

# INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS DE PINOS CON DIFERENTES HONGOS E IDENTIFICACIÓN VISUAL DE LA ECTOMICORRIZA

## PINE SEEDLING INOCULATION WITH DIFFERENT FUNGI AND VISUAL IDENTIFICATION OF ECTOMYCORRHIZAE

María Valdés Ramírez<sup>1</sup>, Enrique Ambríz Parrá, Alejandro Camacho Vera<sup>2</sup> y Aurelio M. Fierros González<sup>3</sup>

### RESUMEN

Dada la necesidad de reforestar grandes áreas del territorio nacional y de contar con microorganismos capaces de inducir el buen crecimiento de los pinos, se desarrolló un ensayo que utiliza un método sencillo de inoculación y de evaluación visual de las ectomicorrizas. Se trabajó con *Pinus devoniana* y *P. pseudostrobus*. Los hongos estudiados fueron *Pisolithus tinctorius* 202 (cepa española), *P. tinctorius* (PHC) y *Scleroderma texense* (nativo). La identificación de las micorrizas se logró por el color y forma de las mismas. A los seis meses de la inoculación, las tres especies fúngicas mostraron buena capacidad colonizadora en los dos taxa de *Pinus* probados; además presentaron una buena formación de micelio externo. Bajo las condiciones experimentales, *S. texense* fue más invasiva de la raíz. En esta etapa temprana tanto *P. devoniana*, como *P. pseudostrobus* al inocularse con *S. texense* tuvieron significativamente mayor biomasa de la parte aérea que las plantas testigo ( $p < 0.05$ ), pero sin diferencias significativas en el volumen. Un año después (a 18 meses de la inoculación), se observó un volumen grande en *Pinus devoniana* con la de *P. tinctorius* 202, en tanto que *S. texense* incidió en el aumento de biomasa con relación a *P. tinctorius* (PHC) y su impacto en el peso seco de las plantas. En *P. pseudostrobus* los valores más altos de volumen y biomasa se registraron con *P. tinctorius* (PHC). En la segunda fase, la colonización micorrízica ya no fue dominada por *S. texense* y se identificaron otros hongos externos en el sistema radical.

**Palabras clave:** Ectomicorriza, identificación visual, *Pinus devoniana*, *Pinus pseudostrobus*, *Pisolithus*, *Scleroderma*.

### ABSTRACT

From the urgent need for reforestation of large areas of our country and to find out microorganisms able to stimulate the growth of pines, this study was conducted using a practical inoculation method to allow an easy recognition of ectomycorrhizal colonization by nursery workers. *Pinus devoniana* and *P. pseudostrobus* were the tree species used in this experiment. The ectomycorrhizal fungi were *Pisolithus tinctorius* 202 (a Spanish isolate), *P. tinctorius* (PHC) and *Scleroderma texense* (native fungus). Identification of fungi based on form and color was easy. Six months after the inoculation the three fungi showed good root colonization; they formed visible external mycelium in both pine species tested. Under the assayed conditions *Scleroderma texense* appeared as a good root colonizer. At this early stage of growth the dry weight of both *P. devoniana* and *P. pseudostrobus* treated with *S. texense* was significantly different compared to control plants ( $p < 0.05$ ); with no statistical differences on volume. After 18 months of inoculation, statistical analysis indicated that the volume of *Pinus devoniana* inoculated with *P. tinctorius* 2002 was significantly higher compared to other treatments; plants treated with *P. tinctorius* 202 and with *S. texense* were different to *P. tinctorius* (commercial strain) in terms of dry matter of the plant. In this stage of seedling growth, root colonization was no longer dominated by *S. texense*; roots were also colonized by other fungi occurring in the nursery soil.

**Key words:** Ectomycorrhizae, visual identification, *Pinus devoniana*, *Pinus pseudostrobus*, *Pisolithus*, *Scleroderma*.

Fecha de recepción: 08 de marzo de 2010

Fecha de aceptación: 19 de octubre de 2010

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Correo-e: mvaldesr@ipn.mx

<sup>2</sup> Departamento de Biología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

<sup>3</sup> Programa Forestal, Colegio de Postgraduados.

## INTRODUCCIÓN

El territorio nacional presenta erosión debido a la alta tasa de deforestación existente entre 75,000 y casi 2 millones de hectáreas por año (Velásquez *et al.*, 2002), lo que pone en riesgo la biodiversidad de México. Aunado a esto, en los bosques del área metropolitana se observa tal deterioro, que los importantes servicios ambientales que brindan a una de las concentraciones urbanas más grandes y complejas del mundo están muy amenazados, por lo que es prioritario conocer alternativas que permitan contribuir a su restauración, sin perjudicar el medio ambiente.

En la naturaleza la regla es que todas las plantas viven asociadas con hongos cuyo resultado es una nueva estructura llamada micorriza. Diversas especies de *Pinus* se usan tradicionalmente en programas de reforestación y de regeneración; sin embargo, su establecimiento ha fallado porque en este proceso y durante su crecimiento son dependientes de la ectomicorriza (EM), aún en las condiciones extremas de reforestación, en particular, en sitios con largos períodos de sequía.

Las EM mejoran el estado fisiológico de los fitobiontes a través de un incremento de la absorción de agua y de nutrimentos (Vogt *et al.*, 1998; Read, 1999), pues el micelio que se extiende por el suelo se convierte en un órgano de absorción que llega a tener dimensiones con una razón raíz:micelio de 1:10<sup>5</sup>; también juegan un papel importante en la protección de la planta contra factores ambientales adversos como: sequía, presencia de patógenos y de metales pesados, entre otros (Read, 1992).

Las EM difieren en sus capacidades para transporte así como la absorción de nutrimentos para promover el crecimiento del árbol asociado (Burgess *et al.*, 1994), habilidades que se relacionan con la colonización radical y con el desarrollo del mismo hongo hacia el suelo; es decir, más allá de la raíz (Thomson *et al.*, 1994). En otras palabras, hay especies como *Suillus bovinus* (L. ex Fr.) que pueden formar hifas de hasta 200 m g<sup>-1</sup> de suelo seco, en bosques (Read, 1991). Este micelio varía en su organización; Schram (1966) observó rizomorfos del micelio de *Pisolithus tinctorius* Mich.: Pers interconectando plántulas de pino a una distancia de 42 cm.

Otras funciones del micelio externo son también la de incrementar el volumen de suelo explorado; además de contribuir a la colonización de las raicillas en proceso de formación (Read, 1992, Schram, 1966).

Desde hace tiempo se sabe que el retraso en el establecimiento de las micorrizas o su carencia en la planta producida en los viveros conducen a obtener plántulas enanas y deficientes en nutrimentos (Trappe y Strand, 1969), o en una baja supervivencia durante la repoblación de áreas sin

## INTRODUCTION

Erosion is present at a national scale due to the high deforestation rate that has been estimated from 75,000 up to 2 million hectares per year (Velásquez *et al.*, 2002), which means that the biodiversity of Mexico is at risk. In addition, the decline of the forests of the metropolitan area is so intense that the important environmental services that they provide to one of the greatest and most complex urban concentrations of the world are severely threatened; thus, it is mandatory to know the options for its restoration, without damaging the environment.

In nature, the rule is that all the plants live in association with fungi, which results in a new structure known as mycorrhiza. Several *Pinus* species are traditionally used for reforestation programs and regeneration; however, its establishment has failed since at this stage they depend upon ectomycorrhizae (EM) as well as for their future development, even in extreme reforestation conditions, in particular, in places with long drought periods.

EMs improve the physiologic state of phytobionts by increasing water absorption and nutriments (Vogt *et al.*, 1998; Read, 1999), since mycelium extends through soil and becomes an absorption organ that may develop such a dimension as 1:10<sup>5</sup> root:mycelium proportion; it also plays an important role in the protection of the plant against environmental factors such as drought, pathogens and heavy metals (Read, 1992).

EMs differ in their transport abilities as well as in nutriment absorption in order to promote growth of the associated tree (Burgess *et al.*, 1994), abilities that are related to root colonization and to the development of the fungus itself towards the soil, that is, beyond the root (Thomson *et al.*, 1994). In other words, there are species such as *Suillus bovinus* L. ex Fr. that form hyphae up to 200 m g<sup>-1</sup> of dry soil in forests (Read, 1991). This mycelium vary in their organization; Schram (1966) observed rhizomorphs of the mycelium of *Pisolithus tinctorius* Mich.: Pers interconnecting pine seedlings at a 42 cm distance.

Other functions of the external mycelium are the increment of the explored soil volume as well as to help the colonization of the forming rootlets (Read, 1992, Schram, 1966).

It has been known for some time that the late mycorrhizal formation or the lack of them in plants produced at nurseries convey to obtain dwarf plants with deficiency of nutriments (Trappe and Strand, 1969), or to a low survival during the covering of tree-less areas and in the restoration of marginal sites (Marx, 1980). Also, the ingredients of the substrate used in pots, frequently have viable EM fungi propagule. Those which grow in media with high nutritious levels, regularly show an erratic and EM deficient formation (Castellano y Molina, 1989).

árboles y en la recuperación de sitios marginales (Marx, 1980). Además, los componentes del sustrato que se usan en los contenedores, con frecuencia adolecen de propágulos viables de hongos EM. Así mismo, los individuos que crecen en medios con niveles nutrimentales altos, es común que tengan una generación errática y deficiente de EM (Castellano y Molina, 1989).

Esto significa que las plántulas de pino sin micorrizar, aún en sustratos artificiales, crecen bien, si se les abastece con suficiente agua y nutrimentos, pero después de que son plantadas, su capacidad para absorber dichos materiales del suelo que les permitan satisfacer las demandas de crecimiento y transpiración, es menor. Las plantas con EM están en mejores condiciones para iniciar la exploración del suelo y por lo tanto, tienen más oportunidades de sobrevivir exitosamente en los sitios de reforestación (Kropp y Langlois, 1990).

La preselección de los hongos EM es una etapa crítica para el establecimiento de programas de inoculación en vivero, los cuales aseguran que las plantas de los contenedores tengan un buen desarrollo. La elección se basa en las diferencias fisiológicas y ecológicas de las especies fúngicas e incluso entre cepas (Marx *et al.*, 1992). Los criterios que se utilizan son los siguientes: a) compatibilidad simbiótica hongo-planta, b) adaptabilidad del hongo EM al sitio de trasplante, c) capacidad del hongo para competir con otros hongos presentes en el vivero y en el sitio de trasplante y, d) facilidad de producción del inóculo.

El inóculo esporal es muy usado por su fácil aplicación y por la gran cantidad de esporas que existen en los esporomas de los hongos; algunos de ellos son particularmente ricos en este tipo de propágulos como *Pisolithus* y *Scleroderma*. Además, no se requiere de un cultivo puro (cuyo proceso necesita de varios meses en el laboratorio) y las esporas toleran períodos largos de almacenamiento (Rincón *et al.* 2001). Aunado a esto, en diferentes taxa han mostrado ser un inóculo eficiente (Marx, 1980; Parladé *et al.*, 1996; Rincón *et al.*, 2001). También se ha tenido éxito cuando se aplica en plantaciones de coníferas a raíz desnuda (Castellano y Trappe, 1985; Marx 1991).

En este ensayo, se propuso usar el inóculo esporal de dos taxa EM comunes en los bosques de México, que forman abundantes esporas y que son eficientes en la formación de micorrizas con varias especies de pino producidas en contenedores de viveros (Marx, 1991; Parladé *et al.*, 1996; Rincón *et al.*, 2001). Así mismo, se han considerado en programas de reforestación con otros árboles y en suelos con diversas condiciones de estrés (Valdés, 1986), incluso en suelos salinos (Chen *et al.*, 2001). El objetivo fue generar información que conduzca a un método sencillo de inoculación y de identificación visual de la EM a partir de hongos capaces de promover un buen crecimiento de los pinos en su etapa inicial.

This means that pine seedlings without mycorrhiza, even in artificial substrates, grow well, if they are provided with enough water and nutriments, but after they are planted, their ability to absorb those materials from the soil that makes it possible to satisfy growth and transpiration demands, is lower. Plants with EM are in better conditions to start soil exploration and, thus, have more opportunities to survive successfully in reforestation stands (Kropp y Langlois, 1990).

The pre-selection of the EM fungi is a critical stage for the establishment of nursery inoculation programs, which guarantee that the plants in the pots have a good development. Election is based upon the physiological and ecological differences of the fungi species and also of the spawn (Marx *et al.*, 1992). The following criteria are used: a) plant-fungi symbiotic compatibility, b) EM fungi adaptability to the transplant site, c) ability of the fungus to compete with other fungi present in the nursery and transplant site, and d) feasibility of inoculum production.

Sporal inoculum is used as it is easy to apply and due to the great number of spores that are in the fungi sporomes; some of them are particularly rich in this kind of propagules like *Pisolithus* and *Scleroderma*. Also, they do not require a pure culture (whose processing needs several months at the lab) and their spores tolerate long storage periods (Rincón *et al.*, 2001). Besides this, it has proved to be an efficient inoculum on different taxa (Marx, 1980; Parladé *et al.*, 1996; Rincón *et al.*, 2001); it has been successful too when applied in naked-root conifer plantations (Castellano y Trappe, 1985; Marx, 1991).

In the actual essay was used the sporal inoculum of two EM taxa very common in the forests of Mexico that form abundant spores and that are efficient in the mycorrhizal formation with several pine species produced in nursery containers (Marx, 1991; Parladé *et al.*, 1996; Rincón *et al.*, 2001). They have been taken into account in reforestation programs with other trees and in soils with diverse stress conditions (Valdés, 1986), including saline trees (Chen *et al.*, 2001). Thus, the objective was to produce information that leads to a simple inoculation method and of the EM visual identification from fungi that are able to promote a good pine growth in their initial stage.

The selected pine species are fast growing, *Pinus devoniana* Lindl. and *P. pseudostrobus* Lindl.

## METHODS AND MATERIALS

An experiment was established with *Pinus devoniana* and *P. pseudostrobus* -that were selected by the National Forest Commission (CONAFOR) which also provided the seed- and were inoculated with three different ectomycorrhizal fungi from various provenances. In the first stage, six month long, the vegetal material was kept in growth chambers and in the

Las especies de pino estudiadas son de crecimiento rápido, *Pinus devoniana* Lindl. y *P. pseudostrobus* Lindl.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se montó un ensayo con *Pinus devoniana* y *P. pseudostrobus* que fueron seleccionadas por la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), misma que proporcionó la semilla y se utilizaron con tres hongos ectomicorrícicos de diferente procedencia. En la primera etapa, de seis meses de duración, el material vegetal se mantuvo en cámara de crecimiento y en la segunda, 12 meses adicionales, se continuó el proceso en vivero. Las plántulas de pino se inocularon individualmente con cada uno de los taxa fúngicos y se dejaron individuos sin inocular, como testigos.

### Producción de inóculo

Los hongos EM con los que se trabajó fueron *Pisolithus tinctorius* 202 Mich.: Pers, *P. tinctorius* comercial (PHC) y *Scleroderma texense* Berk, los que se seleccionaron porque producen ectomicorrizas muy definidas que se distinguen fácilmente por su color.

Las esporas de la primera cepa fueron donadas por el Dr. Xavier Parladé del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarios de Barcelona, España. El inoculante comercial; lo donó la compañía PHC. Los esporomas de *S. texense* se recolectaron en un bosque de pino-encino de la localidad Cañadas de Nanchititla, municipio Tejupilco, Estado de México.

El inóculo se hizo a base de esporas de los tres Sclerodermataceos. Los inoculantes se prepararon con vermiculita como sustrato, con base en la característica hidrófoba de las esporas. Los esporomas de *S. texense* se tamizaron en una malla de 0.5 mm para liberar las esporas, su número se cuantificó con una cámara cuadrículada de Petroff-Hausser. Un gramo de *P. tinctorius* (Pt) tuvo  $16 \times 10^8$  y uno de *Scleroderma* (St)  $5 \times 10^8$  (Rincón *et al.*, 2001).

### Inoculación y condiciones de cultivo.

Se utilizaron contenedores de 175 mL y el sustrato consistió en una mezcla de turba:vermiculita (grado 2), v: v, el cual se esterilizó en autoclave durante 60 min a 120°C y su pH se ajustó a 5.5. Las esporas se colocaron en el sustrato en cantidades de  $10^7$  de Pt y de  $10^6$  de St. La cantidad de inoculante comercial se definió de acuerdo a las indicaciones del fabricante, que consistió en  $10^6$  esporas.

Las semillas de los pinos se lavaron por 12 h con agua corriente, se desinfectaron con  $H_2O_2$  por 30 min y se escarificaron por 30 días a 5°C. Se pusieron dos semillas en cada contenedor y después de la germinación se dejó una sola plántula, lo que dio un total de 50 individuos por tratamiento; de ellos, se evaluaron 20 en cada etapa de crecimiento.

second, 12 additional months, the nursery process continued. Pine seedlings were inoculated individually with each of the fungi taxa and some were left without inoculation, for control.

### Inoculum production

*Pisolithus tinctorius* 202 Mich.: Pers, *P. tinctorius* comercial (PHC) y *Scleroderma texense* Berk were the EM fungi used, and they were selected since they produce very defined ectomycorrhizae that are easily distinguished by their color.

The spores of the first spawn were provided by Dr. Xavier Parladé of the Agricultural Food Institute of Research and Technology of Barcelona, Spain. The commercial inoculum was given in donation by PHC company. The *S. texense* sporomes were collected in a pine-oak forest of Cañadas de Nanchititla location, Tejupilco municipio at Estado de México.

Inoculum was made upon spores of the three Sclerodermataceae. Inoculants were prepared by using vermiculite as substrate, based upon the hydrophobic condition of spores. *S. texense* sporomes were passed through a 0.5 mm sieve in order to free the spores, which were counted by a Petroff-Hausser square lens camera. One gram of *P. tinctorius* (Pt) was  $16 \times 10^8$  and one of *Scleroderma* (St),  $5 \times 10^8$  (Rincón *et al.*, 2001).

### Inoculation and culture conditions

175 mL containers were used and the substratum was made up of a mixture of peat: vermiculite (2 degree), v: v, which was put into a sterilizer for 60 minutes at 120°C and pH was adjusted at 5.5.  $10^7$  of Pt and  $10^6$  of St spores were put on the substrate. The amount of  $10^6$  spores of the commercial inoculum was determined according to the instructions of the manufacturer.

The pine seeds were washed during 12 h with regular water, were disinfected with  $H_2O_2$  during 30 minutes and scarified for 30 days at 5°C. Two seeds were put into each container and after germination, a single seedling was left, which became a total of 50 singles per treatment; of them, 20 of each growth stage were assessed.

In the first stage of the essay, the vegetal material was put in a growth chamber at 25-30°C and 50% of relative humidity (RH) with a 16 h photoperiod. Watering was applied when necessary and was fertilized every three weeks with a 17N-6P-17K solution at a 10 mL/ seedling ratio. The second stage was carried out in nursery conditions.

### Growth assessment

Six months after inoculation, the following variables of the aerial and root parts of the seedlings were determined:

En la primera fase del ensayo, el material vegetal se colocó en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25-30°C y 50% de humedad relativa (HR), con 16 h de fotoperíodo. El riego se aplicó cuando fue necesario y se fertilizó cada tres semanas con 10 mL/plántula con una solución de 17N-6P-17K. La segunda fase se llevó a cabo en condiciones de vivero.

### Evaluación del crecimiento.

Después de seis meses de la inoculación, se determinaron las siguientes variables de la parte aérea y radical de las plántulas: volumen (D<sup>2</sup>H) (Ruehle *et al.*, 1984) y biomasa total. Para ello se seleccionaron al azar y se cosecharon 20 plántulas de cada tratamiento. Para obtener la biomasa se secaron las raíces y los tallos de cada planta a 60°C durante 48 h. El diámetro de la corona se midió con un calibrador electrónico digital marca Truper.

### Evaluación de la micorrización

Se identificó el tipo de micorriza de acuerdo a su morfología y color. Las especies fúngicas inoculadas se distinguen por el color de la EM que forman: la de Pt (PHC) es color ámbar, la cepa Pt 202 color amarillo y St color blanco. En estos tres casos la EM es bifurcada y coraloides.

En la primera etapa de crecimiento las variables de la raíz, volumen y número de bifurcaciones, se evaluaron con el sistema WinRhizo (Régent Instruments Inc., Canadá). A los 18 meses de edad, se hizo visualmente.

A todos los datos se les aplicó un análisis de varianza y las diferencias entre los tratamientos se obtuvieron con la prueba de rango múltiple de Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (Schlotzhauer y Littell, 1987).

volume (D<sup>2</sup>H) (Ruehle *et al.*, 1984) and total biomass. Thus, 20 seedlings for each treatment were selected at random and harvested. In order to know the biomass, the roots and stems of each plant were dried at 60°C during 48 h. Crown diameter was measured with a Truper electronic digital vernier.

### Mycorrhizal colonization assessment

The kind of mycorrhiza was identified according to its morphology and color. The inoculated fungi species are distinguished by the color of the EM they form: Pt (PHC) is amber color, Pt 202 is yellow and St is white. In these three cases, EM is bifurcated and coralloid.

In the first growth stage, root, volume and number of bifurcations were assessed with the WinRhizo (Régent Instruments Inc.) system. At 18 months old, it was visually made.

A variance analysis was applied to all the data, and the differences among treatments were determined by the multiple range Ryan-Einot-Gabriel-Welsh test (Schlotzhauer and Littell, 1987).

## RESULTS AND DISCUSION

The tested spore inoculum was effective for the mycorrhizal colonization of *Pinus devoniana* and *P. pseudostrobus* seedlings. The great amount of spores that can be obtained from a basidium and the easy way to use this type of inoculum make the proposed method a good option for a large scale inoculation of plants in containers, which is coincident with the statements of Brundrett *et al.* (1996).

### Six months after inoculation

The native fungi *S. texense* showed itself as an aggressive pine root colonizer at this growth stage, it covered the roots of the seedlings of other treatments, even of those in which it was not used, including the controls. Its mycelium is white and extensive (Figure 1), while the mycorrhiza shows white bifurcated ramifications (figures 2 and 3).



Figura 1. Micelio de color blanco formado por *Scleroderma texense* en raíces de *Pinus devoniana* cultivado durante seis meses en contenedores, en invernadero.

Figure 1. White color mycelium formed by *Scleroderma texense* in *Pinus devoniana* roots cultivated for six months in containers at a greenhouse.



Figura 2. Micorrizas típicas de color blanco y bifurcadas formadas por *Scleroderma texense* en raíces de *Pinus devoniana* cultivado durante seis meses en contenedores, en invernadero.

Figure 2. White color and bifurcated typical mycorrhiza formed by *Scleroderma texense* in *Pinus devoniana* roots cultivated for six months in containers at a greenhouse.



Figura 3. Acercamiento a la micorriza típica de color blanco y bifurcada y micelio extraradical, formados por *Scleroderma texense* en raíces de *Pinus devoniana* cultivado durante seis meses en contenedores, en invernadero.

Figure 3. Close-up of the white bifurcated typical mycorrhiza and external mycelium formed by *Scleroderma texense* in *Pinus devoniana* roots cultivated for six months in a container at a greenhouse

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El inóculo esporal probado fue efectivo para la micorrización de plántulas de *Pinus devoniana* y *P. pseudostrobus*. La gran cantidad de esporas que pueden obtenerse de un basidioma y la facilidad de uso de este tipo de inóculo hacen que el método propuesto sea apropiado para la inoculación en gran escala de plántulas en contenedores, lo cual coincide con lo planteado por Brundrett *et al.* (1996).

A los seis meses de la inoculación

El hongo nativo *S. texense* se mostró como un colonizador agresivo de las raíces de los pinos en esta etapa del

The inoculated fungi showed compatibility with the pines. In some cases, seedlings of this type of conifers react to the inoculation during the first months of their development with low growth rates, which has been attributed to the great carbohydrate demand of the fungus (Stenström and Ek, 1990). However, in the actual experiment, a rather significant larger biomass amount was produced in regard to the test seedling. When *S. texense* was applied to *P. devoniana* and *P. pseudostrobus*, statistical differences were obtained compared with the non inoculated seedlings; the plants of the two *Pinus* species in which *P. tinctorius* (PHC) was used were different from those inoculated with *S. texense*. No significant differences in seedling volume were observed.

crecimiento, cubrió las raíces de plántulas de otros tratamientos, aún aquellos en los que no se utilizó esta especie, incluso los individuos testigo. Su micelio es blanco y extensivo (Figura 1);

The mycorrhiza formed by *P. tinctorius* 202 is canary bird yellow color (Figure 4) and that by *P. tinctorius* (PHC), amber yellow (Figure 5).



Figura 4. Micorrizas típicas de color amarillo formadas por *Pisolithus tinctorius* 202 en raíces de *Pinus devoniana* cultivado durante seis meses en contenedores, en invernadero.

Figure 4. Yellow color typical mycorrhizae formed by *Pisolithus tinctorius* 202 in *Pinus devoniana* roots cultivated for six months in containers at a greenhouse.



Figura 5. Micorrizas típicas de color ámbar formadas por *Pisolithus tinctorius* (PHC) en raíces de *Pinus devoniana* cultivado durante seis meses en contenedores, en invernadero.

Figure 5. Amber color typical mycorrhizae formed by *Pisolithus tinctorius* (PHC) in *Pinus devoniana* roots cultivated for six months in containers at a greenhouse.

en tanto que, la micorriza presenta ramificaciones bifurcadas y blancas (figuras 2 y 3).

La micorriza formada por *P. tinctorius* 202 es de color amarillo canario (Figura 4) y la de *P. tinctorius* (PHC) amarillo ámbar (Figura 5).

The inoculated fungi showed compatibility with the pines. In some cases, seedlings of this type of conifers react to the inoculation during the first months of their development with low growth rates, which has been attributed to the great carbohydrate demand of the fungus (Stenström and Ek, 1990). However, in the actual experiment, a rather significant larger

Los hongos inoculados mostraron ser compatibles con los pinos en estudio. En algunos casos las plántulas de este tipo de coníferas responden a la inoculación durante los primeros meses de su desarrollo con tasas bajas de crecimiento, atribuidas a la gran demanda de carbohidratos del hongo (Stenström y Ek, 1990). Sin embargo, en el presente experimento se produjo una significativa mayor cantidad de biomasa en relación a las plántulas testigo. Tanto para *P. devoniana*, como para *P. pseudostrobus* con la aplicación de *S. texense* se obtuvieron diferencias estadísticas con respecto

biomass amount was produced in regard to the test seedling. When *S. texense* was applied to *P. devoniana* and *P. pseudostrobus*, statistical differences were obtained compared with the non inoculated seedlings; the plants of the two *Pinus* species in which *P. tinctorius* (PHC) was used were different from those inoculated with *S. texense*. No significant differences in seedling volume were observed. ((Table 1).

The root, volume and bifurcation variables did not have significant differences in any of the treatments (Table 2).

Cuadro 1. Volumen y peso seco de la parte aérea de las plántulas de *Pinus devoniana* y *P. pseudostrobus* cultivadas en cámara de crecimiento durante 24 semanas e inoculadas con tres hongos ectomicorrízicos. Valores promedio de 10 plántulas.

Table 1. Volume and dry weight of the aerial part of *Pinus devoniana* and *P. pseudostrobus* seedlings cultivated in growth chamber for 24 weeks and inoculated with three ectomycorrhizal fungi. Average values of 10 seedlings.

Especie de pino	EM	Volumen (cm <sup>3</sup> )	Biomasa (g)
<i>Pinus devoniana</i>	Testigo	0.155 a*	0.297 bc
	Pt (202)	0.167 a	0.405 ab
	Pt (PHC)	0.119 a	0.239 c
	St	0.163 a	0.445 a
<i>P. pseudostrobus</i>	Testigo	0.263 a	0.284 ab
	Pt (202)	0.271 a	0.308 ab
	Pt (PHC)	0.222 a	0.264 b
	St	0.271 a	0.346 a

Valores con la misma letra en cada columna no difieren significativamente (Ryan-Einot-Gabriel-Welsh, 0.05); Pt = *Pisolithus tinctorius*; PHC = *P. tinctorius* comercial; St = *Scleroderma texense*.

\*Values with the same letter in each column do not differ significantly (Ryan-Einot-Gabriel-Welsh, 0.05); Pt = *Pisolithus tinctorius*; PHC = Commercial *P. tinctorius*; St = *Scleroderma texense*.

Cuadro 2. Variables evaluadas de la raíz de plántulas de *Pinus devoniana* y de *P. pseudostrobus* cultivadas en cámara de crecimiento durante 24 semanas e inoculadas con tres hongos ectomicorrízicos.

Table 2. Assessed variables of the seedlings roots of *Pinus devoniana* and *P. pseudostrobus* cultivated in growth chamber for 24 weeks and inoculated with three ectomycorrhizal fungi.

Especie de pino	EM	Volumen (cm <sup>3</sup> )	Número de bifurcaciones
<i>Pinus devoniana</i>	Testigo	0.127 a*	252.7 a
	Pt (202)	0.184 a	403.5 a
	Pt (PHC)	0.119 a	265.1 a
	St	0.192 a	381.9 a
<i>P. pseudostrobus</i>	Testigo	0.296 a	512.0 a
	Pt (202)	0.276 a	512.8 a
	Pt (PHC)	0.219 a	375.1 a
	St	0.295 a	538.8 a

\*Valores con la misma letra en cada columna no difieren significativamente (Ryan-Einot-Gabriel-Welsh, 0.05); Pt = *Pisolithus tinctorius*; PHC = *P. tinctorius* comercial; St = *Scleroderma texense*.

\*Values with the same letter in each column do not differ significantly (Ryan-Einot-Gabriel-Welsh, 0.05); Pt = *Pisolithus tinctorius*; PHC = Commercial *P. tinctorius*; St = *Scleroderma texense*.



a las plantas no inoculadas; las plantas de las dos especies de *Pinus* en las que se usó *P. tinctorius* (PHC) fueron diferentes a las inoculadas con *S. texense*. No se observaron diferencias significativas en cuanto al volumen de las plántulas (Cuadro 1).

Las variables de la raíz, volumen y bifurcaciones no tuvieron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 3. Volumen y peso seco de la parte aérea de las plántulas de *Pinus devoniana* y *P. pseudostrobus* cultivadas en vivero durante 12 meses e inoculadas seis meses antes con tres hongos ectomicorrícicos. Valores promedio de 20 plántulas.

Table 3. Volume and dry weight of the aerial part of *Pinus devoniana* and *P. pseudostrobus* seedlings cultivated in a nursery during 12 months and inoculated six months before with three ectomycorrhizic fungi. Average values of 20 seedlings.

Especie de pino	Tratamiento	Volumen (cm <sup>3</sup> )	Biomasa (g)
<i>Pinus devoniana</i>	Testigo	2.3067 b*	3.3965 ab
	Pt (202)	2.9312 a	3.6800 a
	Pt (PHC)	2.2011 b	3.1025 b
	St	2.3216 b	3.7979 a
<i>P. pseudostrobus</i>	Testigo	2.3428 b	2.3729 ab
	Pt (202)	2.1011 b	2.1395 b
	Pt (PHC)	2.8439 a	2.5450 a
	St	2.1463 b	2.2422 ab

\*Valores con la misma letra en cada columna no difieren significativamente (Ryan-Einot-Gabriel-Welsh, 0.05); Pt = *Pisolithus tinctorius*; PHC = *P. tinctorius* comercial; St = *Scleroderma texense*.

\*Values with the same letter in each column do not differ significantly (Ryan-Einot-Gabriel-Welsh, 0.05); Pt = *Pisolithus tinctorius*; PHC = Commercial *P. tinctorius*; St = *Scleroderma texense*.

### A los 18 meses de la inoculación

*S. texense* dejó de ser el colonizador dominante en las raíces de los pinos. Se determinaron diferencias estadísticas significativas en las variables de crecimiento tanto en volumen, como en peso seco de la parte aérea. El mayor volumen de *Pinus devoniana* se logró con *P. tinctorius* (202) y el valor superior de biomasa se registró con *P. tinctorius* (202) y *S. texense* (Cuadro 3).

Los datos analizados de las plantas inoculadas de *P. pseudostrobus* mostraron diferencias significativas en volumen y biomasa. Los valores más altos se obtuvieron cuando se inocularon con *P. tinctorius* (PCH) (Cuadro 3).

### Eighteen months after inoculation

*S. texense* stopped being the dominant colonizer of the roots of pines. Significant statistical differences were observed in growth variables of volume and of aerial part dry weight as well. Most of the volume of *Pinus devoniana* was achieved with *P. tinctorius* (202) and the highest biomass value, with *P. tinctorius* (202) and *S. texense* (Table 3).

Of the three species of tested fungi, *S. texense* had a great root colonization ability, with increments in the development of seedlings of the two taxa of *Pinus* in their first stage. It has been observed that some isolations of *Scleroderma* are competitive against native mycorrhizal fungi present in nursery containers (Long Chen et al., 2006) and effective with different pine species (Parladé et al., 1996).

In the second growth stage, after 18 months, plants of *P. devoniana* inoculated with *P. tinctorius* (202) produced the greatest biomass, while those of *P. pseudostrobus* increased their volume and biomass with *P. tinctorius* (PHC). This suggests the importance of selecting ectomycorrhizal fungi according to the pine species.

De las tres especies de hongos ensayadas, *S. texense* tuvo una gran capacidad de colonización de las raíces, con incrementos en el desarrollo de las plántulas de los dos taxa de *Pinus* en su primera etapa. Se ha visto que algunos aislamientos de *Scleroderma* son competitivos ante los hongos micorrízicos nativos presentes en contenedores de vivero (Long Chen *et al.*, 2006), además de ser efectivos con diferentes especies de pinos (Parladé *et al.*, 1996).

En la segunda etapa de crecimiento, a los 18 meses de edad, las plantas de *P. devoniana* inoculadas con *P. tinctorius* (202) y *S. texense* produjeron la mayor biomasa; mientras que las de *P. pseudostrobus* incrementaron su volumen y la biomasa con *P. tinctorius* (PHC). Lo anterior sugiere la importancia de seleccionar los hongos ectomicorrízicos en función de las especies de pinos.

## CONCLUSIONES

Las tres especies de hongos ectomicorrízicos formaron ectomicorrizas en *P. devoniana* y *P. pseudostrobus*. La identificación de las mismas fue fácil, a partir de su diferente color y forma.

Se observó la gran capacidad colonizadora de *S. texense*, en la primera etapa de crecimiento de los pinos. Los efectos de la micorrización parecen acrecentarse conforme aumenta la edad de las plántulas y es mayor en las características aéreas de las mismas, que en las de las raíces.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue llevado a cabo con fondos del Proyecto CONAFOR "Inoculación y persistencia de hongos micorrízicos inoculados a pinos, con fines de reforestación" y del Proyecto IPN 20061576.

## REFERENCIAS

- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajcsuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32, Canberra, Australia. 374 p.
- Burgess, T. I., B. Dell and N. Malajcsuk. 1994. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis*. *New Phytol.* 127:731-739.
- Castellano, M. A. and J. M. Trappe. 1985. Ectomycorrhizal formation and plantation performance of Douglas fir nursery stock inoculated with *Rhizopogon* spores. *Can. J. For. Res.* 15:613-617.
- Castellano, M. A. and R. Molina. 1989. Mycorrhizas. In: The container tree manual. The biological component: nursery pests and mycorrhizas. USDA Forest Service Handbook 674. Washington, DC. USA. pp:101-167
- Chen, D. M., S. Ellul, K. Herdman and J. W. G. Cairney. 2001. Influence of salinity on biomass production by Australian *Pisolithus* spp. isolates. *Mycorrhiza* 11:231-236.
- Kropp, B. R. and C. G. Langlois. 1990. Ectomycorrhizas in reforestation. *Can. J. For. Res.* 20:438-451.

## CONCLUSIONS

The three species of ectomycorrhizal fungi formed ectomycorrhizae with *P. devoniana* and *P. pseudostrobus*. Their identification was easy, from their different color and form.

The great colonizing ability of *S. texense* was observed, in the first growth of pines. Mycorrhization effects seem to increase as does the age of seedlings and are even more intense in their aerial characteristics than in their roots.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The actual research was funded by the Inoculation and mycorrhizal fungi persistence inoculated to pines, with reforestation endings CONAFOR Project and the 20061576 IPN project.

End of the English version

- Long Chen, Y., L. Hua Kang, N. Malajczuc and B. Dell. 2006. Selecting ectomycorrhizal fungi for inoculating plantations in South China: effect of *Scleroderma* on colonization and growth of exotic *Eucalyptus globulus*, *E. urophylla*, and *Pinus radiata*. *Mycorrhiza* 16:251-259.
- Marx, D. H. 1980. Ectomycorrhizal fungus inoculation practices: a tool for improving forestation practices. In: P. Mykola (Ed.). *Tropical Mycorrhiza Research*. Oxford University Press. London, UK. pp. 13-71.
- Marx, D. H. 1991. The practical significance of ectomycorrhizas in forest establishment. In: *Ecophysiology of ectomycorrhizas of forest trees*. Symposium Proc. Marcus Wallenberg Foundation. Stocoolm, Sweden. pp: 54-90.
- Marx, D. H., S. B. Maul and C. E. Cordell. 1992. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In: Leatham, G. F. (Ed.) *Frontiers in industrial mycology*. Chapman and Hall; New York, pp 78-98.
- Parladé, J., J. Péra and I. Alvarez. 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6:237-245.
- Read, D. J. 1991. The role of the mycorrhizal symbiosis in the nutrition of plant communities. In: *Ecophysiology of ectomycorrhizas of forest trees*. Symposium Proc. Marcus Wallenberg Foundation. Estocolmo, Suecia. pp. 27-53.
- Read, D. J. 1999. Mycorrhiza: the state of the art. In: Varma A. and B. Hock (Eds.). *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. New York, NY. USA. pp. 3-34.
- Rincón, A., I. Alvarez and J. Péra. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11:265-277.
- Ruehle, J. L., D. H. Marx and H. D. Muse. 1984. Calculated nondestructive indices of growth response for young pine seedlings. *For. Sci.* 30:469-474.
- Schlotzhauer, S. D. and R. C. Littell. 1987. SAS System for Elementary Statistical Analysis. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA. pp. 232-242.
- Schram, J. M. 1966. Plant colonization studies on black wastes from anthracite mining in Pennsylvania. *Trans. Am. Philos. Soc.* 56:1-194.
- Strentröm, E. and M. Ek. 1990. Field growth of *Pinus silvestris* following nursery inoculation with mycorrhizal fungi. *Can. J. For. Res.* 20:914-918.
- Thomson, B. D., T. S. Grove, N. Malajcsu and G. E. S. Hardy. 1994. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi increasing the growth of *Eucalyptus globulus* in relation of root colonization and hyphal development in soil. *New Phytol.* 125:516-524.

- Trappe, J. M. and R. F. Strand, 1969. Mycorrhizal deficiency in a Douglas-fir region nursery. *For. Sc.* 15:381
- Vogt, K., H. Asbjornsen, A. Ercelawn, F. Montagnini and M. Valdés. 1998. Roots and mycorrhizas in plantation ecosystems. *In*: Nambiar S. and A. Brown (Eds.), *Soil, water and nutrients in tropical plantation forests*. ACIAR/CSIRO Publications. Canberra, Australia. pp. 247- 296.
- Valdés, M. 1986. Survival and growth of pines with specific ectomycorrhizae after three years on a highly eroded site. *Can. J. Bot.* 64:885-888.
- Velázquez, A., J. F. Mass, J. R. Díaz-Gallegos, R. Mayorga-Saucedo, P. C. Alcántara, R. Castro, T. Fernández, G. Bocco, E. Ezcurra y J. L. Palacio. 2002. Patrones y tasas de cambio de uso del suelo en México. *INE, Gaceta Ecológica* 62:21-37.