g)	5.94	8.00	8.74	6.69	7.45	7.10	2.64	2.86
Dry weight (g) / Peso en seco (g)	2.58	1.67	3.34	1.45	3.32	1.85	1.53	0.39
Nt (%)	1.26	1.26	1.20	1.20	1.26	1.13	1.32	1.13
P (%)	0.19	0.27	0.16	0.14	0.16	0.15	0.11	NE
K (%)	1.04	0.63	0.56	0.43	0.45	0.49	0.30	NE
Ca (%)	4.14	2.32	1.97	2.83	2.32	1.72	2.68	NE
Mg (%)	0.19	0.22	0.17	0.19	0.17	0.16	0.15	NE
Na (%)	0.12	0.13	0.11	0.12	0.12	0.12	0.13	NE
Cu (ppm)	4.00	6.00	4.00	4.50	4.00	8.00	3.50	NE
Fe (ppm)	78.00	165.00	48.00	107.50	50.50	88.00	37.50	NE
Mn (ppm)	86.50	32.50	88.50	34.00	81.00	39.00	40.00	NE
Zn (ppm)	43.00	68.50	41.50	63.00	32.50	45.00	30.00	NE

NE = Not enough for analysis.

NS = No suficiente para el análisis.

The results support that pointed out by Ortega (2015), Smits and Wallander (2017), and Chen et al. (2018), who mention that mycorrhizae absorb sugars from plant roots and introduce nutrients such as P, N, K, Ca, S and Zn, among others, into their vascular systems.

Discussion

A favorable effect on the growth of *P. arizonica* species was recorded with any of the inoculated EMF, and also with the commercial product Ectorrize®. These results show the great mycorrhizal potential of *P. tinctorius* or *A. hygrometricus* spore inocula.

Wang (2017) suggested that the use of plants inoculated with mycorrhizal fungi plays an important role in reforestation of heavily disturbed areas. In the present study, inoculation of *P. arizonica* plants with mycorrhizal fungi caused substantial increase in growth and survival variables. *P. tinctorius* and *A. hygrometricus* have been reported to have high capacity to form associations with a wide range of angiosperms and gymnosperms (Kayama & Yamanaka, 2014). This potential may be attributed to the ability of spores to germinate over a wide pH range (4 to 6.5) compared to other temperate forest EMF, which are limited to pH 5 or so; in addition, they could withstand higher temperatures than other species such as *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. (Maltz et al., 2019).

las puntas. El corte histológico transversal mostró que la morfología del manto es plectenquimático de tipo B que se caracteriza por hifas irregulares sobre la superficie del manto, dispuestas principalmente de forma longitudinal (Agerer, 1991). El grosor del manto fue de 70 µm. La red de Hartig presentó células con forma semicircular y alargadas de 3 a 5 µm de longitud.

Análisis mineral en plantas de *Pinus arizonica*

En general, se observó contenido alto de macronutrientes tanto en las partes aéreas como radicales de las plantas de *Pinus arizonica* inoculadas con el producto comercial Ectorrize® y con los hongos *A. hygrometricus* y *P. tinctorius* (Cuadro 5). Para el control negativo, los análisis del sistema radicular no pudieron realizarse, ya que la cantidad de biomasa fue insuficiente.

Los resultados apoyan lo señalado por Ortega (2015), Smits y Wallander (2017) y Chen et al. (2018), quienes mencionan que las micorrizas absorben azúcares de las raíces de las plantas e introducen nutrientes como P, N, K, Ca, S y Zn, entre otros, en sus sistemas vasculares.

Discusión

Se registró un efecto favorable en el crecimiento de la especie *P. arizonica* con cualquiera de los HEM inoculados, así como con el producto comercial

Sebastiana et al. (2018) noted that inoculation with *P. tinctorius* had positive effect on plant height, shoot biomass, shoot basal diameter, and root growth of *Quercus suber* under field conditions, also increased nitrogen concentration and drought tolerance compared to non-inoculated plants.

Regarding morphological aspects, Kayama and Yamanaka (2014) found that the development of leaves, stems, branches and roots of *Quercus glauca* Thunb., *Q. salicina* Blume and *Castanopsis cuspidata* Thunb. inoculated with *A. hygrometricus* was higher than when no EMF were inoculated. Adeleke et al. (2015) inoculated *Pinus patula* Schl. et Cham. plants with *P. tinctorius*, *Paxillus involutus* (Batsch ex Fr.) Fr., *Laccaria bicolor* (Maire) P. D. Orton and *Suillus tomentosus* (Kauffman) Singer under *in vitro* conditions. These fungi induced higher root and shoot biomass production and improved the physiological status of the plants compared to non-inoculated plants.

Wen et al. (2017) inoculated Chinese red pine (*Pinus tabuliformis* Carr.) plants with *P. tinctorius* and *Cenococcum geophilum* Fr. and showed that the level of mycorrhization depended on the fungal species used. The inoculum of *P. tinctorius* gave the best results in nutrient accumulation and pine shoot growth; the authors concluded that these fungi can benefit plant establishment in contaminated areas. Finally, Gómez et al. (2013) evaluated the establishment of *Pinus pseudostrobus* Lindl. in the field with plants inoculated and not inoculated with *P. tinctorius*; the survival rate of inoculated pines was higher (86 %) compared to those with no inoculum (62 %).

Regarding colonization, the results of the present study were consistent with those reported by Garza-Ocañas et al. (2018) and Garza et al. (2022) with values between 60 and 80 % in roots of forest species under greenhouse conditions.

Stem diameter is one of the morphological attributes widely used to characterize the quality of nursery plants and is believed to be related to water and nutrient transfer, mechanical strength, and robustness. It is also a proxy measure of resistance to climatic and biological factors (Sanchez-Costa et al., 2015). In the present study, stem diameter developed appropriately in all treatments except the control.

Root system length is related to the ability of plants to explore the soil for nutrients and water; the content of this element in the substrate will influence root development. If water is abundant, root growth is not stimulated, but if water is scarce, a wide root system will be necessary to survive (Yang et al., 2017). Another important aspect is the capacity that the hyphal system

Ectorrize*. Estos resultados muestran el gran potencial micorrícico que tienen los inóculos de esporas de *P. tinctorius* o *A. hygrometricus*.

Wang (2017) sugirió que el uso de plantas inoculadas con hongos micorrícicos juega un papel importante en la reforestación de áreas fuertemente alteradas. En el presente estudio, la inoculación de plantas de *P. arizonica* con hongos micorrícicos causó aumento sustancial en las variables de crecimiento y supervivencia. Se ha informado que *P. tinctorius* y *A. hygrometricus* tienen capacidad alta para formar asociaciones con una gama amplia de angiospermas y gimnospermas (Kayama & Yamanaka, 2014). Dicho potencial puede atribuirse a la capacidad de las esporas para germinar en un intervalo amplio de pH (4 a 6.5) en comparación con otros HEM de bosques templados, que se limitan a pH 5 aproximadamente; además, podrían soportar temperaturas más altas que otras especies como *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. (Maltz et al., 2019).

Sebastiana et al. (2018) señalaron que la inoculación con *P. tinctorius* tuvo efecto positivo sobre la altura de la planta, la biomasa de los brotes, el diámetro basal del brote y el crecimiento radicular de *Quercus suber* en condiciones de campo, también aumentó la concentración de nitrógeno y la tolerancia a la sequía en comparación con las plantas no inoculadas.

En cuanto a los aspectos morfológicos, Kayama y Yamanaka (2014) encontraron que el desarrollo de hojas, tallos, ramas y raíces de *Quercus glauca* Thunb., *Q. salicina* Blume y *Castanopsis cuspidata* Thunb. inoculados con *A. hygrometricus* fue mayor que cuando no se inocularon HEM. Adeleke et al. (2015) inocularon plantas de *Pinus patula* Schl. et Cham. con *P. tinctorius*, *Paxillus involutus* (Batsch ex Fr.) Fr., *Laccaria bicolor* (Maire) P. D. Orton y *Suillus tomentosus* (Kauffman) Singer bajo condiciones *in vitro*. Estos hongos indujeron mayor producción de biomasa de raíces y brotes, y mejoraron el estado fisiológico de las plantas en comparación con las no inoculadas.

Wen et al. (2017) inocularon plantas de pino rojo chino (*Pinus tabuliformis* Carr.) con *P. tinctorius* y *Cenococcum geophilum* Fr. y demostraron que el nivel de micorrización dependía de las especies fúngicas utilizadas. El inóculo de *P. tinctorius* dio los mejores resultados en la acumulación de nutrientes y crecimiento de brotes de pino; los autores concluyeron que estos hongos pueden beneficiar el establecimiento de plantas en áreas contaminadas. Por último, Gómez et al. (2013) evaluaron el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* Lindl. en campo con plantas inoculadas y no inoculadas con *P. tinctorius*; la tasa de supervivencia de los pinos inoculados fue mayor (86 %) en comparación con aquellos sin inóculo (62 %).

has to explore the substrate and establish connections with tree roots; according to Agerer (2001), *P. tinctorius* and *A. hygrometricus* have long-distance exploratory capacity, which allows them to extend their hyphae a few decimeters and generate ectomycorrhizas more easily. On the other hand, the biomass of the root system of inoculated plants is related to an increase in the absorption surface, and to a higher volume of soil used by mycorrhizal plants (Halifu et al., 2019). Although root length was similar in all treatments, inoculated plants had better root biomass production than the control. Wang et al. (2021) reported higher biomass production of both shoot and root system of *P. tabuliformis* when inoculated with *Suillus variegatus* (Sw.) Kuntze. According to Arteaga-León et al. (2018), shoot biomass is related to higher photosynthetic and transpiration activity, implying good health and, consequently, a strong root system. Again, the highest values in shoot and root biomass production of *Pinus arizonica* plants were found in those inoculated with EMF.

The relationship between dry weight of shoot and root system reflects the degree of development of the plant in the greenhouse. According to the measurements, plants inoculated with EMF had ratio values higher than 1, indicating that shoot biomass was higher than in the root system; these values are within the optimal range (1.5 to 2.5) (Subira et al., 2016). In contrast, non-inoculated control plants had a ratio of 3.44 was obtained, indicating a disproportion between both parts. This reveals an insufficient root system to provide the nutrients the plant needs.

In the identification of symbiont fungi, mycorrhizal morphology is considered valuable, because this is characteristic for each host; the dominant branching type in pine ectomycorrhiza is usually bifurcate, dichotomous, coraloid or tuberculate. In other studies, identification is carried out using molecular methods (Agerer, 1991; Sulzbacher et al., 2016); however, because no EMH experiments had been performed in the greenhouse and treatments were separated from each other, cross-contaminations with other species did not occur and, therefore, molecular analysis of the ectomycorrhizas formed was not necessary.

The morphology and color of the mycorrhizas of *P. tinctorius* agree with that reported by García et al. (2006) in *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. plants; however, the morphology of the mantle reported by these authors was of the prosenchymatous type. On the other hand, the coloration was different from that reported by Valdés et al. (2010), who mentioned a whitish to slightly yellowish color in *P. devoniana* plants. In this regard, the same authors point out that the mycorrhizas of *P. tinctorius* have a whitish color when they are young

En cuanto a la colonización, los resultados del presente estudio fueron consistentes con los reportados por Garza-Ocañas et al. (2018) y Garza et al. (2022) con valores entre 60 y 80 % en raíces de especies forestales en condiciones de invernadero.

El diámetro del tallo es uno de los atributos morfológicos utilizados ampliamente para caracterizar la calidad de las plantas de vivero y se cree que está relacionado con la transferencia de agua y nutrientes, la resistencia mecánica y la robustez. También es una medida representativa de la resistencia a factores climáticos y biológicos (Sánchez-Costa et al., 2015). En el presente estudio, el diámetro del tallo se desarrolló apropiadamente en todos los tratamientos, excepto en el control.

La longitud del sistema radicular está relacionada con la capacidad de las plantas para explorar el suelo en busca de nutrientes y agua; el contenido de este elemento en el sustrato influirá en el desarrollo de las raíces. Si el agua es abundante, el crecimiento de las raíces no se estimula, pero si el agua es escasa, será necesario un sistema radicular amplio para sobrevivir (Yang et al., 2017). Otro aspecto importante es la capacidad que el sistema hifal tiene para explorar el sustrato y establecer conexiones con las raíces de los árboles; de acuerdo con Agerer (2001), *P. tinctorius* y *A. hygrometricus* cuentan con capacidad exploratoria de larga distancia, la cual les permite extender sus hifas algunos decímetros y generar ectomicorrizas con mayor facilidad. Por otra parte, la biomasa del sistema radicular de las plantas inoculadas está relacionada con aumento en la superficie de absorción, y con un mayor volumen del suelo utilizado por las plantas micorrícicas (Halifu et al., 2019). Aunque la longitud de las raíces fue similar en todos los tratamientos, las plantas inoculadas tuvieron mejor producción de biomasa radicular que el control. Wang et al. (2021) reportaron mayor producción de biomasa tanto de la parte aérea como del sistema radicular de *P. tabuliformis* cuando se inoculó con *Suillus variegatus* (Sw.) Kuntze. Según Arteaga-León et al. (2018), la biomasa aérea está relacionada con una mayor actividad fotosintética y de transpiración, lo que implica buena salud y, en consecuencia, un sistema radicular fuerte. Una vez más, los valores más altos en la producción de biomasa aérea y radical de las plantas de *Pinus arizonica* se encontraron en las inoculadas con HEM.

La relación entre el peso seco de la parte aérea y el sistema radicular refleja el grado de desarrollo de la planta en el invernadero. De acuerdo con las mediciones, las plantas inoculadas con HEM tuvieron valores superiores a 1, lo que indica que la biomasa aérea fue mayor que en el sistema radicular; estos valores están dentro del intervalo óptimo (1.5 a 2.5) (Subira et al., 2016). Por el contrario, en las plantas

and then change from beige to yellowish brown as they mature. It is inferred that after nine months of inoculation, *P. arizonica* plants would have mycorrhizae in the mature phase, which may also affect the organization of the mycelium and mantle.

Commercial inoculum has been used by authors such as Gómez et al. (2013) for restoration of *P. pseudostrobus* plantations. These authors did not characterize the mycorrhizae but observed significant changes in plant morphometric variables compared to the control. Several commercial inoculants based on EMF and used in combination with bacteria are beneficial to plants; however, inoculation studies have been conducted mainly with wild fungi (Gómez et al., 2013).

The morphology and color of the ectomycorrhizas formed by *A. hygrometricus* were similar to those reported by Fangfuk et al. (2010) on *Pinus densiflora* Siebold & Zucc.; but are different from those reported by Kaewgrajang et al. (2013) using *Astraeus odoratus* Phosri, Watling, M. P. Martín & Whalley on *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G. Don plants. It is important to mention that this tree is from tropical climates, therefore its nutritional and environmental needs are different from those of temperate forests.

The present study showed a favorable effect on growth and nutritional content of *P. arizonica*. It is possible to confirm the assimilation of N, P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn and Zn in shoot and root system. Plants grown with fungal inoculation had, in general, higher shoot and root biomass, as well as higher macro- and micronutrient contents compared to plants grown without the addition of mycorrhizae. This agrees with that reported by Rentería-Chávez et al. (2017), who found higher uptake, growth and mineral biomass in *P. greggi* plants inoculated with MEF.

Conclusions

Pinus arizonica plants inoculated with spores of *Astraeus hygrometricus* and *Pisolithus tinctorius* at various concentrations successfully formed mycorrhizae, making both ectomycorrhizal fungi (EMF) effective in establishing symbiosis. Plants inoculated with these fungi had higher height, stem diameter, and shoot and root biomass compared to non-inoculated plants. A similar trend was observed in mineral uptake and incorporation, mainly for N, Zn, Mn and Fe. The use of high doses of spores for the inoculation of *P. arizonica* plants is not necessary to obtain a good mycorrhizal colonization. Therefore, the use of a small dose of spore inoculum (10 mL; 10^6 spores·mL⁻¹) is suggested for the production of *P. arizonica* plants in greenhouses; in particular, *P. tinctorius* is recommended for having the best response in the evaluated variables.

control no inoculadas se obtuvo una proporción de 3.44, lo que indicó una desproporción entre ambas partes. Esto revela un sistema radicular insuficiente para proporcionar los nutrientes que la planta necesita.

En la identificación de hongos simbioses, la morfología de las micorrizas se considera valiosa, ya que esta es característica para cada huésped; el tipo de ramificación dominante en la ectomicorriza de pino suele ser bifurcada, dicotómica, coraloide o tuberculada. En otros estudios, la identificación se hace con métodos moleculares (Agerer, 1991; Sulzbacher et al., 2016); no obstante, debido a que en el invernadero no se habían hecho experimentos de HEM y los tratamientos fueron separados entre sí, no se produjeron contaminaciones cruzadas con otras especies y, por tanto, no fue necesario el análisis molecular de las ectomicorrizas formadas.

La morfología y el color de las micorrizas de *P. tinctorius* concuerdan con lo reportado por García et al. (2006) en plantas de *Pinus greggii* Engelm. ex Parl.; sin embargo, la morfología del manto reportada por estos autores era del tipo prosenquimatoso. Por otra parte, la coloración fue diferente a la reportada por Valdés et al. (2010), quienes mencionaron un color blanquecino a ligeramente amarillento en plantas de *P. devoniana*. Al respecto, los mismos autores señalan que las micorrizas de *P. tinctorius* presentan un color blanquecino cuando son jóvenes y que luego cambian de color beige a marrón amarillento a medida que maduran. Se infiere que después de nueve meses de inoculación, las plantas de *P. arizonica* tendrían micorrizas en fase madura, lo cual también puede afectar la organización del manto y micelio.

El inóculo comercial ha sido utilizado por autores como Gómez et al. (2013) para la restauración de plantaciones de *P. pseudostrobus*. Estos autores no caracterizaron las micorrizas, pero observaron cambios significativos en las variables morfométricas de las plantas en comparación con el control. Varios inoculantes comerciales basados en HEM y utilizados en combinación con bacterias son beneficiosos para las plantas; sin embargo, los estudios de inoculación se han llevado a cabo principalmente con hongos silvestres (Gómez et al., 2013).

La morfología y el color de las ectomicorrizas formadas por *A. hygrometricus* fueron similares a las reportadas por Fangfuk et al. (2010) en *Pinus densiflora* Siebold & Zucc.; pero son diferentes de los reportados por Kaewgrajang et al. (2013) usando *Astraeus odoratus* Phosri, Watling, M. P. Martín & Whalley en plantas de *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G. Don. Cabe mencionar que este árbol es de climas tropicales, por lo que las necesidades nutricionales y ambientales son diferentes a las de los bosques templados.

Acknowledgments

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the support of the grant (no. 452136) assigned to M. C. Liliana de Jesús Gómez Flores for her graduate studies.

End of English version

References / Referencias

- Adeleke, R., Cloete, T. E., Bertrand, A., & Khasa, D. P. (2015). Relationship between plant growth and organic acid exudates from ectomycorrhizal and non-ectomycorrhizal *Pinus patula*. *South African Journal of Plant and Soil*, 32(4), 183–188. <https://doi.org/10.1080/02571862.2015.1019376>
- Agerer, R. (1991). Characterization of ectomycorrhizae. In J. R. Norris, D. J. Read, & A. K. Varma (Eds.), *Methods in microbiology: techniques for the study of mycorrhiza* (pp. 25–73). Academic Press.
- Agerer, R. (2001). Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza*, 11(2), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s005720100108>
- Aguilar-Ulloa, W., Arce-Acuña, P., Galiano-Murillo, F., & Torres-Cruz, T. J. (2016). Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. *Revista Tecnología en Marcha*, 29, 5–14. <https://doi.org/10.18845/tm.v29i7.2700>
- Arteaga-León, C., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Victoria, D., Almaraz-Suárez, J. J., Silva-Rojas, H., & Delgado-Alvarado, A. (2018). Ectomycorrhizal inoculation with edible fungi increases plant growth and nutrient contents of *Pinus ayacahuite*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89(4), 1089–1099. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.4.2235>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). *Official methods of analysis* (15th ed.). Association Official Analytical Chemists.
- Chen, A., Gu, M., Wang, S., Chen, J., & Xu, G. (2018). Transport properties and regulatory roles of nitrogen in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 74, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.06.015>
- Fangfuk, W., Okada, K., Fukuda, M., Yamada, A., Petchang, R., & To-anun, C. (2010). *In vitro* mycorrhization of edible *Astraeus* mushrooms and their morphological characterization. *Mycoscience*, 51(3), 234–241. <https://doi.org/10.1007/S10267-009-0031-1>
- Frank, H. E. R., & Garcia, K. (2021). Benefits provided by four ectomycorrhizal fungi to *Pinus taeda* under different external potassium availabilities. *Mycorrhiza*, 31, 755–766. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01048-z>
- García, L., Pérez, J., Aldrete, A., Cetina-Alcala, V., & Vaquera-Huerta, H. (2006). Characterization of the wild ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch In culture in symbiosis with eucalypt and pine.

En el presente trabajo se observó un efecto favorable sobre el crecimiento y contenido nutricional de *P. arizonica*. Es posible confirmar la asimilación de N, P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn y Zn en el sistema radicular y la parte aérea. Las plantas cultivadas con inoculación fúngica tuvieron, en general, mayor biomasa aérea y radical, así como mayor contenido de macro y micronutrientes en comparación con las plantas cultivadas sin la adición de micorrizas. Esto concuerda con lo reportado por Rentería-Chávez et al. (2017), quienes encontraron mayor absorción, crecimiento y biomasa mineral en plantas de *P. greggi* inoculadas con HEM.

Conclusiones

Las plantas de *Pinus arizonica* inoculadas con esporas de *Astraeus hygrometricus* y *Pisolithus tinctorius* a varias concentraciones formaron micorrizas exitosamente, por lo que ambos hongos ectomicorrícicos (HEM) son efectivos para establecer simbiosis con el pino. Las plantas inoculadas con estos hongos tuvieron altura, diámetro del tallo y biomasa aérea y radical mayores en comparación con las plantas no inoculadas. Una tendencia similar se observó en la absorción e incorporación de minerales, principalmente para N, Zn, Mn y Fe. El uso de dosis altas de esporas para la inoculación de las plantas de *P. arizonica* no es necesario para obtener una buena colonización micorrícica. Por lo anterior, se sugiere el uso de una dosis pequeña de inóculo de esporas (10 mL; 10^6 esporas·mL⁻¹), para la producción de plantas de *P. arizonica* en invernaderos; en particular, se recomienda el HEM *P. tinctorius* por tener la mejor respuesta en las variables evaluadas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo en beca de manutención (número 452136) asignada a la M. C. Liliana de Jesús Gómez Flores para sus estudios de posgrado.

Fin de la versión en español

- Agrociencia*, 40(5), 665–676. https://www.researchgate.net/publication/287563410_Characterization_of_the_wild_ectomycorrhizal_fungus_Pisolithus_tinctorius_Pers_Coker_et_couch_in_culture_and_in_symbiosis_with_eucalypt_and_pine
- Garza, O. F., Quiñonez, M. M., Guevara, G. G., Carrillo-Parra, A., De La Fuente, J. I., & García, J. J. (2022). Growth responses of *Quercus fusiformis* (Fagaceae) to ectomycorrhizal inoculation with *Boletus luridellus*. *Österr. Z. f. Pilzkunde*, 29, 193–202. https://www.myk.univie.ac.at/wp-content/uploads/2022/04/OZP29_Fortunato_Boletus_luridellus.pdf
- Garza-Ocañas, F., García-Jiménez, J., Quiñonez-Martínez, M., Guevara-Guerrero, G., Valenzuela-Garza, R., Carrillo-

- Parra, A., Sánchez-Castillo, L. R. M., Villalón-Mendoza, H., & García Aranda, M. A. (2018). *Boletus luridellus* (Murr.) Murrill y *Quercus fusiformis* Small: cultivo, síntesis de micorrizas y producción de esporomas en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9(50), 361–378. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i50.238>
- Gómez, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C., & Lindig-Cisneros R. (2013). Effect of mycorrhization in the establishment of *Pinus pseudostrubus* in gullies. *Madera y Bosques*, 19(3), 51–63. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1405-04712013000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- GraphPad Software, Inc. (2018). GraphPad Prism version 8.0. <https://www.graphpad.com/guides/prism/8/user-guide/index.htm>
- Halifu, S., Deng, X., Song, X., & Song, R. (2019). Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* annual seedlings. *Forests*, 10(9), 758. <https://doi.org/10.3390/f10090758>
- IBM Corporation (2011). *IBM SPSS Statistics for Windows, version 20.0*. IBM Corp.
- Jung, S. C., Martínez-Medina, A., López-Ráez, J., & Pozo, M. (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 651–64. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>
- Kaewgrajang, T., Sangwanit, U., Iwase, K., Kodama, M., & Yamato, M. (2013). Effect of ectomycorrhizal fungus *Astraeus odoratus* on *Dipterocarpus alatus* seedlings. *Journal of Tropical Forest Science*, 25(2), 200–205. <https://www.frim.gov.my/v1/JTFOnline/jtfs/v25n2/200-205.pdf>
- Kayama, M., & Yamanaka, T. (2014). Growth characteristics of ectomycorrhizal seedlings of *Quercus glauca*, *Quercus salicina*, and *Castanopsis cuspidata* planted on acidic soil. *Trees*, 28(2), 569–583. <https://doi.org/10.1007/s00468-013-0973-y>
- Konopická, J., Bohatá, A., Nermuť, J., Jozová, E., Mráček, Z., Palevsky, E., & Zemek, R. (2021). Efficacy of soil isolates of entomopathogenic fungi against the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae). *Systematic and Applied Acarology*, 26(6), 1149–1167. <https://doi.org/10.11158/saa.26.6.11>
- Maltz, M. R., Chen, Z., Cao, J., Arogyaswamy, K., Shulman, H., & Aronson, E. L. (2019). Inoculation with *Pisolithus tinctorius* may ameliorate acid rain impacts on soil microbial communities associated with *Pinus massoniana* seedlings. *Fungal Ecology*, 40, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.11.011>
- Marqués-Gálvez, J. E., Veneault-Fourrey, C., & Kohler, A. (2022). Ectomycorrhizal symbiosis: from genomics to transkingdom molecular communication and signaling. In B. A. Horwitz, & P. K. Mukherjee (Eds.), *Microbial cross-talk in the rhizosphere* (pp. 273–296). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9507-0_11
- Monroy-Vázquez, M. E., Peña-Valdivia, C. B., García-Nava, J. R., Solano-Camacho, E., Campos, H., & García-Villanueva, E. (2017). Imbibición, viabilidad y vigor de semillas de cuatro especies de *Opuntia* con grado distinto de domesticación. *Agrociencia*, 51(1), 27–42. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n1/1405-3195-agro-51-01-00027.pdf>
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Morales-Nieto, C. R., Siqueiros-Candia, M., Álvarez-Holguín, A., Gil-Vega, K. D. C., Corrales-Lerma, R., & Martínez-Salvador, M. (2021). Diversidad, estructura genética e hibridación en poblaciones de *Pinus arizonica* y *P. durangensis*. *Madera y Bosques*, 27(2), e2722170. <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2722170>
- Ortega, P. (2015). El suelo: hábitat de interacciones maravillosas. *CONABIO Biodiversitas*, 122, 10–13. <https://studylib.es/doc/5005310/el-suelo-h%C3%A1bitat-de-interacciones-maravillosas> <http://www.telematica.ccadet.unam.mx/antologias/medio/presentacion/pdf/ANTOLOGIAS%20REALCIONES%20biodiv122art3.pdf>
- Pérez-López, R. I., González-Espinosa, M., Ramírez-Marcial, N., Pérez-Moreno, J., & Toledo-Aceves, T. (2021). Forest management effects on the ectomycorrhizal macromycete community in tropical montane forests in Mexico. *Forest Ecology and Management*, 501, 119670. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119670>
- Prado-Tarango, D. E., Mata-González, R., Hovland, M., & Schreiner, R. P. (2021). Assessing commercial and early-seral arbuscular mycorrhizal fungi inoculation to aid in restoring sagebrush steppe shrubs. *Rangeland Ecology & Management*, 79, 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.rama.2021.08.001>
- Prophet, E., Mills, B., Arrington, J., & Sobin, L. H. (1995). *Métodos histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América.
- 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 ectomicorrícicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.004>
- Sáenz-Romero, C. (2014). *Guía técnica para la planeación de la reforestación adaptada al cambio climático*. Comisión Nacional Forestal. <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/19/6688Guía%20Técnica%20para%20la%20Planeación%20de%20la%20Reforestación.pdf>
- Sánchez-Costa, E., Poyatos, R., & Sabaté, S. (2015). Contrasting growth and water use strategies in four co-occurring Mediterranean tree species revealed by concurrent measurements of sap flow and stem diameter variations. *Agricultural and Forest Meteorology*, 207, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2015.03.012>
- Sebastiania, M., Corrêa, A., Castro, P., & Ramos, M. (2020). *Pisolithus*. In N. Amaresan, M. Senthil-Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial microbes in agro-ecology* (pp. 707–726). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-00594-3>

- Sebastiania, M., da Silva, A. B., Matos, A. R., Alcántara, A., Silvestre, S., & Malhó, R. (2018). Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* reduces stress induced by drought in cork oak. *Mycorrhiza*, 28(3), 247–258. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0823-2>
- Sharma, Y. P., Watpade, S., & Thakur, J. S. (2014). Role of mycorrhizae: A component of integrated disease management strategies. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 44(1), 12–20. https://www.researchgate.net/publication/261008072_Role_of_Mycorrhizae_A_Component_of_Integrated_Disease_Management_Strategies
- Silva-Flores, R., Pérez-Verdín, G., & Wehenkel, C. (2014). Patterns of tree species diversity in relation to climatic factors on the Sierra Madre Occidental, Mexico. *PLoS ONE*, 9(8), e105034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105034>
- Smits, M. M., & Wallander, H. (2017). Role of mycorrhizal symbiosis in mineral weathering and nutrient mining from soil parent material. In N. Collins-Johnson, C. Gehring, & J. Jansa (Eds.), *Mycorrhizal mediation of soil* (pp. 35–46). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804312-7.00003-6>
- Subira, J., Ammar, K., Álvaro, F., García del Moral, L. F., Dreisigacker, S., & Royo, C. (2016). Changes in durum wheat root and aerial biomass caused by the introduction of the Rht-B1b dwarfing allele and their effects on yield formation. *Plant and Soil*, 403(1), 291–304. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2781-1>
- Sulzbacher, M. A., Grebenc, T., García, M. Á., Silva, B. D., Silveira, A., Antonioli, Z. I., Marinho, P., Münzenberger, B., Telleria, M. T., Baseia, L. G., & Martín, M. P. (2016). Molecular and morphological analyses confirm *Rhizopogon verii* as a widely distributed ectomycorrhizal false truffle in Europe, and its presence in South America. *Mycorrhiza*, 26(5), 377–388. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0678-8>
- Tateishi, T., Yokoyama, K., Kohno, N., Okabe, H., & Marumoto, T. (2003). Estimation of mycorrhizal colonization of the roots of oak seedlings inoculated with an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystea*. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(4), 641–645. <https://doi.org/10.1080/00380768.2003.10410054>
- Tiessen, H., & Moir, J. O. (1993). Characterization of available P by sequential extraction. In M. R. Carter (Ed.), *Soil sampling and methods of analysis*. Taylor & Francis Group.
- Valdés, M., Ambriz, E., Camacho, A., & Fierros, A.M. (2010). Pine seedling inoculation with different fungi and visual identification of ectomycorrhizae. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(1), 53–64. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v1i2.637>
- Walker, J. K. M., & Jones, M. D. (2013). Little evidence for niche partitioning among ectomycorrhizal fungi on spruce seedlings planted in decayed wood versus mineral soil microsites. *Oecologia*, 173, 1499–1511. <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2713-9>
- Wang, F. (2017). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in mining-impacted sites and their contribution to ecological restoration: Mechanisms and applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(20), 1901–1957. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1400853>
- Wang, J., Zhang, H., Gao, J., Zhang, Y., Liu, Y., & Tang, M. (2021). Effects of ectomycorrhizal fungi (*Suillus variegatus*) on the growth, hydraulic function, and non-structural carbohydrates of *Pinus tabulaeformis* under drought stress. *BMC Plant Biology*, 21(1), 1–13. doi: 10.1186/s12870-021-02945-3
- Wen, Z., Shi, L., Tang, Y., Shen, Z., Xia, Y., & Chen, Y. (2017). Effects of *Pisolithus tinctorius* and *Cenococcum geophilum* inoculation on pine in copper-contaminated soil to enhance phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 19(4), 387–394. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1244155>
- Yang, M., Défossez, P., Danjon, F., Dupont, S., & Fourcaud, T. (2017). Which root architectural elements contribute the best to anchorage of *Pinus* species? Insights from in silico experiments. *Plant and Soil*, 411(1), 275–291. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2992-0>
- Yin, D., Song, R., Qi, J., & Deng, X. (2018). Ectomycorrhizal fungus enhances drought tolerance of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seedlings and improves soil condition. *Journal of Forestry Research*, 29(6), 1775–1788. doi: 10.1007/s11676-017-0583-4