

Interaction and compatibility in reciprocal grafting with two varieties of *Pinus pseudostrobus* Lindl.

Interacción y compatibilidad en injertos recíprocos con dos variedades de *Pinus pseudostrobus* Lindl.

Rubén Barrera-Ramírez¹; J. Jesús Vargas-Hernández²; Martín Gómez-Cárdenas¹; Eduardo J. Treviño-Garza³; Alberto Pérez-Luna^{2*}

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Av. Latinoamericana, col. Revolución núm. 1101. C. P. 60150. Uruapan, Michoacán, México.

²Colegio de Postgraduados, Postgrado en Ciencias Forestales. km 36.5 carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

³Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Ciencias Forestales. Carretera Nacional km 145. C. P. 67700. Linares, Nuevo León, México.

*Corresponding author: aperez@ujed.mx; tel.: +52 618 812 4488.

Abstract

Introduction: Compatibility between the parts involved in grafting is one of the factors defining its success, growth, and productivity.

Objective: The aim of this study is to determine the effect of the level of taxonomic affinity in the scion/rootstock combination on the survival and shoot growth of reciprocal grafts of *Pinus pseudostrobus* var. *pseudostrobus* and *P. pseudostrobus* var. *oaxacana*.

Materials and methods: The effect of the following three factors was determined: (a) three affinity levels, (b) two varieties of *P. pseudostrobus* and (c) four scion/ rootstock genotypes, on survival and shoot growth (Sg). An ANOVA was performed to determine the effect of factors a, b and c and their interactions on survival and Sg, and a Log-Rank test was carried out for survival analysis.

Results and discussion: Factor a determined that survival was higher in intervarietal grafts (53.3 %); factor b indicated that grafts with scions of var. *pseudostrobus* had higher survival (47.2 %); finally, factor c showed the existence of genotypes that increase success if used as scion and decrease if used as rootstock. Sg only showed statistical differences associated with the effect of factor c, being higher for genotype 62 of var. *pseudostrobus* (18.1 ± 0.63 cm), and in its interaction with factor (a).

Conclusions: There is an adequate level of compatibility between the two varieties of *P. pseudostrobus* with significant effect of variety and scion genotype especially in intervarietal grafting (survival greater than 70 %).

Resumen

Introducción: La compatibilidad entre las partes involucradas del injerto es uno de los factores que define su éxito, crecimiento y productividad.

Objetivos: Determinar el efecto del nivel de afinidad taxonómica en la combinación púa/patrón sobre la supervivencia y crecimiento del brote de injertos recíprocos de *Pinus pseudostrobus* var. *pseudostrobus* y *P. pseudostrobus* var. *oaxacana*.

Materiales y métodos: Se determinó el efecto de tres factores: (a) tres niveles de afinidad, (b) dos variedades de *P. pseudostrobus* y (c) cuatro genotipos de la púa/patrón, sobre la supervivencia y crecimiento del brote (Cb). Se realizó el análisis de varianza para determinar el efecto de los factores a, b y c y sus interacciones sobre la supervivencia y Cb, y una prueba de Log-Rank para el análisis de la supervivencia.

Resultados y discusión: El factor a determinó que la supervivencia fue mayor en injertos intervarietales (53.3 %); el factor b indicó que los injertos con púas de la var. *pseudostrobus* presentan mayor supervivencia (47.2 %); finalmente, el factor c demostró que existen genotipos que aumentan el éxito si se utilizan como púa y disminuye si se utilizan como patrón. El Cb solo presentó diferencias estadísticas asociadas al efecto del factor c, siendo mayor en el genotipo 62 de var. *pseudostrobus* (18.1 ± 0.63 cm), y en su interacción con el factor (a).

Conclusiones: Existe un nivel adecuado de compatibilidad entre las dos variedades de *P. pseudostrobus* con efecto significativo de la variedad y el genotipo de la púa sobre todo en los injertos intervarietales (supervivencia mayor de 70 %).

Keywords: taxonomic affinity; terminal cleft grafting; homografts; intervarietal grafts; genotypes.

Palabras clave: afinidad taxonómica; injerto de fisura terminal; homoinjertos; injertos intervarietales; genotipos.

Introduction

Vegetative propagation allows full cloning of the desired superior genotypes (Darikova et al., 2011). Grafting has been used mainly for fruit tree propagation, while in conifers it has gradually increased, especially for establishing clonal seed orchards (Barrera-Ramírez et al., 2021; Muñoz et al., 2013; Pérez-Luna et al., 2020). The grafting technique is useful for propagating difficult-to-root species (Kita et al., 2018), accelerating seed production with scions from sexually mature individuals (Zobel & Talbert, 1988) and for preserving superior genotypes in clonal banks (Goldschmidt, 2014). Grafting success is higher when scion and rootstock present taxonomic and genetic affinity (Kita et al., 2018; López-Hinojosa et al., 2021).

Scion-rootstock compatibility is reflected by the degree of successful union between the two graft structures and their subsequent development as a single plant (Goldschmidt, 2014). Generally, graft compatibility and success are associated with the level of taxonomic affinity (Darikova et al., 2011). This varies from homografts (when scion and rootstock come from the same individual, with high compatibility), intraspecific grafts (scion and rootstock belonging to the same taxon) and interspecific grafts (scion and rootstock from different species of the same genus), to intergeneric grafts usually presenting incompatibility (Darikova et al., 2011; Goldschmidt, 2014).

Incompatibility between scion and rootstock, due to lack of cambium union, affects graft growth and survival (Castro-Garibay et al., 2017; Goldschmidt, 2014). However, initial cambium attachment alone does not guarantee long-term compatibility; incompatibility sometimes appears after several years (Castro-Garibay et al., 2017; Kita et al., 2018; López-Hinojosa et al., 2021). Although incompatibility is not a measurable quantitative trait several degrees can be differentiated, from a minor interference with a normal development of the graft, to the mortality of one or both structures (Goldschmidt, 2014). The most common failures occur during the choice of the genotypes involved in the graft, as failure is mainly due to differences in growth and development of the parts, where the scion grows faster than the rootstock or vice versa (Goldschmidt, 2014).

The information available on the relationship between taxonomic affinity and graft compatibility in pines is limited (Castro-Garibay et al., 2017), as most of the studies on this topic have been developed using fruit species (Kita et al., 2018). When interspecific grafting of conifers has been practiced (Pérez-Luna et al., 2020), the degree of taxonomic affinity of the parts has not been considered to evaluate the success of the grafts (Castro-Garibay et al., 2017).

Introducción

La propagación vegetativa permite la clonación íntegra de los genotipos superiores deseados (Darikova et al., 2011). El injerto se ha utilizado principalmente para la propagación de árboles frutales, mientras que en coníferas ha aumentado gradualmente, en particular, para establecer huertos semilleros clonales (Barrera-Ramírez et al., 2021; Muñoz et al., 2013; Pérez-Luna et al., 2020). La técnica de injerto es útil para propagar especies difíciles de enraizar (Kita et al., 2018), acelerar la producción de semilla con púas de individuos maduros sexualmente (Zobel & Talbert, 1988) y para preservar genotipos superiores en bancos clonales (Goldschmidt, 2014). El éxito del injerto es mayor cuando la púa y el patrón presentan afinidad taxonómica y genética (Kita et al., 2018; López-Hinojosa et al., 2021).

La compatibilidad entre la púa y patrón se refleja en el grado de éxito de la unión entre ambas estructuras del injerto y su desarrollo posterior como una sola planta (Goldschmidt, 2014). Generalmente, la compatibilidad y éxito del injerto están asociados con el nivel de afinidad taxonómica (Darikova et al., 2011). Esta varía desde homoinjertos (cuando púa y patrón proceden del mismo individuo, con elevada compatibilidad), injertos intraespecíficos (púa y patrón pertenecientes al mismo taxón) e interespecíficos (púa y patrón de diferentes especies del mismo género), hasta injertos intergenéricos que generalmente presentan incompatibilidad (Darikova et al., 2011; Goldschmidt, 2014).

La incompatibilidad entre púa y patrón, debido a la falta de unión del cámbium, afecta el crecimiento y supervivencia del injerto (Castro-Garibay et al., 2017; Goldschmidt, 2014). No obstante, la unión inicial del cámbium no garantiza por sí misma la compatibilidad a largo plazo; en ocasiones, la incompatibilidad aparece después de varios años (Castro-Garibay et al., 2017; Kita et al., 2018; López-Hinojosa et al., 2021). Aunque la incompatibilidad no es un rasgo cuantitativo medible se pueden diferenciar varios grados, desde una leve interferencia con el desarrollo normal del injerto, hasta la mortalidad de alguna o ambas estructuras (Goldschmidt, 2014). Las fallas más comunes se presentan durante la elección de los genotipos involucrados en el injerto, pues el fracaso se debe principalmente a las diferencias en crecimiento y desarrollo de las partes, donde la púa crece más rápido que el patrón o viceversa (Goldschmidt, 2014).

La información disponible de la relación entre afinidad taxonómica y compatibilidad de injertos en pinos es limitada (Castro-Garibay et al., 2017), ya que la mayoría de los trabajos al respecto se han desarrollado en especies frutales (Kita et al., 2018). En las ocasiones en que se han practicado injertos interespecíficos de

Pinus pseudostrabus var. *pseudostrabus* Lindl. and *P. pseudostrabus* var. *oaxacana* Martínez have economic and ecological importance in Mexico, due to their wide distribution (case var. *pseudostrabus*) and common use in reforestation programs and commercial plantations (Barrera-Ramírez et al., 2020; Viveros-Viveros et al., 2006). In addition, these species have been incorporated in forest genetic improvement programs (Viveros-Viveros et al., 2006) and in vegetative propagation studies by grafting (Barrera-Ramírez et al., 2021; Muñoz et al., 2013) with varying degrees of success. Due to the genetic variation and differentiation within and among its populations, this species represents a good biological model to evaluate the relationship between the taxonomic affinity of the scion/ rootstock combination on grafting success. The identification of this relationship would increase the success of clonal propagation programs and seed production of higher genetic quality in seed orchards of this species.

The objective of the present study was to determine the effect of the level of taxonomic affinity in the scion/ rootstock combination on the survival and shoot growth of grafts of *P. pseudostrabus* var. *pseudostrabus* and *P. pseudostrabus* var. *oaxacana*. The effects of scion/ rootstock interaction were also evaluated using reciprocal grafting at three levels of taxonomic affinity. The research hypothesis indicates that at least one level of taxonomic affinity had a significant effect on survival and shoot growth of terminal cleft grafts in the two varieties of *P. pseudostrabus*.

Materials and Methods

Rootstock origin and preparation

The study was carried out at the forest nursery of the Agricultural and Forest Experimental Field, Uruapan, Michoacán of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, located at 19° 24' 25.35" N and 102° 3' 4.16" W, at 1 610 m elevation, in Michoacán, Mexico. A shade net with 50% light retention was used to reduce the temperature inside the nursery. The seed to produce the standard plant was collected from four superior trees of *P. pseudostrabus* var. *oaxacana* in different locations in Oaxaca; one superior tree per location was selected to reduce the error attributable to the effect of the parent. The same procedure was used for the variety *pseudostrabus*, but at locations in Michoacán. No evidence of natural hybridization was found at the collection sites, so the rootstocks produced were considered as representative trees of each variety and the plants as desired progenies (Table 1).

Germination was carried out under greenhouse conditions using plastic containers of 310 cm³ with 54 cavities containing substrate formed by a mixture

coníferas (Pérez-Luna et al., 2020), no se ha considerado el grado de afinidad taxonómica de las partes para evaluar el éxito de los injertos (Castro-Garibay et al., 2017).

En México, *Pinus pseudostrabus* var. *pseudostrabus* Lindl. y *P. pseudostrabus* var. *oaxacana* Martínez son de importancia económica y ecológica, debido a su amplia distribución (caso var. *pseudostrabus*) y su uso común en programas de reforestación y plantaciones comerciales (Barrera-Ramírez et al., 2020; Viveros-Viveros et al., 2006). Además, dichas especies se han incorporado en programas de mejoramiento genético forestal (Viveros-Viveros et al., 2006) y en estudios de propagación vegetativa mediante injertos (Barrera-Ramírez et al., 2021; Muñoz et al., 2013) con grados diferentes de éxito. Debido a la variación y diferenciación genética dentro y entre sus poblaciones, esta especie constituye un buen modelo biológico para evaluar la relación entre la afinidad taxonómica de la combinación púa/patrón en el éxito de los injertos. La identificación de esta relación permitiría aumentar el éxito de los programas de propagación clonal y producción de semilla de calidad genética mayor en los huertos semilleros de la especie.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del nivel de afinidad taxonómica en la combinación púa/patrón sobre la supervivencia y crecimiento del brote de injertos de *P. pseudostrabus* var. *pseudostrabus* y *P. pseudostrabus* var. *oaxacana*. También se evaluaron los efectos de la interacción púa/patrón mediante injertos recíprocos con tres niveles de afinidad taxonómica. La hipótesis de investigación señala que al menos un nivel de afinidad taxonómica tuvo efecto significativo en la supervivencia y el crecimiento del brote de injertos de fisura terminal en las dos variedades de *P. pseudostrabus*.

Materiales y métodos

Origen y preparación de la planta patrón

El estudio se realizó en el vivero forestal del Campo Experimental Uruapan del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicado en las coordenadas 19° 24' 25.35" N y 102° 3' 4.16" O, a 1 610 m de elevación, en Michoacán, México. Para reducir la temperatura dentro del vivero se colocó malla sombra con 50 % de retención de luz. La semilla para la producción de la planta patrón se recolectó de cuatro árboles superiores de *P. pseudostrabus* var. *oaxacana* en diferentes localidades de Oaxaca; se seleccionó un árbol superior por localidad para reducir el error atribuible al efecto del progenitor. El mismo procedimiento se hizo para la variedad *pseudostrabus*, pero en localidades de Michoacán. En los sitios de recolecta no se encontró evidencia de hibridación natural, por lo que las plantas patrones producidas se

Table 1. Seed origin to produce rootstocks and scions of *Pinus pseudostrabus* var. *oaxacana* and *P. pseudostrabus* var. *pseudostrabus*.**Cuadro 1. Origen de la semilla para la producción de planta patrón y púas de *Pinus pseudostrabus* var. *oaxacana* y *P. pseudostrabus* var. *pseudostrabus*.**

Variety/ Variedad	Genotype/ Genotipo	Locality/ Localidad	Latitude (N)/ Latitud (N)	Longitude (O)/ Longitud (O)	Altitude (m)/ Altitud (m)
<i>oaxacana</i>	3	Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca	17° 10'	96° 33'	2 347
	13	Santa María Jaltianguis, Oaxaca	17° 21'	96° 30'	2 367
	38	Teococuilco de Marcos Pérez, Oaxaca	17° 18'	96° 41'	2 495
	45	San Pedro Yolox, Oaxaca	17° 31'	96° 41'	2 536
<i>pseudostrabus</i>	6	Ciudad Hidalgo, Michoacán	19° 36'	100° 40'	2 376
	15	El Rosario, Michoacán	19° 30'	100° 18'	2 680
	62	Santa Ana Jeráhuaro, Michoacán	19° 48'	100° 37'	2 630
	76	Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán	19° 27'	102° 12'	2 665

of peat moss, vermiculite and perlite in a 2:1:1 ratio. After two months, the plant was placed in the nursery under 50 % light retention shade netting, a condition maintained until grafting. Subsequently, at 10 months, the plants were transplanted to black polyethylene bag, 400 caliber of 5.2 L in a substrate of 60 % loam (humic Andosol) and 40 % ground pine bark with Multicote® 15-7-15+2 MgO + micronutrients fertilizer, in the proportion of 3 kg·m⁻³ of substrate. At the time of grafting, the rootstock of both varieties was 1.5 years old. The plants of the *oaxacana* and *pseudostrabus* varieties had average heights of 77.5 ± 8.5 cm and 88.5 ± 5.5 cm, respectively, and average diameter at the base of the stem of 11.0 ± 1.5 mm and 12.4 ± 2.2 mm, respectively.

Collecting the scions

To ensure the greatest genetic compatibility between the organs to be grafted (at least 50 % in homografts), the scions were collected from the same batches of rootstock, corresponding to the progenies of the genotypes selected for each variety; this practice allows obtaining high values of grafting (Loupit & Cookson, 2020). The scions corresponded to the elongation stage and met the growth characteristics described by Viveros-Viveros and Vargas-Hernández (2007). Scions were collected on the same day of grafting (March 10, 2019) by cutting the upper section at 35 ± 6.5 cm from the terminal apex toward the base of the plant, to perform the combinations at each level

consideraron como árboles puros de cada variedad y las plantas como progenies deseadas (Cuadro 1).

La germinación se realizó bajo condiciones de invernadero en contenedores plastificados de 310 cm³ y 54 cavidades que contenían sustrato formado por la mezcla de turba de musgo, vermiculita y perlita en proporción 2:1:1. A los dos meses, la planta se colocó en el vivero bajo malla sombra de 50 % de retención de luz, condición que se mantuvo hasta el injertado. Posteriormente, a los 10 meses, las plantas se trasplantaron a bolsa de polietileno negro, calibre 400 de 5.2 L en un sustrato de 60 % tierra de monte (Andosol húmico) y 40 % corteza de pino molida con fertilizante Multicote® 15-7-15+2 MgO + micronutrientes, en proporción de 3 kg·m⁻³ de sustrato. Al momento del injertado, la planta patrón de ambas variedades tenía 1.5 años. Las plantas de las variedades *oaxacana* y *pseudostrabus* tenían altura promedio de 77.5 ± 8.5 cm y 88.5 ± 5.5 cm, respectivamente, y diámetro promedio en la base del tallo de 11.0 ± 1.5 mm y 12.4 ± 2.2 mm, respectivamente.

Obtención de las púas

Para garantizar la mayor compatibilidad genética entre los órganos a injertar (al menos 50 % en homoinjertos), las púas se recolectaron de los mismos lotes de planta patrón, correspondientes a las progenies de los genotipos seleccionados para cada variedad; esta práctica permite obtener valores elevados de

of scion/rootstock affinity. Scions were 12 ± 1.5 cm long and 10.5 ± 2.2 mm in diameter and were treated with Ridomil Gold® fungicide at a dose of $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ water to prevent fungal damage to the graft.

Grafting combinations by affinity level

Three levels of scion-rootstock affinity were considered in this test: 1) homografts (i.e., combination of scion and rootstock from progenies of the same parent tree) in the two varieties; 2) intravarietal grafts (combination of scion and rootstock from different progenies in the same variety) and 3) intervarietal grafts (combination of scion and rootstock from different varieties). The first affinity level included all eight possible combinations (four in each variety) with six repetitions each (48 grafts); the second level included 24 combinations (12 per variety, including reciprocal grafts) with five repetitions each (120 grafts), and the third level included 18 combinations (nine per variety) with five repetitions each (90 grafts) (Figure 1). The interaction ratio was 4:12:9 for levels one, two and three for each variety. A total of 258 grafts were made using the top cleft technique described by Muñoz et al. (2013) and Barrera-Ramírez et al. (2021), which consists of protecting the graft area with a microclimate created by a transparent polyethylene bag with water inside. Grafting was performed on the same day as scion collection.

Variables evaluated

Graft survival (GS) was evaluated using the criteria outlined by Muñoz et al. (2013) and Barrera-Ramírez

prendimiento (Loupit & Cookson, 2020). Las púas se encontraban en la etapa de elongación y cumplían con las características de crecimiento descritas por Viveros-Viveros y Vargas-Hernández (2007). Las púas se recolectaron el mismo día del injertado (10 de marzo de 2019) mediante el corte de la sección superior a 35 ± 6.5 cm del ápice terminal hacia la base de la planta, para realizar las combinaciones en cada nivel de afinidad púa/patrón. Las púas tuvieron longitud de 12 ± 1.5 cm y diámetro de 10.5 ± 2.2 mm y se trataron con fungicida Ridomil Gold® en dosis de $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de agua, para evitar daños por hongos en el injerto.

Combinaciones de injertos por nivel de afinidad

En el ensayo se consideraron tres niveles de afinidad entre púa y patrón: 1) homoinjertos (i.e., combinación de púa y patrón de progenies del mismo árbol madre) en las dos variedades; 2) injertos intravarietales (combinación de púa y patrón de progenies distintas dentro de una variedad) e 3) injertos intervarietales (combinación de púa y patrón de variedades distintas). En el primer nivel de afinidad se incluyeron las ocho combinaciones posibles (cuatro en cada variedad) con seis repeticiones cada una (48 injertos); en el segundo nivel se incluyeron 24 combinaciones (12 por variedad, incluyendo los injertos recíprocos) con cinco repeticiones cada una (120 injertos), y en el tercer nivel se incluyeron 18 combinaciones (nueve por variedad) con cinco repeticiones cada una (90 injertos) (Figura 1). La proporcionalidad de interacción fue de 4:12:9 para los niveles uno, dos y tres en cada variedad. En total se realizaron 258 injertos mediante la técnica de fisura

		Scion / Púas							
Variety / Variedad		oaxacana							
Rootstock / Planta patrón	Progeny/ Progenies	31	33	84	56		15	62	76
	oaxacana	3	1	222333					
		13	2	1	2233			3	
		38	22		1	2			
		45	222			1	333		
	pseudostrobus	6	33			3	1	222	
		15	33			32		1	22
		62	33			322			1
76						222			1

Figure 1. Combinations at each level of scion-rootstock affinity of superior tree progeny of two *Pinus pseudostrobus* varieties; where 1 = homografts, 2 = intravarietal grafts and 3 = intervarietal grafts.

Figura 1. Combinaciones dentro de cada nivel de afinidad entre púa y patrón de progenies de árboles superiores de dos variedades de *Pinus pseudostrobus*; donde 1 = homoinjertos, 2 = injertos intravarietales y 3 = injertos intervarietales.

et al. (2021) which include binary categories of 0 for unsprouting or decayed grafts, where functional cambial union was not achieved, and 1 for success grafting and with new needle growth response and shoot elongation. GS value was recorded from five to 90 days after grafting (dag). For grafting with GS = 1, shoot length was recorded from a reference point marked on the scion at 30 dag.

Statistical analysis

Three factors with different levels each were evaluated: a) three levels of scion-rootstock affinity, b) two varieties and c) four genotypes (origin) nested for each variety. A 3 x 2 x 4 factorial arrangement was used in a completely randomized experimental design with different number of repetitions per treatment; each graft represented an experimental unit.

The effect of the factors and their interactions in relation to survival values were determined with an analysis of variance (ANOVA) with the generalized linear mixed procedure (GLIMMIX) for data with binomial distribution ($\alpha = 0.05$); for shoot growth, the ANOVA was performed with the MIXED procedure for data with normal distribution. The data used in the analysis correspond to the evaluation at 90 dag. When significant differences were observed, a Tukey's mean comparison test was performed ($P = 0.05$). Survival dynamics were analyzed with the Log-Rank test, using curves constructed by the Kaplan-Meier method, using the function $S(t) = P(T \geq t)$; where, $S(t)$ is the probability of a death occurring at a time T ; P is the probability of survival at the time intervals during evaluation; T is the total survival time to the end of the evaluation, which must be greater than t , and t is the time at any time from the beginning of the evaluation (Kaplan & Meier, 1958).

The scion-rootstock interaction was analyzed with the results of the variety*affinity level interaction using a Chi² test ($\alpha = 0.05$) for individual samples, where the effect of each genotype on grafting success when used as scion or as rootstock was compared regarding the average survival values where it participated in one or the other category. All statistical analyses were performed with SAS 9.4 (SAS Institute, 2013).

Results and Discussion

Graft survival

At 35 dag, needle formation and shoot elongation were detected, indicators of *P. pseudostrobus* grafting success. At 90 dag, overall survival was 33 % which in comparison with other studies on the same species is a high value; for example, Barrera-Ramírez et al. (2021) reported 30 % survival at 90 dag with the same grafting

terminal descrita por Muñoz et al. (2013) y Barrera-Ramírez et al. (2021), la cual consiste en proteger el área del injerto con un microclima formado por una bolsa de polietileno transparente con agua en su interior. El injertado se realizó el mismo día de la recolección de púas.

Variables evaluadas

Se evaluó la supervivencia (SUP) del injerto mediante los criterios señalados por Muñoz et al. (2013) y Barrera-Ramírez et al. (2021) que incluyen las categorías binarias de 0 para los injertos sin prendimiento o decaídos, donde no se logró la unión funcional del cámbium, y 1 para injertos prendidos y con respuesta de crecimiento de acículas nuevas y alargamiento del brote. El valor de SUP se registró desde los cinco hasta los 90 días después del injerto (ddi). En los injertos con SUP = 1 se registró la longitud del brote, a partir de un punto de referencia marcado en la púa a los 30 ddi.

Análisis estadístico

Se evaluaron tres factores con diferentes niveles cada uno: a) tres niveles de afinidad púa-patrón, b) dos variedades y c) cuatro genotipos (origen) anidados en cada variedad. Se utilizó un arreglo factorial 3 x 2 x 4 en un diseño experimental completamente al azar con diferente número de repeticiones por tratamiento; cada injerto representó una unidad experimental.

El efecto de los factores y sus interacciones en relación con los valores de supervivencia se determinaron con un análisis de varianza (ANOVA) con el procedimiento lineal generalizado mixto (GLIMMIX) para datos con distribución binomial ($\alpha = 0.05$); en el caso del crecimiento del brote, el ANOVA se realizó con el procedimiento MIXED para datos con distribución normal. Los datos utilizados en el análisis corresponden a la evaluación a los 90 ddi. Cuando se presentaron diferencias significativas, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey ($P = 0.05$). La dinámica de la supervivencia se analizó con la prueba Log-Rank, mediante curvas construidas por el método Kaplan-Meier, a través de la función $S(t) = P(T \geq t)$; donde, $S(t)$ es la probabilidad de que una muerte ocurra en un tiempo T ; P es la probabilidad de supervivencia en los intervalos de tiempo durante la evaluación; T es el tiempo total de supervivencia hasta el final de la evaluación, que debe ser mayor que t , y t es el tiempo en cualquier momento desde el comienzo de la evaluación (Kaplan & Meier, 1958).

La interacción púa-patrón se analizó con los resultados de la interacción variedad*nivel de afinidad mediante una prueba de Chi² ($\alpha = 0.05$) para muestras individuales, donde se comparó el efecto de cada genotipo en el éxito de los injertos al ser utilizado como púa o como patrón,

technique, Muñoz et al. (2013) reported 80 % survival at 60 dag, but all died before 90 dag.

The age of the scions (1.5 years), which came from a batch of plants produced in a nursery, is not considered an impediment to complementing genetic improvement programs for the species, since *P. pseudostrobus* varieties, being fast-growing, begin to flower and reproduce between the ages of five and seven years (Patiño-Valera, 1973). In addition, grafting is a propagation technique that accelerates the flowering process of the species (Valdés et al., 2003).

The top cleft grafting technique has been widely used in species of the genus *Pinus*, because it is possible to obtain survival greater than 50 %, better shoot growth and precocity in the production of cones, from the first year of grafting (Gaspar et al., 2017; Kita et al., 2018).

Figure 2 shows the survival dynamics estimated with the Kaplan-Meier model. This test indicated significant differences ($P < 0.01$) between graft affinity levels. Survival of homografts and intravarietal grafts was less than 20 %, while in intervarietal grafts it was 32.8 %, with differences of up to 15.5 % between these and homografts.

Survival was determined by pre- and post-grafting environmental conditions (early spring), since the excess relative humidity of the microclimate contributed to

con respecto a los valores promedio de supervivencia en que participó en una u otra categoría. Todos los análisis estadísticos se realizaron con SAS 9.4 (SAS Institute, 2013).

Resultados y discusión

Supervivencia de los injertos

A los 35 ddi se detectó la formación de acículas y alargamiento del brote, indicadores del prendimiento de los injertos de *P. pseudostrobus*. A los 90 ddi, la supervivencia general fue 33 % que en comparación con otros trabajos en la misma especie es un valor alto; por ejemplo, Barrera-Ramírez et al. (2021) reportaron 30 % de supervivencia a los 90 ddi con la misma técnica de injertado, Muñoz et al. (2013) reportaron 80 % de supervivencia a 60 ddi, pero todos murieron antes de los 90 ddi.

Respecto a la edad de las púas (1.5 años), las cuales se obtuvieron de un lote de planta producida en vivero, no se considera un impedimento para complementar los programas de mejora genética de la especie, ya que las variedades de *P. pseudostrobus*, al ser de crecimiento rápido, comienzan su floración y reproducción entre los cinco y siete años (Patiño-Valera, 1973). Además, el injertado es una técnica de propagación que permite acelerar el proceso de floración de las especies (Valdés et al., 2003).

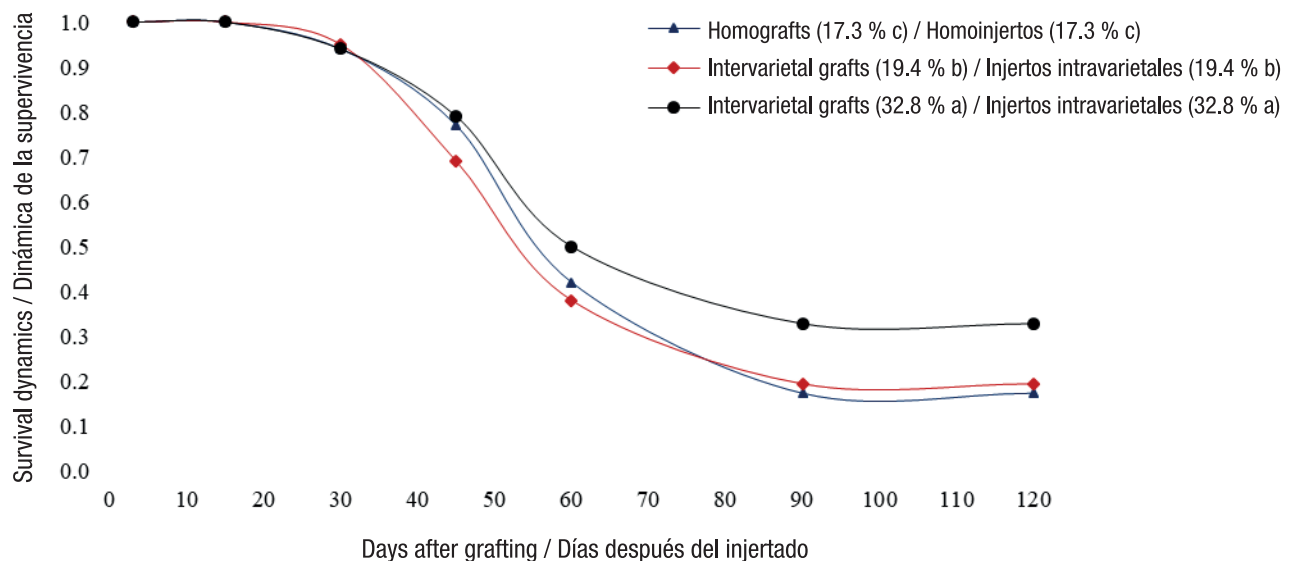


Figure 2. Survival dynamics with the Kaplan-Meier model for grafting at three affinity levels with *Pinus pseudostrobus* var. *oaxacana* and var. *pseudostrobus*. Values with different letters indicate statistical differences between affinity levels according to the Tukey's test ($P = 0.05$).

Figura 2. Dinámica de la supervivencia con el modelo de Kaplan-Meier para injertos realizados en tres niveles de afinidad con *Pinus pseudostrobus* var. *oaxacana* y var. *pseudostrobus*. Valores con letras distintas indican diferencias estadísticas entre niveles de afinidad de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

the presence of fungi, which, despite the application of fungicides, increased the percentage of mortality.

According to Table 2, the three individual factors and the interaction of affinity level with scion variety (a*b) had a significant effect ($P < 0.05$) on graft survival; shoot growth only showed statistical differences associated with the effect of genotype in the same variety (factor c) and its interaction with affinity level (a*c). The success in intervarietal grafting, with the top cleft technique and scions at the end of elongation, differs from that of studies with other pine species, as in grafts with scions of the hybrid of *P. engelmannii* Carr. x *P. arizonica* Engelm. on *P. engelmannii* rootstocks with 80 % survival (Pérez-Luna et al., 2020). It also differs with the results of Kita et al. (2018) with interspecific grafting of *Larix gmelinii* var. *japonica* on rootstocks of the hybrid *L. gmelinii* var. *japonica* x *L. kaempferi* with 93 % success. These authors conclude that the vigor and phenological stage of the scion (dormancy) significantly favored grafting. On the other hand, the use of young rootstocks and scions and the associated physiological characteristics, plus the grafting technique, result in greater success and growth of the grafts, because these factors favor a stronger, healthier, and more homogeneous vascular union between both structures, as pointed out by Milošević et al. (2015) and Kita et al. (2018).

Effect of affinity level

According to Table 3, Tukey's test ($P = 0.05$) established that the highest survival value was 53.3 ± 4.2 % in intervarietal grafts and the lowest in homografts with 22.8 ± 5.2 %, both at 90 dag. Therefore, intra-

La técnica de injertado de fisura terminal se ha utilizado ampliamente en especies del género *Pinus*, debido a que se puede obtener supervivencia mayor de 50 %, mejor crecimiento del brote y precocidad en la producción de conos, desde el primer año del injerto (Gaspar et al., 2017; Kita et al., 2018).

La Figura 2 muestra la dinámica de supervivencia estimada con el modelo de Kaplan-Meier. Esta prueba indicó diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los niveles de afinidad del injerto. La supervivencia de los homoinjertos e injertos intravarietales fue menor de 20 %, mientras que en injertos intervarietales fue 32.8 %, con diferencias de hasta 15.5 % entre estos y los homoinjertos.

La supervivencia estuvo determinada por las condiciones ambientales pre y posinjerto (principios de la primavera), pues el exceso de humedad relativa dentro del microclima contribuyó a la presencia de hongos, los cuales, a pesar de la aplicación de fungicidas, aumentaron el porcentaje de mortalidad.

Acorde con el Cuadro 2, los tres factores individuales y la interacción nivel de afinidad con la variedad de la yema (a*b) tuvieron efecto significativo ($P < 0.05$) en la supervivencia del injerto; el crecimiento del brote solo presentó diferencias estadísticas asociadas al efecto del genotipo dentro de variedad (factor c) y en su interacción con el nivel de afinidad (a*c). El éxito en injertos intervarietales, con la técnica de fisura terminal y púas al final de la elongación, difiere al de estudios con otras especies de pinos, como en los injertos con púas del híbrido de *P. engelmannii* Carr.

Table 2. Analysis of variance of shoot survival and growth in reciprocal grafts of *Pinus pseudostrobus* var. *oaxacana* and *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus*.

Cuadro 2. Análisis de varianza de la supervivencia y crecimiento del brote en injertos recíprocos de *Pinus pseudostrobus* var. *oaxacana* y *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus*.

Factor	Degrees of freedom / Grados de libertad	Survival / Supervivencia	Shoot growth / Crecimiento de brote
Affinity level (a) / Nivel de afinidad (a)	2	0.008*	0.228
Variety (b) / Variedad (b)	1	0.029*	0.834
Genotype in variety (c) / Genotipo dentro de variedad (c)	6	0.008*	0.019*
a*b interaction / Interacción a*b	2	0.003*	0.129
a*c interaction / Interacción a*c	10	0.204	0.0214*

*Significant at a P value ≤ 0.05 .

*Significativo con un valor $P \leq 0.05$.

Table 3. Survival and shoot growth in reciprocal grafts with three affinity levels in two varieties of *Pinus pseudostrabus*.**Cuadro 3. Supervivencia y crecimiento del brote en injertos recíprocos con tres niveles de afinidad en dos variedades de *Pinus pseudostrabus*.**

Affinity level/ Nivel de afinidad	Observations (n)/ Observaciones (n)	Survival (%)/ Supervivencia (%)	Shoot growth (cm)/ Crecimiento de brote (cm)
Homografts/ Homoinjertos	48	22.86 ± 5.2 b	15.74 ± 0.68 a
Intravarietal grafts/ Injertos intravarietales	120	30.82 ± 4.2 ab	15.04 ± 0.38 a
Intervarietal grafts/ Injertos intervarietales	90	53.28 ± 4.5 a	14.41 ± 0.41 a

Mean values ± standard error. Different letters indicate significant differences between affinity levels according to the Tukey's test ($P = 0.05$).

Valores promedio ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre niveles de afinidad de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

and intervarietales grafting can be performed with the two studied varieties of *P. pseudostrabus*. Shoot growth was not significantly affected ($P > 0.05$) by the scion/rootstock affinity level, with an overall mean value of 15.0 ± 0.7 cm at 90 dag.

In most studies it has been pointed out that in grafts with higher taxonomic affinity (case of homografts), success is higher (Goldschmidt, 2014), but the results with *P. pseudostrabus* varieties indicated the opposite, as survival was higher (more than double) in intervarietales grafts.

Some studies have reported that differences in age between scion donor trees or in vigor between scion and rootstock, regardless of affinity level, affect grafting success and development (López-Hinojosa et al., 2021). However, in this study, the scions and rootstocks used had the same age (1.5 years), therefore, differences in the success of intervarietales grafting cannot be attributed to the effect of this factor.

In homografts, inefficient tissue fusion between scion and rootstock could be due to external factors such as post-graft handling, climate, scion quality (Loewe-Muñoz et al., 2022) or due to early partial incompatibility (Gaspar et al., 2017; Goldschmidt, 2014). The low success of homografts can also be attributed to differences in diameter growth, as sometimes scion growth is usually more accelerated than in the rootstock (Pérez-Luna et al., 2019; Solorio-Barragán et al., 2021). The fact is that in these grafts an adequate coupling was not achieved. Goldschmidt (2014) and López-Hinojosa et al. (2021) mention that the reduction of cambial activity and nutrient transport cause low percentage of survival and lower shoot growth, so this study considered that the low success in homografts is mainly due to this factor, even without understanding the precise mechanism by which it occurs.

x *P. arizonica* Engelm. en patrones de *P. engelmannii* con 80 % de supervivencia (Pérez-Luna et al., 2020). También difiere con los resultados de Kita et al. (2018) con injertos interespecíficos de *Larix gmelinii* var. *japonica* en patrones del híbrido *L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* con 93 % de éxito. Estos autores concluyen que el vigor y estado fenológico de la púa (latencia) favoreció significativamente el prendimiento del injerto. Por otra parte, el uso de púas y patrones jóvenes y las características fisiológicas asociadas, más la técnica de injertado, dan como resultado mayor éxito y crecimiento de los injertos, pues estos factores favorecen una unión vascular más fuerte, sana y homogénea entre ambas estructuras, como lo señalan Milošević et al. (2015) y Kita et al. (2018).

Efecto del nivel de afinidad

De acuerdo con el Cuadro 3, la prueba de Tukey ($P = 0.05$) estableció que el valor más alto de supervivencia fue 53.3 ± 4.2 % en injertos intervarietales y el más bajo en homoinjertos con 22.8 ± 5.2 %, ambos a los 90 ddi. Por tanto, se pueden realizar injertos intra e intervarietales con las dos variedades estudiadas de *P. pseudostrabus*. El crecimiento del brote no fue afectado significativamente ($P > 0.05$) por el nivel de afinidad púa/patrón, con valor promedio global de 15.0 ± 0.7 cm a los 90 ddi.

En la mayoría de los estudios se ha señalado que en injertos con mayor afinidad taxonómica (caso de homoinjertos), el éxito es mayor (Goldschmidt, 2014), pero los resultados con las variedades de *P. pseudostrabus* indicaron lo contrario, pues la supervivencia fue superior (más del doble) en injertos intervarietales.

Algunos estudios han documentado que las diferencias de edad entre los árboles donadores de púa o de vigor entre púa y patrón, independientemente del nivel de

In contrast, intra- and intervarietal grafts apparently presented acceptable cambial activity and substance transport between scion and rootstock that was reflected in higher survival and adequate support of the two structures, as described by Milošević et al. (2015) and Loewe-Muñoz et al. (2022) for other pine species. Solorio-Barragán et al. (2021) note that the survival of interspecific grafts of *Pinus rzedowskii* Madrigal & Caball. Del. on rootstocks of *P. pinceana*, *P. maximartinezii*, *P. ayacahuite* var. *veitchii* and *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* was higher (80 ± 0.3 %) when increasing phylogenetic affinity with rootstocks of *P. pinceana* than with rootstocks of *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* (20 ± 0.9 %). Therefore, the success of intervarietal grafting on *P. pseudostrobus* indicates a close relationship between the two varieties.

On the other hand, scions from apical shoots on primary and secondary branches at the top of the crown generated high survival rates, as was the case in intervarietal grafting. Although the grafted scions were taken from nursery-produced plant, Gaspar et al. (2017) and López-Hinojosa et al. (2021) note that the origin of the scion, in terms of its position in the crown of the donor tree, significantly influences graft survival. This effect was also observed by Solorio-Barragán et al. (2021), who used *P. rzedowskii* scions from terminal buds in interspecific grafting.

Variety effect

Survival in grafts with scions of var. *pseudostrobus* (47.2 ± 5.0) was significantly higher ($P = 0.05$) than in grafts with scions of var. *oaxacana* (24.1 ± 5.2). One reason for the low percentage of survival in scions of this variety is due to poor scion-rootstock union, attributed to the physiological characteristics of the vegetative material, as well as scion provenance and origin and partial incompatibility at the three levels of affinity. In addition, the higher number of resiniferous canals in var. *oaxacana* (Martínez, 1943) could also have affected grafting success, as it has been documented that resin release in *Pinus* can cause mortality (Pérez-Luna et al., 2019), as well as the grafting season (autumn in this case) (Barrera-Ramírez et al., 2021). In the case of shoot, the effect of variety was similar ($P > 0.05$) with 15 cm of average growth.

The greater success of grafting with scions of var. *pseudostrobus* indicates good scion-rootstock compatibility. It is possible that grafting success with scions of var. *oaxacana* may increase if younger rootstocks are used; however, further studies are needed to support this assertion. In grafting with *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, it has been reported that variety, physiological stage of the scion, genotype, time

afinidad, afectan el éxito y desarrollo del injerto (López-Hinojosa et al., 2021). No obstante, en este estudio, las yemas y patrones utilizados fueron de la misma edad (1.5 años), por lo que las diferencias en el éxito de los injertos intervarietales no se puede atribuir al efecto de dicho factor.

En los homoinjertos, la fusión ineficiente del tejido entre púa y patrón pudo deberse a factores externos como el manejo posinjerto, el clima, la calidad de las púas (Loewe-Muñoz et al., 2022) o por incompatibilidad parcial temprana (Gaspar et al., 2017; Goldschmidt, 2014). El bajo éxito de los homoinjertos también se puede atribuir a las diferencias de crecimiento en diámetro, pues en ocasiones el crecimiento de la púa suele ser más acelerado que en el patrón (Pérez-Luna et al., 2019; Solorio-Barragán et al., 2021). El hecho es que en estos injertos no se logró un acoplamiento adecuado. Goldschmidt (2014) y López-Hinojosa et al. (2021) mencionan que la reducción de la actividad cambial y el transporte de nutrientes ocasionan porcentaje bajo de supervivencia y crecimiento menor del brote, por lo que en este trabajo se consideró que el bajo éxito en homoinjertos se debe principalmente a este factor, aún sin entender el mecanismo preciso por el que ocurre.

En cambio, los injertos intra e intervarietales presentaron, aparentemente, actividad cambial y transporte de sustancias aceptable entre púa y patrón que se reflejaron en mayor supervivencia y soporte adecuado de las dos estructuras, como lo describen Milošević et al. (2015) y Loewe-Muñoz et al. (2022) para otras especies de pinos. Solorio-Barragán et al. (2021) señalan que la supervivencia de los injertos interespecíficos de *Pinus rzedowskii* Madrigal & Caball. Del. en patrones de *P. pinceana*, *P. maximartinezii*, *P. ayacahuite* var. *veitchii* y *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* fue mayor (80 ± 0.3 %) al aumentar la afinidad filogenética con patrones de *P. pinceana* que con patrones de *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* (20 ± 0.9 %). Por lo tanto, el éxito de los injertos intervarietales en *P. pseudostrobus* indica una relación cercana entre ambas variedades.

Por otra parte, las púas de brotes apicales en ramas primarias y secundarias de la parte superior de la copa generaron porcentajes elevados de supervivencia, como sucedió en los injertos intervarietales. Aunque las púas injertadas se obtuvieron de planta producida en vivero, Gaspar et al. (2017) y López-Hinojosa et al. (2021) señalan que el origen de la púa, en cuanto a su posición en la copa del árbol donante, influye significativamente en la supervivencia del injerto. Este efecto también fue observado por Solorio-Barragán et al. (2021), quienes usaron púas de *P. rzedowskii* de yemas terminales en injertos interespecíficos.

and post-grafting conditions are determinants for high survival rates (>60 %; Gaspar et al., 2017); therefore, in *P. pseudostrobus*, the interaction of these factors also contributes to greater success and better shoot growth (Barrera-Ramírez et al., 2021; Muñoz et al., 2013). The same happened in intra- and intervarietal grafting of *Prunus americana* L., where Milošević et al. (2015) highlight the importance of proper scion choice of a variety that works in most crosses with rootstocks. Ahsan et al. (2019) obtained 80 % survival in intervarietal grafts of *P. americana* Mill 'Hass' x *P. americana* Mill 'Velvick' (scion/rootstock); however, success decreased in their reciprocals (-20 %). In the present study, buds from leading, young and healthy shoots were used, a factor that increased graft success, vigor and growth, as reported by Świerczyński et al. (2018) and Kita et al. (2018), especially in intervarietal grafts of var. *pseudostrobus* x var. *oaxacana* (scion and rootstock, respectively). Furthermore, phenological differences in scion and rootstock growth (Martinez-Ballesta et al., 2010) between the two varieties, together with genotype, significantly determined grafting success and growth (Koepke & Dhingra, 2013). This may be attributed to the fact that a young bud increases vegetative growth of the grafts (Martinez-Ballesta et al., 2010), as was the case in the present study, in addition to facilitating vascular connections between tissues in the scion/rootstock interaction.

Genotype in variety

Table 4 shows that survival was higher in var. *pseudostrobus* (40 a 62 %); however, not differences were found among genotypes. For var. *oaxacana*, grafting success with juvenile scions varied significantly among genotypes; the highest survival values were obtained with scions of genotype 3 (53.0 ± 7.8 %). In contrast, shoot growth showed significant differences only for var. *pseudostrobus*; grafts with scions of genotype 62 reached the best growth with 18.1 cm.

Differences in survival and shoot growth of genotypes in *P. pseudostrobus* varieties indicate phenological and physiological differences in the stage of scion or rootstock development, as pointed out by Darikova et al. (2011) in their study with heteroplastic grafts of *Pinus sibirica* Du Tour and *P. cembra* L. grafted on *P. sylvestris* L. rootstocks.

Interaction effects

The interaction affinity level by genotype in the same variety (a*c) had significant effects ($P = 0.05$) on shoot growth. Graft growth differences among var. *pseudostrobus* genotypes were different from one affinity level to another; only genotype 62 had the best values in the three affinity levels with an average growth of

Efecto de la variedad

La supervivencia en los injertos con púas de la var. *pseudostrobus* (47.2 ± 5.0) fue significativamente mayor ($P = 0.05$) que en los injertos con púas de la var. *oaxacana* (24.1 ± 5.2). Una causa del bajo porcentaje de supervivencia en las púas de esta variedad se debe a una unión deficiente entre púa-patrón, atribuido a las características fisiológicas del material vegetativo, así como procedencia y origen de la púa e incompatibilidad parcial en los tres niveles de afinidad. Además, el número mayor de canales resiníferos en la var. *oaxacana* (Martínez, 1943) también pudo afectar el éxito de los injertos, ya que se ha documentado que la liberación de resina en *Pinus* puede causar la mortalidad (Pérez-Luna et al., 2019), así como la época de injertado (otoño en este caso) (Barrera-Ramírez et al., 2021). En el caso del brote, el efecto de la variedad fue similar ($P > 0.05$) con 15 cm de crecimiento promedio.

El mayor éxito de los injertos con púas de la var. *pseudostrobus* indica compatibilidad adecuada entre púa-patrón. Es posible que el éxito del injertado con púas de la var. *oaxacana* aumente si se utilizan patrones de menor edad; sin embargo, son necesarios estudios adicionales que respalden dicha aseveración. En injertos con *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze se ha señalado que la variedad, el estado fisiológico de la púa, el genotipo, la época y las condiciones posinjertado son determinantes para obtener porcentaje alto de supervivencia (>60 %; Gaspar et al., 2017); por lo tanto, en *P. pseudostrobus*, la interacción de estos factores también contribuye para obtener mayor éxito y mejor crecimiento del brote (Barrera-Ramírez et al., 2021; Muñoz et al., 2013). Lo mismo sucedió en injertos intra e intervarietales de *Prunus americana* L., donde Milošević et al. (2015) resaltan la importancia de la elección apropiada de las púas de una variedad que funcione en la mayoría de las cruces con los portainjertos. Ahsan et al. (2019) obtuvieron 80 % de supervivencia en injertos intervarietales de *P. americana* Mill 'Hass' x *P. americana* Mill 'Velvick' (púa/patrón); sin embargo, el éxito disminuyó en sus recíprocos (-20 %). En el presente trabajo se utilizaron yemas provenientes de brotes líderes, jóvenes y sanos, factor que aumentó el éxito, vigor y crecimiento de los injertos, tal y como lo señalan Świerczyński et al. (2018) y Kita et al. (2018), especialmente en injertos intervarietales de var. *pseudostrobus* x var. *oaxacana* (púa y patrón, respectivamente). Además, las diferencias fenológicas de crecimiento de la púa y patrón (Martinez-Ballesta et al., 2010) entre las dos variedades, junto con el genotipo, determinaron significativamente el éxito y crecimiento del injerto (Koepke & Dhingra, 2013). Esto puede atribuirse a que una yema joven aumenta el crecimiento vegetativo de los injertos (Martinez-Ballesta et al., 2010), tal y como sucedió en el presente

Table 4. Survival and shoot growth per genotype in the same variety in grafts made with scions of two varieties of *Pinus pseudostrobus*.

Cuadro 4. Supervivencia y crecimiento del brote por genotipo dentro de variedad en injertos realizados con púas de dos variedades de *Pinus pseudostrobus*.

Genotype (same variety)/ Genotipo (dentro de variedad)	Observations (n)/ Observaciones (n)	Survival (%)/ Supervivencia (%)	Shoot growth (cm)/ Crecimiento de brote (cm)
var. <i>oaxacana</i>			
3	36	53.0 ± 7.8 a	15.2 ± 0.55 a
13	36	11.0 ± 7.8 c	14.0 ± 0.63 a
38	21	19.0 ± 10.3 bc	14.5 ± 0.58 a
45	36	42.0 ± 7.8 ab	14.7 ± 0.60 a
var. <i>pseudostrobus</i>			
6	36	40.0 ± 7.8 a	14.1 ± 0.63 b
15	36	44.0 ± 7.8 a	13.6 ± 0.61 b
62	36	42.0 ± 7.8 a	18.1 ± 0.63 a
76	21	62.0 ± 10.2 a	15.0 ± 0.73 ab

Mean values ± standard error. Different letters indicate significant differences between genotypes of the same variety according to the Tukey's test ($P = 0.05$).

Valores promedio ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos de una misma variedad de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

15.2 to 18.1 cm. For var. *oaxacana*, growth was similar ($P > 0.05$) among graft affinity levels with an average range of 15.4 to 17.3 cm.

The interaction of affinity level with scion variety indicated that reciprocal effects in scion-rootstock interaction are important in intervarietal grafting, since a higher percentage of survival was observed when grafting scions of var. *pseudostrobus* onto the rootstock of var. *oaxacana* (72 ± 1.2 %), than the other way around (33.9 ± 1.4 %), while in intravarietal grafts no significant differences were found (average success of 31 ± 2.1 %). Higher grafting success was also reported in homografts with scions and rootstocks of var. *pseudostrobus* (42 ± 0.14 %) (Figure 3).

The success of var. *oaxacana* seemed to remain the same when its scions were grafted on rootstocks of the same variety or on a rootstock of var. *pseudostrobus*. On the other hand, the success of var. *pseudostrobus* scions grafted on rootstocks of the same variety was good (42 %), although it was better when grafted on var. *oaxacana* rootstocks (72 %; Figure 3).

Differences in the survival of reciprocal intervarietal grafts may be associated with physiological differences in the scion/rootstock interaction, due to the contrast between the growth and diameter of scion and rootstock. The average diameter of scions and rootstocks was similar in grafts of var. *oaxacana* (homograft) (7.0 and 8.7 mm), as well as in intravarietal grafts with var.

trabajo, además de facilitar las conexiones vasculares entre los tejidos de la interacción púa/patrón.

Genotipo dentro de la variedad

El Cuadro 4 muestra que la supervivencia fue mayor en la var. *pseudostrobus* (40 a 62 %); sin embargo, no hubo diferencias entre genotipos. En la var. *oaxacana*, el éxito de los injertos con púas juveniles sí varió significativamente entre los genotipos; los valores más altos de supervivencia se obtuvieron con púas del genotipo 3 (53.0 ± 7.8 %). En contraste, el crecimiento del brote presentó diferencias significativas solo para la var. *pseudostrobus*; los injertos con púas del genotipo 62 alcanzaron el mejor crecimiento con 18.1 cm.

Las diferencias en supervivencia y crecimiento del brote de los genotipos dentro de las variedades de *P. pseudostrobus* indican diferencias fenológicas y fisiológicas en el estado de desarrollo de las púas o la planta patrón, como lo señala Darikova et al. (2011) en su trabajo con injertos heteroplásticos de *Pinus sibirica* Du Tour y *P. cembra* L. injertados en patrones de *P. sylvestris* L.

Efecto de las interacciones

La interacción nivel de afinidad por genotipo dentro de variedad (a*c) tuvo efectos significativos ($P = 0.05$) en el crecimiento del brote. Las diferencias de crecimiento del injerto entre genotipos de la var.

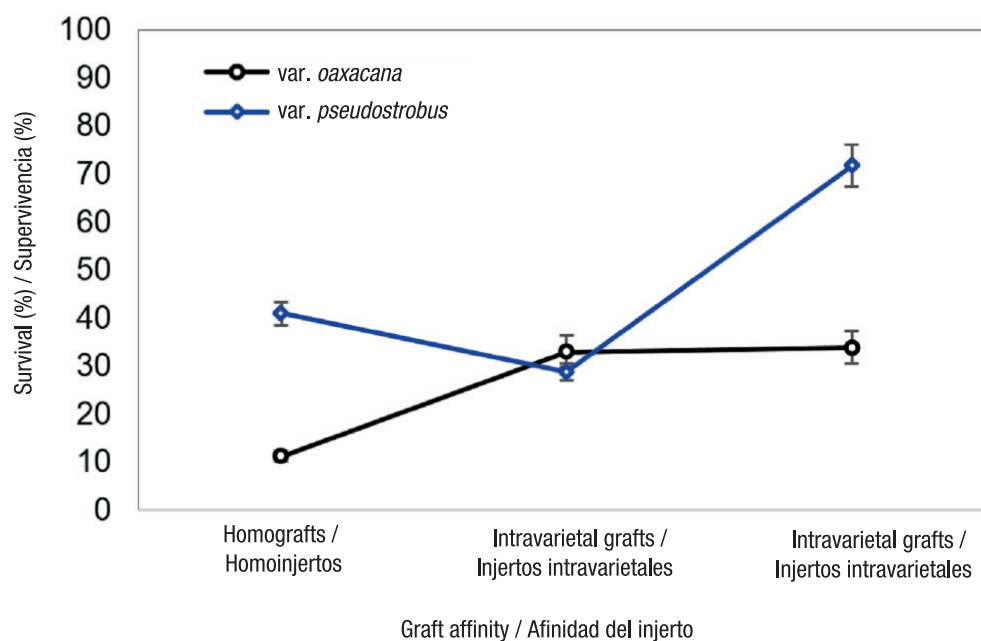


Figure 3. Average survival (%) of grafts with different levels of affinity in the two varieties of *Pinus pseudostrobus* included in this experiment.

Figura 3. Supervivencia promedio (%) de los injertos con diferente nivel de afinidad en las dos variedades de *Pinus pseudostrobus* incluidas en el ensayo.

pseudostrobus (8.0 and 9.5 mm). However, the difference in diameter of intervarietal grafts of var. *oaxacana* on var. *pseudostrobus* rootstocks was greater (7.0 vs. 9.5 mm), which may have generated less contact between cambial zones and affected grafting. In contrast, reciprocal intervarietal grafts of var. *pseudostrobus* on var. *oaxacana* rootstocks had greater homogeneity in scion and rootstock diameter (8.0 and 8.7 mm), which favored greater contact between cambial tissue. The var. *oaxacana* had a greater number of resin channels (Martinez, 1943), compared to var. *pseudostrobus*, which probably affected the functional union of the scion and rootstock, since the excessive release of resin from the scion prevents contact with the cambium of the rootstock and reduces the possibility of grafting success, as mentioned by Pérez-Luna et al. (2019).

Despite the significant effect of the variety and affinity level interaction, indicating the importance of scion-rootstock interaction in intervarietal grafting, the Chi² test did not detect significant differences (Table 5) in the scion or rootstock performance of the genotypes, except for genotype 15 in var. *pseudostrobus*, which was more successful when used as a scion (44.7 %) than as a rootstock (16.1 %). However, the small number of repetitions in each genotype in this experiment may have affected the ability of the statistical test to detect significant effects of reciprocal grafting at the genotype level. Therefore, it is necessary to identify the possible anatomical and physiological factors involved in the success or failure of these grafts, as well as the

pseudostrobus fueron distintos de un nivel de afinidad a otro; solo el genotipo 62 presentó los mejores valores en los tres niveles de afinidad con un crecimiento promedio de 15.2 a 18.1 cm. En la var. *oaxacana*, el crecimiento fue similar ($P > 0.05$) entre los niveles de afinidad del injerto con un rango promedio de 15.4 a 17.3 cm.

La interacción del nivel de afinidad con la variedad de la yema indicó que los efectos recíprocos en la interacción púa-patrón son importantes en los injertos intervarietales, ya que se obtuvo mayor porcentaje de supervivencia cuando se injertaron púas de la var. *pseudostrobus* en planta patrón de la var. *oaxacana* (72 ± 1.2 %), que a la inversa (33.9 ± 1.4 %), mientras que en los injertos intravarietales no hubo diferencias significativas (éxito promedio de 31 ± 2.1 %). En homoinjertos también se encontró mayor prendimiento con púas y patrones de la var. *pseudostrobus* (42 ± 0.14 %) (Figura 3).

Al parecer el éxito de la var. *oaxacana* no cambió cuando sus púas se injertaron en patrones de la misma variedad o en un patrón de la var. *pseudostrobus*. Por otra parte, el éxito de las púas de la var. *pseudostrobus* injertadas en patrones de la misma variedad fue bueno (42 %), aunque fue mejor cuando se injertaron en patrones de la var. *oaxacana* (72 %; Figura 3).

Las diferencias en la supervivencia de los injertos intervarietales recíprocos puede estar asociado a

Table 5. Average percentage of success in genotypes of two *Pinus pseudostrobus* varieties when participating as scion/rootstock in intervarietal grafts.

Cuadro 5. Porcentaje promedio de éxito en genotipos de dos variedades de *Pinus pseudostrobus* cuando participan como púa/patrón en injertos intervarietales.

Variety/Variiedad	Genotype/Genotipo	Genotype function/Función del genotipo		Chi ²
		Rootstock (%)/ Patrón (%)	Scion (%) /Púa (%)	
<i>oaxacana</i>	3	66.7	49.6	ns
	13	25.7	11.4	ns
	38	35.0	20.0	ns
	45	40.0	42.9	ns
	6	36.7	46.7	ns
<i>pseudostrobus</i>	15	16.1	44.7	<0.01
	62	41.9	41.9	ns
	76	45.8	52.8	ns

Significant differences at $\alpha = 0.05$, ns = not significant; DF = 1 in X^2 tables.

Diferencias significativas con un valor de $\alpha = 0.05$, ns = no significativo; GL = 1 en tablas de X^2 .

nature of scion-rootstock interaction in intervarietal and interspecific grafts, as compared to grafts between individuals with higher level of taxonomic and genetic affinity of *P. pseudostrobus*.

Conclusions

The survival of *Pinus pseudostrobus* grafts was good (>33 %) compared to that reported in other studies with the same species; however, further research is needed to identify the causes and pre- and post-grafting management factors that determine the success of this technique in this species and its varieties. The success and growth of grafts of both *P. pseudostrobus* varieties and their reciprocals are determined by the level of affinity, scion variety, scion genotype and scion-rootstock interaction at the variety level. Therefore, phylogenetic compatibility exists between the two varieties at the intervarietal level when scions of var. *pseudostrobus* are grafted onto rootstock of var. *oaxacana* (72 % survival), but not in their reciprocal grafts. This evidence indicates that the anatomical and physiological interaction between scion-rootstock is important in *P. pseudostrobus*, but more detailed studies are required for the identification of this interaction.

Acknowledgments

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for funding facilities to the first author and to project 277784 “Establishment of regional asexual seed orchards and progeny trials of *Pinus pseudostrobus* for genetic evaluation of parents” of the Fondo Sectorial CONACyT-CONAFOR.

diferencias fisiológicas en la interacción púa/patrón, debido al contraste entre el crecimiento y diámetro de la púa y del patrón. En injertos de la var. *oaxacana* (homoinjerto), las púas y patrones tuvieron diámetro promedio similar (7.0 y 8.7 mm), también en injertos intravarietales con var. *pseudostrobus* (8.0 y 9.5 mm). No obstante, la diferencia en diámetro de los injertos intervarietales de var. *oaxacana* en patrones de var. *pseudostrobus* fue mayor (7.0 vs. 9.5 mm), lo que pudo generar menor contacto entre las zonas cambiales y afectar su prendimiento. En cambio, los injertos intervarietales recíprocos de la var. *pseudostrobus* en patrones de var. *oaxacana* tuvieron mayor homogeneidad en el diámetro de púa y patrón (8.0 y 8.7 mm), lo cual favoreció mayor contacto entre el tejido cambial. La var. *oaxacana* presenta mayor número de canales resiníferos (Martínez, 1943), en comparación con la var. *pseudostrobus*, lo que probablemente afectó la unión funcional de la púa y el patrón, pues la liberación excesiva de resina de la púa impide el contacto con el cámbium del patrón y reduce la posibilidad de éxito del injerto, tal y como lo mencionan Pérez-Luna et al. (2019).

A pesar del efecto significativo de la interacción variedad y nivel de afinidad, indicando la importancia de la interacción púa-patrón en los injertos intervarietales, la prueba de Chi² no detectó diferencias significativas (Cuadro 5) en el comportamiento como púa o patrón de los genotipos, con excepción del genotipo 15 en la var. *pseudostrobus* que tuvo mayor éxito cuando se usó como púa (44.7 %) que como patrón (16.1 %). No obstante, el número reducido de repeticiones en cada genotipo del ensayo pudo haber afectado la capacidad de la prueba estadística para la detección de efectos significativos de los injertos recíprocos a nivel de genotipo. Por tanto,

End of English version

References / Referencias

- Ahsan, M. U., Hayward, A., Alam, M., Bandaralage, J. H., Topp, B., Beveridge, C. A., & Mitter, N. (2019). Scion control of miRNA abundance and tree maturity in grafted avocado. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1994-5>
- Barrera-Ramírez, R., González-Cubas, R., Treviño-Garza, E. J., González-Larreta, B., & López-Aguillón, R. (2020). Áreas potenciales para establecer Unidades Productoras de Germoplasma Forestal con dos variedades de *Pinus pseudostrubus* en México. *Bosque (Valdivia)*, 41(3), 277–287. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002020000300277>
- Barrera-Ramírez, R., Vargas-Hernández, J. J., López-Aguillón, R., Muñoz-Flores, H. J., Treviño-Garza, E. J., & Aguirre-Calderón, O. A. (2021). Impact of external and internal factors on successful grafting of *Pinus pseudostrubus* var. *oaxacana* (Mirov) Harrison. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 27(2), 243–256. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.05.037>
- Castro-Garibay, S. L., Villegas-Monter, A., & López-Upton, J. (2017). Anatomy of rootstocks and scions in four pine species. *Forest Research*, 6, 1–6. <https://doi.org/10.4172/2168-9776.1000211>
- Darikova, J. A., Savva, Y. V., Vaganov, E. A., Grachev, A. M., & Kuznetsova, G. V. (2011). Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock (a review). *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 1(4), 54–63. <https://cyberleninka.ru/article/n/grafs-of-woody-plants-and-the-problem-of-incompatibility-between-scion-and-rootstock-a-review>
- Gaspar, R. G. B., Wendling, I., Stuepp, C. A., & Angelo, A. C. (2017). Rootstock age and growth habit influence top grafting in *Araucaria angustifolia*. *CERNE*, 23(4), 465–471. <https://doi.org/10.1590/01047760201723042447>
- Goldschmidt, E. (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00727>
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457–481.
- Kita, K., Kon, H., Ishizuka, W., Agathokleous, E., & Kuromaru, M. (2018). Survival rate and shoot growth of grafted Dahurian larch (*Larix gmelinii* var. *japonica*): a comparison between Japanese larch (*L. kaempferi*) and F1 hybrid larch (*L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi*) rootstocks. *Silvae Genetica*, 67(1), 111–116. <https://doi.org/10.2478/sg-2018-0016>
- Koepke, T., & Dhingra, A. (2013). Rootstock scion somatogenetic interactions in perennial composite plants. *Plant Cell Reports*, 32, 1321–1327. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1471-9>
- López-Hinojosa, M., de María, N., Guevara, M. A., Vélez, M. D., Cabezas, J. A., Díaz, L. M., Mancha, J. A., Pizarro, A., Manjarrez, L. F., Collada, C., Díaz-Sala, C., & Cervera-Goy, M. T. (2021). Rootstock effects on scion gene expression in maritime pine. *Scientific Reports*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90672-y>
- Loewe-Muñoz, V., Del Río, R., Delard, C., & Balzarini, M. (2022). Enhancing *Pinus pinea* cone production by grafting in a non-native habitat. *New Forests*, 53(1), 37–55. <https://doi.org/10.1007/s11056-021-09842-5>
- Loupit, G., & Cookson, S. J. (2020). Identifying molecular markers of successful graft union formation and compatibility. *Frontiers in Plant Science*, 11, 610352. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.610352>
- Martínez, M. (1943). Una nueva especie de *Pinus* mexicano. *Madroño*, 7(1), 4–8. <https://www.jstor.org/stable/41422467>
- Martínez-Ballesta, M. C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., & Carvajal, M. (2010). Physiological es necesario identificar con mayor detalle los posibles factores anatómicos y fisiológicos involucrados en el éxito o fracaso de estos injertos, así como la naturaleza de la interacción púa-patrón en injertos intervarietales e interespecíficos, en comparación con los injertos entre individuos con mayor nivel de afinidad taxonómica y genética de *P. pseudostrubus*.

Conclusiones

La supervivencia de los injertos de *Pinus pseudostrubus* fue buena (>33 %) en comparación con lo señalado en otros trabajos con la misma especie; sin embargo, son necesarios estudios adicionales para la identificación de causas y factores de manejo pre y posinjerto que determinan el éxito de esta técnica en la especie y sus variedades. El éxito y crecimiento de los injertos de ambas variedades de *P. pseudostrubus* y sus recíprocos están determinados por el nivel de afinidad, variedad de la púa, genotipo de la púa y la interacción púa-patrón a nivel de variedades. Por lo tanto, existe compatibilidad filogenética entre las dos variedades a nivel intervarietal cuando se injertan púas de la var. *pseudostrubus* en planta patrón de la var. *oaxacana* (72 % de supervivencia), pero no en sus injertos recíprocos. Estas evidencias indican que la interacción anatómica y fisiológica entre púa-patrón es importante en *P. pseudostrubus*, pero se requieren estudios más detallados para la identificación de dicha interacción.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por las facilidades de financiamiento al primer autor y al proyecto 277784 “Establecimiento de huertos semilleros asexuales regionales y ensayos de progenie de *Pinus pseudostrubus* para la evaluación genética de los progenitores” del Fondo Sectorial CONACyT-CONAFOR.

Fin de la versión en español

- aspects of rootstock scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.002>
- Milošević, T., Milošević, N., & Glišić, I. (2015). Apricot vegetative growth, tree mortality, productivity, fruit quality and leaf nutrient composition as affected by Myrobalan rootstock and Blackthorn Inter-Stem. *Erwerbs-Obstbau*, 57(2), 77–91. <https://doi.org/10.1007/s10341-014-0229-z>
- Muñoz-Flores, H. J., Prieto-Ruíz, J. Á., Flores, G. A., Pineda, O. T., & Morales, G. E. (2013). *Técnicas de injertado enchapado lateral y fisura terminal en Pinus pseudostrobus Lindl.* Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.
- Patiño-Valera, F. (1973). Floración, fructificación y recolección de conos y aspectos sobre semilla de pinos mexicanos. *Bosques y Fauna*, 10(4), 20–30.
- Pérez-Luna, A., Prieto-Ruíz, J. Á., López-Upton, J., Carrillo-Parra, A., Wehenkel, C., Chávez-Simental, J. A., & Hernández-Díaz, J. C. (2019). Some factors involved in the success of side veneer grafting of *Pinus engelmannii* Carr. *Forests*, 10(2), 112. <https://doi.org/10.3390/f10020112>
- Pérez-Luna, A., Wehenkel, C., Prieto-Ruíz, J. Á., López-Upton, J., & Hernández-Díaz, J. C. (2020). Survival of side grafts with scions from pure species *Pinus engelmannii* Carr. and the *P. engelmannii* × *P. arizonica* Engelm. var. *arizonica* hybrid. *PeerJ*, 8, e8468. <https://doi.org/10.7717/peerj.8468>
- Solorio-Barragán, E. R., Delgado-Valerio, P., Molina-Sánchez, A., Rebolledo-Camacho, V., & Tafolla-Martínez, M. Á. (2021). Interspecific grafting as an alternative for asexual propagation of *Pinus rzedowskii* Madrigal & Caball. Del. in danger extinction. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales*, 27(2), 277–288. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.06.04>
- Statistical Analysis System Institute (SAS). (2013). SAS computer software v. 9.4. Cary, NC, USA. Świerczyński, S., Kolasiński, M., Urbaniak, M., Stachowiak, A., & Nowaczyk, N. (2018). Influence of rootstock and grafting date on the success and grafts growth of two cultivars of pines. *Horticulture*, 21(4), 06. <https://doi.org/10.30825/5.EJPAU.165.2018.21.4>
- Valdés, A. E., Fernández, B., & Centeno, M. L. (2003). Alterations in endogenous levels of cytokinins following grafting of *Pinus radiata* support ratio of cytokinins as an index of ageing and vigor. *Journal of Plant Physiology*, 160(11), 1407–1410. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00992>
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., Vargas-Hernández, J. J., & López-Upton, J. (2006). Variación entre procedencias de *Pinus pseudostrobus* establecidas en dos sitios en Michoacán, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(2), 121–121. <https://www.redalyc.org/pdf/610/61029204.pdf>
- Viveros-Viveros, H., & Vargas-Hernández, J. J. (2007). Dormancia en yemas de especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13(2), 31–135. <https://www.redalyc.org/pdf/629/62913206.pdf>
- Zobel, B. J., & Talbert, J. T. (1988). *Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales*. Ed. Limusa.