



## Nota de Investigación / Research Note

# Respuesta a la inoculación inducida de *Russula delica* Fr. en plantas de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero

## Response to induced *Russula delica* Fr. inoculation in *Pinus engelmannii* Carr. plants in the nursery

Laura Elena Martínez Nevárez<sup>1</sup>, Homero Sarmiento López<sup>2</sup>, José Ángel Sigala Rodríguez<sup>2</sup>, Sergio Rosales Mata<sup>2</sup> y José Bernardo Montoya Ayón<sup>1</sup>

### Resumen

La micorriza es la simbiosis a través de la cual se establece un intercambio de nutrientes minerales y carbohidratos entre miembros de los reinos Fungi y Vegetal. Su presencia es uno de los parámetros morfológicos para evaluar la calidad de la planta forestal producida en vivero. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la inoculación inducida de *Russula delica* sobre planta de *Pinus engelmannii* producida en vivero. Los esporomas fueron recolectados en un bosque de pino-encino y la preparación del inoculante se llevó a cabo en condiciones controladas, para su posterior utilización. Se evaluaron dos métodos de aplicación (en sustrato y en riego) y cuatro dosis de inoculante (0, 0.75, 1.50 y 2.25 g por charola) El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de los tratamientos. Las variables de respuesta fueron: diámetro del cuello de la raíz, biomasa seca de la raíz, índice de calidad de Dickson (ICD) y el porcentaje de micorrización (PM). El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos. Los mejores resultados en las variables morfológicas se obtuvieron con la inoculación en riego a una dosis baja. El mayor PM se presentó en el tratamiento de inoculación en sustrato con una dosis alta, con diferencias altamente significativas sobre el testigo.

**Palabras clave:** Calidad de planta forestal, ectomicorriza, inoculante ectomicorrízico, planta en vivero, porcentaje de micorrización, *Pinus engelmannii* Carr.

### Abstract

The mycorrhiza is the symbiosis through which an exchange of mineral nutrients and carbohydrates is established between members of the Fungi and Vegetal kingdoms. Its presence is one of the morphological parameters to evaluate the quality of the forest plant grown in nursery. The objective of the present paper was to determine the effect of the induced inoculation with *Russula delica* on *Pinus engelmannii* plants grown in nursery. Sporomes were collected in a pine-oak forest, and the inoculum was prepared under controlled conditions for subsequent utilization. Two application methods (in substrate and in irrigation water) and four doses of the inoculum (0, 0.75, 1.50 and 2.25 g per tray) were evaluated. The experimental design was completely random, with factorial treatment arrangement. The response variables were: root neck diameter, dry root biomass, Dickson's quality index (QI), and mycorrhiza percent infection (MP). The variance analysis showed significant differences between treatments. The best results for the morphological variables were obtained with inoculation in irrigation water at a low dose. The highest MP occurred in the substrate inoculation treatment with a high dose, with highly significant differences in relation to the control.

**Key words:** Forest plant quality, ectomycorrhiza, ectomycorrhizal inoculum, plant grown in nursery, mycorrhiza percent infection, *Pinus engelmannii* Carr.

Fecha de recepción/Date of receipt: 15 de octubre de 2015; Fecha de aceptación /Date of acceptance: 14 de diciembre de 2015.

<sup>1</sup> Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, México. Correo-e: laura.elena.mn@gmail.com

<sup>2</sup> Campo experimental Valle del Guadiana, CIR-Norte Centro, INIFAP, México.

La micorriza es la asociación simbiótica que existe entre las raíces de una planta y miembros del reino Fungi, mediante la cual se lleva un intercambio de nutrientes minerales y carbohidratos derivados de la fotosíntesis (Brundrett *et al.*, 1996). En esta interacción ecológica, el micelio del hongo, mediante su red extensa de hifas contribuye en la función de la raíz para aprovechar y asimilar eficientemente los nutrimentos minerales del suelo (Alarcón y Ferrera, 2000).

Existen varios tipos, entre ellos, la ectomicorriza se presenta, principalmente, en especies de coníferas y algunas latifoliadas como los encinos (Landis y Amaranthus, 2009; García *et al.*, 2012). Su existencia mejora los sistemas radicales, en particular las raíces finas, donde se lleva a cabo la mayor absorción de nutrientes (Simard *et al.*, 2002). Lo anterior se correlaciona con la supervivencia y el crecimiento de las plantas durante los primeros años, después de su establecimiento en campo, sobre todo en sitios degradados (Ortega *et al.*, 2004; Menkis *et al.*, 2007).

En los últimos años, la inoculación inducida de hongos para la formación de ectomicorizas es una práctica que se ha implementado en la producción de planta en viveros forestales (Rodríguez, 2008); incluso, la existencia de ectomicorizas es un criterio para evaluar la calidad de planta destinada a los programas de reforestación (SE, 2014). Sin embargo, esta actividad genera un esfuerzo y costos adicionales durante la producción (Menkis *et al.*, 2005); por ello, es necesario definir los taxa fúngicos con mayor capacidad de colonización, así como las dosis óptimas de inoculación y los métodos de aplicación más eficientes.

Los hongos del género *Russula* forman ectomicorizas, de manera natural, en los bosques de pino-encino (Matabuena, 2005). En el estado de Durango, *Russula* spp. se desarrolla en las mismas áreas de distribución de *Pinus engelmannii* Carr., el cual es un *taxon* de importancia comercial y muy reproducido en vivero para los programas de reforestación (Bustamante *et al.*, 2012; Sigala *et al.*, 2015). Los objetivos del estudio que se documenta fueron determinar el efecto de la inoculación inducida con *Russula delica* Fr. sobre la calidad morfológica de la planta de *Pinus engelmannii*, y definir si es posible establecer una asociación entre ambas especies en condiciones de vivero para, en su caso, determinar la dosis y método de aplicación que promueva una mejor micorrización.

## Recolecta y preparación del material fúngico

Los esporomas de *Russula delica* se obtuvieron de un bosque de pino-encino del municipio Pueblo Nuevo, Durango, sobre las coordenadas 23°44.89' N y 105°32.27' O y una altitud de 2 836 m. El material fue transportado en hieleras al vivero forestal del Campo Experimental Valle del Guadiana del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y

The mycorrhiza is the symbiotic association existing between the roots of a plant and members of the Fungi kingdom through which an exchange of mineral nutrients and carbohydrates derived from the photosynthesis takes place (Brundrett *et al.*, 1996). In this ecological interaction, the fungus mycelium contributes, through its extensive hyphae network, to the root's function of efficiently absorbing and assimilating the mineral nutrients from the soil (Alarcón and Ferrera, 2000).

There are various types, including the ectomycorrhiza, which occurs mainly in conifer species, as well as in some broadleaves like oaks (Landis and Amaranthus, 2009; García *et al.*, 2012). Their existence improves the root systems, particularly fine roots, through which most of the absorption of nutrients takes place (Simard *et al.*, 2002). This is related to the survival and growth of the plants during the first years, after their establishment in field, especially in degraded sites (Ortega *et al.*, 2004; Menkis *et al.*, 2007).

In recent years, the practice of induced inoculation with fungi in order to form ectomycorrhizae has been implemented in plant production in forest nurseries (Rodríguez, 2008); furthermore, the existence of ectomycorrhizae is a criterion for the assessment of the quality of the plant destined for reforestation programs (SE, 2014). However, this activity generates additional effort and costs during production (Menkis *et al.*, 2005) for this reason, the fungal taxa with the highest colonization capacity, the optimal doses and the most effective application methods must be identified.

The fungi of the *Russula* genus naturally form ectomycorrhizae in pine-oak forests (Matabuena, 2005). In the state of Durango, *Russula* spp. develops in the same distribution areas as *Pinus engelmannii* Carr., a commercially significant taxon abundantly reproduced in nurseries for reforestation programs (Bustamante *et al.*, 2012; Sigala *et al.*, 2015). The objectives of the study documented herein were to determine the effect of induced inoculation with *Russula delica* Fr. on the morphological quality of the *Pinus engelmannii* plant and to define whether or not an association between both species under nursery conditions may be established in order to determine, where applicable, the dose and application method that will promote better mycorrhiza infection.

## Collection and preparation of the fungal material

The *Russula delica* sporomes were obtained in a pine-oak forest in the municipality of Pueblo Nuevo, Durango, at the coordinates 23°44.89' N and 105°32.27' W and at an altitude of 2 836 m. The material was transported in ice boxes to the forest nursery of the Valle del Guadiana Experimental Station of INIFAP in Durango, Dgo. (23°44.39' N - 104°37.42' W, 1 879 m). The material was cleaned, dissected in pieces of homogenous size, and placed in a solar dehydrator at a temperature of

Pecuarías (INIFAP), localizado en Durango, Dgo. (23°44.39' N - 104°37.42' O, altitud de 1 879 m). El material se limpió, diseccionó en trozos de tamaño homogéneo y se colocó en un deshidratador solar a una temperatura de 35 °C, hasta alcanzar una consistencia crujiente. A continuación, se molió en un molino eléctrico *Thomas Model 4 Wiley® Mill* para forraje y se pasó por un tamiz de 1 mm para uniformizar la granulometría.

La presencia de esporas, se verificó en una suspensión preparada con 0.1 g de los esporomas molidos en Polisorbato 80 al 0.1 %, se agitó con ayuda de un bortex, durante un minuto y se hicieron observaciones en microscopio óptico *American Optical® One Ten Micro Star* (40x). El número de esporas se contabilizó en una cámara de *Neubauer*. La cantidad promedio fue de  $162 \times 10^6$  esporas por gramo.

### Producción de planta

Se llevó a cabo en el vivero forestal del Campo Experimental Valle del Guadiana (INIFAP). La mezcla de sustrato utilizada consistió en 50 % de turba, 40 % de corteza de pino compostada y 10 % de perlita expandida; y se agregó fertilizante de liberación controlada (8 meses de liberación, 18-6-12 N-P-K + microelementos), en una proporción de 4 kg m<sup>-3</sup> de sustrato, la cual es una dosis, generalmente, usada para la producción de *Pinus engelmannii* en los viveros forestales del estado de Durango. Los contenedores fueron charolas de poliestireno de 77 cavidades (162 mL por cavidad), mismas que se desinfectaron con una solución de cloro al 10 % e impregnaron con sulfato de cobre (4 kg por 100 L de agua).

La siembra se realizó en octubre de 2013; previamente, la semilla fue remojada en agua durante 24 horas y desinfectada con cloro al 10 % por 15 minutos. Una vez establecida la germinación, se aplicaron riegos cada tercer día. Asimismo, se aplicaron fertilizantes hidrosolubles dos veces por semana a razón de 1 g L<sup>-1</sup> de agua, de acuerdo a las prácticas convencionales para la producción de planta de pino. En los tres primeros meses se suministró la fórmula 7-40-19 (N-P-K), en los siguientes seis meses se adicionó la fórmula 20-10-20 (N-P-K) y en los últimos tres meses 4-25-35 (N-P-K).

### Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron dos métodos de aplicación (en sustrato y en riego) y cuatro dosis de inculante (0, 0.75, 1.50 y 2.25 g por charola) (Cuadro 1). La dosis baja se estimó con base en la inoculación de 100 000 plantas con 1 kg de material inculante, a partir de esto se calcularon las dosis media y alta, duplicándola y triplicándola, respectivamente. El diseño experimental fue al azar, con un arreglo factorial de los tratamientos 2 x 4 (dos métodos de aplicación y cuatro dosis). Por cada tratamiento se hicieron cuatro repeticiones, cada una de ellas correspondió a una charola con 77 plantas.

35 °C until it reached a crisp consistency. Subsequently, it was ground in a *Thomas Model 4 Wiley® Forage Mill* and passed through a 1 mm sieve in order to homogenize the grain size.

The presence of spores in a suspension prepared with 0.1 g of ground sporomes in Polysorbate-80 at 0.1 % was verified; this suspension was stirred with a Bortex mixer for one minute and observed through an *American Optical® Microstar One-Ten* microscope (40x). The spores were counted using a *Neubauer* chamber. The average number was  $162 \times 10^6$  spores per gram.

### Plant production

The plants were grown in the forest nursery of the *Valle del Guadiana* Experimental Station (INIFAP). The substrate mixture utilized consisted of 50 % peat moss, 40 % composted pine bark, and 10 % expanded perlite; controlled-release fertilizer was added (8 month release, 18-6-12 N-P-K + microelements), in a proportion of 4 kg m<sup>-3</sup> of substrate, a dose generally used for growing *Pinus engelmannii* in the forest nurseries of the state of *Durango*. The containers were polystyrene trays with 77 cavities (162 mL per cavity), disinfected with a 10 % chlorine solution and impregnated with copper sulfate (4 kg in 100 L water).

The seeds, previously soaked in water for 24 hours and disinfected with a 10 % chlorine solution during 15 minutes, were planted in October 2013. Once the germination was established, the seedlings were watered every other day. Furthermore, hydrosoluble fertilizers were applied twice a week in a proportion of 1 g L<sup>-1</sup> water, according to the conventional practices for pine plant production. During the first three months, the NPK 7-40-19 fertilizer was administered; the NPK 2010-20 formula was added in the course of the subsequent months, and the NPK 4-25-35 formula, during the last three months.

### Treatments and experimental design

Two application methods (in substrate and in irrigation water) and four doses of inoculum (0, 0.75, 1.50 and 2.25 g per tray) were evaluated (Table 1). The low dose was calculated based on the inoculation of 100 000 plants with 1 kg inoculum; medium and high doses were determined by duplicating and triplicating the low dose, respectively. The experimental design was random, with a 2 x 4 factorial treatment arrangement (two application methods and four doses). For each treatment four repetitions were carried out, each in a tray with 77 plants.



Cuadro 1. Tratamientos de inoculación inducida con *Russula delica* Fr. evaluados en plantas de *Pinus engelmannii* Carr.

Tratamiento	Método de aplicación	Dosis de inoculante
1	Sustrato*	Sin aplicar (0.00 g)
2	Sustrato	Baja (0.75 g)
3	Sustrato	Media (1.50 g)
4	Sustrato	Alta (2.25 g)
5	Riego**	Sin aplicar (0.00 g)
6	Riego	Baja (0.75 g)
7	Riego	Media (1.50 g)
8	Riego	Alta (2.25 g)

\*Aplicación durante la preparación del sustrato. \*\*Dividido en tres aplicaciones (42, 135 y 198 días después de la siembra).

### Variables de respuesta y análisis estadístico

A los 12 meses (358 días) después de la siembra, se realizó un muestreo destructivo en el que se extrajeron cuatro plantas seleccionadas al azar, en cada repetición, para evaluar las variables morfológicas: diámetro del cuello de la raíz (mm), biomasa seca de la raíz (g) y el índice de calidad de Dickson (ICD) (Dickson *et al.*, 1960). Además, se calculó el porcentaje de micorrización en la raíz, mediante el método de Grand y Harvey (Carrera y López, 2004) que consiste en determinar la relación del número de raíces con micorrizas entre el número total de raíces, multiplicado por 100.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \eta_j + (\tau\eta_{ij}) + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- $Y_{ij}$  = Variable de respuesta
- $\mu$  = Efecto medio general
- $\tau_i$  = Efecto atribuido al  $i$ -ésimo método de aplicación
- $\eta_j$  = Efecto atribuido a la  $j$ -ésima dosis de inoculante
- $\tau\eta_{ij}$  = Interacción entre el método de aplicación y dosis de inoculante
- $\varepsilon_{ij}$  = Término de error aleatorio

En el caso de las variables que tuvieron diferencias significativas a una probabilidad de 95 %, se efectuó una comparación múltiple de medias con prueba de Tukey. El análisis estadístico se realizó con el procedimiento GLM de SAS versión 9.3 (2009).

El análisis de varianza evidenció diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los métodos de aplicación y entre dosis de inoculante para todas las variables morfológicas evaluadas.

Table 1. Induced inoculation treatments with *Russula delica* Fr. evaluated in *Pinus engelmannii* Carr. plants.

Treatment	Application method	Dose of inoculum
1	Substrate*	Not applied (0.00 g)
2	Substrate	Low (0.75 g)
3	Substrate	Medium (1.50 g)
4	Substrate	High (2.25 g)
5	Irrigation**	Not applied (0.00 g)
6	Irrigation	Low (0.75 g)
7	Irrigation	Medium (1.50 g)
8	Irrigation	High (2.25 g)

\*Application during the preparation of the substrate. \*\*Divided into three applications (42, 135 and 198 days after planting).

### Response variables and statistical analysis

Two months (358 days) after planting, destructive sampling was carried out, with the extraction of four plants selected at random in each repetition, in order to evaluate the morphological variables: root neck diameter (mm), dry root biomass (g), and Dickson quality index (QI) (Dickson *et al.*, 1960). In addition, the root mycorrhiza percent infection was estimated using Grand and Harvey method (Carrera and López, 2004), which consists in determining the ratio of the number of roots with mycorrhiza infection to the total number of roots multiplied by 100.

The data were subjected to a variance analysis, previously verifying the normalcy assumption and variance homogeneity. The following statistical model was utilized:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \eta_j + (\tau\eta_{ij}) + \varepsilon_{ij}$$

Where:

- $Y_{ij}$  = Response variable
- $\mu$  = Mean general effect
- $\tau_i$  = Effect ascribed to the  $i^{\text{th}}$  application method
- $\eta_j$  = Effect ascribed to the  $j^{\text{th}}$  a dose of inoculum
- $\tau\eta_{ij}$  = Interaction between the application method and the dose of inoculum
- $\varepsilon_{ij}$  = Term of random error

In the case of the variables that had significant differences with a 95 % probability, a multiple mean comparison was carried out with Tukey's test. The statistical analysis was performed using the GLM procedure of the SAS 9.3 software (2009).

The variance analysis evidenced significant differences ( $p < 0.05$ ) between application methods and between doses of inoculum for all the assessed morphological variables. The percentage of mycorrhization displayed highly significant

El porcentaje de micorrización presentó diferencias altamente significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los métodos de aplicación, las dosis y sus interacciones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de  $p$  de los análisis de varianza para el efecto de la inoculación sobre la variables de calidad de planta de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero.

Factor	Diámetro	BSR	ICD	PM
Método de aplicación (A)	0.0049	0.0043	0.0015	<0.0001
Dosis de inoculante (D)	0.0086	0.0024	0.0026	<0.0001
A x D	0.3396	0.0987	0.1310	0.0001

BSR=Biomasa seca de raíz; ICD = Índice de Calidad de Dickson; PM = Porcentaje de micorrización.

Las variables morfológicas de calidad de planta, diámetro al cuello de la raíz, biomasa seca de la raíz e índice de calidad de Dickson (ICD) registraron promedios mayores con la aplicación en riego; no obstante su respuesta difirió, debido a las dosis del inoculante. El diámetro del cuello de la raíz fue mayor en el testigo, con diferencias significativas en comparación con la dosis alta; en cambio, para la biomasa anhidra de la raíz e ICD, el tratamiento con mejores resultados fue la dosis baja, con diferencias significativas sobre las media y alta, así como con el testigo (Cuadro 3).

En todos los tratamientos, se obtuvieron promedios de diámetro mayores de 6.0 mm; valores que representan un buen indicador de calidad de planta, ya que, de acuerdo con lo recomendado por Prieto *et al.* (2009), las plantas con diámetro superior a 5 mm son más resistentes al doblamiento y toleran mejor los daños por plagas y fauna nociva; además, el diámetro define la robustez del tallo y se relaciona directamente con el vigor y supervivencia de las plantas en campo.

Cuadro 3. Valores de  $p$  de los análisis de varianza para el efecto de la inoculación con *Russula delica* Fr. sobre la variables de calidad de planta de *Pinus engelmannii* Carr.

Factor	Nivel	Diámetro	BSR	ICD
Método de aplicación	Riego	6.5 A	1.22 A	1.24 A
	Sustrato	6.1 B	1.10 B	1.08 B
Dosis de inoculante	0.00 g	6.6 a	1.14 b	1.15 b
	0.75 g	6.2 ab	1.30 a	1.32 a
	1.50 g	6.4 a	1.11 b	1.13 b
	2.25 g	6.0 b	1.09 b	1.05 b

BSR = Biomasa seca de raíz; ICD = Índice de Calidad de Dickson. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre niveles de cada factor, mediante, la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

differences ( $p < 0.0001$ ) between application methods, the doses and their interactions (Table 2).

Table 2.  $P$  values of the variance analysis for the effect of inoculation on the quality of the *Pinus engelmannii* Carr. plants grown in nursery.

Factor	Diameter	DRB	QI	MP
Application method (A)	0.0049	0.0043	0.0015	<0.0001
Dose of inoculum (D)	0.0086	0.0024	0.0026	<0.0001
A x D	0.3396	0.0987	0.1310	0.0001

DRB = Dry root biomass; QI = Dickson's Quality Index; MP = Mycorrhiza percent infection.

The morphological variables of the plant quality, root neck diameter, dry root biomass and Dickson quality index (QI) registered higher averages with the application in irrigation water; however, their response differed according to the dose of the inoculum. The root neck diameter was larger in the control, with significant differences compared to the high dose. Conversely, for the anhydrous biomass of the root and QI; the treatment with the best results was the low dose, with significant differences in relation to the medium and high doses, as well as to the control (Table 3).

In all the treatments, average diameters were estimated to be above 6.0 mm; these values are a good indicator of the quality of the plant, as, according to the recommendations of Prieto *et al.* (2009), plants with a diameter larger than 5 mm are more resistant to bending and tolerate the damages due to pests and noxious fauna better. Furthermore, the diameter determines the robustness of the stem and is directly related to the vigor and survival rate of the plants in the field.

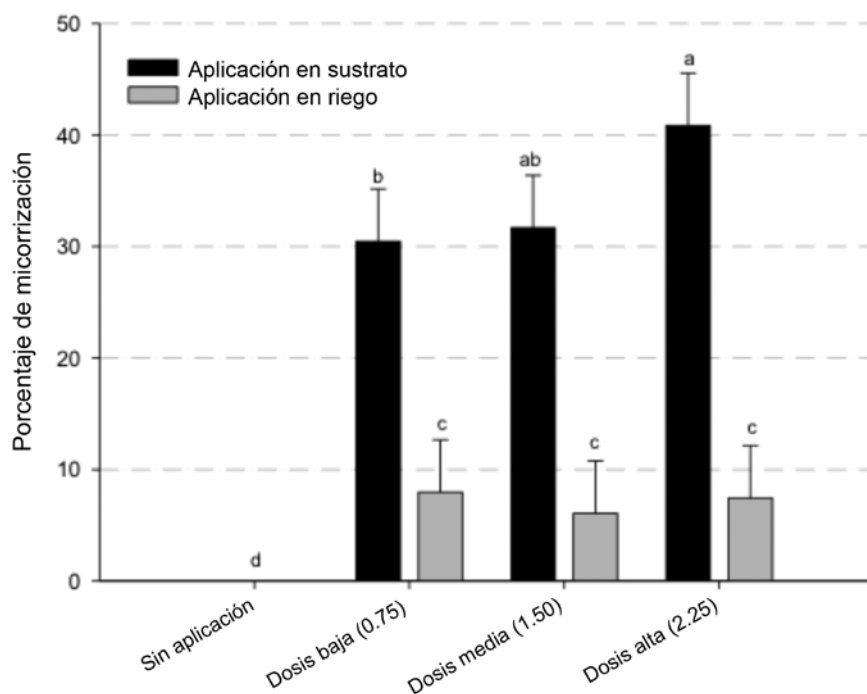
Table 3.  $P$  values of the variance analyses for the effect of inoculation with *Russula delica* Fr. on the quality variables of the *Pinus engelmannii* Carr.

Factor	Level	Diameter	DRB	QI
Application method	Irrigation water	6.5 A	1.22 A	1.24 A
	Substrate	6.1 B	1.10 B	1.08 B
Dose of inoculum	0.00 g	6.6 a	1.14 b	1.15 b
	0.75 g	6.2 ab	1.30 a	1.32 a
	1.50 g	6.4 a	1.11 b	1.13 b
	2.25 g	6.0 b	1.09 b	1.05 b

DRB = Dry root biomass; QI = Dickson's Quality Index. Different letters in the same column indicate significant differences between levels of each factor using Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

El porcentaje de micorrización más alto se observó cuando se inoculó el sustrato, con diferencias altamente significativas sobre el riego. Esta variable se incrementó a medida que aumentó la dosis del inoculante, con altas diferencias sobre el testigo. También, se evidenció un efecto significativo de la interacción entre el método de aplicación y la dosis del inoculante, lo cual indica que la respuesta inducida por la dosis de inoculante dependerá de cómo se suministre. En la Figura 1 se aprecia que para el riego, cuyos valores de micorrización varían de 6.1 a 7.9 %, la dosis de inoculante no presenta diferencias significativas; sin embargo, para el sustrato, los porcentajes (30.1 a 40.8 %) variaron significativamente en función de la dosis utilizada.

The highest mycorrhiza percent infection was observed after inoculation of the substrate, with highly significant differences with regard to application in irrigation water. This variable increased with the dose of inoculum, with high differences in relation to the control. Likewise, a significant effect of the interaction between the application method and the dose of inoculum was evident, an indication that the response induced by the dose of inoculum will depend on how this is administered. Figure 1 shows that the dose of inoculum does not show significant differences when applied in irrigation water, with mycorrhization values ranging from 6.1 to 7.9 %; however, when applied in the substrate, the mycorrhiza percent infections varied significantly (30.1 to 40.8 %) according to the dose utilized.



Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, determinadas mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Different letters indicate significant differences between treatments, determined using Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

Figura 1. Porcentaje de micorrización en plantas de *Pinus engelmannii* Carr. en respuesta a la inoculación inducida con *Russula delica* Fr.

Figure 1. Mycorrhiza percent infection in *Pinus engelmannii* Carr. plants in response to induced inoculation with *Russula delica* Fr.

Los resultados mostraron una tendencia a disminuir la calidad de planta a medida que se aumentaron las dosis de inoculante, principalmente el diámetro al cuello de la raíz. En contraparte, Montes *et al.* (2001) en un estudio similar citan mayor diámetro en plantas de *P. engelmannii* inoculadas con *Glomus intraradices* N. C. Schenck & G. S. Sm., hongo que forma micorriza arbuscular, en comparación con aquellas que no fueron inoculadas; sin embargo, Chilvers *et al.* (1987) consideran que las ectomicorizas tienen mejor capacidad que las arbusculares para efectuar inoculaciones secundarias debido a su propagación por hifas a través de las raíces.

The results showed a tendency to reduce the plant quality – particularly the root neck diameter – as the doses of inoculum increased. Conversely, Montes *et al.* (2001) cite, in a similar study, larger diameters in *P. engelmannii* plants inoculated with *Glomus intraradices* N. C. Schenck & G. S. Sm., a fungus forming arbuscular mycorrhiza, compared to those that were not inoculated. However, according to Chilvers *et al.* (1987), ectomycorrhizae have a better capacity than arbuscular mycorrhiza to effect secondary inoculations because of their propagation across the roots through hyphae.

Por otra parte, la biomasa de la raíz se incrementó cuando se inoculó con una dosis baja, en comparación con el testigo, lo cual se atribuye a que la micorriza modifica la raíz e incrementa el peso seco (Hernández y Salas, 2009), lo que se considera un buen indicador, ya que las plantas con más biomasa de la raíz tienen mayor supervivencia en campo (Davis y Jacobs, 2005). En cambio, cuando se emplearon las dosis media y alta fue menor e incluso no presentaron diferencias significativas sobre el testigo; resultados que coinciden con lo señalado por Chávez *et al.* (2009), quienes inocularon *Pinus radiata* D. Don con *Rhizopogon luteolus* Fr. & Nordholm, *Suillus bellinii* (Inzenga) Watling y *Suillus luteus* L. (Fries) Gray, en dosis de hasta  $1 \times 10^7$  esporas por planta, y registraron diferencias no significativas para la biomasa de la raíz. Los mismos efectos consignan para el ICD, y una mejor calidad de planta con dosis bajas de inoculante. Lo anterior se relaciona con el hecho de que las variables de materia seca son las más fuertemente correlacionadas con el ICD (Bionotto *et al.*, 2010). Lo anterior indica que la inoculación con dosis altas no siempre resulta en un buen desarrollo de la planta, y puede limitar su crecimiento. Al respecto, los valores bajos en plantas micorrizadas podría atribuirse a las altas demandas de carbohidratos de los hongos (Dosskey *et al.*, 1991). El mismo comportamiento ha sido documentado en diferentes especies de coníferas (Rincon *et al.*, 2005; Menkis *et al.*, 2010), en las cuales se ha observado una disminución de las tasas de crecimiento en plantas con abundantes micorrizas. García *et al.* (2010) al inocular *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake con *Glomus intraradices* y *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch señalan ICD superiores en planta sin micorrizas.

No obstante, en este estudio es importante hacer notar que existe una diferencia entre el uso de inoculante y su omisión. Se prueba que una dosis baja puede ser recomendable para estimular la formación de micorrizas y mejorar la condición de la planta para su establecimiento en campo. Varios autores han demostrado que las plantas micorrizadas tienen mayor probabilidad de supervivencia en los sitios de plantación, debido a que se incrementa la disponibilidad de nutrientes (Menkis *et al.*, 2011), y el estatus hídrico en las plantas mejora (Ortega *et al.*, 2004); aunque, la eficiencia de la ectomicorriza dependerá, también, de las características físicas y químicas de los suelos (Teste *et al.*, 2004).

Finalmente, se observó una diferencia alta entre los métodos de aplicación sobre la formación de micorrizas; si bien, la inoculación mediante el riego generó indicadores de calidad de planta superiores, el método en la mezcla de sustratos es una opción apropiada para hacer más eficiente la inoculación, aun con dosis más bajas, lo que incide en un ahorro en el uso del inoculante. Con base en lo anterior, las nuevas investigaciones se deberán enfocar a definir las mejores prácticas culturales, como el uso de sustratos, envases, rutinas de fertilización y riegos que propicien la colonización eficiente de hongos ectomicorrízicos,

On the other hand, the root biomass increased when the plant was inoculated with a low dose, compared to the control; this has been attributed to the fact that the mycorrhiza modifies the root and increases the dry weight and is therefore considered to be a good indicator, as plants with more biomass and plants with a larger root biomass have a higher survival rate in field (Davis and Jacobs, 2005). Conversely, when medium and high doses were used, the survival rate was lower and even showed no significant differences in relation to the control. These results agree with the findings of Chávez *et al.* (2009), who inoculated *Pinus radiata* D. Don with *Rhizopogon luteolus* Fr. & Nordholm, *Suillus bellinii* (Inzenga) Watling infection and *Suillus luteus* L. (Fries) Gray in doses of up to  $1 \times 10^7$  spores per plant, and registered insignificant differences for the root biomass. The same effects occurred for the QI, and a better plant quality was obtained with low doses of inoculums. This is related to the fact that the variables of dry matter are the most closely correlated with the QI (Bionotto *et al.*, 2010), which indicates that inoculation with high doses not always results in a good development of the plant and may limit its growth. In this respect, low values in mycorrhizal plants may be ascribed to the high demand of the fungi for carbohydrates (Dosskey *et al.*, 1991). The same behavior has been documented in various species of conifers (Rincón *et al.*, 2005; Menkis *et al.*, 2010), in which a reduction of the growth rates has been observed in plants with abundant mycorrhizae. García *et al.* (2010) inoculated *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake with *Glomus intraradices* y *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch and found higher QIs in plants without mycorrhizae.

In this study, there is nevertheless a noteworthy difference between the use of inoculum and its omission. A low dose is proven to be advisable to stimulate the formation of mycorrhizae and to improve the condition of the plant for its establishment in field. Various authors have shown that mycorrhizal plants have a higher probability in the plantation sites because mycorrhizae increase the availability of nutrients (Menkis *et al.*, 2011) and improve the hydric status of the plants (Ortega *et al.*, 2004); however, the efficiency of the ectomycorrhiza also depends on the physical and chemical characteristics of the soil (Teste *et al.*, 2004).

Finally, a large difference was observed in the formation of mycorrhizae between application methods; although inoculation in irrigation water generated higher plant quality indices, inoculation in the substrate is an appropriate option to render the inoculation more effective, even with lower doses, resulting in a reduced use of inoculum. Based on this, the new research must focus on determining the best cultural practices, such as the use of substrates, containers, fertilization routines and irrigation to propitiate effective colonization by ectomycorrhizal fungi, as well as on evaluating the performance of mycorrhizal plants in the plantation sites.

así como a evaluar el desempeño de las plantas micorrizadas en los sitios de plantación.

Se determinó un efecto significativo del método de aplicación y la dosis de inoculante de *Russula delica* sobre la calidad de planta de *Pinus engelmannii* en condiciones de vivero. La adición a través del riego con una dosis baja (0.75 g por charola) propicia una mejor calidad morfológica de la planta. El porcentaje de micorrización más alto se obtiene con la inoculación en sustrato, lo que sugiere la posibilidad de probar dosis más bajas que garanticen la colonización de los hongos ectomicorrízicos.

## Agradecimientos

El presente trabajo forma parte del proyecto "Tecnologías para la recolección de semilla y producción de planta de alta calidad para establecer plantaciones forestales en clima templado frío", financiado por Fondos Fiscales del INIFAP.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Contribuciones por autor

Laura Elena Martínez Nevárez: establecimiento y manejo del ensayo en vivero, toma de datos, análisis y redacción del manuscrito; Homero Sarmiento López: definición del diseño experimental y tratamientos; José Ángel Sigala Rodríguez: análisis de datos, elaboración de gráficas y cuadros y documentación bibliográfica; Sergio Rosales Mata: recolección y beneficio de hongos y establecimiento del ensayo en vivero; José Bernardo Montoya Ayón: revisión del manuscrito.

## Referencias

- Alarcón, A. y R. Ferrera C. 2000. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra* 17 (3): 179-191.
- Bionotto, A. F., A. Dal, C. Lúcio and S. J. Lopes. 2010. Correlations between growth variables and the Dickson quality index in forest seedlings. *CERNE* 16 (4): 457-464.
- Brundrett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajczuk. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural. Canberra, Australia. Research 32. 374 p.
- Bustamante G., V., J. A. Prieto R., E. Merlín B., R. Álvarez Z., A. Carrillo P. y J. C. Hernández D. 2012. Potencial y eficiencia de producción de semilla de *Pinus engelmannii* Carr., en tres rodales semilleros del estado de Durango, México. *Madera y Bosques* 18 (3): 7-21.
- Carrera N., A. y G. F. López R. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie de Ciencias Forestales y del Ambiente* 10(2): 93-98.
- Chávez M., D., G. Pereira C. y A. Machuca H. 2009. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque* 30 (1): 4-9.
- Chilvers G. A., F. F. Lapeyrie and D. P. Horan. 1987. Ectomycorrhizal vs endomycorrhizal fungi within the same root system. *New Phytologist* 107 :441-448.
- Davis, A. S. and D. F. Jacobs. 2005. Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to out planting performance. *New Forest* 30: 295-311.

The application method and the dose of *Russula delica* inoculum were determined to have a significant effect on the quality of the plant in the nursery. The addition of a low dose (0.75 g per tray) in the irrigation water promotes a better morphological quality of the plant. The highest mycorrhiza percent infection was obtained with inoculation in the substrate; this suggests the possibility of trying lower doses to ensure colonization by ectomycorrhizal fungi.

## Acknowledgements

This study is part of the project "Tecnologías para la recolección de semilla y producción de planta de alta calidad para establecer plantaciones forestales en clima templado frío", sponsored by Fondos Fiscales of INIFAP.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Contributions by author

Laura Elena Martínez Nevárez: establishment and management of the assay in the nursery, data collection and analysis, and drafting of the manuscript; Homero Sarmiento López: definition of the experimental design and treatments; José Ángel Sigala Rodríguez: data analysis, development of charts and tables and bibliographical documentation; Sergio Rosales Mata: fungi collection and utilization, and establishment of the assay in the nursery; José Bernardo Montoya Ayón: review of the manuscript.

*End of the English version*



- Dickson, A., A. L. Leaf and J. F. Hosner. 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. Department of Silviculture, State University College of Forestry at Syracuse University. New Syracuse, NY, USA. pp. 10-13.
- Dosskey M. G., L. Boersma and R. G. Linderman. 1991. Role for the photosynthate demand of ectomycorrhizas in response of Douglas-fir seedlings to drying soil. *New Phytologist* 117 327-334.
- García R., J. L., A. Aldrete, J. Pérez M., A. V. Cetina M. y H. Vaquera H. 2010. Efecto de la fertilización, tamaño de envase e inoculación micorrízica en la calidad de brinzales de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake en vivero. In: Prieto R., J. A., R. E. Madrid A. y L. V. Macías G. V. (comps.) Reunión Nacional de Innovación Forestal Campeche. Campeche, Camp., México. pp. 38.
- García R., J. L., J. M. Mejía B., D. Amador S., J. A. Sigala R. y J. A. Prieto R. 2012. Identificación de hongos ectomicorrízicos en bosques de coníferas de los municipios de Pueblo Nuevo, San Dimas y Durango, Durango. Campo Experimental Valle del Guadiana. INIFAP. Durango, Dgo., México. Folleto Técnico Núm. 53. 38 p.
- Hernández, W. y E. Salas, 2009. La inoculación con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. *Agronomía costarricense* 33: 17-30.
- Landis, T. D. and M. A. Amaranthus. 2009. Inoculate with Mycorrhizae, Rebuild Your Soil, and Help Stop Global Warming. *Forest Nursery Notes* 29(1):13-16.



- Matabuena V., J. A., 2005. *Russulas*. <http://www.fungipedia.org/setas-informacion-y-consultas/6forogeneral/16702-magnifico-documento-sobre-ussulas.html>. (10 de junio de 2014).
- Menkis, A., R. Vasiliauskas, A. F. S. Taylor, J. Stenlid and R. Finlay. 2005. Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16:33-41.
- Menkis, A., R. Vasiliauskas, A. F. S. Taylor, J. Stenlid and R. Finlay. 2007. Afforestation of abandoned armland with conifer seedlings inoculated with three ectomycorrhizal fungi—impact on plant performance and ectomycorrhizal community. *Mycorrhiza* 17:337-348.
- Menkis, A., A. Uotila, N. Arhipova and R. Vasaitis. 2010. Effects of stump and slash removal on growth and mycorrhization of *Picea abies* seedlings outplanted on a forest clear-cut. *Mycorrhiza* 20: 505-509.
- Menkis, A., R. Bakys, V. Lygis and R. Vasaitis. 2011. Mycorrhization, Establishment and Growth of Outplanted *Picea abies* Seedlings Produced under Different Cultivation Systems. *Silva Fennica* 45(2): 283-289.
- Montes R., G., S. Solís G. y M. Quintos E. 2001. Efecto del inoculante comercial burize (*Glomus intraradices*) sobre el desarrollo de *Pinus engelmannii* Carr. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 7 (2): 123-126.
- Ortega, U., Dunabeitia M., Menendez S., Gonzalez, C. Murua and J. Majada. 2004. Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on growth and water relations of *Pinus radiata* in different water regimes. *Tree Physiology* 24:65-73
- Prieto R., J. A., J. A. Sigala R., S. Pinedo L., J. L. García R., R. E. Madrid A., J. L. García P. y J. M. Mejía B. 2009. Calidad de planta en los viveros forestales del Estado de Durango. *Publicación Especial Núm. 30. Campo Experimental del Valle del Guadiana. INIFAP. Durango, Dgo., México.* 81 p.
- Rincón, A., J. Parladé and J. Pera. 2005. Effects of ectomycorrhizal inoculation and the type of substrate on mycorrhization, growth and nutrition of containerized *Pinus pinea* L. seedlings produced in a commercial nursery. *Annals of Forest Science* 62: 1-6.
- Rodríguez T., D. A. 2008. Indicadores de calidad de planta forestal. *Mundi-Prensa México. México, D.F., México.* 156 p.
- Secretaría de Economía (SE). 2014. Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2014. Certificación de Operación de Viveros Forestales. Comisión Nacional Forestal. Zapopan, Jal., México. 172 p.
- Sigala R., J. A., H. Sarmiento L., J. I. Ferrel S., E. Basave V., S. Rosales M. y J. A. Prieto R. 2015. Sistemas de producción de planta en los viveros forestales del estado de Durango. *Campo Experimental Valle del Guadiana CIRNOC. Durango, Dgo., México.* Folleto técnico Núm. 79. 30 p.
- Simard, S. W., D. Durall and M. Jones. 2002. Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In: van der Heijden, M. G. A. and I. R. Sanders (eds.). *Mycorrhizal ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 33-74.
- Teste, F. P., M. G. Schmidt, S. M. Berch, C. Bulmer and K. N. Egger. 2004. Effects of ectomycorrhizal inoculants on survival and growth of interior Douglas-fir seedlings on reforestation sites and partially rehabilitated landings. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 2074-2088.



