

Interspecific grafting as an alternative for asexual propagation of *Pinus rzedowskii* Madrigal & Caball. Del. in danger extinction

Injerto interespecífico como alternativa para la propagación asexual de *Pinus rzedowskii* Madrigal & Caball. Del. en riesgo de extinción

Edgar R. Solorio-Barragán¹; Patricia Delgado-Valerio^{1*}; Agustín Molina-Sánchez¹; Virginia Rebolledo-Camacho²; Miguel Á. Tafolla-Martínez¹

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Av. Revolución esquina con Berlín s/n, col. Viveros. C. P. 60170. Uruapan, Michoacán, México.

²Universidad Veracruzana, Instituto de Investigaciones Forestales. Parque Ecológico “El Haya”, Carretera antigua a Coatepec s/n. C. P. 91070. Xalapa, Veracruz, México.

*Corresponding author: dvalerio@umich.mx; +52 452 129 7585.

Abstract

Introduction: *Pinus rzedowskii* Madrigal & Caball. Del. is endemic to Mexico, in danger of extinction and low natural reproduction. An alternative for propagation is interspecific grafting, under the assumption that the phylogenetically more related species positively influence survival.

Objectives: To evaluate grafting survival of *P. rzedowskii* with rootstocks of five *Pinus* species.

Materials and methods: Interspecific grafting of *P. rzedowskii* with *P. pinceana* Gordon & Glend., *P. maximartinezii* Rzed., *P. ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) Shaw, *P. pseudostrobus* Lindl. and *P. rzedowskii* (control treatment) was carried out. The grafting method was side-veneer graft; grafting was quantified for six months and survival was evaluated using the nonparametric Kaplan-Meier method.

Results and discussion: The highest final grafting survival and expected survival function were obtained with rootstocks of *P. rzedowskii* (85.7 ± 0.21 %; $m = 0.97$), followed by *P. pinceana* (80 ± 0.31 %; $m = 0.95$); *P. pseudostrobus* had the lowest values (20 ± 0.89 %; $m = 0.66$). Significant differences ($P < 0.0001$) were observed between *P. pseudostrobus* and *P. maximartinezii* regarding *P. rzedowskii* a *P. pinceana*.

Conclusion: *P. pinceana*, a species phylogenetically closer to *P. rzedowskii* and *P. maximartinezii*, was the one with the highest survival rate, which may be an alternative for the rescue and *ex situ* conservation of *P. rzedowskii*.

Keywords: survival; phylogenetic relationships; side-veneer grafting; grafting success; *Pinus pinceana*.

Resumen

Introducción: *Pinus rzedowskii* Madrigal & Caball. Del. es endémica de México, en peligro de extinción y con baja reproducción natural. Una alternativa para su propagación es el injerto interespecífico, bajo la premisa de que las especies filogenéticamente más relacionadas influyen positivamente en la supervivencia.

Objetivos: Evaluar la supervivencia de injertos de *P. rzedowskii* con plantas-patrón de cinco especies de *Pinus*.

Materiales y métodos: Se realizaron injertos interespecíficos de *P. rzedowskii* con *P. pinceana* Gordon & Glend., *P. maximartinezii* Rzed., *P. ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) Shaw, *P. pseudostrobus* Lindl. y *P. rzedowskii* (testigo). El método de injerto fue el enchapado lateral; el prendimiento se cuantificó durante seis meses y la supervivencia se evaluó con el método no paramétrico de Kaplan-Meier.

Resultados y discusión: La supervivencia final más alta de los injertos y la función esperada de supervivencia se obtuvieron con plantas-patrón de *P. rzedowskii* (85.7 ± 0.21 %; $m = 0.97$), seguido de *P. pinceana* (80 ± 0.31 %; $m = 0.95$); *P. pseudostrobus* obtuvo los valores más bajos (20 ± 0.89 %; $m = 0.66$). Se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre *P. pseudostrobus* y *P. maximartinezii* con relación a *P. rzedowskii* y *P. pinceana*.

Conclusión: *P. pinceana*, especie filogenéticamente más cercana con *P. rzedowskii* y *P. maximartinezii*, fue la de mayor supervivencia, por lo que puede ser una alternativa para el rescate y conservación *ex situ* de *P. rzedowskii*.

Palabras clave: supervivencia; relaciones filogenéticas; enchapado lateral; prendimiento de injerto; *Pinus pinceana*.

Introduction

Grafting is one of the most widely used asexual propagation methods for pine species (Aparicio-Rentería, Viveros-Viveros, & Rebolledo-Camacho 2013; Muñoz-Flores, Prieto-Ruiz, Flores-García, Pineda-Ojeda, & Morales-González, 2013; Pérez-Luna et al., 2019). This method accelerates the reproductive cycle to have higher plant production with better genetic quality in less time; the plant is used for reforestation and conservation activities, establishment of clonal seed orchards or development of commercial plantations (Aparicio-Rentería et al., 2013; Guadaño & Mutke, 2016; Muñoz-Flores et al., 2013; Pérez-Luna et al., 2019, 2020a). However, most studies have been conducted with rootstocks of the same species and few studies have been reported with different species (Climent, Prada, Gil, & Pardos, 1997; Darikova, Vaganov, Kuznetsova, & Grachev, 2013; Villaseñor & Carrera, 1980; Pérez-Luna et al., 2020b).

Some of the most important advantages of interspecific grafting are the ability to adapt to environments different from that of the original species and the production of a greater number of reproductive structures with an increase in the availability of seeds (Climent et al., 1997). These advantages have been observed in species of wide distribution and economic importance; in contrast, there are no studies for pines with restricted distribution and endangered species. Grafting in this type of species can be an invaluable tool for conservation, because it mitigates degradation of their natural areas through propagation to help repopulation and reduces the loss of genetic variants that are of great adaptive and evolutionary significance for the genus.

Pinus rzedowskii Madrigal & Caball. Del. is endemic to Mexico and in danger of extinction (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2010). The species is distributed in the Sierra de Coalcomán, Michoacán, with fragmented populations (15) and represented by few individuals (9 to 3 500 per population; Castilleja, Delgado, Sáenz-Romero, & Herrerías, 2016; Delgado, Piñero, Chaos, Pérez-Nasser, & Alvarez-Buylla, 1999). Its habitat is characteristic of nutrient-poor limestone soils (Cambisol), with populations comprised mostly of senescent adult individuals, which reduces regeneration capacity (Delgado et al., 1999). Nevertheless, genetic variation is relatively high (>0.275), although with significant levels of inbreeding ($F = 0.270$; Delgado et al., 1999). This condition affects reproductive success with low production of viable seeds (17 % with embryo) and low germination (3 %; Castilleja et al., 2016).

One of the alternatives for increasing the reproduction of *P. rzedowskii* is grafting, which unfortunately is

Introducción

El injerto es uno de los métodos de propagación asexual más utilizados en especies de pino (Aparicio-Rentería, Viveros-Viveros, & Rebolledo-Camacho 2013; Muñoz-Flores, Prieto-Ruiz, Flores-García, Pineda-Ojeda, & Morales-González, 2013; Pérez-Luna et al., 2019). Este método acelera el ciclo reproductivo con el fin de obtener mayor producción de planta con mejor calidad genética en menor tiempo; la planta es utilizada para las actividades de reforestación y conservación, establecimiento de huertos semilleros clonales o desarrollo de plantaciones comerciales (Aparicio-Rentería et al., 2013; Guadaño & Mutke, 2016; Muñoz-Flores et al., 2013; Pérez-Luna et al., 2019, 2020a). No obstante, la mayoría de los ensayos se han realizado con tutores de la misma especie y los estudios reportados entre especies diferentes son escasos (Climent, Prada, Gil, & Pardos, 1997; Darikova, Vaganov, Kuznetsova, & Grachev, 2013; Villaseñor & Carrera, 1980; Pérez-Luna et al., 2020b).

Algunas de las ventajas más destacadas del injerto interespecífico son: la capacidad de adaptación en ambientes diferentes al de la especie original y la producción de mayor cantidad de estructuras reproductivas con incremento en la disponibilidad de semillas (Climent et al., 1997). Estas ventajas se han observado en especies de distribución amplia y de importancia económica; en contraste, los ensayos en pinos de distribución restringida y en peligro de extinción son nulos. La aplicación de injertos en este tipo de especies puede ser una herramienta de gran valor para su conservación, ya que mitiga la degradación de sus áreas naturales a través de la propagación para ayudar a su repoblación y reduce la pérdida de variantes genéticas que son de gran importancia adaptativa y evolutiva para el género.

Pinus rzedowskii Madrigal & Caball. Del. es endémica de México y está en peligro de extinción (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2010). La especie se distribuye en la Sierra de Coalcomán, Michoacán, con poblaciones fragmentadas (15) y representadas por pocos individuos (9 a 3 500 por población; Castilleja, Delgado, Sáenz-Romero, & Herrerías, 2016; Delgado, Piñero, Chaos, Pérez-Nasser, & Alvarez-Buylla, 1999). Su hábitat es característico de suelos calizos (Cambisol) pobres en nutrientes, con poblaciones conformadas en su mayoría por individuos adultos senescentes, lo cual reduce su capacidad de regeneración (Delgado et al., 1999). No obstante, la variación genética es relativamente alta (>0.275), aunque con niveles importantes de endogamia ($F = 0.270$; Delgado et al., 1999). Esta condición afecta el éxito reproductivo con una producción escasa de semillas viables (17 % con embrión) y germinación baja (3 %; Castilleja et al., 2016).

difficult to perform between individuals of the same species, due to the scarce availability of viable seeds (Castilleja et al., 2016). Therefore, it is necessary to explore the possibility of using other pine rootstock-species, under the assumption that the selection of phylogenetically close species, where anatomical characteristics have probably evolved in a similar way, will allow better tissue coupling and, consequently, greater grafting success. This phylogenetic assumption has not been documented for pines, but other factors have been explored, although also scarcely, such as: the phenological state and viability of the scion and rootstock, time of grafting, the skill of the grafter, control of environmental conditions, and taxonomic and anatomical compatibility of species (Climent et al., 1997; Hartmann, Kester, Davies, & Geneve, 2002; Pérez-Luna et al., 2019, 2020a, 2020 b).

Phylogenetic reconstructions with molecular data from chloroplast and nucleus DNA regions (Gernandt, Geada, Ortiz, & Liston, 2005; Montes et al., 2019) place *P. rzedowskii* within the Parrya section, Cembroides subsection, whose phylogenetic relationships with *P. pinceana* Gordon & Glend. and *P. maximartinezii* Rzed. form a monophyletic clade. Therefore, the use of rootstock plants with these pine species supports the possibility of having grafts compatible with *P. rzedowskii*.

Interspecific grafting of *P. rzedowskii* with rootstocks of *P. pinceana*, *P. maximartinezii*, *P. ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) Shaw and *P. pseudostrobus* Lindl. were carried out to evaluate survival in this study. The hypothesis is that species phylogenetically closer to *P. rzedowskii* show higher survival compared to species with a more distant phylogenetic relationship.

Materials and methods

Biological material and grafting

Rootstock plants were produced by seed germination of the following five species: *P. rzedowskii*; *P. maximartinezii*, *P. pinceana* and *P. ayacahuite* var. *veitchii*, three phylogenetically close species of the *Strobus* subgenus; and *P. pseudostrobus* of the *Pinus* subgenus (Table 1).

Seeds were treated with 0.2 % sodium hypochlorite for 5 min; subsequently, seeds were rinsed with tap water and soaked in a solution of distilled water with 2 % hydrogen peroxide for 24 h, selecting seeds with embryo by the flotation technique (Castilleja et al., 2016). Finally, seeds were treated with 3 g·L⁻¹ of Captan® fungicide for 5 min and planted in transparent plastic tray (30 x 30 x 30 x 5 cm) with 100 % vermiculite substrate. After 40 days, seedlings were changed to a substrate composed of 50 % moss peat, 25 % agrolite, 25 % vermiculite and 5.0 g·plant⁻¹ of controlled release

Una de las alternativas para el incremento de la reproducción de *P. rzedowskii* es la implementación de injertos, que desafortunadamente son difíciles de realizar entre individuos de la misma especie, debido a la disponibilidad escasa de semillas viables (Castilleja et al., 2016). Por lo anterior, es necesario explorar la posibilidad del uso de otras especies-patrón de pino, bajo el supuesto de que la selección de especies filogenéticamente cercanas, donde las características anatómicas probablemente han evolucionado de manera similar, permitirá mejor acoplamiento de los tejidos y, en consecuencia, mayor éxito de los injertos. Este supuesto filogenético no se ha documentado en pinos, pero se han explorado otros factores, aunque también de manera escasa, como son: el estado fenológico y viabilidad de la vareta y el patrón, la época del injertado, la habilidad del injertador, el control de las condiciones ambientales y la compatibilidad taxonómica y anatómica de las especies (Climent et al., 1997; Hartmann, Kester, Davies, & Geneve, 2002; Pérez-Luna et al., 2019, 2020a, 2020 b).

Las reconstrucciones filogenéticas con datos moleculares de regiones de ADN de cloroplasto y núcleo (Gernandt, Geada, Ortiz, & Liston, 2005; Montes et al., 2019) ubican a *P. rzedowskii* dentro de la sección Parrya, subsección Cembroides, cuyas relaciones filogenéticas con *P. pinceana* Gordon & Glend. y *P. maximartinezii* Rzed. forman un clado monofilético. Por ello, el uso de plantas-patrón con estas especies de pino sustentan la posibilidad de obtener injertos compatibles con *P. rzedowskii*.

En el presente estudio se hicieron injertos interespecíficos de *P. rzedowskii* con plantas-patrón de *P. pinceana*, *P. maximartinezii*, *P. ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) Shaw y *P. pseudostrobus* Lindl. con el objetivo de evaluar la supervivencia. La hipótesis plantea que las especies filogenéticamente más cercanas a *P. rzedowskii* presentan mayor supervivencia que las especies con relación filogenética más distante.

Materiales y métodos

Material biológico e injertación

Las plantas-patrón se obtuvieron por germinación de semillas de cinco especies: *P. rzedowskii*; *P. maximartinezii*, *P. pinceana* y *P. ayacahuite* var. *veitchii*, tres especies filogenéticamente cercanas del subgénero *Strobus*; así como *P. pseudostrobus* del subgénero *Pinus* (Cuadro 1).

Las semillas se trataron con hipoclorito de sodio 0.2 % por 5 min; posteriormente, se enjuagaron con agua corriente y se embebieron en una solución de agua destilada con peróxido de hidrógeno al 2 % por 24 h, seleccionando las semillas con embrión por la técnica de

Table 1. Source of seeds used to obtain rootstock plants of the *Pinus* species under study.**Cuadro 1. Procedencias de las semillas utilizadas para la obtención de las plantas-patrón de las especies de *Pinus* en estudio.**

Species / Especie	Source / Procedencia	Latitude (N) / Latitud (N)	Length (W) / Longitud (O)	Altitude (m) / Altitud (m)
<i>P. pinceana</i>	Guadalcazar, San Luis Potosí	22° 40' 10"	100° 29' 30"	1600
<i>P. maximartinezii</i>	Pueblo Viejo, Jalisco	21° 21' 15"	103° 21' 22"	2380
<i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>	La Palma, Michoacán	19° 36' 39"	102° 20' 24"	2150
<i>P. pseudostrobus</i>	San Juan Nuevo Parangaricutiro, Michoacán	19° 27' 06"	102° 12' 57"	2685
<i>P. rzedowskii</i>	El Varaloso, Michoacán	18° 40' 59"	102° 59' 34"	2800

fertilizer (Multicote®), in black plastic containers of 5 L capacity (30 x 20 cm); irrigations were applied every third day. Rootstock plants were selected from three years old according to the recommended characteristics; age between 2 to 4 years, as straight as possible and with a diameter between 1.5 to 2.5 cm (Muñoz-Flores et al., 2013). Due to reproductive problems of *P. rzedowskii* (Castilleja et al., 2016), only seven plants were obtained, therefore, the number of plants for the rest of the species was approximated to 10 with the intention of avoiding bias in the results, due to differences in the sample size.

The *P. rzedowskii* scions were collected in the locality of Chiqueritos, Dos Aguas, municipality of Aguililla, Michoacán (18° 04' 17" N and 102° 59' 36" W). Seventy scions with terminal buds of similar size (5 to 8 cm in length) were collected from an adult reproductive tree (140 years old; diameter of 30 cm and height of 25 m). The collection was made from the lower middle part of the tree, which contained the largest number of buds. Collecting and grafting was carried out in a 24 h period (February 18 and 19, 2017) to keep the tissues alive and have grafting success (Aparicio-Rentería et al., 2013; Muñoz-Flores et al., 2013).

Grafting was carried out in a rustic nursery or common garden with the following dimensions 4 x 8 x 3 m and 50 % shade mesh at the "Presidente Juárez" Faculty of Agrobiology of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Grafting stages are shown in Figure 1. The grafting method was side-veneer grafting, recommended for pine species (Muñoz-Flores et al., 2013; Pérez-Luna et al., 2019; Villaseñor & Carrera 1980;). Temperature conditions were constant between 23 to 24 °C and relative humidity ranged from 60 to 80 % in the study. Grafts were kept covered with a brown paper bag to reduce light incidence and a plastic bag with water to keep them hydrated (Muñoz-Flores et al., 2013); the paper bag was removed after 30 days, at this moment grafting success was observed due to bud growth, and the plastic bag was removed after 60 days. To avoid fungal problems, Ridomil Gold® fungicide (3 g·L⁻¹) was applied to the foliage and graft area once a week.

flotación (Castilleja et al., 2016). Finalmente, las semillas se trataron con 3 g·L⁻¹ de fungicida Captán® por 5 min y se plantaron en charola de plástico transparente (30 x 30 x 5 cm) con sustrato vermiculita al 100 %. Posterior a los 40 días, las plántulas se cambiaron a un sustrato compuesto de 50 % de turba de musgo, 25 % de agrolita, 25 % de vermiculita y 5.0 g·planta⁻¹ de fertilizante de liberación controlada (Multicote®), en envases de plástico negro de 5 L de capacidad (30 x 20 cm); los riegos se aplicaron cada tercer día. Las plantas-patrón se seleccionaron de tres años acorde con las características recomendadas; edad entre 2 a 4 años, lo más rectas posibles y con diámetro entre 1.5 a 2.5 cm (Muñoz-Flores et al., 2013). Debido a los problemas reproductivos que *P. rzedowskii* presenta (Castilleja et al., 2016), solo se obtuvieron siete plantas, por ello, el número de plantas para el resto de las especies se aproximó a 10 con la intención de evitar sesgo en los resultados, a causa de las diferencias en el tamaño de muestra.

Las varetas de *P. rzedowskii* se obtuvieron en la localidad de Chiqueritos, Dos Aguas, municipio de Aguililla, Michoacán (18° 04' 17" N y 102° 59' 36" O). Se recolectaron 70 varetas con yemas terminales de tamaños similares (5 a 8 cm de longitud), provenientes de un árbol adulto reproductivo (140 años; diámetro de 30 cm y altura de 25 m). La recolecta se hizo de la parte media baja del árbol que contenía la mayor cantidad de yemas. El trabajo de recolecta e injerto se realizó en un periodo de 24 h (18 y 19 de febrero de 2017), con la finalidad de que los tejidos continuaran vivos y se lograra un injerto exitoso (Aparicio-Rentería et al., 2013; Muñoz-Flores et al., 2013).

Los injertos se hicieron en un vivero rústico o jardín común con dimensiones de 4 x 8 x 3 m y malla al 50 % de sombra en la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las etapas del injertado se muestran en la Figura 1. El método de injerto fue el enchapado lateral, recomendado para especies de pinos (Muñoz-Flores et al., 2013; Pérez-Luna et al., 2019; Villaseñor & Carrera 1980). Durante el experimento, las condiciones de temperatura fueron constantes entre 23 a 24 °C y la humedad relativa varió de 60 a 80 %. Los injertos se mantuvieron cubiertos con bolsa de papel estraza para



Figure 1. Sequence of grafting stages. a) *Pinus rzedowskii* scion, b) cutting the rootstock stem, c) size matching, d) side-veneer grafting, e) tying the graft with plastic tape (MD brand), f) plastic bag with water to avoid dehydration, g) brown paper cover to reduce light incidence, h) grafting with rootstock plants of *P. ayacahuite* var. *veitchii*, with developing male strobiles, i) second pruning of *P. pinceana* at the central-top part of the graft with the terminal end unpruned and male strobiles, j) graft of *P. rzedowskii* with larger male strobiles at the pollen release stage, k) third pruning and graft release, and l) grafting with new needles and twigs of *P. rzedowskii*.

Figura 1. Secuencia de las etapas de injertado. a) vareta de *Pinus rzedowskii*, b) corte en el tallo de la planta-patrón, c) acoplamiento de tamaños, d) injertado de enchapado lateral, e) amarrado con cinta plástica para injerto (marca MD), f) bolsa plástica con agua para evitar deshidratación, g) cubierta de papel estraza para disminuir la incidencia de luz, h) injerto con plantas-patrón de *P. ayacahuite* var. *veitchii*, con estróbilos masculinos en desarrollo, i) segunda poda de *P. pinceana* en la parte central-superior del injerto con el extremo terminal sin podar y estróbilos masculinos, j) injerto de *P. rzedowskii* con estróbilos masculinos de mayor tamaño en la etapa de liberación del polen, k) tercera poda y liberación del injerto, e l) injerto con acículas y ramillas nuevas de *P. rzedowskii*.

On May 20, 2017, the first pruning of the total foliage and branches below the graft area was carried out. On June 3, 2017, the second pruning of the foliage and branches was carried out in the continuous area at the top of the graft, without pruning the terminal end of the rootstock. This pruning was carried out so that the sap would not feed its main bud, giving priority to the graft (Goldschmidt, 2014; Muñoz-Flores et al., 2013). On June 17, 2017, advanced growth of graft buds was observed and total pruning of rootstock plants and their release was chosen.

Data collection and analysis

Live and dead grafts were quantified every seven days until six months after grafting (March-August, 2017). A value of 0 was assigned to plants with loss of bud turgor and yellowing in the graft area, and 1 to plants with live buds for each evaluation (Barchuk & Díaz, 2000; Sigala, González, & Prieto-Ruíz, 2015). Each species was considered as a treatment (five treatments) with 10 replicates, except for *P. rzedowskii* (control treatment), since only seven plants were obtained.

Survival curves were performed using the non-parametric Kaplan-Meier model (Sigala et al., 2015), which allows statistical significance studies on the survival of each treatment over time; that is, it analyzes the time elapsed for an event to occur (in this case the death of plants) also regarding the censored data, which correspond to the individuals that, until the last moment of measurement, had shown no event (live plants) (García, 2012). A total of 12 measurements were taken with an interval of 15 days for six months. Differences between treatments were evaluated using the Log-Rank test, based on the comparison of observed versus expected events through the survival function (Le, 1997) defined as: $S(t) = P(T > t)$; where, $S(t)$ is the probability that at least one death occurs at a time T , as large as time t . Furthermore, with this non-parametric approximation, the mean value of the survival function (m) of the samples of each treatment was collected. When following up each sample that did or did not present the event (plant death), the mean value of survival over time was estimated, obtained from the number of days (md) elapsed from the observations made in six months (180 days). Finally, paired Chi-square (X^2) comparisons were made to determine the contribution of treatments. Data was analyzed in the R platform (R Development Core Team, 2016) with the Survival (2.41.3) and Survminer (0.4.0) packages.

Results and Discussion

The highest final survival value was for rootstock-plant grafts of the same species: *P. rzedowskii* with six out of seven grafts ($85.7 \pm 0.21\%$), followed by *P. piniceana* with eight out of 10 ($80 \pm 0.316\%$), both with the highest

disminuir la incidencia de luz y bolsa plástica con agua para mantenerlos hidratados (Muñoz-Flores et al., 2013); la bolsa de papel se retiró a los 30 días, momento en que se apreció el prendimiento de los injertos por el crecimiento de las yemas y la bolsa plástica se retiró a los 60 días. Para evitar problemas por hongos se aplicó fungicida Ridomil Gold® ($3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en el follaje y en el área del injerto una vez por semana.

El 20 de mayo del 2017 se realizó la primera poda en el total del follaje y ramas debajo de la zona del injerto. El 3 de junio del 2017 se realizó la segunda poda del follaje y ramas en la zona continua a la parte superior del injerto, sin podar el extremo terminal del patrón. Esta poda se hizo con la finalidad de que la savia no alimentara su yema principal, dándole prioridad al injerto (Goldschmidt, 2014; Muñoz-Flores et al., 2013). El 17 de junio del 2017 se observó crecimiento avanzado de las yemas de los injertos y se optó por la poda total de las plantas-patrón y de su liberación.

Obtención de datos y análisis

Los injertos vivos y muertos se cuantificaron cada siete días hasta los seis meses posteriores al injertado (marzo-agosto, 2017). En cada evaluación se asignó un valor de 0 a las plantas con pérdida de la turgencia de las yemas y amarillamiento en la zona del injerto, y 1 a las plantas con yemas vivas (Barchuk & Díaz, 2000; Sigala, González, & Prieto-Ruíz, 2015). Cada especie se consideró como tratamiento (cinco tratamientos) con 10 repeticiones, a excepción de *P. rzedowskii* (tratamiento testigo), ya que solo se obtuvieron siete plantas.

Se realizaron curvas de supervivencia con el modelo no paramétrico de Kaplan-Meier (Sigala et al., 2015), el cual permite hacer pruebas de significancia estadística sobre la supervivencia de cada tratamiento a través del tiempo; es decir, analiza el tiempo transcurrido para que ocurra un suceso (en este caso la muerte de las plantas) considerando también los datos censurados, los cuales corresponden a los individuos que, hasta el último momento de medición, no habían presentado el suceso (plantas vivas) (García, 2012). Las mediciones realizadas fueron 12 con un intervalo de 15 días durante seis meses. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron con la prueba Log-Rank, fundamentada en la comparación de eventos observados versus los esperados a través de la función de supervivencia (Le, 1997) definida como: $S(t) = P(T > t)$; donde, $S(t)$ es la probabilidad de que al menos una muerte ocurra en un tiempo T , tan grande como el tiempo t . Asimismo, con esta aproximación no paramétrica se obtuvo el valor medio de la función de supervivencia (m) de las muestras de cada tratamiento. Al dar seguimiento a cada muestra que presentó o no el evento (muerte de la planta), se estimó el valor medio de supervivencia en el tiempo, obtenido del número de días (md) transcurridos

mean values of expected survival function ($m = 0.97$ and $m = 0.95$) and mean estimated survival values in number of days ($md = 163.4$ and $md = 162.2$) (Table 2; Figure 2).

A recent genomic study of the Cembroides subsection indicates that *P. pinceana* is one of the two species phylogenetically closest to *P. rzedowskii* (Montes et al., 2019); their anatomical characteristics and modifications over time have probably been similar, allowing better coupling and functionality of cambium tissues (Castro-Garibay, Villegas-Monter, & López-Upton, 2017; Pérez-Luna et al., 2020a). It has been reported that xylem characteristics and the shape of vascular

de las observaciones realizadas en seis meses (180 días). Finalmente se hicieron comparaciones pareadas de Chi-cuadrado (X^2), para determinar la contribución de los tratamientos. Los datos se analizaron en la plataforma R (R Development Core Team, 2016) con la paquetería Survival (2.41.3) y Survminer (0.4.0).

Resultados y discusión

El valor más alto de supervivencia final se obtuvo con injertos de plantas-patrón de la misma especie: *P. rzedowskii* con seis de siete injertos (85.7 ± 0.21 %), seguido de *P. pinceana* con ocho de 10 (80 ± 0.316 %), ambas con los mayores valores medios de la función

Table 2. Kaplan-Meier survival function for grafting with *Pinus rzedowskii* with five treatments (rootstock species) and 12 evaluations at 15-day intervals for six months.

Cuadro 2. Función de supervivencia de Kaplan-Meier en injertos de *Pinus rzedowskii* con cinco tratamientos (especies-patrón) y 12 evaluaciones en intervalos de 15 días durante seis meses.

Species/Especie	m	SD/DE	CI (95 %)/IC (95 %)		md	SD/DE	CI (95 %)/IC (95 %)	
			Lower limit/Límite inferior	Upper limit/Límite superior			Lower limit/Límite inferior	Upper limit/Límite superior
<i>P. pinceana</i>	0.951	0.035	0.886	1.000	162.203	2.962	156.291	167.616
<i>P. maximartinezii</i>	0.758	0.085	0.609	0.944	130.993	6.150	116.975	145.010
<i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>	0.852	0.065	0.834	0.988	145.796	4.690	145.211	164.381
<i>P. pseudostrobus</i>	0.666	0.106	0.558	0.873	121.509	8.523	102.844	140.174
<i>P. rzedowskii</i>	0.973	0.027	0.922	1.000	163.421	0.000	-	-

m = mean values of the expected survival function, md = mean values of survival in relation to the number of days, CI = confidence interval (95 %), SD = standard deviation of the mean.

m = valores medios de la función esperada de supervivencia, md = valores medios de supervivencia respecto al número de días, IC = intervalo de confianza (95 %), DE = desviación estándar de la media.

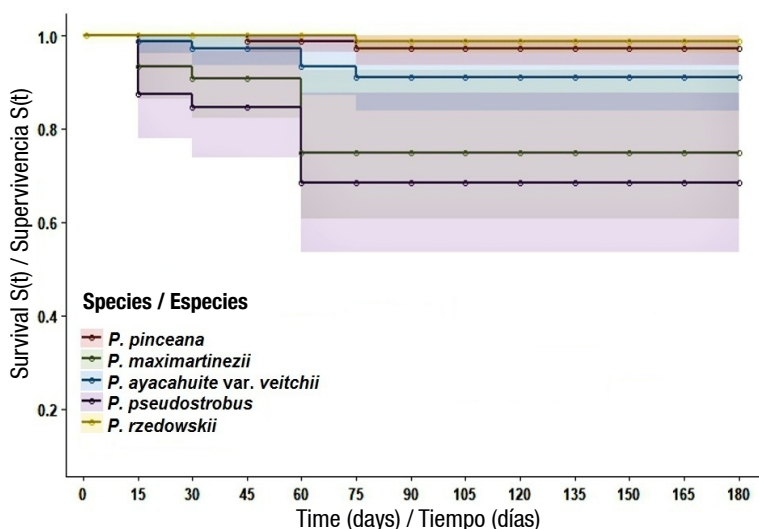


Figure 2. Distribution of the Kaplan-Meier survival function for *Pinus rzedowskii* grafts using five rootstock species. Colors in light shades indicate confidence intervals (95 %) for each species.

Figura 2. Distribución de la función de supervivencia de Kaplan-Meier para injertos de *Pinus rzedowskii* con el uso de cinco especies-patrón. Los colores en tonos claros indican los intervalos de confianza (95 %) para cada especie.

bundles should also be similar for the contact to be as homogeneous as possible (Castro-Garibay et al., 2017; Daricova et al., 2013; Pérez-Luna et al., 2019). In this sense, and according to the results, *P. pinceana* is recommended as a rootstock for successful grafting with *P. rzedowskii*.

Although *P. pinceana* is under the special protection status (NOM-59-SEMARNAT-2010), in contrast with *P. rzedowskii*, it shows no extreme reproductive problems with 54 to 55 % seed efficiency (Quiroz-Vázquez, López-Upton, Cetina-Alcalá, & Ángeles-Pérez, 2017) and some of the populations show adequate regeneration, represented by 22 to 59 % of young plants (1 to 25 years old) with a recruitment rate higher than one individual per tree (Martínez-Ávalos et al., 2015; Molina-Freaner, Delgado, Pérez, Piñero, & Alvarez-Buylla, 2001). Based on the above, *P. pinceana* can be a safe seed source for the production of rootstock plants for *P. rzedowskii* grafting, without affecting the demographic and genetic balance of the species.

P. maximartinezii, the second species closely related to *P. rzedowskii*, had a low final survival with three out of 10 grafts (30 ± 0.91 %) and lower than expected according to the survival function ($m = 0.758$; $md = 130.9$). This result was possibly due to the fact that rootstock-plants were larger in size (diameter and stem height) compared to the other species used, although they were of the same age, as recommended (Aparicio-Rentería et al., 2013). Probably, due to differences in natural growth with anatomical structures with different size (v. g., vascular bundles with larger diameter), an adequate coupling of tissues was not achieved. To corroborate this assertion, it is necessary to study grafts with rootstock-plants younger than three years and see if tissue adjustment is possible to increase the survival rate. It is worth mentioning that *P. maximartinezii* is considered microendemic and under special protection status (NOM-59-SEMARNAT-2010). Although it shows no problems of demographic stability (López-Mata, 2013), its seed is used for production and marketing of ornamental plants without any regulation. Due to the above, natural regeneration of *P. maximartinezii* could be affected if plants produced in nurseries are not reintroduced into their own stocks, therefore, the development of a repopulation program for protection could be required.

One of the promising species for grafting success is *P. ayacahuite* var. *veitchii*, which is also part of the *Strobos* subgenus with a vascular bundle as *P. rzedowskii*; although it is grouped in another section (*Quinquifoliae*) and subsection (*Strobos*) (Gernandt et al., 2005) it has been observed that trees of both species have very similar physiognomic characteristics when they are young (2 to 15 years), so it is very probable to obtain good tissue attachment. Being the second

esperada de supervivencia ($m = 0.97$ y $m = 0.95$) y de los valores medios de supervivencia estimados en número de días ($md = 163.4$ y $md = 162.2$) (Cuadro 2; Figura 2).

Un estudio genómico reciente de la subsección *Cembroides* indica que *P. pinceana* es una de las dos especies más cercanas filogenéticamente a *P. rzedowskii* (Montes et al., 2019); sus características anatómicas y modificaciones a través del tiempo han sido similares probablemente, permitiendo mejor acoplamiento y funcionalidad de los tejidos del cámbium (Castro-Garibay, Villegas-Monter, & López-Upton, 2017; Pérez-Luna et al., 2020a). Se ha documentado que las características del xilema y la forma de los haces vasculares también deben ser similares para que el contacto sea lo más homogéneo posible (Castro-Garibay et al., 2017; Daricova et al., 2013; Pérez-Luna et al., 2019). En este sentido, y de acuerdo con los resultados obtenidos, se recomienda a *P. pinceana* como planta-patrón para el injerto exitoso con *P. rzedowskii*.

No obstante que *P. pinceana* está catalogada en el estatus de protección especial (NOM-59-SEMARNAT-2010), a diferencia de *P. rzedowskii*, aún no presenta problemas reproductivos extremos con 54 a 55 % de eficiencia de semillas (Quiroz-Vázquez, López-Upton, Cetina-Alcalá, & Ángeles-Pérez, 2017) y algunas de las poblaciones muestran regeneración adecuada, representada por 22 a 59 % de plantas jóvenes (1 a 25 años) con una tasa de reclutamiento superior a un individuo por árbol (Martínez-Ávalos et al., 2015; Molina-Freaner, Delgado, Pérez, Piñero, & Alvarez-Buylla, 2001). Con base en lo anterior, *P. pinceana* puede ser una fuente de semillas segura para la producción de plantas-patrón para el injerto con *P. rzedowskii*, sin afectar el equilibrio demográfico y genético de la especie.

P. maximartinezii, la segunda especie cercanamente emparentada con *P. rzedowskii*, tuvo una supervivencia final baja con tres de 10 injertos (30 ± 0.91 %) y menor que la esperada de acuerdo con la función de supervivencia ($m = 0.758$; $md = 130.9$). Este resultado posiblemente se debió a que las plantas-patrón tenían mayor tamaño (diámetro y altura del tallo) en comparación con las otras especies utilizadas, aunque eran de la misma edad, de acuerdo con lo recomendado (Aparicio-Rentería et al., 2013). Probablemente, debido a las diferencias de crecimiento natural con estructuras anatómicas de tamaño distinto (v. g., haces vasculares de mayor diámetro), no se logró un acoplamiento adecuado de los tejidos. Para corroborar esta aseveración es necesario probar injertos con plantas-patrón menores de tres años y ver si es posible el ajuste de los tejidos que incrementen la tasa de supervivencia. Cabe mencionar que *P. maximartinezii* está considerada como microendémica y en estatus de protección especial (NOM-59-SEMARNAT-2010). Aunque no presenta problemas de estabilidad demográfica (López-

species with the highest percentage of final survival (50 ± 0.628) and with an acceptable mean expected survival time ($m = 0.85$, $md = 154.7$), is proposed as a rootstock species suitable for grafting with *P. rzedowskii*. In addition, obtaining seeds from *P. ayacahuite*, for plant production, has no effect on the demographic balance of its natural populations, since it has no reproductive problems with 54.9 % seed efficiency and 71.5 % germination (Castilleja et al., 2016).

The least indicated species was *P. pseudostrobus* with lower final survival (20 ± 0.89 %) and mean expected survival time ($m = 0.66$; $md = 121.5$). One of the main factors that probably influenced this result was its distant phylogenetic relationship with *P. rzedowskii*, because it is part of another subgenus (*Pinus*) with different morphological and anatomical characteristics that possibly prevented the complete union of the tissues (Darikova et al., 2013; Goldschmidt, 2014).

The heterogeneity observed between the species was highly significant with the Log-Rank test ($X^2 = 25.24$, $P < 0.0001$), which is due to differences between *P. rzedowskii* with *P. pseudostrobus* ($X^2 = 13.480$, $P < 0.0001$) and *P. maximartenzii* ($X^2 = 8.390$, $P < 0.004$), and these last two species in relation to *P. pinceana* (*P. pseudostrobus*, $X^2 = 15.357$, $P < 0.0001$; *P. maximartenzii*, $X^2 = 9.105$, $P < 0.003$) both with the lowest survival (Figure 2). Differences were also observed between *P. ayacahuite* var. *veitchii* and *P. pseudostrobus* ($X^2 = 5.344$) with lower but significant statistical support ($P < 0.021$). The results suggest that phylogenetic relationships are an important factor for grafting success, showing that the most distant species (*P. pseudostrobus*) was the least successful and had the most significant differentiation.

To date, studies on heterospecific grafting are scarce and no clear pattern of their behavior has been determined. However, some of these studies show trends similar to the results obtained in this study; the study of *P. patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. on *P. radiata* D. Don. with 96.7 % survival (Dyson, 1975), both belonging to the Australes subsection (Gernandt et al., 2005); *P. patula* (Australes subsection) on *P. pseudostrobus* and *P. douglasiana* Mtz. (both in the Ponderosa subsection) with 80 % and 69 % survival, respectively (Villaseñor & Carrera 1980), which belong to the Trifoliae section (Gernandt et al., 2005), which probably made their survival possible. Another study is that of *P. brutia* Ten. on *P. nigra* Arnold. with 56 % survival (Climent et al., 1997), both from *Pinus* subsection (Eckert & Hall, 2006).

A recent study on *P. engelmannii* Carr. grafting with the same species and with a hybrid of *P. engelmannii* x *P. arizonica* Engelm. var. *arizonica* indicated higher survival with the hybrid (83 %) than with the pure species (25 %) (Pérez-Luna et al., 2020b). The authors conclude

Mata, 2013), su semilla se usa para la producción y comercialización de planta ornamental sin regulación. Debido a lo anterior, la regeneración natural de *P. maximartenzii* podría verse afectada si las plantas producidas en los viveros no se reintroducen en sus poblaciones, por tanto, el desarrollo de un programa de repoblación para su protección podría ser requerido.

Una de las especies promisorias para el éxito de los injertos es *P. ayacahuite* var. *veitchii*, que también forma parte del subgénero *Strobus* con un haz vascular como *P. rzedowskii*; aunque está agrupada en otra sección (Quinquefoliae) y subsección (Strobus) (Gernandt et al., 2005) se ha observado que los árboles de ambas especies tienen características fisionómicas muy similares cuando son jóvenes (2 a 15 años), por lo que es muy probable obtener buen acoplamiento de los tejidos. Al ser la segunda especie con el mayor porcentaje de supervivencia final (50 ± 0.628) y con un tiempo medio de supervivencia esperada aceptable ($m = 0.85$, $md = 154.7$), se propone como una especie-patrón apta para su injerto con *P. rzedowskii*. Además, la obtención de semillas de *P. ayacahuite*, para la producción de planta, no afecta el equilibrio demográfico de sus poblaciones naturales, ya que no presenta problemas reproductivos con 54.9 % de eficiencia de semillas y 71.5 % de germinación (Castilleja et al., 2016).

La especie menos indicada fue *P. pseudostrobus* con supervivencia final (20 ± 0.89 %) y tiempo medio de supervivencia esperada ($m = 0.66$; $md = 121.5$) más bajos. Uno de los principales factores que probablemente influyó en este resultado fue su relación filogenética distante con *P. rzedowskii*, debido a que forma parte de otro subgénero (*Pinus*) con características morfológicas y anatómicas diferentes que posiblemente impidieron la unión completa de los tejidos (Darikova et al., 2013; Goldschmidt, 2014).

La heterogeneidad observada entre las especies fue altamente significativa con la prueba de Log-Rank ($X^2 = 25.24$, $P < 0.0001$), la cual se debe a diferencias entre *P. rzedowskii* con *P. pseudostrobus* ($X^2 = 13.480$, $P < 0.0001$) y *P. maximartenzii* ($X^2 = 8.390$, $P < 0.004$), y estas dos últimas especies con relación a *P. pinceana* (*P. pseudostrobus*, $X^2 = 15.357$, $P < 0.0001$; *P. maximartenzii*, $X^2 = 9.105$, $P < 0.003$) ambas con la menor supervivencia (Figura 2). También se presentaron diferencias entre *P. ayacahuite* var. *veitchii* y *P. pseudostrobus* ($X^2 = 5.344$) con un soporte estadístico menor pero significativo ($P < 0.021$). Los resultados sugieren nuevamente que las relaciones filogenéticas son un factor importante para el éxito de los injertos, mostrando que la especie más distante (*P. pseudostrobus*) fue la menos exitosa y que generó la mayor diferenciación.

A la fecha, los estudios sobre injertos heteroespecíficos son escasos y no se ha logrado determinar algún patrón

that the low grafting success was due to the high density of resiniferous canals in *P. engelmannii* scions (Pérez-Luna et al., 2019); while, in the case of grafting success with the hybrid, the authors indicate that the presence of few stomata in the needles of *P. arizonica* makes the grafts more resistant to environmental stress with an increase in survival. These differences are present despite the fact that both taxa are closely related (Ponderosae subsection; Eckert & Hall, 2006), which can also be considered as another important factor for the results obtained with the grafts of the hybrid plants.

In a study on the anatomy of rootstock and grafting rootstocks of four pine species (*P. patula*, *P. greggii* Engelm. ex Parl., *P. teocote* Schiede ex Schltdl. et Cham. and *P. leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham.), Castro-Garibay et al. (2017) demonstrated that a circular and continuous cambium is the most suitable for a complete connection of graft tissues; these authors observed these characteristics for *P. teocote* and *P. leiophylla*, considered as candidate rootstock-species for grafting the rest of the species they evaluated. In the same study, the anatomical results suggested the influence of phylogenetic proximity, where the most promising species (*P. teocote* and *P. leiophylla*) were included in a phylogenetic study of *Pinus* (Gernandt et al., 2005), within the Australes subsection and all (the four species) within the Trifoliata section.

The above studies show that phylogenetic proximity is a common factor for grafting success. Therefore, the heterogeneity of the results obtained in this study is associated with the phylogenetic and evolutionary differences of the species. Currently, there is no information on the anatomy of the stems of the species studied; however, some taxonomic studies report anatomical differences in needles (Farjon & Styles, 1997; Madrigal & Caballero, 1969; Martínez, 1948). Therefore, future studies on vascular tissues of rootstock-plants and scions are required to corroborate the compatibility of vascular tissues of species systematically and rigorously.

Conclusions

Side-veneer grafting propagation strategy is viable for *P. rzedowskii*, because it achieves a survival of more than 80 %. It is also shown that interspecific grafting is possible, and that the species factor affects survival over time, which is associated with the phylogenetic closeness of the species. The highest survival was obtained with rootstock plants of *P. pinceana*, which forms a monophyletic group with *P. rzedowskii*. This information is an initiative with a solid scientific and biotechnological basis for the propagation of the species on a larger scale, of great utility for its *ex-situ* conservation and for future genetic improvement studies.

claro de su comportamiento. No obstante, algunos de ellos muestran tendencias similares a los resultados obtenidos en este estudio; el ensayo de *P. patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. en *P. radiata* D. Don. con 96.7 % de supervivencia (Dyson, 1975), ambas pertenecientes a la subsección Australes (Gernandt et al., 2005); *P. patula* (subsección Australes) en *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana* Mtz. (ambas en la subsección Ponderosa) con 80 % y 69 % de supervivencia, respectivamente (Villaseñor & Carrera 1980), las cuales pertenecen a la sección Trifoliae (Gernandt et al., 2005), lo que probablemente posibilitó su supervivencia. Otro estudio es el de *P. brutia* Ten. en *P. nigra* Arnold. con 56 % de supervivencia (Climent et al., 1997), ambas de la subsección *Pinus* (Eckert & Hall, 2006).

Un estudio reciente sobre injertos de *P. engelmannii* Carr. con la misma especie y con un híbrido de *P. engelmannii* x *P. arizonica* Engelm. var. *arizonica* indicó mayor supervivencia con el híbrido (83 %) que con la especie pura (25 %) (Pérez-Luna et al., 2020b). Los autores concluyen que el bajo prendimiento se debió a la alta densidad de canales resiníferos en las varetas de *P. engelmannii* (Pérez-Luna et al., 2019); mientras que, para el caso del éxito de los injertos con el híbrido, los autores indican que la presencia de pocos estomas en las acículas de *P. arizonica* hace que los injertos sean más resistentes al estrés ambiental con un incremento en la supervivencia. Estas diferencias existen a pesar de que ambos taxones están relacionados cercanamente (subsección Ponderosae; Eckert & Hall, 2006), lo que también puede considerarse como otro factor importante para los resultados obtenidos con los injertos de las plantas híbridas.

En un estudio sobre la anatomía de plantas-patrón y varetas para injertos de cuatro especies de pino (*P. patula*, *P. greggii* Engelm. ex Parl., *P. teocote* Schiede ex Schltdl. et Cham. y *P. leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham.), Castro-Garibay et al. (2017) demostraron que un cámbium circular y continuo es el más adecuado para una conexión completa de los tejidos del injerto; dichos autores observaron estas características en *P. teocote* y *P. leiophylla*, consideradas como especies-patrón candidatas para el injerto del resto de las especies que evaluaron. En el mismo trabajo, los resultados anatómicos sugirieron la influencia de la cercanía filogenética, donde las especies más promisorias (*P. teocote* y *P. leiophylla*) fueron incluidas en un estudio filogenético de *Pinus* (Gernandt et al., 2005), dentro de la subsección Australes y todas (las cuatro especies) dentro de la sección Trifoliata.

En general, en los estudios mencionados se observa que la proximidad filogenética es un factor común para el éxito de los injertos. Por tanto, la heterogeneidad de los resultados obtenidos en este trabajo está asociada claramente a las diferencias filogenéticas y evolutivas

Acknowledgments

The authors thank the Consejo de la Investigación Científica de la UMSNH, for the funding granted within the 2018-2019 Research Program. The authors also thank to the community of Dos Aguas, Michoacán, for the facilities granted during the study and to the anonymous reviewers who substantially enriched the manuscript with their comments.

End of English version

References / Referencias

- Aparicio-Rentería, A., Viveros-Viveros, H., & Rebolledo-Camacho, V. (2013). Huertos semilleros clonales: una alternativa para los programas de reforestación en Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4(20), 90–97. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322013000600009
- Barchuk, A. H., & Díaz, M. P. (2000). Vigor de crecimiento y supervivencia de plantaciones de *Aspidosperma quebracho-blanco* y de *Prosopis chilensis* en el Chaco árido. *Quebracho*, 8, 17–29. Retrieved from https://fcf.unse.edu.ar/archivos/quebracho/q8_02-Barchuk.pdf
- Castro-Garibay, S. L., Villegas-Monter, A., & López-Upton, J. (2017). Anatomy of rootstocks and scions in four pine species. *Forest Research*, 6(3), 1–6. doi: 10.4172/2168-9776.1000211
- Castilleja, S. P., Delgado, P., Sáenz-Romero, C., & Herrerías, D. Y. (2016). Reproductive success and inbreeding differ in fragmented populations of *Pinus rzedowskii* and *Pinus ayacahuite* var. *veitchii*, two endemic Mexican pines under threat. *Forests*, 7(8), 1–17. doi: 10.3390/f7080178
- Climent, J. M., Prada, M. A., Gil, L. A., & Pardos, J. A. (1997). Increase of flowering in *Pinus nigra* Arn subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco by means of heteroplastic grafts. *Annals of Forest Science*, 54(2), 145–153. doi: 10.1051/forest:19970202
- Darikova, Y. A., Vaganov, E. A., Kuznetsova G. V., & Grachev, A. M. (2013). Changes in the anatomical structure of tree rings of rootstock and scion in the heterografts of Siberian pine. *Trees*, 27, 1621–1631. doi: 10.1007/s00468-013-0909-6
- Delgado, P., Piñero, D., Chaos, A., Pérez-Nasser, N., & Alvarez-Buylla, E. R. (1999). High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine: *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 86(5), 669–676. doi: 10.2307/2656576
- Dyson, W. G. (1975). A note on dwarfing of *Pinus patula* grafts. *Silvae Genetica*, 24, 60–61. Retrieved from https://www.thuenen.de/media/institute/fg/PDF/Silvae_Genetica/1975/Vol_24_Heft_2-3/24_2-3_60.pdf
- Eckert, J. A., & Hall, D. B. (2006). Phylogeny, historical biogeography, and patterns of diversification for *Pinus* de las especies. Actualmente, no existe información sobre la anatomía de los tallos de las especies estudiadas; sin embargo, algunos trabajos taxonómicos reportan diferencias anatómicas en acículas (Farjon & Styles, 1997; Madrigal & Caballero, 1969; Martínez, 1948). Por lo anterior, se requiere de trabajos futuros sobre los tejidos vasculares de las plantas-patrón y varetas que de manera sistemática y rigurosa corroboren la compatibilidad de los tejidos vasculares de las especies.

Conclusiones

La estrategia de propagación por injerto enchapado lateral es viable para *P. rzedowskii*, ya que se logra supervivencia mayor de 80 %. De igual manera se demuestra que el injerto interespecífico es posible y que el factor especie afecta la supervivencia a través del tiempo, la cual está asociada a la cercanía filogenética de las especies. La mayor supervivencia se obtuvo con plantas-patrón de *P. pinceana*, que forma un grupo monofilético con *P. rzedowskii*. Esta información es una iniciativa con una sólida base científica y biotecnológica para la propagación de la especie a mayor escala, de gran utilidad para su conservación *ex situ* y para ensayos futuros de mejoramiento genético.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de la Investigación Científica de la UMSNH, por el financiamiento otorgado dentro del Programa de Investigación 2018-2019. A la comunidad de Dos Aguas, Michoacán, por las facilidades otorgadas durante el trabajo de campo y a los revisores anónimos que con sus comentarios enriquecieron el manuscrito sustancialmente.

Fin de la versión en español

(Pinaceae): Phylogenetic tests of fossil-based hypotheses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(1), 166–182. doi: 10.1016/j.ympev.2006.03.009

Farjon, A., & Styles, B. T. (1997). *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica*, 75, 1–291. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4393881>

García, B. J. J. (2012). Análisis de supervivencia aplicado al estudio de la mortalidad en injertos de inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten). *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(4), 759–769. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6104314>

Gernandt, D. S., Geada, L. G., Ortiz, G. S., & Liston, A. (2005). Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*, 54(1), 29–42. doi: 10.2307/25065300

Goldschmidt, E. E. (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–9. doi: 10.3389/fpls.2014.00727

- Guadaño, C., & Mutke, S. (2016). *Establecimiento de plantaciones clonales de Pinus pinea para la producción de piñón mediterráneo*. Madrid, España: INIA.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (2002). *Plant propagation. principles and practices* (7th ed.). New Jersey, USA: Prentice Hall.
- Le, C. T. (1997). *Applied survival analysis*. New York, USA: John Wiley and Sons.
- López-Mata, L. (2013). The impact of seed extraction on the population dynamics of *Pinus maximartinezii*. *Acta Oecologica*, 49, 39–44. doi: 10.1016/j.actao.2013.02.010
- Madrigal, X. S., & Caballero, D. M. (1969). *Una nueva especie mexicana de Pinus*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales.
- Martínez-Ávalos, J., Sánchez-Castillo, C. G., Martínez-Gallegos, R., Sánchez-Ramos, G., Trejo I., Mora-Olivo, A., & Alanís, E. (2015). Primer registro de *Pinus pinceana* (Pinaceae) para Tamaulipas: aspectos ecológicos y estructurales. *Botanical Sciences*, 93(2), 357–360. doi: 10.17129/botsci.87
- Molina-Freaner, F., Delgado, P., Perez, N. N., Piñero, D., & Alvarez-Buylla, E. R. (2001). Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botany*, 79(2), 131–138. doi: 10.1139/b00-155
- Montes, J. R., Peláez, P., Willyard, A., Moreno-Letelier, A., Piñero, D., & Gernandt, D. S. (2019). Phylogenetics of *Pinus* subsection *Cembroides* Engelm. (Pinaceae) inferred from low-copy nuclear gene sequences. *Systematic Botany*, 44(3), 501–518. doi: 10.1600/036364419X15620113920563
- Muñoz-Flores, H. J., Prieto-Ruiz, J. Á., Flores-García, A., Pineda-Ojeda, T., & Morales-González, E. (2013). *Técnicas de injertado "enchapado lateral" y "fisura terminal" en Pinus pseudostrobus Lindl.* México: INIFAP. Retrieved from https://www.academia.edu/31278206/T%C3%A9cnicas_de_injertado_enchapado_lateral_y_fisura_terminal_en_Pinus_pseudostrobus_Lindl
- Pérez-Luna, A., Prieto-Ruiz, J. A., López-Upton, J., Carrillo-Parra, A., Wehenkel, Ch., Chávez-Simental, J. A., & Hernández-Díaz, J. C. (2019). Some factors involved in the success of side veneer grafting of *Pinus engelmannii* Carr. *Forests*, 10(2), 112. doi: 10.3390/f10020112
- Pérez-Luna, A., Wehenkel, C., Prieto-Ruiz, J. A., López-Upton, J., Solís-González, S., Chávez-Simental, J. A., & Hernández, J. C. (2020a). Grafting in conifers: a review. *Pakistan Journal of Botany*, 52(4), 1–10. doi:10.30848/PJB2020-4(10)
- Pérez-Luna, A., Wehenkel, C., Prieto-Ruiz, J. A., López-Upton, J., Solís-González, S., & Hernández-Díaz, J. C. (2020b). Survival of side grafts with scions from pure species *Pinus engelmannii* Carr. and the *P. engelmannii* x *P. arizonica* Engelm. var. *arizonica* hybrid. *PeerJ*, 8:e8468. doi: 10.7717/peerj.8468
- Quiroz-Vázquez, R. I., López-Upton, J., Cetina-Alcalá, V. M., & Ángeles-Pérez, G. (2017). Capacidad reproductiva de *Pinus pinceana* Gordon en el límite sur de su distribución natural. *Agrociencia*, 51(1), 91–104. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000100091
- R Development Core Team. (2016). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. México: Diario Oficial de la Federación. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/134778/35.-NORMA_OFICIAL_MEXICANA_NOM-059-SEMARNAT-2010.pdf
- Sigala, R. J. A., González, T. M. A., & Prieto-Ruiz, J. A. (2015). Supervivencia en plantaciones de *Pinus pseudostrobus* Lindl. en función del sistema de producción y preacondicionamiento en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(30), 20–31. doi: 10.29298/rmcf.v6i30.205
- Villaseñor, R. R., & Carrera, G. M. (1980). Tres ensayos de injertado en *Pinus patula* Schl. et Cham. *Ciencia Forestal*, 5(23), 21–36. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19820685496>